



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Carolina Pereira Tavares Botelho

**"FATOR DE TRANSCRIÇÃO AtMYB30 DE *Arabidopsis thaliana*:  
INFLUÊNCIA DA S-NITROSILAÇÃO E ALTERAÇÕES  
FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS CAUSADAS PELA LIGAÇÃO  
AO DNA".**

Florianópolis  
2014

Carolina Pereira Tavares Botelho

**"FATOR DE TRANSCRIÇÃO AtMYB30 DE *Arabidopsis thaliana*:  
INFLUÊNCIA DA S-NITROSILAÇÃO E ALTERAÇÕES  
FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS CAUSADAS PELA LIGAÇÃO  
AO DNA".**

Tese submetida ao Programa de Pós-  
graduação em Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Doutor em Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Hernán Terenzi

Coorientador: Prof. Dr. Javier Vernal

Florianópolis  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

A ficha de identificação é elaborada pelo próprio autor

Maiores informações em:

<http://portalbu.ufsc.br/ficha>

*Dedico este trabalho aos meus  
pais Luiz Holly e Avani Tavares.*



## AGRADECIMENTOS

Treze anos atrás tive um súbito sonho de tornar-me professora e pesquisadora. Iniciei o curso superior na UFSC e já no primeiro semestre busquei um laboratório de pesquisa, onde pudesse fazer iniciação científica e começar esta trajetória. Foi em 2003, andando pelos corredores do antigo departamento de química da Universidade, que vi colado no mural um anúncio: Precisa-se de aluno de IC para trabalhar com bioquímica, biologia molecular e química de proteínas. E foi neste mesmo laboratório de bioquímica que fiz IC, mestrado e agora finalizo o doutorado.

Por isso, agradeço ao Prof. Hernán Terenzi, que mesmo sem me conhecer ou ainda ter um histórico escolar, abriu as portas de seu laboratório, para que uma caloura inexperiente pudesse dar início à vida acadêmica. Tive a oportunidade de entrar em um excelente grupo de pesquisa, aprender e partilhar conhecimentos da área e conhecer pessoas capacitadas e dedicadas. Obrigada professor pelos ensinamentos e esforços para nos fornecer tudo o necessário para que nossa pesquisa fosse possível, eficiente e de qualidade.

Ao meu coorientador Javier Vernal, quem me recebeu desde o meu primeiro dia em um laboratório e me ensinou grande parte do que sei hoje. Obrigada pelas correções e aprendizados e por, no final, tornar-se um amigo.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e todos os outros que fizeram parte de minha jornada acadêmica desde o curso de farmácia.

Aos colegas de laboratório, amigos, parceiros e confidentes Angela Menegatti, Angélica Cavalett, Camila Matiollo, Cristine Saibert, Deise Kolling, Elis Coelho, Gabrielle Müller, Gabriela Ecco, Gabriel Kreft, Jean Bertoldo, Manuel Couto, Nathalia Castilho, Patrícia Severino, Patrícia Rabelo, Paulo Leal, Priscila Martins, Ricardo Delena e Tiago Bortolotto e todos os outros que pelo laboratório passaram nos últimos 11 anos, pelas ideias e dúvidas trocadas, discussões, conversas divertidas e pelas centenas de favores laboratoriais. Obrigada Cris e Tiago pela ajuda fundamental nesta reta final com o preparo dos géis. Em especial às “Cebimetes” pela convivência, jantares e conversas sobre a vida e seus desafios.

Ao fiel companheiro, amigo e marido Vitor que foi incansável durante todo este tempo e suportou ao meu lado toda a dor e a delícia do que eu sou hoje pessoal e profissionalmente. Treze anos que juntos

fizemos esta caminhada até aqui. Obrigada por estar ao meu lado me apoiando de forma incontestável em todos os momentos e decisões, por compreender meus inúmeros momentos de ausência e por me incentivar a seguir em frente mesmo quando nem eu mesma achava que era possível. Esta conquista e tantas outras eu compartilho com você que “segura as pontas” e preenche meu coração por inteiro.

Aos meus pais Luiz Holly e Avani que me geraram e me deram uma família muito longe da perfeição, mas a aquela que foi suficiente para ensinar-me o valor dos estudos e trabalho árduos, generosidade e o amor genuíno. Este é apenas um dos frutos das oportunidades que vocês me proporcionaram com sua dedicação e incentivo.

À minha família, aos irmãos Fernando, Alexandre, Andréia e Felipe, aos cunhados Giovani, Jennifer, Carlos e Janese, aos sobrinhos Vinícius, Eric, Sara, Daniel, Orden, Kaylee e Taís e aos sogros Beto e Beti que, mesmo sem saber explicar o que tanto fiz nos últimos anos, me apoiaram e proporcionaram a felicidade e tranquilidade nos poucos momentos de descanso.

À UFSC que foi meu segundo lar nos últimos 11 anos e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de estudo, CAPES, MCT, FINEP, FAPESC e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB).

A Deus agradeço por TUDO que tenho, por sua paciência e por colocar grandes oportunidades e, principalmente, todas estas pessoas ao meu lado e que contribuíram pra tornar-me quem eu sou hoje.

*“How much of life do we miss by waiting to  
see the rainbow before thanking God that there is rain?”  
(Dieter F. Uchtdorf)*



## RESUMO

As proteínas MYB constituem uma importante família de fatores de transcrição e desempenham, em plantas, funções regulatórias no desenvolvimento e nas respostas de defesa. Exemplo importante desta família é a proteína AtMYB30 de *Arabidopsis thaliana* que está envolvida no início da morte celular, durante o processo de resposta de hipersensibilidade e respostas de defesa vegetal. No processo de sinalização celular, o óxido nítrico pode regular a ligação das proteínas MYB ao DNA de diversas maneiras, entre elas através da S-nitrosilação. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar e avaliar a ocorrência da modificação pós-traducional S-nitrosilação no fator de transcrição AtMYB30 de *Arabidopsis thaliana*, sua interação com o DNA e o efeito estrutural destes fatores. Mutagênese sítio-dirigida foi usada para obter os mutantes C49A, C53A e C49AC53A. O domínio de ligação ao DNA de AtMYB30 foi capaz de ligar-se ao DNA na forma ativa, assim como os seus simples mutantes em cisteína, o que não ocorreu com o duplo mutante, comprovando a importância destes aminoácidos altamente reativo na formação do complexo. Além disso, foi confirmada a S-nitrosilação destas proteínas pela técnica de Biotin-Switch, modificação que provavelmente impediu a formação dos complexos DNA-proteína quando na presença de doadores de NO nos testes de retardamento de migração eletroforética. Utilizando o dicróismo circular foi observado que o NO, possivelmente através da S-nitrosilação, influencia estruturalmente AtMYB30, alterando seu conteúdo de estrutura secundária, porém com certa reversibilidade ao conteúdo inicial por efeito de um agente redutor. Quando comparadas, a cisteína 49 parece ser mais importante nesta modificação estrutural, ao passo que a cisteína 53 apresenta maior afinidade com a molécula de DNA. Foi possível identificar e confirmar por espectrometria de massa MALDI-TOF a S-nitrosilação no resíduo de cisteína 53. Nos ensaios de desnaturação térmica a proteína selvagem apresentou uma temperatura de desnaturação ( $T_m$ ) de 38,26 °C enquanto que os mutantes C49A e C53A foram menos estáveis estruturalmente, apresentando uma menor  $T_m$  de 32,43 °C e 31,25 °C, respectivamente. Já sob o efeito da S-nitrosilação, o perfil de desnaturação térmica da AtMYB30 selvagem apresentou um leve aumento de  $3,69 \pm 1,01$  °C na  $T_m$  quando comparado à proteína não S-nitrosilada, assim como para C49A de 33,08 °C a 39,82 °C; ~6 °C. Apenas para o mutante C53A a  $T_m$  reduziu na presença do doador de NO SNOG, apresentando valores de 29.49 °C a 23.15 °C. Assim, a S-nitrosilação do resíduo C49 (presente no mutante C53A)

promoveu o efeito mais pronunciado na sensibilidade térmica, enquanto a maior estabilidade térmica quando S-nitrosiladas foi observada em AtMYB30 selvagem e mutante C49A, sugerindo que o resíduo C49 pode ser responsável pelas modificações estruturais causadas pela adição do NO à proteína. Quanto ao efeito do DNA nos espectros de fluorescência de AtMYB30, foi observada uma redução de intensidade de fluorescência e uma alteração no comprimento de onda máximo quando na ligação entre AtMYB30 e o DNA, inclusive para as simples mutantes, comprovando a alteração estrutural causada pela ligação devido ao enovelamento da proteína. Finalmente, utilizando a técnica de *DNase footprint* foi possível confirmar a sequência de ligação do DNA à AtMYB30.

**Palavras-Chave:** Fatores de transcrição MYB, Óxido nítrico, S-nitrosilação, domínio de ligação AtMYB30, interação DNA-proteína, *Arabidopsis*.

## ABSTRACT

MYB proteins are a family of transcription factors that play an important role in plant development and regulatory defense processes. *Arabidopsis thaliana* AtMYB30, a member of this protein family, is involved in cell death processes during the hypersensitive response (HR) of plants. HR is characterized by a vast production of reactive oxygen species and nitric oxide (NO). NO may thus influence the binding of AtMYB30 to DNA. In this work we evaluated the effect of NO on AtMYB30 DNA binding activity, and also on the protein structure. A fully active minimal DNA-binding domain (DBD) of AtMYB30 (residues 11–116) containing two cysteine residues (C49 and C53) was overexpressed and purified. Site-directed mutagenesis was used to obtain AtMYB30 mutants C49A, C53A and C49AC53A. The DNA binding activity of AtMYB30 and Cys single mutants was clearly inhibited upon incubation with a NO donor, and S-nitrosylation was confirmed by the biotin-switch assay. In order to understand the mechanism of the NO effect on AtMYB30 DNA binding activity we performed circular dichroism (CD) analysis, to correlate the observed protein function inhibition and a potential structural impairment on AtMYB30. Indeed, NO modification of C49 and C53 residues promotes a subtle modification of the secondary structure of this transcription factor. When compared, cysteine 49 is more important in the structural modification while cysteine 53 exhibits greater affinity with DNA. It was confirmed by Mass Spectrometry MALDI-TOF the S-nitrosylation in cysteine 49. Thermal denaturation analysis by CD indicated for wild type AtMYB30 a melting temperature ( $T_m$ ) value of 38,26 °C, while for C49A and C53A, 32,43 °C and 31,25 °C, respectively and less structural stability. Following S-nitrosylation, the thermal denaturation profile of wild type AtMYB30 and C49A mutant had the  $T_m$  slightly increase when compared to non-nitrosylated protein and decreased to C53A mutant. Fluorescence spectroscopy indicated a substantially decrease intensity in all proteins when in binding to DNA, caused by protein folding in the complex. We thus demonstrated, using various techniques, the *in vitro* effect of NO on AtMYB30, and thus the potential consequences of NO activity on plant metabolism influenced by this transcription factor. Finally, by DNA footprint assay we were able to confirm the DNA sequence that binds to AtMYB30.

**Keywords:** MYB transcription factors, nitric oxide, S-nitrosylation, binding domain AtMYB30, DNA-protein interaction, *Arabidopsis*.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Modelo do domínio MYB R2R3.....	26
<b>Figura 2.</b> <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	28
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de S-nitrosilação/Denitrosilação.....	31
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de S-nitrosilação no resíduo de cisteína.....	32
<b>Figura 5.</b> Resposta de hipersensibilidade em vegetais.....	35
<b>Figura 6.</b> Esquema representativo de processo de morte celular em resposta à infecção em célula vegetal.....	36
<b>Figura 7.</b> Rotas da síntese de NO a partir de nitrito e arginina.....	41
<b>Figura 8.</b> Expressão da resposta de hipersensibilidade em <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	43
<b>Figura 9.</b> Sequência de DNA que codifica o domínio MYB de ligação ao DNA da proteína AtMYB30.....	46
<b>Figura 10.</b> Mapa do vetor de expressão pET-14b.....	47
<b>Figura 11.</b> Região de clonagem do vetor pET -14b.....	48
<b>Figura 12.</b> Esquema representativo da técnica de Ensaio de retardamento de migração eletroforética (EMSA) para análise da interação DNA-proteína.....	54
<b>Figura 13.</b> Detecção de proteínas S-nitrosiladas pela técnica de Biotin-Switch.....	55
<b>Figura 14.</b> Análise da interação DNA-proteína por <i>DNase I Footprint</i> .....	59
<b>Figura 15.</b> Amplificação do fragmento que codifica o domínio de ligação ao DNA de AtMYB30.....	61
<b>Figura 16.</b> PCR de colônia de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ transformadas com o vetor pET-14b-AtMYB30.....	62
<b>Figura 17.</b> Digestão dos plasmídios com as enzimas <i>NdeI</i> e <i>XhoI</i> .....	63
<b>Figura 18.</b> Amplificação dos gene mutantes de AtMYB30 de <i>Arabidopsis.thaliana</i> .....	64
<b>Figura 19.</b> União dos fragmentos da mutação-sítio dirigida de AtMYB30.....	64
<b>Figura 20.</b> PCR de colônia das colônias de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ com inserção do vetor pGEM T_AtMYB30.....	65
<b>Figura 21.</b> Digestão dos vetores pGEM T- <i>easy</i> e do plasmídios pET-14b para construção dos plasmídios mutantes de AtMYB30.....	66
<b>Figura 22.</b> PCR de colônia das colônias de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ com inserção dos vetores mutantes de AtMYB30.....	67

<b>Figura 23.</b> Confirmação da inserção do fragmento AtMYB30 no vetor pET-14b.....	68
<b>Figura 24.</b> Purificação de AtMYB30 e mutantes por IMAC em cromatógrafo ÄKTA.....	70
<b>Figura 25.</b> Massa intacta de AtMYB30 selvagem e mutantes por Espectrometria de massa.....	72
<b>Figura 26.</b> Espectro de massa de PMF experimental de AtMYB30 selvagem.....	73
<b>Figura 27.</b> Espectrometria de massas de AtMYB30 selvagem para obtenção do peptídeo contendo a cisteína 53.....	75
<b>Figura 28.</b> Alinhamento múltiplo de sequência de AtMYB30 e outros membros da família MYB de mamífero e outras espécies vegetais.....	76
<b>Figura 29.</b> Modelo estrutural de c-Myb formando o heterotrímero e associado ao DNA utilizado para comparação com AtMYB30.....	77
<b>Figura 30.</b> Modelo estrutural de AtMYB30 formando o heterodímero associado ao DNA.....	78
<b>Figura 31.</b> Ensaio de retardamento de migração eletroforética de AtMYB30 selvagem e mutantes.....	79
<b>Figura 32.</b> Teste de eficiência de doadores de NO por Ensaio de retardamento de migração eletroforética de AtMYB30 selvagem.....	81
<b>Figura 33.</b> Ensaio de migração eletroforética de AtMYB30 selvagem e mutantes utilizando sonda não específica APB1 de milho ( <i>Zea Mays</i> ).....	82
<b>Figura 34.</b> Avaliação do efeito de agentes redutores na formação do complexo DNA-AtMYB30 por ensaio de retardamento de migração eletroforética.....	83
<b>Figure 35.</b> Avaliação de afinidade de ligação de AtMYB30 selvagem ao DNA por Ensaio de retardamento de migração eletroforética.....	86
<b>Figura 36.</b> Avaliação de afinidade de ligação de AtMYB30 C49A ao DNA por Ensaio de retardamento de migração eletroforética.....	87
<b>Figura 37.</b> Avaliação de afinidade de ligação de AtMYB30 C53A ao DNA por Ensaio de retardamento de migração eletroforética.....	88
<b>Figura 38.</b> Ensaio de biotilação por Biotin-switch de AtMYB30 selvagem e mutantes.....	91
<b>Figura 39.</b> Análise do peptídeo biotilado de AtMYB30 por espectrometria de massa MALDI-TOF.....	93
<b>Figura 40.</b> Espectroscopia de dicroísmo circular de AtMYB30 selvagem e mutantes simples na avaliação da estrutura secundária.....	95
<b>Figura 41.</b> Perfil de desnaturação térmica de AtMYB30 selvagem e mutantes simples.....	96

<b>Figura 42.</b> Espectroscopia de dicroísmo circular de AtMYB30 selvagem na avaliação da estrutura secundária a partir da S-nitrosilação.....	97
<b>Figura 43.</b> Perfil de desnaturação térmica de AtMYB30 S-nitrosilada.....	98
<b>Figura 44.</b> Espectroscopia de dicroísmo circular de AtMYB30 C49A na avaliação da estrutura secundária a partir da S-nitrosilação.....	99
<b>Figura 45.</b> Perfil de desnaturação térmica de AtMYB30 C49A S-nitrosilada.....	100
<b>Figura 46.</b> Espectroscopia de dicroísmo circular de AtMYB30 C53A na avaliação da estrutura secundária a partir da S-nitrosilação.....	101
<b>Figura 47.</b> Perfil de desnaturação térmica de AtMYB30 C53A S-nitrosilada.....	102
<b>Figura 48.</b> Análise da fluorescência intrínseca de AtMYB30 e mutantes a 25°C. ....	106
<b>Figura 49.</b> Espectroscopia de dicroísmo circular na região espectral do UV-distante na avaliação do efeito estrutural da interação de AtMYB30 selvagem e mutantes ao DNA.....	108
<b>Figura 50.</b> Análise de interação AtMYB30 e o DNA por <i>DNase I Footprint</i> .....	110





## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Constantes de dissociação na formação dos complexos DNA-AtMYB30.....	89
<b>Tabela 2.</b> Valores médios de temperatura de desnaturação térmica ( $T_m$ ) ( $^{\circ}\text{C}$ ) de AtMYB30 selvagem e mutantes após o tratamento com GSH ou SNOG (1 mM).....	103

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

Å	Ångstrm
ACN	Acetonitrila
AJ	Ácido jasmônico
AS	Ácido salicílico
AtSNOGR1	S-glutationa redutase ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )
Biotina-HPDP	N-[6-(Biotinamido)hexil]-3'-(2'-piridilditio) propionamida
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BST	Técnica de <i>biotin-switch</i>
C, Cis	Cisteína
CD	Dicroísmo circular
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementar
DO	Densidade tica
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMSA	Ensaio de retardamento de migração eletroforética
ERNs	Espécies reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies reativas de Oxignio
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FT	Fator de transcrição
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa Oxidada
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxitil)1-piperazinil]-etanosulfônico
HLH	Hélice-volta-Hélice
IMAC	Cromatografia de afinidade por metal imobilizado
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
ITC	Calorimetria por titulação isotérmica
k	<i>Kilo</i>
K <sub>D</sub>	Constante de dissociação
LB	Luria Bertani
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
m/z	Razão massa carga
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MMS	Metil-Metanotiosulfato

MPT	Modificação pós-traducional
MS	Espectrometria de massa
NLS	Sinal de localização nuclear
NO	Óxido nítrico
NO sintase	Óxido nítrico sintase
NPS	Nitroprussiato de sódio
NR	Nitrato redutase
TOF	<i>Time-of-flight</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Sequência de leitura aberta)
pb	Par de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato-salina)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	Potencial hidrogeniônico (-log [H <sup>+</sup> ])
pI	Ponto isoelétrico
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint</i>
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PR	Proteínas realacionadas à patogênese
RH	Resposta de hipersensibilidade
RNA	Ácido ribonucleico
SAR	Resistência Sistêmica adquirida
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em gel de poliacrilamida usando dodecil sulfato de sódio)
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicilamina
SNOG	S-nitrosoglutationa
TBE	Tris/Borato/EDTA
TFA	Ácido trifluoroacético
Tris	Tris-hidroximetilaminoetano
UV	Ultravioleta
WT	<i>Wild type</i> (selvagem)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>1.1 Fatores de transcrição e sua aplicabilidade .....</b>	<b>23</b>
<b>1.2 Fatores de transcrição da família MYB .....</b>	<b>24</b>
<b>1.3 <i>Arabidopsis thaliana</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>1.4 S-Nitrosilação de proteínas .....</b>	<b>29</b>
<b>1.5 Mecanismos de defesa em plantas.....</b>	<b>34</b>
<b>1.6 Óxido nítrico e seus efeitos na S-nitrosilação.....</b>	<b>38</b>
<b>1.7 Fator de transcrição AtMYB30 .....</b>	<b>42</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>45</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>45</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1 Clonagem do gene para o domínio de ligação ao DNA de     AtMYB30 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2 Mutagênese sítio dirigida de AtMYB30 .....</b>	<b>48</b>
<b>3.3 Preparação e transformação das bactérias competentes.....</b>	<b>49</b>
<b>3.4 Expressão do domínio de ligação ao DNA de AtMYB30 e     mutantes.....</b>	<b>50</b>
<b>3.5 Purificação dos domínios de ligação ao DNA de AtMYB30 e     mutantes.....</b>	<b>51</b>
<b>3.6 Identificação das proteínas por Espectrometria de Massa     (MS).....</b>	<b>52</b>
<b>3.7 Ensaio de retardamento de migração eletroforética.....</b>	<b>53</b>
<b>3.8 Ensaio de biotilação para detecção de proteínas S-     nitrosiladas .....</b>	<b>54</b>

3.9 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) de AtMYB30 e mutantes .....	56
3.10 Fluorescência Intrínseca de AtMYB30 e mutantes na análise da interação com o DNA .....	57
3.11 Purificação dos peptídeos S-nitrosilados e espectrometria de massa .....	57
3.12 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) de AtMYB30 e mutantes na análise da interação com o DNA .....	58
3.13 Análise dos sítios de interação no DNA por <i>DNase I Footprint</i> .....	58
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
4.1 Clonagem do gene para o domínio de ligação ao DNA de AtMYB30 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	61
4.2 Mutagênese sítio dirigida de AtMYB30 .....	63
4.3 Expressão e purificação da proteína AtMYB30 e mutantes..	68
4.4 Identificação das proteínas por Espectrometria de Massa (MS) .....	71
4.5 Homologia e modelagem comparativa entre AtMYB30 e outras proteínas da família MYB.....	76
4.6 Teste de atividade por Ensaio de retardamento de migração eletroforética .....	78
4.7 Análise da afinidade de AtMYB30 ao DNA por Ensaio de retardamento de migração eletroforética.....	83
4.8 Ensaio de biotilação para detecção de proteínas S-nitrosiladas.....	90
4.9 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) de AtMYB30 e mutantes .....	94
4.10 Fluorescência intrínseca de AtMYB30 e mutantes na análise da interação com o DNA .....	104

<b>4.11 Espectroscopia de Dicroísmo Circular de AtMYB30 e mutantes na análise da interação com DNA .....</b>	<b>106</b>
<b>4.12 Análise dos sítios de interação no DNA por <i>DNase I Footprint</i>.....</b>	<b>109</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>112</b>
<b>6. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>114</b>
<b>7. ESTÁGIO DOUTORAL.....</b>	<b>115</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>116</b>
<b>9. ANEXO A - Artigo relacionado à tese.....</b>	<b>129</b>

# 1.INTRODUÇÃO

## 1.1 Fatores de transcrição e sua aplicabilidade

Em eucariotos a expressão gênica é regulada por intrincados processos nos quais a diferenciação celular é alcançada por alterações na expressão dos genes. Para a maioria dos genes esta regulação ocorre no início da transcrição, na qual regiões regulatórias do DNA são necessárias para ativar ou desativar genes específicos. Estas regiões regulatórias do DNA precisam ser reconhecidas por proteínas regulatórias ou fatores de transcrição, que se ajustam firmemente às características especiais da superfície da dupla hélice em uma determinada região, para que se dê a regulação gênica (GASTON E JAYARAMAN, 2003; HAGER, MCNALLY E MISTELI, 2009; NELSON E COX, 2005). Ou seja, estes fatores de transcrição são proteínas capazes de regular a expressão de genes alvo através de ligações específicas a sequências de DNA regulando a atividade do complexo de iniciação da transcrição.

Estes fatores de transcrição são compostos por no mínimo quatro domínios: *i*) domínio de ligação ao DNA, *ii*) sinal de localização nuclear (NLS), *iii*) domínio de ativação/repressão da transcrição e *iiii*) sítio de oligomerização, os quais operam juntos para regular processos bioquímicos por modulação do início da transcrição (DU et al., 2009; PTASHNE, 1988).

As plantas atribuem grande parte do seu genoma aos fatores de transcrição, perfazendo mais de 1600 genes (7% do genoma) identificados em *Arabidopsis* (RIECHMANN et al., 2000), revelando a complexidade da regulação em nível transcricional, já que a adaptação de plantas às condições ambientais é dependente destas proteínas. De acordo com os tipos de domínios de ligação ao DNA, os fatores de transcrição em eucariotos foram classificados em diversas famílias, sendo que os que estão associados à resposta ao estresse são das famílias DREB/CBF, AREB/ABF, **MYB/MYC** e NAC (NAKASHIMA et al., 2009).

Os primeiros produtos da engenharia genética para melhoramento de culturas agrícolas há aproximadamente 15 anos foram baseados em características monogênicas, como tolerância a

herbicidas ou resistência a insetos, nos quais não eram necessárias manipulações de vias moleculares de plantas transgênicas. Com o desenvolvimento da biotecnologia, como por exemplo, o sequenciamento de genomas completos (*Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*) e manipulações poligênicas viáveis, surgiu a possibilidade de identificar genes regulatórios importantes que influenciam e colaboram nestes melhoramentos genéticos de culturas. Por sua vez, por agirem como reguladores de processos celulares, os fatores de transcrição podem ser excelentes candidatos na modificação de características importantes de desenvolvimento, maturação, adaptação ao ambiente e defesa em culturas de plantas. Assim, tecnologias baseadas em fatores de transcrição são potencialmente importantes como parte de culturas manipuladas por biotecnologia. Dentro de uma mesma cultura, tecnologias transgênicas são capazes de permitir modificações de vias regulatórias em uma planta, por exemplo, através do uso de um fator de transcrição de uma segunda planta (AMBAWAT et al., 2013; CENTURY et al., 2008).

## 1.2 Fatores de transcrição da família MYB

Fatores de transcrição MYB são amplamente distribuídos em todos os organismos eucarióticos e constituem uma das maiores famílias de fatores de transcrição no reino vegetal. Nesses organismos, os fatores de transcrição desempenham funções regulatórias no processo de desenvolvimento e nas respostas de defesa. As proteínas dessa família têm como característica comum um domínio MYB de ligação ao DNA na região N-terminal bastante conservado evolutivamente (DU et al., 2012; YANHUI et al., 2006).

O primeiro gene MYB identificado foi o oncogene v-Myb do vírus de mieloblastose aviária e algumas evidências obtidas de comparações de sequências indicam que v-Myb tem origem em uma mutação do gene de vertebrados, tornando-se parte do vírus (KLEMPNAUER et al., 1982). Posteriormente, três genes relacionados à v-Myb foram encontrados em vertebrados — c-Myb, A-Myb e B-Myb — e estão envolvidos na regulação da proliferação, diferenciação e apoptose celular (DU et al., 2009). Além desses, outros genes similares têm sido identificados em insetos, plantas e fungos (WESTON et al., 1998; STRACKE, WERBER E WEISSHAAR, 2001). Desde então, proteínas

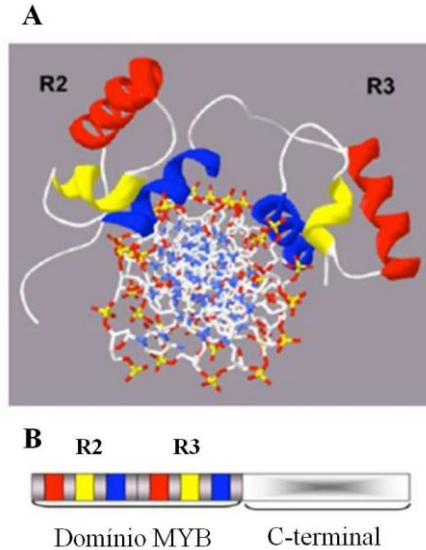


MYB têm sido descobertas em todo organismo eucariótico analisado (LIPSICK, 1996).

Em plantas, o primeiro gene MYB identificado há 20 anos foi o gene C1 (Colored1) de *Zea mays*, o qual codifica um fator de transcrição responsável pela síntese de antocianinas nas aleuronas (camada de células que reveste o endosperma de algumas sementes) do milho (PAZ-ARES et al., 1987; AMBAWAT et al., 2013). A variedade da família MYB encontrada em plantas indica a importância da mesma no controle de processos fundamentais nestes eucariotos.

Essas proteínas são cruciais no controle da proliferação e diferenciação em diversos tipos celulares e compartilham o domínio MYB de ligação ao DNA. O domínio MYB é constituído normalmente de uma a três repetições imperfeitas (R1R2R3), cada uma contendo três  $\alpha$ -hélices e apresentando um motivo de ligação ao DNA hélice-volta-hélice (HVH), de cerca de 50 a 53 aminoácidos. A terceira hélice desempenha o papel de reconhecimento e interação com o DNA (Figura 1). Outra característica marcante das repetições MYB é um agrupamento de três resíduos de triptofano regularmente espaçados na estrutura tridimensional da proteína. A segunda e terceira hélices de cada repetição formam a estrutura de HVH com estes três triptofanos (ou resíduos hidrofóbicos) formando um núcleo hidrofóbico que estabiliza a estrutura tridimensional de HVH. Já a terceira hélice de cada repetição é responsável pelo reconhecimento e faz o contato direto com o DNA intercalando no sulco maior da estrutura. Em contraste, a região C-terminal é o domínio de ativação e varia consideravelmente entre proteínas MYB, o que leva à grande variedade de tipos de regulação dessa família de genes (DU et al., 2012; JIA et al., 2004; OGATA et al., 1996).

**Figura 1.** Modelo do domínio MYB R2R3.



(A) Estrutura tridimensional esquemática (PDB 1H88) do domínio de ligação ao DNA com a segunda e a terceira repetição da proteína c-MYB de vertebrados 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. Adaptado de (HEINE, 2006).

A partir desta característica estrutural, as proteínas MYB podem ser classificadas dentro de três subfamílias, de acordo com o número de repetições adjacentes no domínio MYB. No caso de haver apenas uma repetição, a proteína é classificada como MYB R1; no caso de duas, MYB R2R3 e no caso de três, MYB R1R2R3 (STRACKE, WERBER, WEISSHAAR, 2001). Proteínas MYB de animais possuem três motivos MYB designados R1, R2 e R3 (BRAUN E GROTEWOLD, 1999; JIANG et al., 2004), enquanto em plantas estes domínios possuem, em sua maioria, dois motivos chamados de R2 e R3 e formam a família de genes *myb* R2R3 e, em menor número, a família com apenas um motivo R1 (BRAUN E GROTEWOLD, 1999). O genoma de *A. thaliana* contém apenas cinco genes R1R2R3-*myb* e aproximadamente 190 genes R2R3-*myb*. O motivo citado de HVH foi o primeiro descrito como motivo de reconhecimento de proteínas ao DNA e é encontrado em vários fatores de transcrição de procariotos e eucariotos (LEWIN, 1994).

Com o sequenciamento do seu genoma, genes que codificam as três repetições R1, R2 e R3, foram detectados em *A. thaliana*. (BRAUN E GROTEWOLD, 1999). Dezenas de genes que codificam proteínas MYB, os quais apresentam 40% a 60% de identidade com o domínio MYB de vertebrados (c-*proto*-MYB oncoproteína) estão presentes no genoma de *Arabidopsis* (cerca de 125 genes MYB R2R3) e do milho (mais de 200 genes MYB R2R3) (KRANZ, SCHOLZ, WEISSHAAR, 2000; RABINOWICZ et al., 1999).

As funções da maioria dos membros da família MYB em plantas ainda são desconhecidas, embora já existam alguns estudos demonstrando papéis bem definidos para estes fatores de transcrição: controle do metabolismo secundário, em particular na biossíntese de flavonóides (GROTEWOLD et al., 1994); regulação na morfogênese celular (LIP et al., 2014; OPPENHEIMER et al., 1991); vias de transdução de sinal, como em resposta ao estresse abiótico (VILARRASA-BLASI et al., 2014; URAO et al., 1993) e ataque a patógenos (YANG E KLESSIG, 1996).

### 1.3 *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* é uma planta herbácea da família das *Brassicaceae*, a qual inclui espécies mais conhecidas como a couve e a mostarda e é nativa do território europeu até a Ásia Central, com ampla distribuição pela Europa, Ásia e América do Norte. Foi descoberta no séc. XVI por Johannes Thal (origem do nome *thaliana*) nas montanhas Harz, na Alemanha (Figura 2). Dependendo do seu habitat natural e em resposta às condições ambientais, esta planta pode apresentar grande heterogeneidade genética, o que se reflete na diversidade das suas características morfológicas e fisiológicas e, por isso, são conhecidos mais de 750 ecótipos em todo o mundo. É considerada uma planta daninha de pequena importância agrícola. É um dos organismos modelo para o estudo em genética, botânica, bioquímica e fisiologia, papel semelhante ao de *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* no estudo da biologia animal. *A. thaliana* foi a primeira planta e o terceiro organismo multicelular cujo genoma foi completamente sequenciado (THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE, 2000). Características como ciclo de vida curto (seis semanas), pequeno porte (15 a 20 cm), alta acessibilidade, fácil manipulação, genoma reduzido quando comparado a outras espécies vegetais, possibilidade de ser cultivada e mantida em placas de petri, existência de um número significativo de

linhagens geneticamente alteradas que facilita a sua análise, tornam a *Arabidopsis* um importante modelo para investigações fundamentais em biologia. Já que resultados obtidos em estudos de *A. thaliana*, podem ser corroborados em outras plantas e, em muitos aspectos, também em outros eucariotos, estudos realizados com o intuito de identificar a função dos genes desse organismo têm sido o foco de muitas pesquisas (MEINKE et al., 1998; TOHGE et al., 2005).

**Figura 2.** *Arabidopsis thaliana*.



À esquerda, o estado vegetativo com folhas em forma de roseta. No centro, a planta adulta em floração. As barras representam 1 cm. À direita, pormenor da flor, estames e sementes. As barras representam 1 mm. Adaptado de The Jean-Pierre Bourgin Institute, 2010 (<http://www-ijpb.versailles.inra.fr/en/arabido/arabido.htm>).

Atualmente, grande parte dos conhecimentos sobre genes da família MYB em plantas foi obtido de estudos em *Arabidopsis*, baseado no sequenciamento do seu genoma. Porém, esta planta apresenta certas

características, como a inabilidade de formar associações simbióticas para fixação de nitrogênio com *rhizobia* ou de sequestrar nutrientes do solo com *micorrizas*. Assim, embora constitua um excelente modelo para estudos gênicos, a *Arabidopsis* possui certo potencial limitado em aplicações de agricultura e, para isso, as leguminosas são mais utilizadas (DU et al., 2012).

#### 1.4 S-Nitrosilação de proteínas

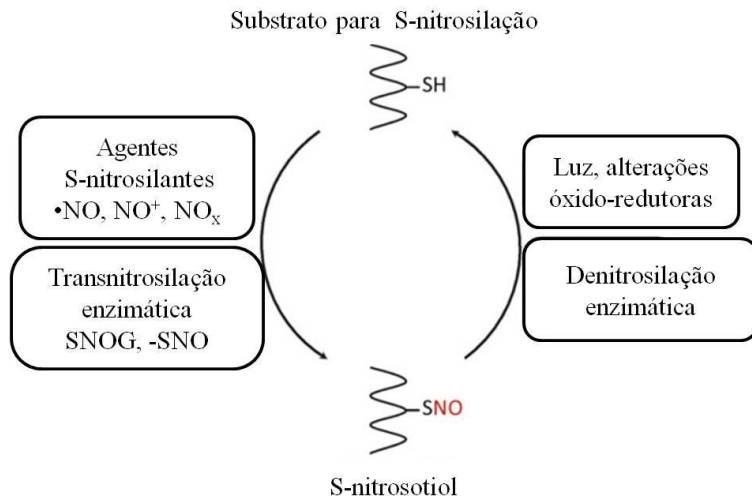
Os resíduos de cisteína normalmente são os menos abundantes em proteínas e, ainda assim, já foi demonstrado que são sítios importantes funcionalmente, apresentando função catalítica, regulatória, como cofator e estabilizadora de estrutura (MARINO E GLADYSHEV, 2012). Assim, estes resíduos podem ser classificados em quatro grupos funcionais: estrutural, ligação a metal, catalítico e regulatório (GOULD et al., 2013; MARINO E GLADYSHEV, 2012). Por formarem ligações dissulfeto, os resíduos de cisteína apresentam função estrutural importante durante o enovelamento de proteínas. Além disso, as cisteínas podem coordenar com uma variedade de metais e, juntamente com a histidina, são os resíduos que mais participam de sítios de ligação a metais em proteínas, influenciando na estabilidade estrutural e atividade proteica. Controlam também modificações enzimáticas como a S-acilação e auxiliam na catálise de diversas famílias de proteínas, como oxidoredutases, proteases e aciltransferases. Os grupos tióis de cisteínas são os únicos capazes de interagir covalentemente com outros tióis criando ligações dissulfeto intra e intermoleculares. A cadeia lateral da cisteína pode também reagir diretamente com diversos oxidantes ou produtos celulares oxidados quando em condições fisiológicas e patológicas como, por exemplo, oxidação reversível de tióis como intermediários do tipo ácido sulfênico ou covalentes como a S-nitrosilação, S-glutationilação (adição de glutationa) e S-sulfidrilção (adição de sulfeto de hidrogênio). Todos estes exemplos são conhecidos por apresentarem papel importante na regulação por óxido-redução de proteínas, comprovando que as cisteínas são o principal alvo do estresse nitrosativo, levando à formação de S-nitrosotióis reversíveis. Apesar da versatilidade nos tipos de reações, a suscetibilidade de cisteínas a elas, bem como à S-nitrosilação, depende da reatividade de cada tiol (GOULD et al., 2013; MARINO E GLADYSHEV, 2012).

Por ser um resíduo de aminoácido altamente reativo e com alta plasticidade, a cisteína é capaz de sofrer tanto modificações pós

tradicionais (MPT) nucleofílicas quanto oxidativas (MAJMUDAR E MARTIN, 2013). Como já citado, uma destas reações oxidativas envolve a modificação covalente e reversível de cisteína, através do segundo mensageiro óxido nítrico (NO), conhecida como S-nitrosilação (R-SNO). A adição ou transferência da molécula de NO ao grupo tiol da cisteína constitui uma das MPT mais importantes em processos fisiológicos e patológicos, tanto em humanos quanto em plantas (FARES et al., 2011). Em humanos a S-nitrosilação age em vias que participam desde problemas no tecido vascular endotelial e cardíaco (MURPHY et al., 2014), doenças neurodegenerativas (NAKAMURA et al., 2013) até a apoptose da artrite reumatoide (LI E WAN, 2013). Em plantas, a S-nitrosilação tem se mostrado presente nos mais diversos processos, principalmente os de defesa, tanto em condições de estresse abióticas quanto bióticas.

Como uma MPT clássica, a S-nitrosilação é um mecanismo reversível e altamente lábil à luz e reações óxido-redutoras. Assim, a ligação S-NO pode ser desfeita por agentes redutores intracelulares como GSH (Glutationa reduzida) e ascorbato e também por íons de metais reduzidos. Além da S-nitrosilação, há também o processo reverso de denitrosilação de proteínas em diversos processos biológicos, os quais devem ser regulados por enzimas específicas, para manutenção dos níveis de S-nitrosilação intracelular (Figura 3) (ASTIER et al., 2011). Esta modificação contribui para a regulação gênica dependente de NO, a qual é dependente, por sua vez, da localização na planta e dos estímulos a que é submetida. Alterações na expressão gênica têm sido intensamente estudadas com diferentes doadores de NO apesar de existirem elementos reguladores comumente expressos nestas vias (LEITNER et al., 2009).

**Figura 3.** Mecanismos de S-nitrosilação/Denitrosilação.

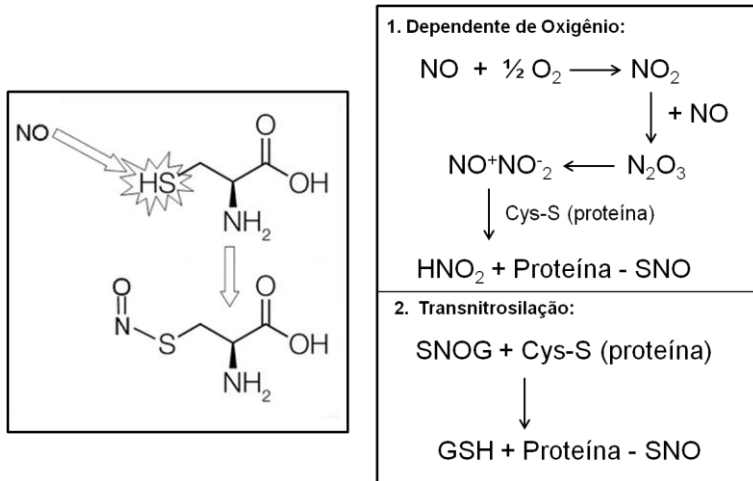


A S-nitrosilação ocorre em resíduos específicos de cisteína mediada por espécies reativas de nitrogênio ( $\text{NO}\cdot$ ,  $\text{NO}^+$ ,  $\text{NO}_x$ ) como  $\text{N}_2\text{O}_3$ , agentes transnitrosilantes como SNOG. Depois de formados, os S-nitrosotióis são bastante lábeis e sensíveis à luz e a alterações óxido-redutoras, além de poder sofrer denitrosilação enzimática. Adaptado de (ASTIER et al., 2011).

Quimicamente, a S-nitrosilação é a reação do NO com o átomo de enxofre do resíduo de cisteína formando a ligação S-NO, através do ataque nucleofílico do  $\text{NO}^+$  (cátion nitrosônio) ao tiolato (Figura 4). Esta modificação requer inicialmente a reação do  $\text{NO}\cdot$  (radical NO) com  $\text{O}_2$  para a formação de óxidos nitrogenados, principalmente  $\text{N}_2\text{O}_3$ , o qual dissocia-se em  $\text{NO}^+$  após a perda do elétron do radical NO. No entanto, há evidências da formação da ligação S-NO a partir de ataques nucleofílicos ao enxofre pelo  $\text{NO}^-$  ou pela reação entre radical  $\text{RS}\cdot$  e  $\text{NO}\cdot$  (LINDERMAYR E DURNER, 2009; WANG et al., 2006).

Além destas reações já citadas, a S-nitrosilação também pode ser formada a partir da transnitrosilação, que consiste na troca direta de  $\text{NO}^+$  de uma proteína S-nitrosilada para um tiol reativo da proteína alvo e que explicaria a nitrosilação de resíduos de cisteína em condições desfavoráveis para a reação. A transnitrosilação envolve pequenas

**Figura 4.** Mecanismo de S-nitrosilação no resíduo de cisteína.



O óxido nítrico reage com o grupo tiol SH do resíduo de cisteína substituindo-o pelo grupo nitrosil e esta modificação pode ocorrer sob efeito do oxigênio (1): ataque nucleofílico do  $\text{NO}^+$  ao tiolato, requerendo a reação do  $\text{NO}^\bullet$  com  $\text{O}_2$  para a formação de óxidos nitrogenados, como  $\text{N}_2\text{O}_3$ , o qual dissocia-se em  $\text{NO}^+$  após a perda do elétron do radical  $\text{NO}$ ; ou por transnitrosilação (2): troca direta de  $\text{NO}^+$  de uma proteína S-nitrosilada para um tiol reativo da proteína alvo.

moléculas, como a S-nitrosoglutationa (SNOG) formada pela S-nitrosilação da glutathiona (GSH) e que funciona como um reservatório de NO na célula (WANG et al., 2006). Diferente de animais e plantas em geral, que possuem a SNOG redutase (responsável pela metabolização de SNOG em amônia e GSSG para a geração de S-nitrosotióis), *A. thaliana* não apresenta níveis altos desta enzima. Esta evidência sugere que os altos níveis de S-nitrosotióis em *Arabidopsis*, devem-se ao efeito do SNOG (ASTIER et al., 2011; WANG et al., 2006).

Embora a maioria das proteínas possuam resíduos de cisteína, apenas alguns deles são suscetíveis à S-nitrosilação *in vivo*, para assim contribuir na modulação dependente de NO nas funções de proteínas. Esta especificidade e suscetibilidade à S-nitrosilação é dependente de diversos fatores, entre eles, os relativos estruturalmente à proteína e também ao meio reacional da célula (ASTIER et al., 2011). A formação



do S-nitrosotiol pode estar favorecida em resíduos de cisteína mais ionizáveis, como aqueles rodeados por aminoácidos ácidos ou básicos. Assim foi definida uma região S-NO de consenso para a S-nitrosilação: os resíduos ácidos e básicos que flanqueiam a região não precisam estar apenas adjacentes à cisteína reativa na sequência primária, mas também podem estar na proximidade quando enovelados na estrutura tridimensional da proteína (LIU et al., 2010; STAMLER et al., 1997). Além disso, compartimentos hidrofóbicos da proteína podem promover a S-nitrosilação, já que núcleos hidrofóbicos da estrutura proteica podem concentrar NO e O<sub>2</sub>, induzindo a formação de agentes nitrosilantes *in situ* (SETH E STAMLER, 2010).

Ou seja, apesar das dificuldades em categorizar as propriedades gerais das cisteínas, pode-se dizer que este aminoácido pode comportar-se tanto como um resíduo hidrofóbico (devido à natureza hidrofóbica de aminoácidos quando "empacotados" dentro da estrutura da proteína), assim como quando exposto (acessível ao solvente na superfície molecular de proteínas) pode interagir com ligações hidrogênio (moléculas de água) ou com outros resíduos polares. Estas interações, por sua vez, podem polarizar a cisteína exposta influenciando seu pKa, sendo que estas cisteínas expostas são significativamente mais polares e seu pKa é próximo do pH fisiológico (MARINO E GLADYSHEV, 2012). Mesmo com pequenas variações de pH no meio fisiológico, os resíduos de cisteína expostos podem facilmente alterar seu caráter nucleofílico e experimentar mudanças repentinas eletrostáticas e de carga, alterações estas, que podem estender-se para regiões adjacentes ao resíduo na superfície molecular da proteína. Em algumas situações, estas mudanças eletrostáticas podem afetar a habilidade da proteína de interagir com o ambiente e com outras proteínas. Este fato mostra a alta responsividade de cisteínas expostas e explica por que as cisteínas são encontradas menos frequentemente nas superfícies moleculares para, por exemplo, sofrer uma MPT. Além dos aspectos intramoleculares, a colocalização das fontes de NO com a proteína alvo contribui para a especificidade da S-nitrosilação (ASTIER et al., 2011, MARINO E GLADYSHEV, 2012). Assim, a reatividade das cisteínas é dependente da exposição ao solvente e da protonação em seu grupo funcional e, fatores que aumentam a nucleofilicidade do átomo de enxofre dos resíduos de cisteína, incluindo o enovelamento e alosteridade, induzem a S-nitrosilação.

Recentemente, novos softwares que preveem sítios de S-nitrosilação têm sido desenvolvidos e estão disponíveis para consulta (<http://sno.biocuckoo.org/online.php>) (XUE et al., 2010). Estas

ferramentas são úteis para análises experimentais, assim como para triagens (*screening*) iniciais de proteínas potencialmente reguladas por esta MPT.

### 1.5 Mecanismos de defesa em plantas

Normalmente as plantas apresentam estratégias de defesa que retardam ou impedem a penetração de agentes fitopatogênicos, como fungos, bactérias ou vírus, podendo ser constitutivas ou induzidas. Além disso, as plantas reagem frente ao estresse abiótico, como variações de temperatura, ausência de água, alta salinidade ou tratamento com agentes químicos. A ativação deste mecanismo ocorre por meio de sucessivos eventos e sinais que se iniciam no reconhecimento do agente agressor pela planta e culmina com a ativação das barreiras físicas e químicas. Dentre as defesas utilizadas pelas plantas estão a resposta de hipersensibilidade (RH), resistência sistêmica adquirida (SAR), indução de proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas) e compostos sinalizadores, como por exemplo, ácido salicílico, peróxido de hidrogênio, etileno e ácido jasmônico (FERNANDES et al., 2009). A seguir serão abordados os mecanismos gerais de defesa em plantas, com ênfase na resposta de hipersensibilidade (RH) e via do ácido salicílico (AS), por estes processos estarem possivelmente envolvidos no assunto discutido na tese.

Estas respostas de defesa primária na planta incluem desde uma reorganização do citoesqueleto, fortificação da parede celular, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) até a síntese de fitoalexinas, enquanto os eventos tardios compreendem a transcrição de proteínas relacionadas à patogênese (PR) e desenvolvimento da resposta de hipersensibilidade (CLEMENCIA et al., 2014).

A RH em plantas é considerada um dos principais eventos da resposta de defesa da planta contra o ataque de patógenos, caracterizada por ser uma resposta rápida e localizada. Conceitualmente a RH é a indução da morte celular diretamente no sítio de ataque por patógenos, processo característico de resistência em plantas. Esta resposta é acompanhada pelo isolamento do patógeno no sítio de inoculação e pela ativação de mecanismos de defesa nas células vizinhas e pode ser comparado com outras formas de morte celular programada em plantas e com apoptose em animais (Figura 5) (DANIEL et al., 1999; FERNANDES et al., 2009). Este colapso do tecido vegetal ao redor do

sítio de infecção é causado pela liberação, principalmente de compostos tóxicos, os quais também atuam, em alguns casos, diretamente sobre o patógeno, ocasionando sua morte (FERNANDES et al., 2009).

Dentre as principais alterações decorrentes da RH está a indução da produção de diversas proteínas como as PR, destacando-se as peroxidases, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases. Outras respostas paralelas à infecção são o aumento da expressão da fenilalanina amônia liase (PAL) e deposição de lignina e aumento dos níveis de AS (VERBENE et al, 2000).

**Figura 5.** Resposta de hipersensibilidade em vegetais.



Processo de resposta de defesa característico da resposta de hipersensibilidade em plantas com o isolamento do patógeno em folha de feijão-caupi. Fonte: FERNANDES et al., 2009.

As primeiras observações da RH são do ano 1902 em infecções de *Puccinia glumarum* no trigo e o termo resposta de hipersensibilidade foi cunhado em 1915 para descrever uma reação de morte celular desencadeada por *Puccinia graminis* também no trigo. Este mecanismo é caracterizado pela retração do citoplasma, condensação da cromatina, expansão da mitocôndria combinados com características específicas de plantas, como a vacuolização e rompimento dos cloroplastos nos estágios finais. O cloroplasto possui um papel importante nas respostas

de defesa em plantas, já que constitui uma fonte de moléculas de sinalização como as EROs e ERNs e hormônios como o AS e o ácido jasmônico (AJ) (Figura 6). Outro ponto importante é que a luz é muitas vezes necessária para o desenvolvimento da RH. Molecularmente, os eventos moleculares que induzem a RH incluem o acúmulo de AS, EROs e ERNs, ativação de cascatas de MAPK quinase, mudanças nos níveis de cálcio intracelular, reprogramação transcricional e síntese de compostos antimicrobianos (COLL et al. 2011).

**Figura 6.** Esquema representativo de processo de morte celular em resposta à infecção em célula vegetal.

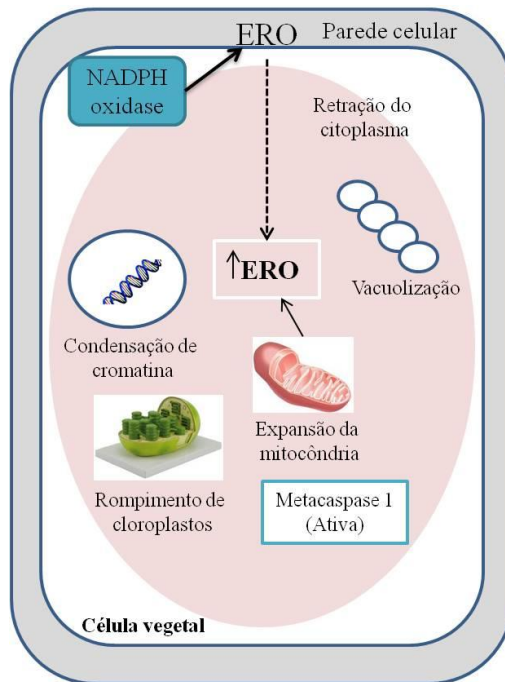


Diagrama representativo de algumas características da célula vegetal que sofre morte celular programada na resposta de hipersensibilidade. Adaptado de (COLL et al., 2011).

Agentes bióticos como fungos, bactérias e vírus ativam um tipo de resistência em plantas que é conhecida como Resistência Sistêmica

Adquirida (SAR), a qual depende do agente envolvido. Para que seja iniciada a SAR, a infecção inicial precisa resultar na formação de lesões necróticas, decorrentes da RH (acúmulo de peróxido de hidrogênio) ou como sintoma da doença (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000). A resistência induzida, que é inicialmente localizada na região de infecção, passa a ocorrer em locais da planta distantes do local da infecção pelo patógeno, ou do local de aplicação dos agentes eliciadores abióticos, caracterizando, assim, a resposta sistêmica adquirida (AGRIOS, 2004).

O mecanismo da SAR deve envolver uma cascata de eventos e sinais que se iniciam no momento da interação planta/patógeno ou do tratamento com fatores abióticos, levando a alterações no seu metabolismo celular com a emissão de sinais moleculares para outras partes da planta, reduzindo a severidade da doença. Em resposta a estes sinais, ocorre a síntese de algumas moléculas, entre elas, as PR, além da formação de barreiras estruturais, como a lignina. Moléculas como o NO, etileno, JA e SA, tem sido sugeridos como sinalizadores da SAR. (DOREY et al., 1997; DURNER et al., 1997).

Algumas destas PR-Proteínas encontram-se expressas em baixos níveis de forma constitutiva em plantas e seus níveis são aumentados quando submetidas a condições de estresse. A indução da expressão destas proteínas é mediada pela ação de substâncias sinalizadoras que são classificadas em dois tipos, conforme sua origem: elicitores endógenos, da própria planta; e elicitores exógenos (do patógeno ou componentes abióticos). Dentre os componentes abióticos estão o cloreto de mercúrio, etanol, bromo, ácido acetilsalicílico, AJ, etileno, AS e ácido 1,2,3-benzotiadiazol-7-carbotióico (BTH). Acredita-se que a ativação de alguns genes que codificam PR-Proteínas seja regulada pela cascata de transdução de sinais mediada pelo AS, interligando as duas vias (FERNANDES et al., 2009). Atualmente, as PR-Proteínas são classificadas em 17 grupos, variando de PR-1 até PR-17, baseando-se nas características de cada proteína (CHRISTENSEN et al., 2002).

O AS, que tem papel importante na RH e também na resistência sistêmica adquirida, juntamente com AJ e etileno regulam os sistema de defesa contra microrganismos. A sinalização dependente de etileno é importante para a resposta de plantas aos patógenos, ferimento mecânico e ferimento produzido por herbívoros. A sinalização dependente de AS é crítica para o estabelecimento da resistência local e sistêmica a bactérias, enquanto que a sinalização dependente de AJ é induzida principalmente em resposta ao ferimento. A intercomunicação entre as vias de sinalização permite à planta ajustar as respostas de

defesa, dependendo do tipo de invasor que encontra (AGRIOS, 2004; FERNANDES et al., 2009).

Integrando todas as vias que participam do sistema de defesa em plantas discutidas até o momento, pode-se dizer que: toda esta “explosão” oxidativa de EROs e ERNs compreende um sistema integrado e amplificado de sinalização, que envolve o AS no disparo dos mecanismos de defesa. Por sua vez, o desenvolvimento da HR, inicialmente desencadeado pela presença de EROs, promove o estabelecimento gradual da resistência sistêmica adquirida (SAR) (RESENDE et al., 2003).

### 1.6 Óxido nítrico e seus efeitos na S-nitrosilação

O óxido nítrico é uma molécula de sinalização envolvida em diversas funções em plantas e, devido a sua alta reatividade e efeito ambivalente dependendo da taxa e local de produção nas células, esta molécula tem se colocado em lugar de destaque nas pesquisas atuais. O NO regula diferentes processos através da indução da transcrição gênica ou ativando segundo mensageiros, além de induzir modificações em proteínas (GAUPELS et al., 2011; MARTINEZ-RUIZ et al., 2011). Além disso, o NO apresenta atividade em diversas situações de estresse para as plantas, entre elas: indução do fechamento de estômatos em períodos de seca, neutralização de metais pesados e salinidade, redução da toxicidade do alumínio e aumento da resistência à injúria mecânica (NARITA, 2010)

Quimicamente, o NO é uma molécula diatômica, composta por um átomo de oxigênio e um de nitrogênio e sua alta reatividade é conferida pela presença de um elétron desemparelhado no orbital  $\pi$  com meia vida de 1 a 10 segundos. É um gás tóxico, corrosivo, inodoro e levemente solúvel em água. Por ser solúvel em água e em solventes orgânicos, o NO é lipossolúvel e pode ser transportado rapidamente através da membrana celular (NAGANO E YOSHIMURA, 2002). Além da forma molecular, o NO ocorre em outras formas intercambiáveis: radical ( $\text{NO}^\circ$ ), cátion nitrosônio ( $\text{NO}^+$ ) e radical nitroxil (NO) (ASTIER et al., 2011).

Quanto ao modo de ação esta molécula age diretamente, quando o radical interage com biomoléculas, metais ou outros radicais livres, ou indiretamente, através de sua reação com o oxigênio ou ânion

superóxido, formando ERNs, capazes de interagir com proteínas, lipídios ou o DNA (NARITA, 2010).

Embora o NO tenha sido identificado há mais de 150 anos, foi no período de 1970-1990 que ele foi descrito como um gás transdutor de sinal (MARTINEZ-RUIZ et al., 2011). E foi na mesma época que se deu o início dos estudos da função do NO em plantas, quando foi observado que sua produção na soja tratada com herbicidas era diretamente proporcional à quantidade aplicada do agente químico.

As hipóteses para a atuação do NO no sistema de defesa em plantas envolve mecanismos nos quais esta molécula ativa a transcrição de genes relacionados à defesa. O desenvolvimento da resistência sistêmica adquirida pode estar envolvido na associação do NO e da S-nitrosoglutationa, que atuam como sinalizadores transportados pelo floema da planta (DURNER E KLESSIG, 1999). Além disso, foi demonstrado que o NO é capaz de induzir a morte celular programada em células de folhas de *Kalanchoe daigremontiana* e *Taxus brevifolia* (PEDROSO et al., 2000).

O NO apresenta várias funções nas respostas fisiológicas em plantas, como no desenvolvimento, sinalização hormonal e defesa. O mecanismo de como o NO regula estas respostas fisiológicas ainda não é claro, mas a S-nitrosilação é considerada uma das mais importantes modificações que regula a atividade e interação de proteínas (ROMERO-PUERTAS et al., 2013).

Feechan e colaboradores (2005) mostraram que mutações na enzima AtSNOGR1 (S-nitrosoglutationa redutase) de *A. thaliana* influenciam os níveis de NO na planta tanto em condições basais quanto em injúrias infecciosas. Na ausência da enzima, que normalmente regula os níveis de S-nitrosilação na célula por gerar o reservatório móvel de NO (SNOG), a resistência basal foi comprometida. Estes dados indicam que a S-nitrosilação de proteínas, que antes acreditava-se ser apenas controlada pela síntese de NO, possui um mecanismo de regulação de *turnover* (síntese e degradação) (STAMLER et al., 2001). Além disso, os pesquisadores mostraram que AtSNOGR1 regula positivamente a via do AS, a qual tem papel central na indução da resistência e defesa contra ataques de patógenos, como já demonstrado para *Pseudomonas syringae* (FEECHAN et al., 2005; RAFFAELE et al, 2006). Assim, a formação de moléculas nitrosiladas e sua renovação controlam a resistência a doenças de diferentes maneiras.

A invasão do patógeno desencadeia alterações rápidas no estado óxido-redutor da célula de eucariotos, inclusive de plantas. Estas alterações são orientadas pelo acúmulo de EROs e ERNs. Enquanto as

fontes de EROs são bem estabelecidas, as enzimas responsáveis pela geração de ERNs continuam controversas. Após o desencadeamento da resposta com produção de EROs e ERNs, tem sido reportado que vários reguladores sofrem S-nitrosilação em cisteínas altamente reativas e que apresentam baixo pKa, como já citado (YU et al., 2012).

Romero-Puertas e colaboradores (2007) sugerem como a atividade do NO pode controlar o acúmulo de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) durante a RH. Os pesquisadores mostraram que a S-nitrosilação de peroxidoredoxina II (PrxII), proteína responsável pela detoxificação de ONOO<sup>-</sup> e que é um potente oxidante, inibe este processo, causando um considerável aumento de peroxinitrito. Ou seja, o NO regularia os efeitos dos seus próprios radicais através da S-nitrosilação de componentes cruciais para o sistema de defesa antioxidante em plantas (ROMERO-PUERTAS et al., 2007).

Outro exemplo deste mecanismo é a S-nitrosilação *in vivo* do regulador de defesa AtSABP3 de *A. thaliana* na cisteína 280 quando há aumento na produção de NO após a invasão do patógeno. A inibição desta proteína, que participa do mecanismo do AS e na ativação da via da anidrase carbônica (ambas responsáveis pela ativação da defesa após a invasão do patógeno no hospedeiro), poderia contribuir como uma retroalimentação negativa das respostas de defesa em plantas, que por sua vez controlaria o processo (WANG et al., 2009).

Juntos, estes dados exemplificam a conexão molecular entre as alterações nos níveis de NO desencadeados pela invasão do patógeno e ativação da resistência a doenças e infecções.

Apesar de sua importância, ainda há controvérsias quanto a fonte de ERNs em vegetais, diferente das EROs. Existem sete possíveis mecanismos de geração destas ERNs em plantas, sendo que alguns deles parecem participar da defesa contra patógenos (GUPTA et al., 2011). Em mamíferos, ERNs são geradas através da enzima NO sintase (três isoformas caracterizadas) a partir da oxidação de arginina com geração de NO e citrulina, processo esse, dependente de NAPH. Apesar da identificação de uma enzima com atividade de NO sintase *in vitro* em algas verdes (*Ostreococcus tauri*) e com o sequenciamento do genoma de diversas espécies de plantas, ainda não foram identificados genes para esta enzima em plantas superiores. Outro fato importante é que quando são adicionados inibidores de NO sintase em extratos de plantas superiores, há redução na síntese de NO e citrulina (CORPAS et al., 2006; YU et al., 2012). Estes dados sugerem a existência de uma NO sintase em plantas, a qual deve ser estruturalmente distinta da enzima de mamíferos ou até mesmo de *O. tauri* (YU et al., 2012).



Além da NO sintase, há a enzima nitrato redutase (NR), que primariamente catalisa a redução de nitrato a nitrito, mas também causa a redução de nitrito a NO (Figura 7). No entanto, a eficiência desta reação é baixa e requer baixa tensão de oxigênio e altas concentrações de nitrito (ROCKEL et al., 2002).

**Figura 7.** Rotas da síntese de NO a partir de nitrito e arginina.

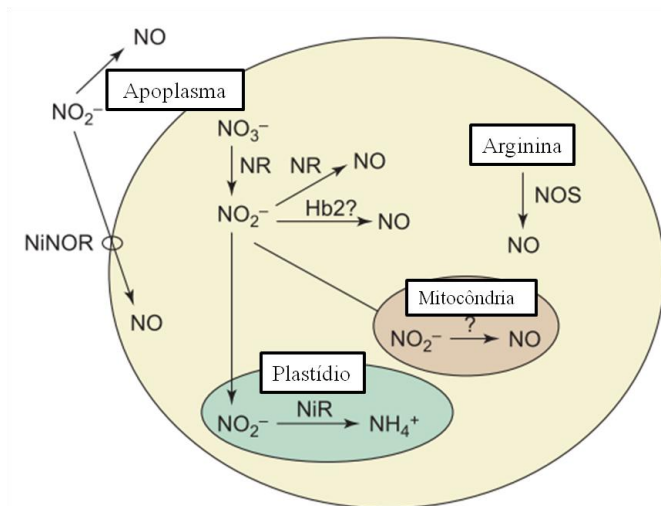


Diagrama mostrando mecanismos conhecidos e mecanismos postulados para a síntese de NO em plantas. O nitrito é reduzido a NO por vias não enzimáticas no apoplasto, nitrito-óxido nítrico redutase (NiNOR) na membrana plasmática, nitrato redutase (NR) no citosol, uma possível hemoglobina classe 2 e mitocôndria por mecanismos desconhecidos. A principal competição por estas reações é a redução do nitrito a amônio no plastídio. A reação dependente de arginina envolve a óxido nítrico sintase. Adaptado de CRAWFORD E GUO, 2005.

Como já discutido, o reconhecimento ao patógeno desencadeia a RH, limitando a infecção. Quando foi observado que em tomates infectados com cepas avirulentas de *Pseudomonas syringae* os níveis de SNO estavam aumentados, mostrou-se que a geração de ERNs e EROs, gerados por NADPH oxidases está em harmonia com o desenvolvimento da RH mediando a morte celular. O estudo mostrou

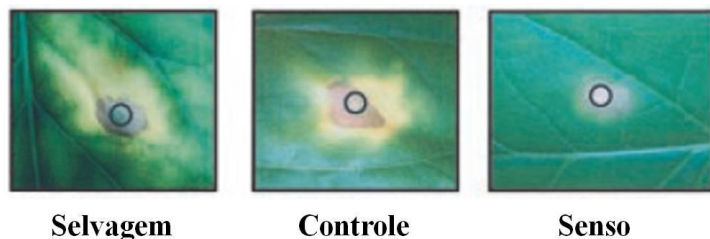
evidências genéticas que o aumento de S-nitrosotiois facilita a RH na ausência de AS e síntese de intermediários de EROs. Neste caso, quando a concentração de SNO estava alta ocorreu regulação por retroalimentação negativa limitando a RH mediada pela S-nitrosilação de NADPH oxidase abolindo a habilidade de sintetizar EROs e seus intermediários (YUN et al, 2011).

### 1.7 Fator de transcrição AtMYB30

A proteína MYB30 de *A. thaliana* (AtMYB30) é um fator de transcrição MYB R2R3 típico e tem sido reportado seu envolvimento, principalmente, no início da morte celular, durante o processo de resposta de hipersensibilidade (RH) e respostas de defesa e estresse (DANIEL et al., 1999; VAILLEAU et al., 2002).

Foi demonstrado que AtMYB30 é expressa preferencialmente durante a RH em resposta a patógenos como *Xanthomonas campestris* e *Pseudomonas syringae*, quando inoculados em *A. thaliana* nos seus estágios iniciais de desenvolvimento ou em culturas de células desta mesma planta. Estes resultados sugeriram uma forte correlação entre AtMYB30 e a morte celular, além de sua associação ao desenvolvimento (DANIEL et al., 1999). Vaillau e colaboradores (2002) demonstraram que a superexpressão de MYB30 em *Arabidopsis* e tabaco acelera e intensifica o aparecimento da RH em resposta a diferentes bactérias avirulentas, virulentas e fungos (Figura 8). Analisando plantas transgênicas que expressavam AtMYB30 constitutivamente, foi observado que a superexpressão de AtMYB30 acelera o aparecimento da RH em resposta a patógenos avirulentos e causa respostas semelhantes à RH quando os patógenos são virulentos. Além disso, observou-se um aumento da resistência contra diferentes bactérias e o fungo *Cercospora nicotianae*. Já nas linhagens de *Arabidopsis* anti-senso de AtMYB30, a morte celular causada pela RH foi fortemente diminuída ou suprimida em resposta a patógenos avirulentos, mostrando um fenótipo oposto as outras linhagens. Assim, os pesquisadores propõem que AtMYB30 é um regulador positivo de morte celular programada associada à resistência de plantas e expressa durante a RH (VAILLEAU et al., 2002).

**Figura 8.** Expressão da RH em *Arabidopsis thaliana*.



Sintomas da doença causada por *C. nicotianae* após 14 dias de inoculação em linhagens selvagem, controle e senso. O círculo preto indica o ponto de inoculação do patógeno (VAILLEAU et al., 2002).

Já foram propostos alguns modelos de metabolismo, nos quais AtMYB30 participaria de algumas vias importantes em plantas e estas serão discutidas a seguir.

Num trabalho desenvolvido por Raffaele e colaboradores (2006) foram usadas diferentes técnicas para elucidar o papel do AS na regulação de AtMYB30 na RH e a morte celular induzida pela superexpressão de AtMYB30. Os resultados mostraram que a ativação transcricional de AtMYB30 é dependente do acúmulo de AS e independente de NPR-1, principal proteína reguladora na ativação de genes de defesa dependentes de AS. Neste estudo, utilizando inoculações de *Pseudomonas syringae*, foi possível obter evidências moleculares de que este fator de transcrição está envolvido na cascata de sinalização que modula direta e indiretamente a síntese de AS, age através desta via e sua expressão é regulada por AS (RAFFAELE et al., 2006). Alguns destes pesquisadores também propuseram um modelo, através de análise de microarray de *Arabidopsis*, no qual AtMYB30 modula a RH via síntese de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) ou derivados, que funcionariam como mensageiros de morte celular em plantas, ativando genes envolvidos nos passos iniciais desta via biossintética. Ou seja, as plantas expressavam juntamente com AtMYB30, genes que codificavam as quatro enzimas do complexo acil-coA elongase (sintetiza o AGCL) que, por sua vez, seriam alvo de MYB30 (RAFFAELE et al., 2008).

Outra participação relatada de AtMYB30 é na amplificação de sinal de brassinosteróides, hormônios que agem no processo de crescimento e desenvolvimento de plantas, incluindo germinação, expansão celular,

fotomorfogênese, diferenciação vascular e resistência à senescência, estresse e doenças. AtMYB30 e BES-1 (fator de transcrição da via de brassinosteróides) funcionariam cooperativamente para promover a expressão de genes relacionados à via de brassinosteróides. Assim, eles estabeleceram um mecanismo no qual AtMYB30 seria um alvo para BES1, amplificando o sinal destes hormônios (LI et al., 2009).

Além destas evidências foi demonstrado que AtMYB30 pode sofrer sumoilação (modificação pós-traducional de proteínas caracterizada pela adição de uma proteína similar à ubiquitina em resíduos de lisina) (OKADA et al., 2009; ZHENG et al., 2012) e ser regulado pós-transcricionalmente via silenciamento de RNA (FROIDURE et al., 2010). Esta modificação por sumoilação, por exemplo, poderia funcionar como um processo de regulação da RH em plantas, desligando o mecanismo de defesa, por inibição de AtMYB30, o qual apresenta-se como regulador positivo da RH, através da ubiquitinação deste FT (MARINO et al., 2013). Juntos, estes dados demonstram que AtMYB30, um forte indutor da morte celular para a defesa de plantas contra ataque de patógenos, pode ser regulado via diversas modificações, sendo sua maioria, relacionada aos sistemas de defesa em plantas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência da modificação pós-traducional S-nitrosilação no fator de transcrição AtMYB30 de *Arabidopsis thaliana*, sua interação com o DNA e o efeito estrutural dessa modificação.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Clonar a sequência de DNA que codifica o domínio MYB de AtMYB30 de *A. thaliana* e inseri-lo no vetor de expressão pET-14b;
- Expressar de maneira heteróloga AtMYB30 de *A. thaliana* em bactérias *E. coli* pLysS (DE3) e purificá-la por cromatografia para caracterização;
- Avaliar a S-nitrosilação *in vitro* AtMYB30 de *A. thaliana*;
- Purificar as proteínas mutantes (AtMYB30 C49A, C53A e C49AC53A) e avaliar o efeito das mutações sobre a atividade, estrutura secundária, estrutura tridimensional e estabilidade térmica;
- Avaliar a capacidade das proteínas de se ligarem ao DNA e determinar a influência do NO nesta ligação;
- Analisar os efeitos estruturais do NO sobre as funções das proteínas;

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Clonagem do gene para o domínio de ligação ao DNA de AtMYB30 de *Arabidopsis thaliana*

O DNA complementar (cDNA) que codifica a proteína AtMYB30 *A. thaliana* foi fornecido pelo Centro de Pesquisa Biológica de *Arabidopsis* (Universidade do Estado de Ohio, Columbus, OH, USA). Este cDNA tem 409 pb e foi usado como molde para amplificar, por PCR, o domínio de ligação ao DNA de AtMYB30, aqui denominado de AtMYB30 (Figura 9). 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), AtMYB30anv (5'- GGA AAT CAT ATG GGA GTG AAG AAA GGG CC -3'), e o reverso continha o códon de terminação e o sítio de restrição *XhoI* (sublinhado), AtMYB30rev (5'- GTT AAC CTC GAG TTA GAG TTT CTT CTT CAA ATG AG -3').

**Figura 9.** Sequência de DNA que codifica o domínio MYB de ligação ao DNA da proteína AtMYB30.

```

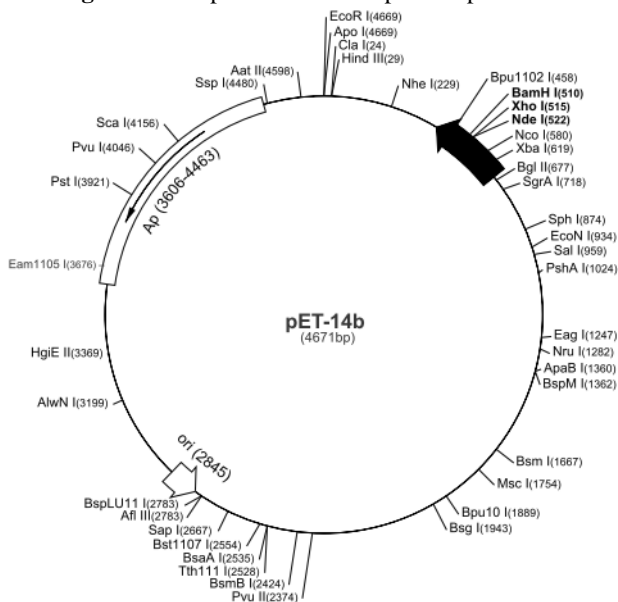
ATGGACTCCTGAAGAAGATATCATTTTAGTCACTTACATCC
AAGAACATGGTCCTGGTAATTGGAGAGCTGTTCTACCAA
TACTGGGCTGCTTAGATGCAGTAAGAGTTGTAGACTTAGA
TGGACAAACTATTTAAGGCCAGGAATCAAAAGAGGCAATT
TCACAGAACATGAAGAAAAGATGATTGTTCATCTCCAAGC
CCTCTTAGGAAATAGATGGGCTGCAATTGCGTCATATCTTC
CACAAAGGACAGACAATGACATTAAGAACTATTGGAACA
  
```

A amplificação por PCR usando Taq DNA polimerase 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<sub>2</sub>, 5 µL de tampão da Taq DNA polimerase (10x) e água ultra pura para um volume final de 50 µL. O programa do termociclador (MiniCycler) 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.

Após a finalização da amplificação, os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,3 µg/mL por meio de um transiluminador acoplado a um sistema de vídeo (UVP Bioimaging System). Os fragmentos obtidos foram extraídos do gel e purificados com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

Os fragmentos de DNA obtidos (379 pb) e o vetor de expressão pET-14b de 4671 pb (Novagene) foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* (Figura 10). Os produtos da digestão foram visualizados em gel de agarose 1% e a purificação foi feita da mesma forma já descrita acima. Em seguida foi feita a ligação dos fragmentos amplificados ao plasmídeo com a DNA ligase T4. O gene foi inserido sob o controle do promotor do fago T7 e dessa forma é dependente da RNA polimerase de T7 para ser expresso.

**Figura 10.** Mapa do vetor de expressão pET-14b.

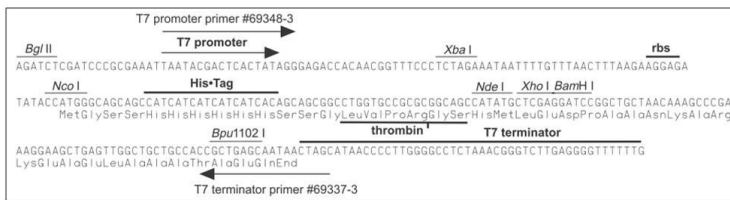


São mostrados os sítios de clivagem para as endonucleases *NdeI*, *BamHI* e *XhoI*, origens de replicação; genes marcadores de seleção e região promotora. Fonte: [www.novagen.com](http://www.novagen.com).

O gene foi inserido “in frame” e a jusante à sequência de DNA que codifica a seguinte sequência de aminoácidos incluindo uma cauda com 6 histidinas: MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH (Figura 11).

O plasmídio recombinante foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* DH5α conforme será abordado. Estas células são utilizadas como hospedeiras para a clonagem do gene e propagação do plasmídio. Clones com o plasmídio inserido foram identificados por PCR de colônia e confirmados por sequenciamento de DNA.

**Figura 11.** 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 *XhoI*.

Para a reação de PCR de colônia, uma colônia a ser analisada foi colocada em 50 µL de água, aquecida a 100°C por 5 min, homogeneizada e centrifugada a 10000 x g por 10 min. A reação de PCR foi feita com 10 µL do sobrenadante nas mesmas condições de PCR descritas acima. Como controle positivo foi utilizado como DNA molde o fragmento do gene que codifica AtMYB30.

### 3.2 Mutagênese sítio dirigida de AtMYB30

Com o intuito de verificar a importância das alterações funcionais e estruturais causadas pelos resíduos de cisteína na proteína estudada, foram construídos plasmídios com mutações neste aminoácido. Para isto, alguns códons do plasmídio recombinante pET-14bAtMYB30 foram mutados por PCR com o objetivo de obter as seguintes substituições em AtMYB30: C49A, C53A e C49AC53A. Para substituir a cisteína 49 ou a cisteína 53 para alanina, dois ciclos de PCRs foram feitos. No primeiro ciclo, duas metades do gene de AtMYB30



com a mutação desejada foram inseridas pelos iniciadores mutantes e amplificadas: **AtMYB30 C49A**: MUT49For 5'-GGG CTG CTT AGA GCT AGT AAG AGT-3' e MUT49Rev 5'-ACT CTT ACT AGC TCT AAG CAG CCC-3' / **AtMYB30 C53A**: MUT53for 5'-AGT AAG AGT GCT AGA CTT AGA TGG-3' e MUT53rev 5'-CCA TCT AAG TCT AGC ACT CTT ACT -3' / mutações inseridas estão sublinhadas). Os iniciadores MUT49For ou MUT53For foram usados em associação com AtMYB30rev e MUT49Rev ou MUT53Rev foi utilizada em associação com MD30For. Os dois fragmentos mutados obtidos foram então usados como molde para o segundo ciclo de PCR em combinação com os iniciadores AtMYB30For e MD30Rev nas mesmas condições descritas na seção acima. O duplo mutante AtMYB30 C49AC53A foi obtido da mesma maneira utilizando a sequência de DNA de AtMYB30 C53A como molde inicial. Os fragmentos de DNA obtidos foram então unidos ao vetor pGEM T-*easy* e então digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* e ligados ao vetor de expressão pET-14b previamente digerido com as mesmas enzimas. As mutações dos plasmídios foram verificadas e confirmadas por sequenciamento de DNA.

### 3.3 Preparação e transformação das bactérias competentes

O preparo das bactérias competentes e a transformação bacteriana foram baseados no protocolo descrito por Ausubel e colaboradores (1992). Para tornar as células de *E. coli* pLysS (DE3) ou DH5 $\alpha$  aptas a receber os vetores de expressão, as mesmas foram submetidas a um tratamento químico com cálcio. Bactérias *E. coli* pLysS (DE3) ou DH5 $\alpha$  foram semeadas por esgotamento em meio Luria Bertani (LB) sólido (1% NaCl, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura e 1,5% ágar pH 7,5) e cultivadas a 37 °C por 15 horas. Em seguida, as células foram cultivadas em 50 mL de meio LB líquido (1% NaCl, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura, pH 7,5) a 37 °C, sob agitação, até alcançar a densidade ótica (DO) de 0,4 em 600 nm. As células foram então centrifugadas a 2600 x g por 20 min a 4 °C. O precipitado celular foi homogeneizado com 25 mL de uma solução de cálcio (100 mM CaCl<sub>2</sub>) gelada, incubado por 1 hora em gelo e centrifugado novamente a 2600 x g durante 20 min a 4 °C. O precipitado celular foi finalmente homogeneizado em 5 mL de solução de cálcio contendo 20% de glicerol e as células foram incubadas

em gelo por 30 min (AUSUBEL et al., 1992). Por fim, as bactérias competentes foram separadas em alíquotas e armazenadas a - 80 °C.

Para transformar as bactérias competentes, 100 µL de células de *E. coli* pLysS (DE3) ou DH5α foram incubadas com 50 ng do vetor de expressão de interesse em gelo por 20 min. Após o período de incubação, as células sofreram um choque térmico: 1 min e 30 segundos a 42 °C e 2 min a 0 °C. Em seguida, as células foram estabilizadas com a adição de 500 µL de meio LB líquido, sendo mantidas a 37 °C durante 1 hora. Por fim, as células foram semeadas em meio LB sólido suplementado com o antibiótico para o qual o plasmídeo confere resistência (vetor pET14b, 100 µg/mL de ampicilina) e com cloranfenicol (50 µg/mL) quando bactérias *E. coli* pLysS (DE3) e cultivadas a 37 °C durante 15 horas (AUSUBEL et al., 1992). Como controle negativo, foi realizado o mesmo procedimento com células de *E. coli* pLysS (DE3) ou DH5α competentes que não receberam vetor de expressão.

### 3.4 Expressão do domínio de ligação ao DNA de AtMYB30 e mutantes

Os vetores de expressão pET14b AtMYB30 e seus respectivos mutantes foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* pLysS (DE3). Uma colônia recombinante, selecionada por resistência à cloranfenicol (50 µg/mL) e ampicilina (100 µg/mL), foi utilizada para inocular 10 mL de meio LB líquido suplementado com 50 µg/mL de cloranfenicol (50 µg/mL) e ampicilina (100 µg/mL). Os cultivos foram mantidos sob agitação a 37 °C durante 15 h. Do pré-inóculo, 5 mL foram transferidos para 250 mL de meio LB novo, suplementado com cloranfenicol (50 µg/mL) e ampicilina (100 µg/mL), no qual as bactérias continuaram crescendo sob agitação a 37 °C até alcançar DO<sub>600nm</sub> entre 0,6 e 0,7, medida através de leitura espectrofotométrica. Em seguida, a expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de 1 mM IPTG e o cultivo mantido sob agitação a 15 °C durante 15 h. Após a expressão das proteínas, os cultivos foram centrifugados a 6000 x g por 30 min a 4 °C e o precipitado celular (aproximadamente 2 gramas a partir de 1 L de cultivo) foi homogeneizado com 10 mL de tampão de

lise (500 mM Fosfato de sódio pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol) suplementado com inibidor de proteases (PMSF 40 µg/mL).

Finalmente, as células foram rompidas por sonicação em gelo (6 ciclos de 30 segundos, com intervalos de 60 segundos) e os homogenatos foram centrifugados (16000 x g por 30 min a 4 °C) para obtenção das frações solúveis, que posteriormente foram utilizadas para a purificação das proteínas recombinantes.

### 3.5 Purificação dos domínios de ligação ao DNA de AtMYB30 e mutantes

Todas as proteínas expressas com uma cauda de seis resíduos de histidina na porção N-terminal, foram purificadas em condições nativas por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC) com colunas carregadas com cobre (HisTrap HP 1 mL, GE Healthcare) conectadas a um cromatógrafo ÄKTA (GE Healthcare). Antes de ser carregada com a amostra, a coluna foi previamente equilibrada com 500 mM Fosfato de sódio pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol. As proteínas que ligaram à coluna, devido à interação dos resíduos de histidina da cauda N-terminal com os íons de cobre, foram eluídas com um gradiente de 20 a 500 mM imidazol, o qual compete quimicamente com as cadeias laterais dos resíduos de histidina, em um fluxo de 1 mL/min e em frações de 1 mL. Alíquotas de cada fração foram coletadas para visualização em SDS-PAGE 16%, sob condições desnaturantes e redutoras e foi corado com azul de Coomassie R-250 0,25%. Após o processo de purificação das proteínas, as amostras foram alíquotadas e armazenadas a -80°C e, dependendo do tipo de análise, o excesso de imidazol foi retirado através de filtros ou diálises.

A quantificação do conteúdo proteico foi estimada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976) com albumina de soro bovino como padrão ou por espectrofotometria a 280 nm na presença de 6 M de hidrocloreto de guanidina (EDELHOCH, 1967; PACE et al., 1995), levando em consideração a absorvidade molar de cada proteína (selvagem e mutantes). O valor da absorvidade molar foi determinado a partir da estrutura primária de cada proteína no site [www.expasy.ch/tools/protparam.html](http://www.expasy.ch/tools/protparam.html).

### 3.6 Identificação das proteínas por Espectrometria de Massa (MS)

Para confirmar a identidade das proteínas, foi realizada a digestão enzimática *in-gel* (SHEVCHENKO et al., 1996) seguida de espectrometria de massa MALDI/TOF. As bandas contendo as proteínas foram retiradas do gel (SDS-PAGE) e descoradas com 500  $\mu\text{L}$  de uma solução de descoloração contendo 50% de acetonitrila (ACN) em 25 mM de bicarbonato de amônio pH 8,0 sob agitação até a completa descoloração. Em seguida, foram desidratadas com 100  $\mu\text{L}$  de ACN por 15 minutos. Posteriormente, a ACN foi removida e os fragmentos remanescentes do gel foram secos em sistema de centrifugação a vácuo (Speed Vac/Eppendorf) durante 10 minutos. As bandas de gel foram reidratadas com 10  $\mu\text{L}$  de tripsina (Promega) em 25 mM de bicarbonato de amônio pH 8,0, na concentração final de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , durante 30 min em gelo, em seguida foram incubadas a 37 °C durante pelo menos 12 horas.

Após a digestão enzimática, os peptídeos foram eluídos do gel com 45  $\mu\text{L}$  de solução de extração contendo 50% de ACN e 5% de ácido trifluoroacético (TFA). Foram realizadas duas etapas de extração durante 30 minutos em vórtex e em cada etapa o sobrenadante foi transferido a um novo microtubo. Todas as alíquotas de sobrenadante da respectiva proteína foram reunidas e concentradas durante 1 hora em um sistema a vácuo até secagem completa.

As análises de espectrometria de massa foram realizadas em um espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF/TOF modelo Autoflex III Smartbean (Bruker Daltonics). Os peptídeos extraídos foram solubilizados em 10  $\mu\text{L}$  0,1 % de TFA. Uma amostra de 1  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi homogeneizada com 1  $\mu\text{L}$  da solução saturada da matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (5 mg/mL em 50% ACN, 0,1% TFA). Em seguida, 1  $\mu\text{L}$  desta mistura foi aplicada diretamente na placa do espectrômetro MALDI/TOF e submetida à cristalização a temperatura ambiente. Após a cristalização da amostra foram realizadas as análises espectrométricas em modo positivo. A calibração externa foi realizada usando o kit *Peptide Standard* (Bruker Daltonics). Os espectros gerados foram analisados com o programa FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics). As proteínas foram identificadas por comparação com a lista de peptídeos da digestão teórica (ProteinProspector MS-Digest [www.prospector.ucsf.edu](http://www.prospector.ucsf.edu)) com o perfil de *peptide mass fingerprinting* (PMF) obtido por MS.

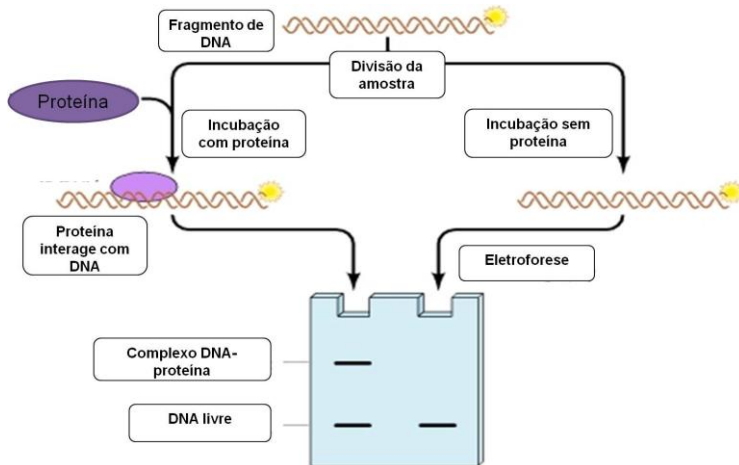
A massa molecular das proteínas foi confirmada por MS de massa intacta. Uma amostra solúvel de AtMYB30 e suas mutantes (1  $\mu$ L), concentração final de 5  $\mu$ M, foi homogeneizada com 1  $\mu$ L de matriz (ácido sinapínico: 10 mg/mL em 30% ACN, 0,1% TFA) e analisada como descrito acima. A calibração externa foi realizada usando o kit *Protein Standard II* (Bruker Daltonics).

### 3.7 Ensaio de retardamento de migração eletroforética

A capacidade de ligação ao DNA do fator de transcrição AtMYB30 e mutantes foi avaliada através do ensaio de retardamento de migração eletroforética (EMSA) usando uma sequência de oligonucleotídeos de fita dupla marcada com Alexa 647 (5'-/Alexa647N/  
CTTTCTTTACCTACCACCAACCTAACGGTCAAAACCACCAAACCTCTG-3') (Sítio de ligação MYB com elementos AC estão sublinhados) (LI et al., 2009; PROUSE E CAMPBELL, 2012). As reações foram feitas num volume de 40  $\mu$ L em tampão de reação contendo 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 5% glicerol e 0,4  $\mu$ M das proteínas indicadas (selvagem ou mutantes). As amostras tratadas com o doador de NO, nitroprussiato de sódio (NPS) 1 mM, foram incubadas a 4 °C por 15 minutos e, após o tratamento para a S-nitrosilação, 250 nM de oligonucleotídeo fluorescente foi adicionado à reação e esta incubada por 15 min a 4°C. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel nativo 10 % de poliacrilamida usando sistema de tampão tris-borato EDTA (TBE) a 4°C. Para a detecção da fluorescência das amostras foi utilizado o scanner de fluorescência FLA-9000 (GE Healthcare) e visualização do gel.

Nas análises quantitativas do ensaio de EMSA, para os cálculos das constantes de dissociação ( $K_D$ ) dos experimentos, correspondendo à constante de equilíbrio de dissociação do complexo DNA-proteína, o mesmo procedimento acima foi feito com concentrações crescentes das

**Figura 12.** Esquema representativo da técnica de Ensaio de retardamento de migração eletroforética (EMSA) para análise da interação DNA-proteína.



O fragmento de DNA específico é incubado com a proteína em análise ou sozinho e submetido à eletroforese para efeito comparativo entre as amostras, na qual ocorre retardamento da migração do complexo na amostra em que ocorre a interação.

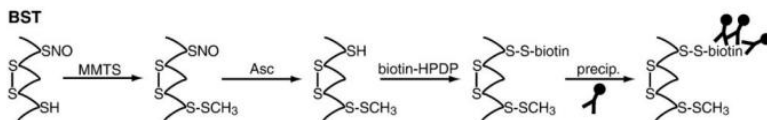
respectivas proteínas, variando de 5 a 500 nM com adição de 125 nM de sonda fluorescente. As amostras foram então visualizadas em fotodocumentador Gel Logic 200 (Kodak) e as bandas quantificadas através do programa KODAK Molecular Imaging Software 5.0 (Carestream Health, USA).

### 3.8 Ensaio de biotilação para detecção de proteínas S-nitrosiladas

Com o intuito de investigar se AtMYB30 e as proteínas mutantes são S-nitrosiladas foi realizado o ensaio de biotilação (*biotin switch*) (Figura 13) segundo Jaffrey e Snyder (JAFFREY; SNYDER, 2001), com algumas modificações. Alíquotas de proteínas, normalmente armazenadas em tampão fosfato, foram submetidas à diálise em tampão HEN (250 mM HEPES pH 7,7, 1 mM EDTA, 0,1 mM neocuproína). Em seguida, a concentração de proteína foi ajustada a 0,5 mg/mL e a amostra proteica foi tratada com 1 mM de S-nitrosoglutationa (SNOG) ou S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) por 30 min, na ausência de

luz, em temperatura ambiente. Após a nitrosilação, as amostras foram incubadas por 30 min com quatro volumes de tampão de bloqueio (HEN, 2,5 % SDS, 27 mM metil-metano-tiosulfonato - MMTS) a 50 °C, sob frequente agitação. O MMTS residual foi removido por precipitação com 10 volumes de acetona gelada (-20 °C) e a amostra foi ressolubilizada em tampão HENS (HEN mais 1 % SDS). Em seguida, as cisteínas S-nitrosiladas foram novamente reduzidas com 1 mM de ascorbato de sódio por 10 min, a temperatura ambiente. Após a redução, as cisteínas livres foram biotiniladas com 2 mM de biotina-HPDP (Thermo Scientific) por 1h, a temperatura ambiente. Como controle negativo, as amostras foram tratadas com 1mM de glutathiona reduzida (GSH) ao invés de SNOG ou com DMSO ao invés de SNAP e como controle positivo, realizou-se a S-nitrosilação da PtpA de *M. tuberculosis* (MATIOLLO et al., 2013).

**Figura 13.** Detecção de proteínas S-nitrosiladas pela técnica de Biotin-Switch.



Tióis livres são primeiro S-metilados com MMTS sob condições desnaturantes. Em um segundo passo, resíduos de cisteína S-nitrosilados são denitrosilados com ascorbato e, assim os tióis são biotinilados para posterior detecção. Adaptado de FOSTER, 2011.

Para detectar a biotinilação por *western blot*, as proteínas do ensaio de biotinilação foram separadas por SDS-PAGE 10%, transferidas à membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF). Em seguida, a membrana foi bloqueada com 25 mL da solução de PBS-T (PBS mais 0,1% Tween 20) suplementado com leite em pó desnatado (5%) durante 12 horas a 4 °C. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com 25 mL PBS-T contendo o anticorpo de camundongo anti-biotina (dilução 1:10.000) (Sigma) por 1 h sob agitação, em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada com PBS-T e incubada em temperatura ambiente por 1 h sob agitação com 25 mL PBS-T contendo o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo do kit *Amersham ECL Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare), diluição 1:30.000. Para detecção da fluorescência da formação do

complexo através do anticorpo secundário foi usado o digitalizador de fluorescência FLA-9000 (GE Healthcare).

### 3.9 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) de AtMYB30 e mutantes

As análises de espectroscopia de AtMYB30 e suas mutantes foram realizadas em um espectropolarímetro JASCO J-815 equipado com um controlador de temperatura e uma unidade de fluorescência. Para avaliar o conteúdo de estrutura secundária das proteínas, observar possíveis alterações estruturais causadas pelas mutações ou nitrosilações nos resíduos de cisteína, espectros de CD UV-distante foram obtidos em um intervalo de comprimento de onda entre 190 a 260 nm, a 15 °C, com 10 µM de proteína em tampão contendo 10 mM Hepes, pH 7,4 com SNOG como doador de NO ou GSH como seu controle negativo a 1 mM. Para verificar a reversibilidade da S-nitrosilação nas proteínas, as amostras foram incubadas com 1mM de DTT após o tratamento com SNOG. Os experimentos foram realizados em cubeta de quartzo com caminho óptico de 2 cm, com velocidade de varredura de 50 nm/min, resolução de 0,1 nm, resposta de 8 segundos e largura de faixa de 2 nm. Em cada experimento, foram obtidos a média de 3 espectros consecutivos e de cada espectro de proteína foi subtraído o espectro do tampão ou tampão mais agente nitrosilante e DTT.

A estabilidade térmica de AtMYB30 e suas mutantes foi avaliada por CD monitorando a elipticidade a 222 nm em uma faixa de temperatura de 4 a 70 °C, com aumento gradual de 1 °C, com um período inicial de equilíbrio de 10 min a 4 °C. O mesmo experimento foi feito para avaliar o efeito da S-nitrosilação na estabilidade térmica da proteína usando SNOG como doador de NO e GSH como controle negativo. As proteínas foram pré-incubadas com 1mM de SNOG ou GSH por 30 min a 25°C no escuro. Em cada experimento, foi obtida a média de 3 espectros consecutivos e de cada espectro de proteína foi subtraído o espectro do tampão ou tampão mais agente nitrosilante.

Estes experimentos foram realizados com 10 µM de proteína em tampão contendo 10 mM Hepes, pH 7,4 em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 2 cm. As temperaturas médias de desnaturação ( $T_m$ ) para cada proteína foram calculadas a partir das curvas de elipticidade a



222 nm *versus* a temperatura por regressão não linear (curva sigmoideal de Boltzmann) no programa GraphPad Prism 5.0.

### 3.10 Fluorescência Intrínseca de AtMYB30 e mutantes na análise da interação com o DNA

Para a realização destes experimentos trocou-se o tampão proteico para o tampão de reação contendo 10 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA e 5% glicerol e posteriormente as amostras de proteína foram concentradas por meio de centrifugação com filtros Microcon 10 kDa (Millipore). Espectros de fluorescência foram obtidos com 2  $\mu$ M de proteína em tampão de reação com adição crescente de oligonucleotídeos (1;2,5; 4; 5,5; 7; 8,5; 10 e 11,5  $\mu$ M) específicos e marcados fluorescentemente com Alexa 647. A cada alíquota de oligonucleotídeos adicionada, a amostra foi mantida em um período inicial de equilíbrio e ligação de 15 min. Os experimentos foram realizados em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm, com um comprimento de onda de excitação de 280 nm, espectros de emissão entre 260 e 400 nm e largura de faixa de 10 nm. Em cada experimento, foi obtida a média de 3 espectros consecutivos e de cada espectro de proteína foi subtraído o espectro do tampão. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

### 3.11 Purificação dos peptídeos S-nitrosilados e espectrometria de massa

Após a S-nitrosilação *in vitro* e subsequente biotilação de AtMYB30, como descrito anteriormente, uma alíquota contendo 100  $\mu$ M de proteína biotilada foi submetida à precipitação com acetona a -20°C para retirada do excesso de biotina-HPDP. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas em tampão 25 mM Tris HCl e 1 mM EDTA, pH 7,7 para digestão com a endoproteínase LyS-C (Promega, Madison, WI) e incubadas por 16 h a 37 °C. Após a clivagem foram adicionados 40  $\mu$ L de neutravidina-agarose (Thermo Fisher Scientific) com incubação por 1 h a temperatura ambiente sob leve agitação a cada

10 minutos. A matriz foi então lavada com dois volumes de tampão de neutralização contendo 20 mM HEPES, pH 7,7, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 600 mM NaCl e 0,5% Triton X-100), centrifugada a 16000 g. Os peptídeos ligados à matriz de neutravidina foram eluídos com tampão de neutralização contendo 100 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol e a amostra seca em sistema de centrifugação a vácuo (Speed Vac/Eppendorf). Uma alíquota de 1  $\mu$ L dos peptídeos purificados e concentrados foram misturados com 1  $\mu$ L da solução saturada da matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (5 mg/mL em 50% ACN, 0,1% TFA). Em seguida, 1  $\mu$ L dessa mistura foi aplicada diretamente na placa do espectrômetro MALDI/TOF e submetida à cristalização a temperatura ambiente. Após a cristalização da amostra foram realizadas as análises espectrométricas em modo positivo como descrito anteriormente.

### 3.12 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) de AtMYB30 e mutantes na análise da interação com o DNA

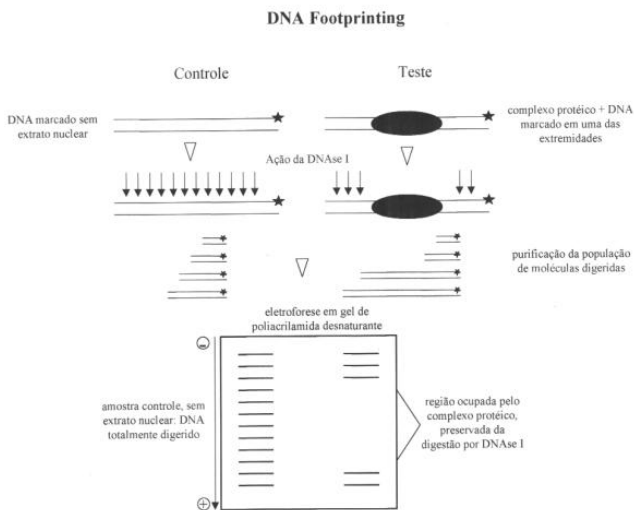
As análises de espectroscopia de AtMYB30 e suas mutantes quando em interação com o DNA foram realizadas em um espectropolarímetro JASCO J-815 equipado com um controlador de temperatura. Para avaliar o conteúdo de estrutura secundária das proteínas e observar possíveis alterações estruturais causadas por esta interação DNA-proteína, espectros de CD UV-distante foram obtidos em um intervalo de comprimento de onda entre 190 a 260 nm, a 15 °C, com 10  $\mu$ M de proteína em tampão contendo 10 mM Tris pH7,5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA e 5% glicerol e adições crescentes (5 a 25  $\mu$ M) de oligonucleotídeo específico. Os experimentos foram realizados em cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,5 nm, com velocidade de varredura de 50 nm/min, resolução de 0,1 nm, resposta de 8 segundos e largura de faixa de 2 nm. Em cada experimento, foram obtidos a média de 3 espectros consecutivos e de cada espectro de proteína foi subtraído o espectro do tampão ou tampão mais oligonucleotídeo.

### 3.13 Análise dos sítios de interação no DNA por *DNase I Footprint*

A análise por *DNase I footprint* do oligonucleotídeo de fita dupla marcado com fluorescência (5'-/56-

FAM/CAGAGGTTTGGTGGTTTGACCGTTAGGTTGGTGGTAGG TAAAGAAAG-3' /Sequência complementar à fita contendo sequência de ligação à AtMYB30 sublinhada) foi feita a partir da reação já descrita para os experimentos de EMSA contendo cerca de 10 pmoles de DNA e com concentrações crescentes de AtMYB30 (50 a 100  $\mu$ M; em um volume de reação de 50  $\mu$ l). A enzima DNase I (60 U) foi então adicionada, a clivagem mantida por 5 min e a reação parada por precipitação com o sistema EDTA/glicogênio/Etanol (HENGGEN, 1996). Os produtos da reação foram então ressuspensos no tampão de corrida e separados em gel de sequenciamento de acrilamida 16%. Como controles foram usadas as reações de DNA tratado com DNase I sem proteína para formação do complexo e o DNA tratado pela reação de Maxam-Gilbert G + A, neste caso, o fragmento foi tratado com ácido fórmico e piperidina de acordo com os procedimentos padrões (DEXHEIMER E POMMIER, 2008).

**Figura 14.** Análise da interação DNA-proteína por *DNase I Footprint*.



Na presença da proteína ligada à sonda, um espaço denominado “footprint” é observado no gel, revelando as bases de DNA que interagem com a proteína em análise. Fonte: LIN E BARBOSA, 2002.

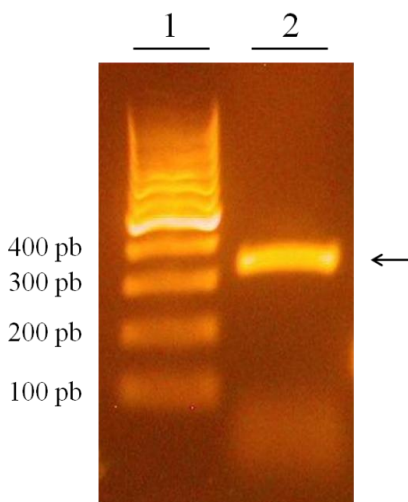
Esta técnica baseia-se no fato da ligação de uma proteína a uma fita de DNA proteger este último contra ação de clivagem de um agente químico ou de uma enzima. Assim, quando uma fita de DNA marcada em uma das extremidades sofre a ação degradante de uma substância química ou enzima uma série de fragmentos de diversos comprimentos é gerada. Todos estes fragmentos terão uma extremidade comum e o seu número e comprimento dependerá da especificidade de sequência do agente utilizado na reação. Por outro lado, se a ligação de uma proteína a esta fita de DNA produzir um ou mais pontos de proteção contra o ataque, fragmentos de uma determinada faixa de comprimento não serão produzidos quando a reação de clivagem for precedida por incubação da fita de DNA com esta proteína. Quando produtos de clivagem gerados na presença e na ausência de proteína ligadora de DNA são resolvidos lado a lado numa eletroforese em condições desnaturantes, observar-se-ão falhas na linha correspondente ao DNA incubado com a proteína. Estas falhas são os *footprints* da proteína analisada (Figura 14) (DEY et al., 2012; LIN E BARBOSA, 2002).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Clonagem do gene para o domínio de ligação ao DNA de AtMYB30 de *Arabidopsis thaliana*

Um fragmento de 379 pb (Figura 15), correspondente à região do gene *myb30* que codifica o domínio de ligação ao DNA (AtMYB30), foi obtido da amplificação a partir do cDNA da proteína AtMYB30 clonado no vetor U16062, a qual possui 350 aminoácidos com uma massa molecular de 41 kDa.

**Figura 15.** Amplificação do fragmento que codifica o domínio de ligação ao DNA de AtMYB30.

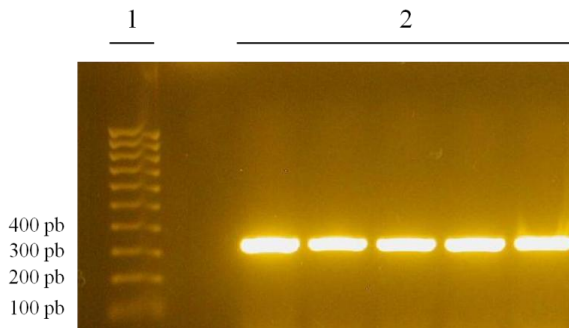


Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1. Marcador de massa molecular. 2. Banda corresponde ao fragmento amplificado de 379 pb do inserto (indicado pela seta) utilizado posteriormente como DNA molde.

Para confirmar quais colônias bacterianas (*E. coli* DH5 $\alpha$ ) possuíam o plasmídio com o gene de interesse foi feito PCR diretamente das colônias após a transformação. Os fragmentos amplificados

apresentaram os 379 pb esperados que correspondem ao fragmento do gene inserido ao vetor (Figura 16).

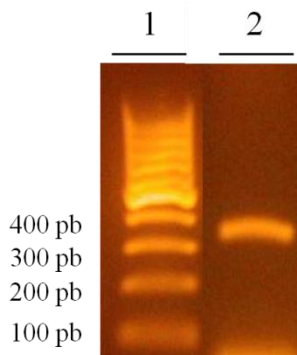
**Figura 16.** PCR de colônia de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas com o vetor pET-14b-AtMYB30.



Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1. Marcador de massa molecular. 2. Amplificação do fragmento de 379 pb correspondente a AtMYB30.

As colônias positivas foram cultivadas em meio LB para realizar a extração dos plasmídios contendo o inserto de interesse. Após a extração, os plasmídios foram digeridos com as enzimas de restrição *Nde*I e *Xho*I para averiguar se os fragmentos de AtMYB30 estavam inseridos nos vetores. A digestão liberou um fragmento de aproximadamente 379 pb de acordo ao esperado (Figura 17). Os plasmídios foram sequenciados e a presença do fragmento que codifica o AtMYB30 foi confirmada.

**Figura 17.** Digestão dos plasmídios com as enzimas *NdeI* e *XhoI*.



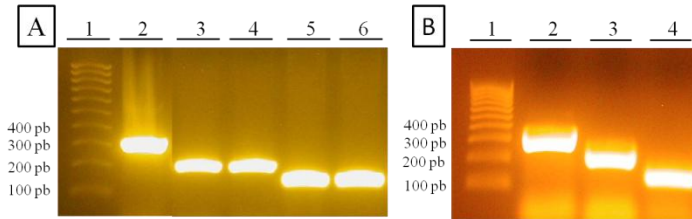
Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1. Marcador de massa molecular. 2. Fragmento de 379 pb (inserto) liberado após a digestão pelas enzimas na confirmação da inserção do gene de interesse nos plasmídios.

#### 4.2 Mutagênese sítio dirigida de AtMYB30

Para investigar os resíduos envolvidos na ligação ao DNA e na S-nitrosilação de AtMYB30, os resíduos de cisteína 49 e 53 foram substituídos por um resíduo de alanina individualmente e concomitantemente. Os plasmídios mutantes, AtMYB30\_C49A, AtMYB30\_C53A e AtMYB30\_C49AC53A, foram construídos através de mutação sítio-dirigida utilizando como molde o plasmídio não mutado de AtMYB30 (para os simples mutantes C49A e C53A) e o plasmídio mutante AtMYB30\_C53A (para o duplo mutante AtMYB30\_C49AC53A) através de reações de PCR com vetores de expressão pET 14b e iniciadores contendo o códon para as mutações.

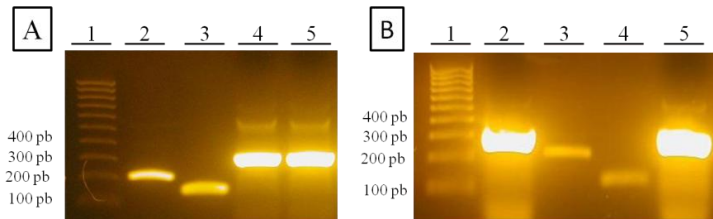
Para os três mutantes separadamente, o fragmento gênico de AtMYB30\_C49A, AtMYB30\_C53A ou AtMYB30\_C49AC53A, foi amplificado com dois grupos de iniciadores, gerando dois fragmentos: A com 231 pb e B com 148 pb (Figura 18A e 18B). Posteriormente, foi realizada uma PCR para unir os fragmentos A e B, gerando a sequência completa dos fragmentos gênicos dos três mutantes, os quais possuem 379 pb cada (Figura 19).

**Figura 18.** Amplificação dos gene mutantes de AtMYB30 de *Arabidopsis thaliana*.



Eletróforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. (A) Mutação sítio-dirigida de AtMYB30\_C49A e C53A. 1, marcador de massa molecular. 2, fragmento selvagem (controle positivo). 3, fragmento A, 232 pb. 5, fragmento B, 148 pb do mutante C49A. 4, fragmento A, 232 pb. 6, fragmento B, 148 pb do mutante C53A. (B) Mutação sítio-dirigida de AtMYB30\_C49AC53A. 1, marcador de massa molecular. 2, fragmento selvagem (controle positivo). 3, fragmento A, 231 pb. 4, fragmento B, 148 pb.

**Figura 19.** União dos fragmentos da mutação-sítio dirigida de AtMYB30.



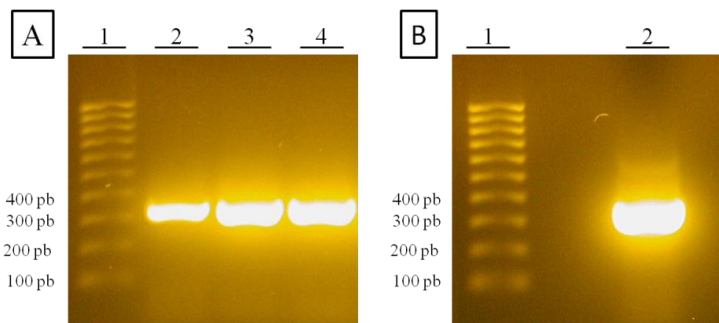
Eletróforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. (A) 1, marcador de massa molecular. 2. Fragmento A, 232 pb e 3, Fragmento B, 148 pb, ambos do mutante C49A. 4, união de A e B, 379 pb do mutante AtMYB30\_C49A. 5, união de A e B, 379 pb do mutante AtMYB30\_C53A. (B) 1, marcador de massa molecular. 2, fragmento selvagem (controle positivo). 3 e 4, iniciadores como controle negativo 5, fragmento mutado, união de A e B, 379 pb do duplo mutante AtMYB30\_C49AC53A.

Após a união dos fragmentos, esses foram ligados ao vetor pGEM T-*easy*, através das suas adeninas livres nas extremidades 5' complementares às timidinas livres nas extremidades 3' do pGEM e



transformadas em *E. coli* DH5 $\alpha$  e submetidas a PCR de colônia, confirmando a inserção (Figura 20).

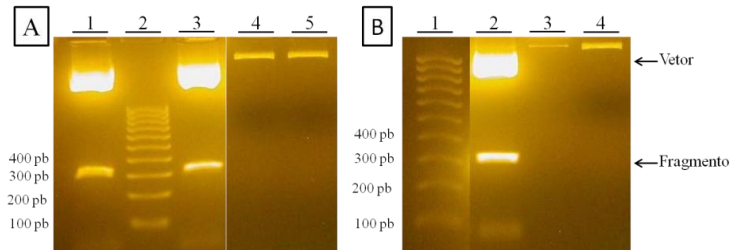
**Figura 20.** PCR de colônia das colônias de *E. coli* DH5 $\alpha$  com inserção do vetor pGEM T\_AtMYB30.



Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. (A) 1, marcador de massa molecular. 2. fragmento selvagem (controle positivo). 3. Amplificação do fragmento que codifica AtMYB30\_C49A. 4. Amplificação do fragmento que codifica AtMYB30\_C53A. (B) 1, marcador de massa molecular. 2, Amplificação do fragmento que codifica AtMYB30\_C49C53A.

Após a inserção dos fragmentos ao vetor pGEM T-*easy*, estes e o plasmídeo pET-14b foram digeridos com as enzimas de restrição *Nde*I e *Xho*I para confirmação da inserção do fragmento de 379 pb liberado (Figura 21), assim como preparação do vetor pET-14b para posterior ligação.

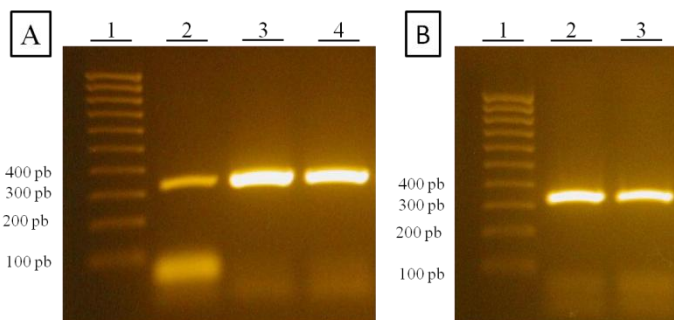
**Figura 21.** Digestão dos vetores pGEM T-*easy* e do plasmídios pET-14b para construção dos plasmídios mutantes de AtMYB30.



Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. (A) 1. Vetor pGEM\_ATMYB30 C49A digerido. 2. marcador de massa molecular. 3. Vetor pGEM\_ATMYB30 C53A digerido. 4 e 5. Plasmídio pET-14b digerido. (B) 1, marcador de massa molecular. 2, Vetor pGEM\_AtMYB30 C49AC53A digerido. 3 e 4. Plasmídio pET-14b digerido.

O fragmento gênico digerido, contendo extremidades coesivas, após a purificação, foi então clonado no vetor pET-14b digerido com as mesmas enzimas de restrição. Após a clonagem, o pET-14b-D MYB30 C49A, C53A ou C49AC53A foram usados para transformar bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$ , e a partir das colônias recombinantes foi realizada uma reação de PCR diretamente das colônias transformadas. Os fragmentos amplificados apresentaram aproximadamente 379 pb que correspondem ao fragmento de cada um dos genes inseridos no vetor pET-14b (Figura 22A, 22B).

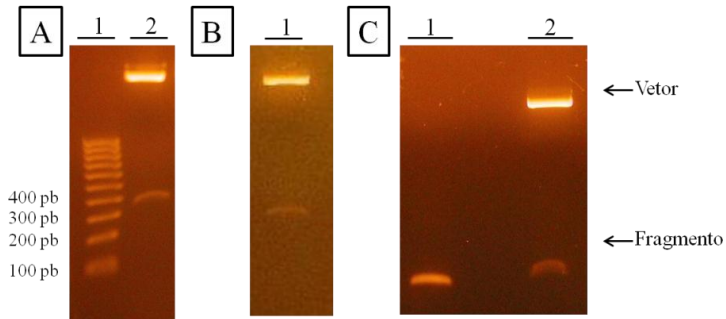
**Figura 22.** PCR de colônia das colônias de *E. coli* DH5a com inserção dos vetores mutantes de AtMYB30.



Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. (A) 1, marcador de massa molecular. 2, fragmento selvagem (controle positivo). 3, Amplificação do fragmento que codifica AtMYB30\_C49A. 4, Amplificação do fragmento que codifica AtMYB30\_C53A. (B) 1, marcador de massa molecular. 2, Amplificação do fragmento que codifica AtMYB30\_C49AC53A.

As colônias positivas foram cultivadas em meio LB para realizar a extração dos plasmídios contendo o inserto de interesse. Após a extração, os plasmídios foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoHI* para averiguar se os fragmentos de cada um dos mutantes de AtMYB30 estavam inseridos nos vetores. A digestão liberou um fragmento de aproximadamente 379 pb de acordo com o esperado (Figura 23). Os plasmídios foram sequenciados e foi confirmada a presença dos genes que codificam AtMYB30 contendo as mutações simples C49A e C53A e a dupla C49AC53A.

**Figura 23.** Confirmação da inserção do fragmento AtMYB30 no vetor pET-14b.



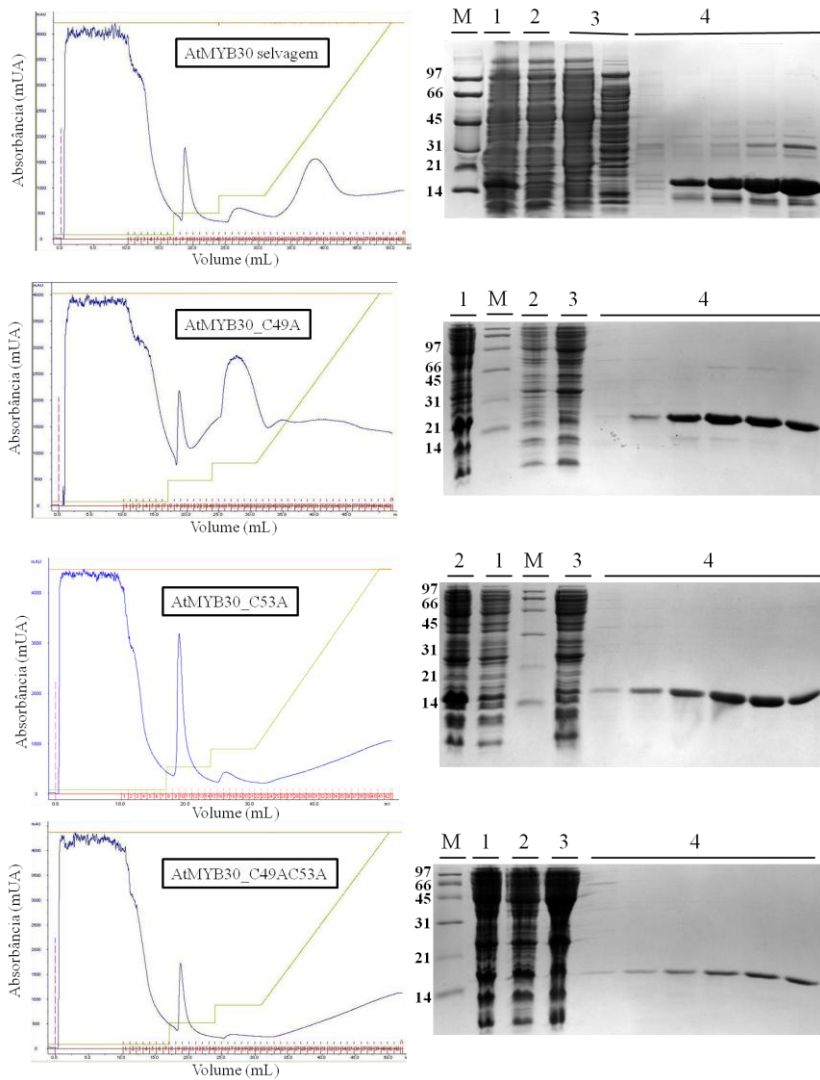
Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. (A) 1, marcador de massa molecular. 2, plasmídeo digerido - fragmento de 379 pb liberado após a clivagem do pET-14b\_C49A. (B) plasmídeo digerido - fragmento de 379 pb liberado após a clivagem do pET-14b\_C53A. (C) 1, Fragmento digerido controle. 2 plasmídeo digerido - fragmento de 379 pb liberado após a clivagem do pET-14b\_C49AC53A.

#### 4.3 Expressão e purificação da proteína AtMYB30 e mutantes

Os domínios de ligação da proteína AtMYB30 (número de acesso NCBI: NP\_189533) de *A.thaliana* e mutantes foram expressos em *E. coli* pLysS (DE3) a partir dos vetores de expressão pET14b-AtMYB30, pET14b-AtMYB30\_C49A, pET14b-AtMYB30\_C53A e pET14b-AtMYB30\_C49AC53A. Todas as proteínas foram melhor expressas a uma temperatura de indução de 15°C, por 15 h e com 1 mM de IPTG. Uma vez que o vetor pET-14b confere uma sequência N-terminal de 6 histidinas, a proteína AtMYB30 selvagem e mutantes, expressas na fração solúvel bacteriana, foram purificadas por IMAC, sendo o cobre o metal utilizado. A proteína AtMYB30 selvagem (massa teórica de 14.647,7 Da), AtMYB30\_C49A (massa teórica de 14.615,6 Da), AtMYB30\_C53A (massa teórica de 14.615,6 Da) e AtMYB30\_C49A53A (massa teórica de 14.583,6 Da) foram eluídas com concentrações crescentes de 60 mM a 200 mM de imidazol e as frações eluídas analisadas em gel SDS-PAGE 16% corado com azul de Coomassie (Figura 24).

Após o processo de purificação, o rendimento final foi de aproximadamente 4 mg de proteína por litro de cultivo para a proteína selvagem e simples mutantes e 2 mg por litro de cultivo para a dupla mutante de AtMYB30. A expressão em baixo nível pode ser explicada pelo fato de que esta é uma proteína de espécie vegetal expressa de maneira heteróloga em bactérias. Além disso, é possível observar que a dupla troca dos resíduos de cisteína por alanina acarretou um menor rendimento quando comparado com a proteína selvagem ou simples mutantes. As preparações de proteínas obtidas, após a aplicação em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, apresentaram-se como uma banda única com massa molecular aparente de aproximadamente 15kDa (Figura 24), valores consistentes com a massa molecular teórica dos domínios de ligação esperada para a proteína recombinante (14,6 kDa).

**Figura 24.** Purificação de AtMYB30 e mutantes por IMAC em cromatógrafo ÄKTA.



À esquerda, gráfico da eluição das proteínas com concentrações crescentes de imidazol (mM). No eixo das ordenadas esquerdo está representada a absorbância a 280 nm de cada volume de eluição a partir do aumento da

concentração de imidazol (0-500 mM). À direita, SDS-PAGE 16% da purificação das proteínas. 15 µL de cada amostra de proteínas purificadas foram aplicados em cada canaleta. M, marcador de massa molecular em kDa. 1.fração insolúvel do lisado bacteriano, 2. fração solúvel do lisado bacteriano, 3. Fração coletada,4. frações eluídas coletadas mostrando as proteínas recombinantes com cerca de 15 kDa.

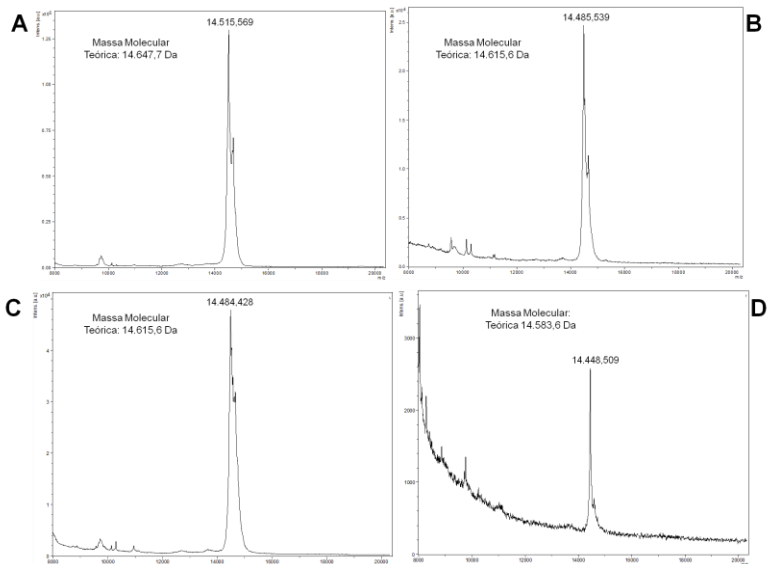
#### 4.4 Identificação das proteínas por Espectrometria de Massa (MS)

A identidade das proteínas AtMYB30 selvagem, AtMYB30\_C49A AtMYB30\_C53A e AtMYB30\_C49A53A foi confirmada por espectrometria de massa MALDI-TOF, avaliando a massa intacta das proteínas, bem como os peptídeos trípticos gerados através da digestão enzimática com tripsina. Como podemos observar no espectro de massa intacta (Figura 25), a proteína selvagem apresentou uma massa de 14.515,569 Da, AtMYB30\_C49A de 14.485,539 Da, AtMYB30\_C53A de 14.484,428 Da e AtMYB30\_C49A53A de 14448,509 Da. Esses valores estão de acordo com a massa teórica sem a metionina N-terminal (selvagem 14.647,5 Da, C49A e C53A 14.615,6 Da e C49AC53A 14.583,6 Da) devido à perda deste resíduo em cada uma das proteínas por atividade de peptidases na extremidade amino-terminal como descrita em XIAO et al., 2010.

Através da análise do perfil da digestão tríptica das proteínas, o PMF, foi confirmada a cobertura de aproximadamente 75% da sequência de aminoácidos da proteína selvagem e mutante C49A e 50% dos mutantes C53A e C49AC53A (Figura 26).

Com o intuito de identificar os peptídeos contendo as cisteínas e obter o completo sequenciamento dos mesmos por espectrometria de massa, foram utilizadas outras proteases como Glu-C, Asp-N e Lys-C para clivagem das proteínas. Devido ao conjunto de peptídeos gerados para cada uma das peptidases, foi possível apenas com Lys-C encontrar o peptídeo contendo apenas uma das cisteínas e com a resolução adequada para um sequenciamento satisfatório. O pico de aproximadamente 1920 Da (contendo a cisteína 53) gerado a partir da clivagem da proteína selvagem com Lys-C, assim como sua fragmentação e devido sequenciamento são mostrados na figura 27.

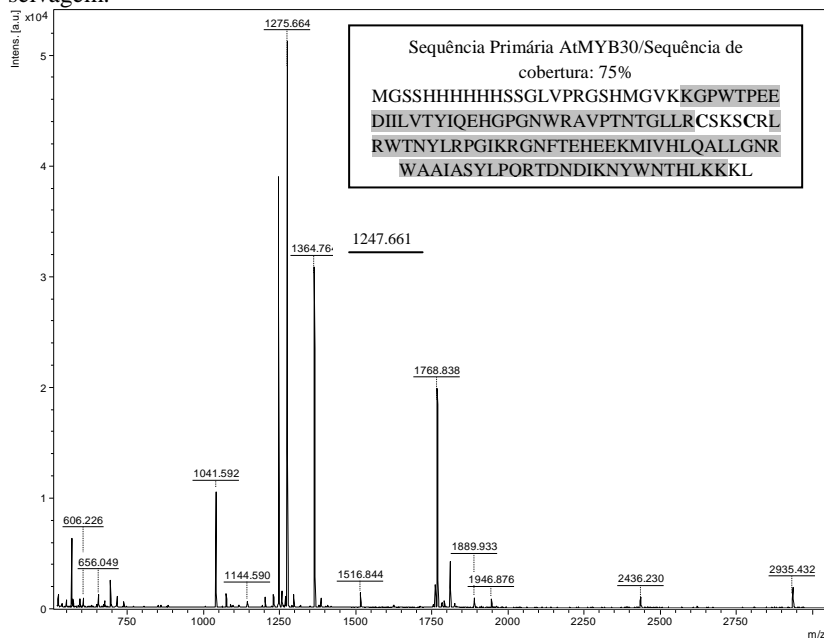
**Figura 25.** Massa intacta de AtMYB30 selvagem e mutantes por Espectrometria de massa.



Os espectros de massa intacta para identificação das proteínas foram adquiridos utilizando Espectrometria de massa MALDI-TOF. Em (A) AtMYB30, (B) C49A, (C) C53A e (D) C4953A são mostrados os valores de massa das proteínas recombinantes observados com a perda da metionina e os valores teóricos previstos.



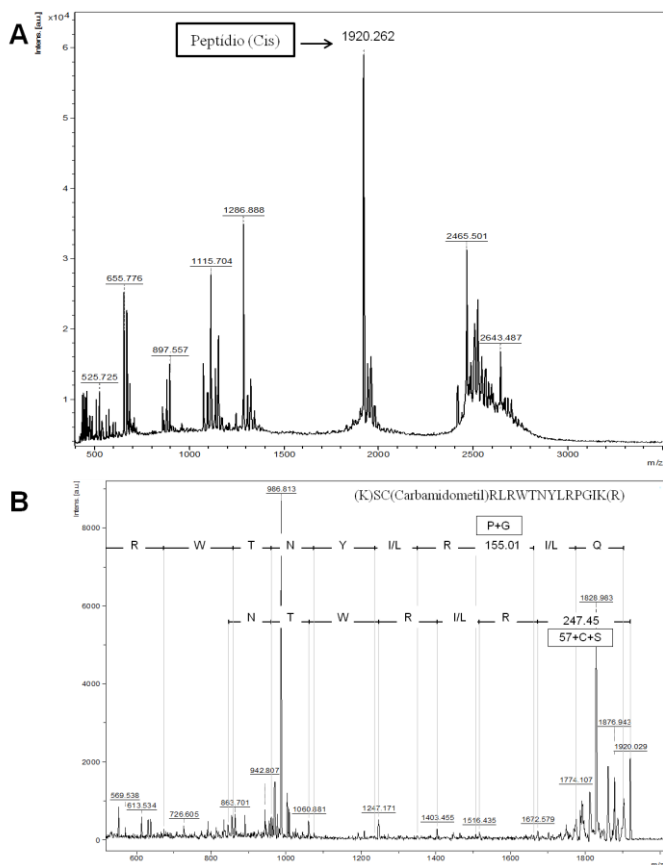
**Figura 26.** Espectro de massa de PMF experimental de AtMYB30 selvagem.



Number	m/z (mi)	m/z (av)	Start	End	Missed Cleavages	Sequence
● · - - ▶ 1	691.3668	691.8351	63	67	1	(K)SC(Carbamidomethyl)RLR(W)
1	705.3414	705.7469	111	116	0	(R)TDNDIK(N)
1	715.3556	715.8543	18	24	0	(R)GSHMGVK(K)
● · - - ▶ 1	797.3393	797.9357	60	65	1	(R)C(Carbamidomethyl)SKSC(Carbamidomethyl)R(L)
1	843.4505	844.0295	18	25	1	(R)GSHMGVKK(G)
▶ 1	1041.6051	1042.2307	50	59	0	(R)AVPTNTGLLR(C)
● · - - ▶ 1	1066.5244	1067.2849	60	67	2	(R)C(Carbamidomethyl)SKSC(Carbamidomethyl)RLR(W)
▶ 1	1075.5320	1076.2071	117	124	0	(K)NYWNTHLK(K)
1	1090.4800	1091.1289	79	87	0	(R)GNFTEHEEK(M)
▶ 1	1203.6269	1204.3823	117	125	1	(K)NYWNTHLKK(K)
1	1246.5811	1247.3175	78	87	1	(K)RGNFTEHEEK(M)
▶ 1	1247.6895	1248.4794	68	77	0	(R)WTNYLRPGIK(R)
▶ 1	1275.6844	1276.4899	100	110	0	(R)WAAIASYLPQRT(T)
1	1331.7219	1332.5574	117	126	2	(K)NYWNTHLKK(L)
▶ 1	1364.7831	1365.6941	88	99	0	(K)MIVHLQALLGNR(W)
1	1403.7906	1404.6680	68	78	1	(R)WTNYLRPGIKR(G)
● · - - ▶ 1	1416.7628	1417.6805	50	62	1	(R)AVPTNTGLLR(C)Carbamidomethyl)SK(S)
▶ 1	1516.8747	1517.8285	66	77	1	(R)LRWTNYLRPGIK(R)
1	1672.9758	1674.0171	66	78	2	(R)LRWTNYLRPGIKR(G)
▶ 1	1761.8555	1762.9312	111	124	1	(R)TDNDIKNYWNTHLK(K)
● · - - ▶ 1	1819.9265	1821.1437	50	65	2	(R)AVPTNTGLLR(C)Carbamidomethyl)SKSC(Carbamidomethyl)R(L)
▶ 1	1889.9504	1891.1064	111	125	2	(R)TDNDIKNYWNTHLKK(K)
1	1899.8892	1901.0918	1	17	0	(-)MGSSHHHHHSSGLVPR(G)
● · - - ▶ 1	1920.0385	1921.2917	63	77	2	(K)SC(Carbamidomethyl)RLRWTNYLRPGIK(R)
1	1962.0080	1963.2140	100	116	1	(R)WAAIASYLPQRTDNDIK(N)
▶ 1	2436.2452	2437.8002	79	99	1	(R)GNFTEHEEKMIVHLQALLGNR(W)
1	2475.2528	2476.7741	68	87	2	(R)WTNYLRPGIKRGNFTEHEEK(M)
1	2592.3463	2593.9888	78	99	2	(K)RGNFTEHEEKMIVHLQALLGNR(W)
1	2596.2269	2597.9234	1	24	1	(-)MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMGVK(K)
1	2621.4497	2623.1612	88	110	1	(K)MIVHLQALLGNRWAAIASYLPQRT(T)
1	2724.3219	2726.0986	1	25	2	(-)MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMGVKK(G)
▶ 1	2807.3788	2809.1298	26	49	0	(K)GPWTPPEEDIILVTYIQEHGPGNWR(A)
1	2935.4737	2937.3050	25	49	1	(K)KGPWTPPEEDIILVTYIQEHGPGNWR(A)
1	3018.5221	3020.3984	100	124	2	(R)WAAIASYLPQRTDNDIKNYWNTHLK(K)
1	3307.7732	3309.8854	88	116	2	(K)MIVHLQALLGNRWAAIASYLPQRTDNDIK(N)
1	3631.8114	3634.1366	18	49	2	(R)GSHMGVKKGPWTPPEEDIILVTYIQEHGPGNWR(A)
1	3692.9118	3695.2673	79	110	2	(R)GNFTEHEEKMIVHLQALLGNRWAAIASYLPQRT(T)
1	3829.9660	3832.3377	26	59	1	(K)GPWTPPEEDIILVTYIQEHGPGNWRVPTNTGLLR(C)
1	3958.0610	3960.5129	25	59	2	(K)KGPWTPPEEDIILVTYIQEHGPGNWRVPTNTGLLR(C)

Acima é apresentado um espectro de massa utilizando a protease tripsina. Abaixo a lista de peptídeos teóricos obtidos a partir da clivagem teórica de AtMYB30 selvagem em ExPasy Bioinformatics Resource Portal. Setas cheias indicam os peptídeos encontrados na análise experimental e as tracejadas os peptídeos não encontrados.

**Figura 27.** Espectrometria de massas de AtMYB30 selvagem para obtenção do peptídeo contendo a cisteína 53.



Em (A) Clivagem Proteolítica de AtMYB30 selvagem utilizando protease Lys-C, mostrando o pico referente ao peptídeo que contém a cisteína 53 (1920  $m/z$ ); (B) Espectrometria de massa MALDI MS/MS do peptídeo C53.

É importante salientar a dificuldade apresentada em detectar os picos contendo as cisteínas, provavelmente devido ao fato que estes peptídeos previstos pela clivagem teórica apresentarem maior probabilidade de serem perdidos como é visualizado na lista de peptídeos gerados na figura 26.

#### 4.5 Homologia e modelagem comparativa entre AtMYB30 e outras proteínas da família MYB

Como já citado, as proteínas MYB figuram como uma das maiores famílias de fatores de transcrição presentes em plantas, mas também estão presentes em outros organismos eucarióticos. O gene *Myb30* de *A. thaliana* codifica o domínio de ligação ao DNA de 106 aminoácidos, AtMYB30 (sem a cauda de histidina). A comparação da estrutura primária do domínio de ligação AtMYB30 com a base de dados de sequências não-redundantes, usando o algoritmo BLAST, revelou similaridade com proteínas MYB de diversos outros vegetais, especialmente leguminosas, com valores de 80 a 90%. O alinhamento de múltiplas sequências, com outro domínio de ligação MYB de *A. thaliana* (AtMYB2) e outros fatores de transcrição da família MYB de *Oryza sativa* e *Mus musculus*, mostra a similaridade observada nos domínios de ligação destes fatores de transcrição de diferentes espécies. É importante ressaltar o fato que o resíduo de cisteína 49 está presente apenas em AtMYB30, embora a cisteína 53 é conservada entre os fatores MYB, bastante característico desta família (Figura 28).

**Figura 28.** Alinhamento múltiplo de sequências de AtMYB30 e outros membros da família MYB de mamífero e outras espécies vegetais.

```

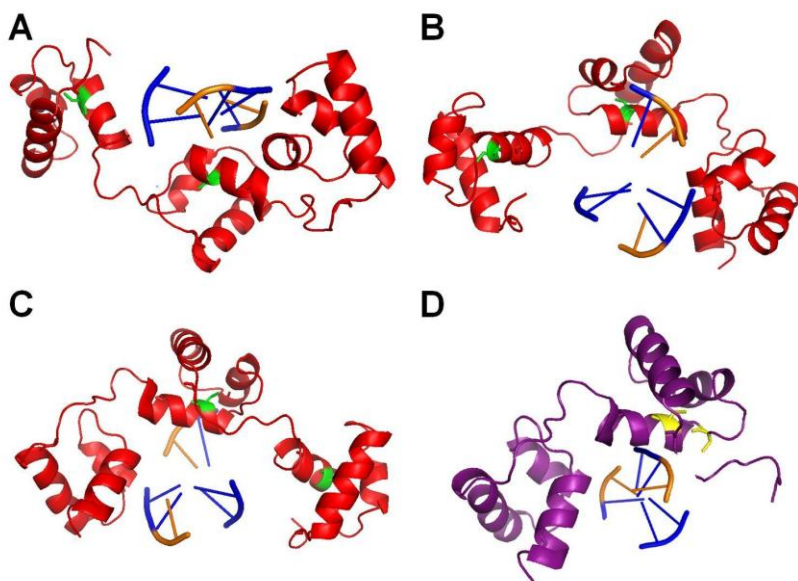
M. musculus   QNGTDDWKVIANLYPNRTDVQCQHRWQKVLNPELIKGPWTKCEDQRVIELVQKYGPKRWS 116
AtMYB30      -----GVKKGFWTPEEDIILLVYTIQEHGPGNWR 38
AtMYB2      -----DVRKGPWTEEDAILVNFVSIHGDAW 46
O. sativa    PQGEDPLIG-----IKAAAAGGGGIMRKGFWTEQEDVQLVWFVRLGERRWD 82
                                     ***** ** * *
M. musculus   VIAKHL-KGRIGKQCRERWHNHLNPEVKKTS-----TEEDRIIYQAHKRLGN 163
AtMYB30      AVPTNTGLLRCSKSCRLRWNTNLYLRFGIKRGN-----FTEHEEKMIVHLQALLGN 87
AtMYB2      HIARSSGLKRTGKSCRLRWLNLYLRPDVRRGN-----ITLEEQFMILKLSLWGN 95
O. sativa    FLAKVSGLQRSKSCRLRWVNYLHPGLKRGR-----MSPFEERMVVQLHAKLGN 131
                                     * * * * * * * * * *
M. musculus   RWAEIAKLLPGRTDNAIKNHWNSTMRRKVEQEGYLQEPSKASQTPV-----A----- 210
AtMYB30      RWAAIASYLPQRTDNDIKNYWNTHLKCKL-----LQEPSKASQTPV----- 116
AtMYB2      RWSKIAQYLPGRTDNEIKNYWRTRVQKQAK-----LQEPSKASQTPV----- 125
O. sativa    RWSRIAKSIPGRTDNEIKNYWRTHLRKLKQKQKQSDHHDND-----DDDDRNS 185
** ** * * * * * *

```

Comparação da estrutura primária do domínio de ligação ao DNA de AtMYB30 (AF250339\_1) de *A. thaliana*, AtMYB2 (NP\_182241.1) de *A. thaliana* e fatores MYB de *Oryza sativa* (AAU84433.1) e *Mus musculus* (NP\_034978.3). Os aminoácidos conservados estão sinalizados com os asteriscos e os peptídeos identificados em AtMYB30 selvagem por espectrometria de massa estão sublinhados. Números à direita indicam a posição dos resíduos de aminoácidos na sequência completa da proteína. O alinhamento foi realizado com o programa ClustalW.

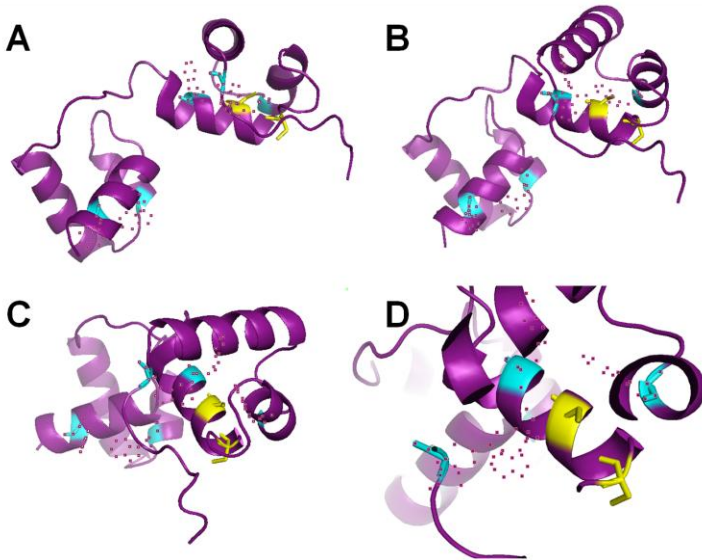
O modelo estrutural de AtMYB30, construído através de modelagem por homologia, pelo programa SWISS-MODEL (*Automated mode*), baseou-se na estrutura tridimensional de c-Myb, um proto-oncogene regulador da proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas (TAHIROV et al., 2002) quando em interação com o DNA e formando o heterotrímero denominado 1h88 (Figuras 29 e 30).

**Figura 29.** Modelo estrutural de c-Myb formando o heterotrímero e associado ao DNA utilizado para comparação com AtMYB30.



A modelagem foi feita através do programa SWISS-MODEL. Em (A), (B) e (C) são mostradas diferentes visões de c-Myb interagindo com o DNA. Em (D), para efeito comparativo, é mostrado o dímero de AtMYB30 gerado por homologia com a interação com o DNA no interior das cadeias.

**Figura 30.** Modelo estrutural de AtMYB30 formando o heterodímero associado ao DNA.



A modelagem foi feita através do programa SWISS-MODEL. Em (A), (B) e (C) são mostradas diferentes perspectivas de AtMYB30. Em amarelo são destacados os dois resíduos de cisteína e em azul os resíduos de triptofano. Em (D) está em destaque a proximidade dos dois resíduos de cisteína.

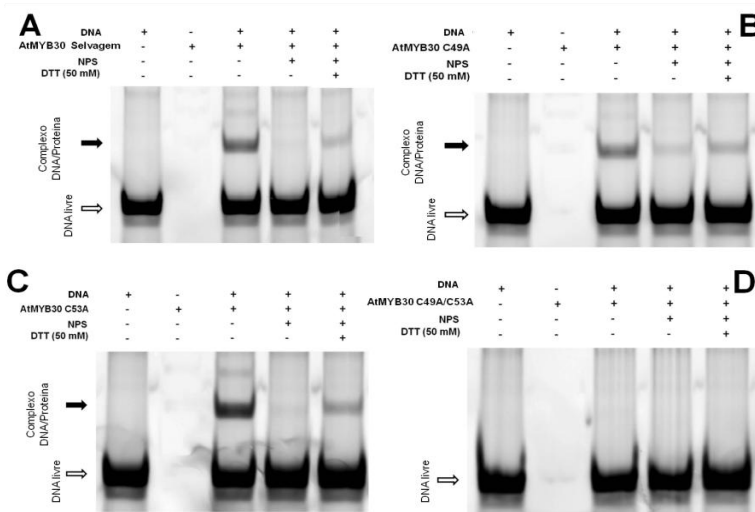
#### 4.6 Teste de atividade por Ensaio de retardamento de migração eletroforética

Com o objetivo de analisar a atividade do domínio de ligação ao DNA de AtMYB30 e o potencial efeito da nitrosilação dos resíduos de cisteína, foi utilizado o ensaio de retardamento de migração eletroforética (EMSA). Este teste ainda é considerado um dos métodos mais sensíveis para o estudo das propriedades de ligação de uma proteína ao DNA e pode ser utilizado para: *i*) determinação de parâmetros de ligação e *ii*) de afinidades relativas de uma proteína por um ou mais sítios do DNA, *iii*) e comparação de afinidades de diferentes proteínas pelos mesmos sítios de ligação. Em um EMSA, um fragmento

de DNA contendo um sítio específico de ligação e marcado com fluoróforo, por exemplo, é incubado com a proteína de interesse. Os complexos DNA-proteína são separados do DNA livre (não ligado) por eletroforese em gel de poliácridamida não desnaturante. A proteína retarda, então, a mobilidade dos fragmentos de DNA ao qual se liga e o DNA livre migra mais rapidamente no gel do que o complexo DNA-proteína.

Neste trabalho o teste de EMSA foi utilizado para avaliar se a proteína AtMYB30 selvagem apresentava capacidade de ligação ao DNA e se as mutações dos resíduos de cisteína para alanina, assim como uma possível S-nitrosilação em cisteína, causavam alguma alteração nesta ligação.

**Figura 31.** Ensaio de retardamento de migração eletroforética de AtMYB30 selvagem e mutantes.



Os ensaios foram feitos na presença ou ausência das proteínas, doador de NO ou DTT (indicado por + e -, respectivamente) antes da incubação com o DNA dupla fita específico para AtMYB30. As setas preenchidas e vazadas indicam o complexo proteína-DNA e a sonda de DNA livre, respectivamente. Em (A) AtMYB30 selvagem, (B) C49A, (C) C53A e (D) C49A/C53A.

Como é possível observar na figura 31, AtMYB30 selvagem e os mutantes C49A e C53A retardaram a migração da sonda de DNA (colunas 3), um oligonucleotídeo dupla fita contendo a sequência

consenso 5'-ACAAAAC-3', confirmando que apenas o domínio de ligação ao DNA (resíduos 11-116) é suficiente para alcançar e ligar-se ao DNA. As mutações simples (C49A ou C53A) não foram capazes de alterar a atividade de ligação de AtMYB30, porém a dupla mutação (C49AC53A) afetou claramente esta função, tornando este mutante incapaz de ligar-se ao DNA como é observado na figura 31D, coluna 4.

Como mencionado anteriormente, um dos objetivos foi avaliar se uma possível S-nitrosilação nos resíduos de cisteína poderia afetar a atividade de ligação ao DNA de AtMYB30. O tratamento de AtMYB30 ou dos dois simples mutantes C49A e C53A com o doador de óxido nítrico nitroprussiato de sódio (NPS, 1 mM) antes da adição da sonda de DNA, aboliu completamente a formação do complexo DNA-proteína (Figura 31, colunas 4).

Além disso, o efeito de inibição da ligação da proteína ao DNA foi revertido parcialmente pela adição de um agente redutor (DTT, 50 mM), antes da exposição ao NO na reação (Figura 31A, B e C, coluna 5). Estes resultados indicam a reversibilidade da modificação causada pelo NO na proteína, confirmando alguns resultados já mostrados na literatura (BRENFORD et al., 1998; SERPA et al., 2007; ZHANG et al., 2012). Um exemplo disto é c-Myb, que também foi impedida de ligar-se ao DNA por ação de agentes nitrosilantes, inibição esta revertida pelo tratamento com excesso de DTT. Estes resultados também mostram que, neste caso, a cisteína 130, sensível ao processo óxido-redutor, é necessária à sensibilidade do NO, assim como nossos resultados mostraram para AtMYB30.

Já o duplo mutante C49AC53A não foi capaz de ligar-se ao oligonucleotídeo de fita dupla, indicando que a ausência de ambas as cisteínas impede completamente a formação do complexo DNA-proteína (Figura 31 D, linha 3).

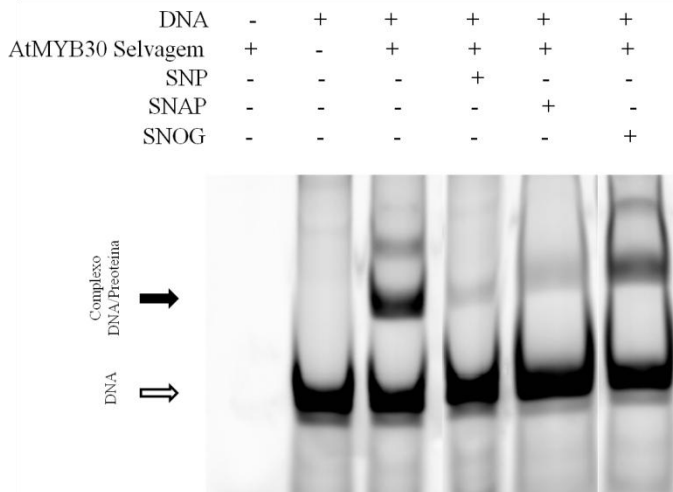
Além disso, foi avaliada a capacidade de inibição de formação do complexo DNA-proteína por diferentes doadores de NO como NPS, SNOG e SNAP (Figura 32), os quais inibiram a interação em diferentes proporções: NPS e SNAP foram mais eficazes na inibição quando comparado ao SNOG. Este resultado deve-se ao fato destes doadores de NO gerarem esta molécula por maneiras distintas.

Baseado nestes resultados pode ser concluído que: *i*) a sequência mínima de domínio de ligação ao DNA (resíduos 11-116) é funcionalmente ativa, assim como os simples mutantes, já que a ausência de apenas uma das cisteínas não reduz a formação do complexo; *ii*) A ligação ao DNA é fortemente inibida por agentes nitrosilantes, como o NPS, e a inibição da atividade de ligação ao DNA



para AtMYB30 e mutantes C49A e C53A foi revertida por DTT, indicando que os resíduos C49 e C53 em estado reduzido são necessários para a formação do complexo; *iii*) para a formação do

**Figura 32.** Teste de eficiência de doadores de NO por Ensaio de retardamento de migração eletroforética de AtMYB30 selvagem.



O ensaio foi feito na ausência ou presença da proteína com diferentes doadores de NO na concentração de 1 mM dos mesmos antes da incubação com o DNA dupla fita específico para AtMYB30. As setas preenchidas e vazadas indicam o complexo proteína-DNA e a sonda de DNA livre, respectivamente.

complexo é necessária a presença de pelo menos uma das cisteínas. Juntos estes resultados sugerem que a atividade de ligação ao DNA para AtMYB30 selvagem e seus simples mutantes, é provavelmente regulada por S-nitrosilação, como já demonstrado pelo nosso grupo para o domínio de ligação ao DNA AtMYB2 (SERPA et al., 2007).

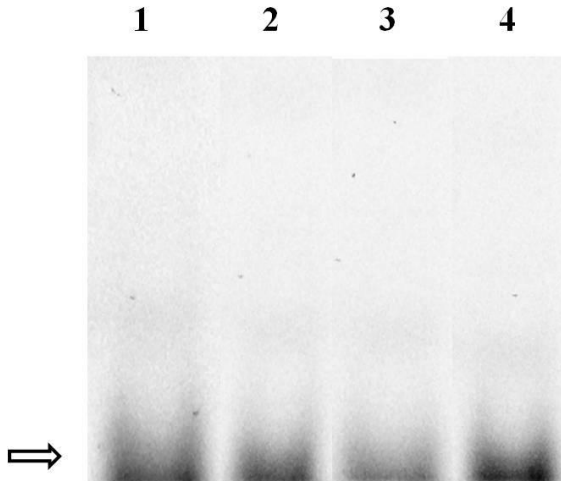
Estas observações corroboram com o fato que a S-nitrosilação é, hoje, uma importante modificação pós-traducional do tipo óxido-redução regulada por S-nitrosoglutathione (SNOG) redutase, o principal regulador dos níveis de S-nitrosilação em plantas (KWON et al., 2012).

É importante salientar que Yun e colaboradores (2011) obtiveram evidências genéticas que dão suporte ao fato de que o incremento de modificações nos grupos tióis de cisteínas por atividade

de NO facilita a resposta de hipersensibilidade na ausência de ácido salicílico, molécula sinalizadora que é produzida no início do processo de interação entre a planta e o patógeno para induzir o processo de morte celular.

Foi também utilizado nos testes, a sonda de DNA não específica APB1 (correspondente ao DNA com região específica de ligação à P1, um fator de transcrição com domínio MYB de *Zea mays*) para verificar a especificidade de ligação de AtMYB30 ao DNA. AtMYB30 selvagem e mutantes não se ligaram formando complexo com APB1 e que possui o motivo de ligação 5'-CCTACCAACC-3' (Figura 33).

**Figura 33.** Ensaio de migração eletroforética de AtMYB30 selvagem e mutantes utilizando sonda não específica APB1 de milho (*Zea Mays*).

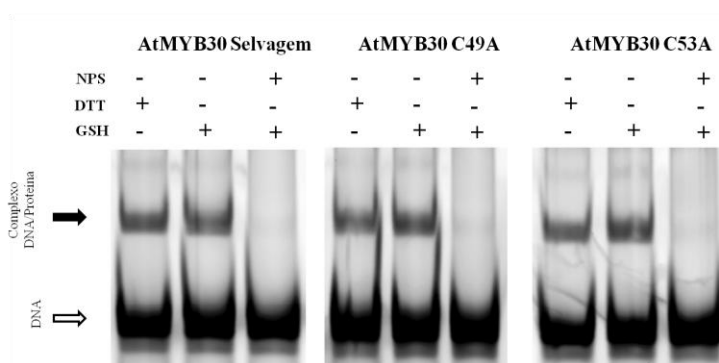


O ensaio foi feito utilizando uma sonda de DNA não específica APB1. Em (1) AtMYB30 selvagem, (2) C49A, (3) C53A e (4) C49AC53A, respectivamente, é mostrada a ausência de formação do complexo proteína-DNA quando estas proteínas são submetidas ao ensaio padrão de EMSA. A seta vazada indica o DNA livre.

Devido à proximidade dos dois resíduos de cisteína na estrutura primária de AtMYB30 (C49 e C53) foi também avaliada a existência de uma possível ligação dissulfeto entre eles, se esta ligação poderia afetar a formação do complexo DNA-proteína e uma inibição por NO. Assim, as proteínas foram incubadas com 5 mM de dois diferentes agentes

redutores (DTT e GSH) antes da adição da sonda de DNA no teste de EMSA. Foi observado que a formação do complexo DNA-proteína (Figura 34) é mantida mesmo com o tratamento prévio destes agentes redutores, sugerindo que uma possível ligação dissulfeto entre as cisteínas C49 e C53 não é necessária para a ligação ao DNA.

**Figura 34.** Avaliação do efeito de agentes redutores na formação do complexo DNA-AtMYB30 por ensaio de retardamento de migração eletroforética.



Todas as proteínas (0,4  $\mu$ M) foram previamente incubadas com 5 mM de DTT ou GSH antes da adição de 1 mM do doador de NO e 250 nM da sonda de DNA.

#### 4.7 Análise da afinidade de AtMYB30 ao DNA por Ensaio de retardamento de migração eletroforética.

Como já mencionado, o teste de EMSA é um método rápido para a detecção de interações de proteínas e o DNA. Além disso, em certas condições específicas ele pode fornecer dados quantitativos quanto a esta interação. Assim, foram avaliados os fatores cinéticos baseados nas constantes de equilíbrio de dissociação ( $K_D$ ) a partir da interação de AtMYB30 e mutantes à sequência de DNA consenso, permitindo, assim, mensurar a afinidade para esta ligação.

Nos resultados anteriores e já publicados (Tavares et al., 2014), foi mostrada a importância dos resíduos de cisteína na ligação da proteína ao DNA, estabelecida pela ausência de complexo formado entre o mutante C49AC53A (sem cisteína) e o DNA. A proteína selvagem e mutantes exibiram migrações bastante semelhantes em condições nativas e as proteínas interagiram com o DNA em concentrações crescentes com alta afinidade (como já mostrado anteriormente) e mais de um complexo foi formado como observado nas figuras 35, 36 e 37.

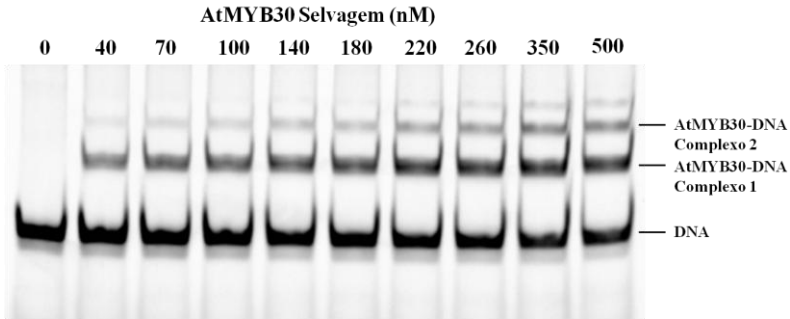
Com o intuito de medir o  $K_D$  da interação AtMYB30/DNA e os complexos formados, uma série de reações de ligação foram feitas com a titulação de concentrações crescentes de proteína (0-500 nM). Os resultados dos testes de EMSA para mensurar a afinidade da interação entre AtMYB30 e o DNA são mostrados nas figuras 35, 36 e 37. A linha 1 de todos os géis mostra a migração de DNA não ligado e as linhas de 2 a 9 mostram o deslocamento na migração do DNA que ocorreu com a adição crescente de AtMYB30 e mutantes na reação de ligação. Aproximadamente 20% do DNA foi deslocado para a reação com 40 nM de proteína, o que gerou um  $K_D$  estimado para a ligação da proteína selvagem e mutantes de 10 nM a 23 nM. O sinal de fluorescência de cada ligação ou ausência dela foi quantificado e a fração de DNA ligado em cada reação foi plotada versus a concentração de AtMYB30 selvagem ou mutantes (nM). Nas figuras citadas são plotados estes gráficos gerados a partir de dados dos géis, dos quais foram obtidos os valores de  $K_D$  e que estão sumarizados na tabela 1.

AtMYB30 selvagem e os dois simples mutantes formam complexo com o DNA como uma banda simples inicialmente e, com a titulação de proteína, a migração do DNA é retardada em duas a três bandas distintas (Figuras 35, 36 e 37), sugerindo que as primeiras duas apresentam sítios simples de ligação enquanto a última possui quatro sítios de ligação ao DNA, todas com diferentes níveis de afinidade de ligação. Estes resultados corroboram com os diferentes  $K_D$  observados para cada complexo formado. Porém, para efeito comparativo e de confiabilidade nos dados apenas foram quantificados o  $K_D$  para os complexos 1 e 2.

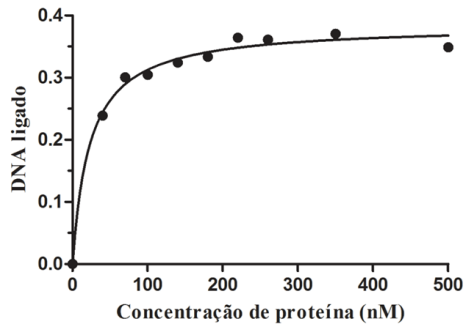
Comparando os valores de  $K_D$  do complexo 1 de AtMYB30 selvagem e mutantes foi observado que o  $K_D$  para a proteína selvagem (10 nM) é menor que o do mutante C49A (13 nM) e C53A (23 nM). A partir deste resultado é possível sugerir que, embora C49A e C53A mantenham a ligação ao DNA, o sítio de ligação é altamente cooperativo entre os dois resíduos de cisteína, o que acarreta em uma maior afinidade à proteína selvagem. Quando comparamos apenas as proteínas mutantes, a cisteína 53 parece apresentar maior afinidade com

o DNA do que a cisteína 49, apesar de a cisteína 49 demonstrar ser mais importante para a modificação estrutural do mutante C53A causada pela S-nitrosilação anteriormente avaliada (Tavares et al., 2014). A mesma proporção de afinidades ocorre para o complexo 2, no qual a afinidade ocorre de AtMYB30 selvagem e mutantes C49A e C53A de forma decrescente, além de ser claro que a formação do complexo 1 apresenta uma maior afinidade quando comparada ao complexo 2.

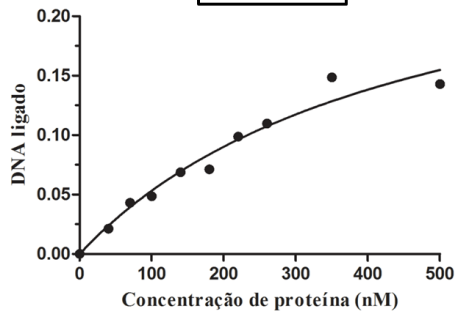
**Figure 35.** Avaliação de afinidade de ligação de AtMYB30 selvagem ao DNA por Ensaio de retardamento de migração eletroforética.



Complexo 1

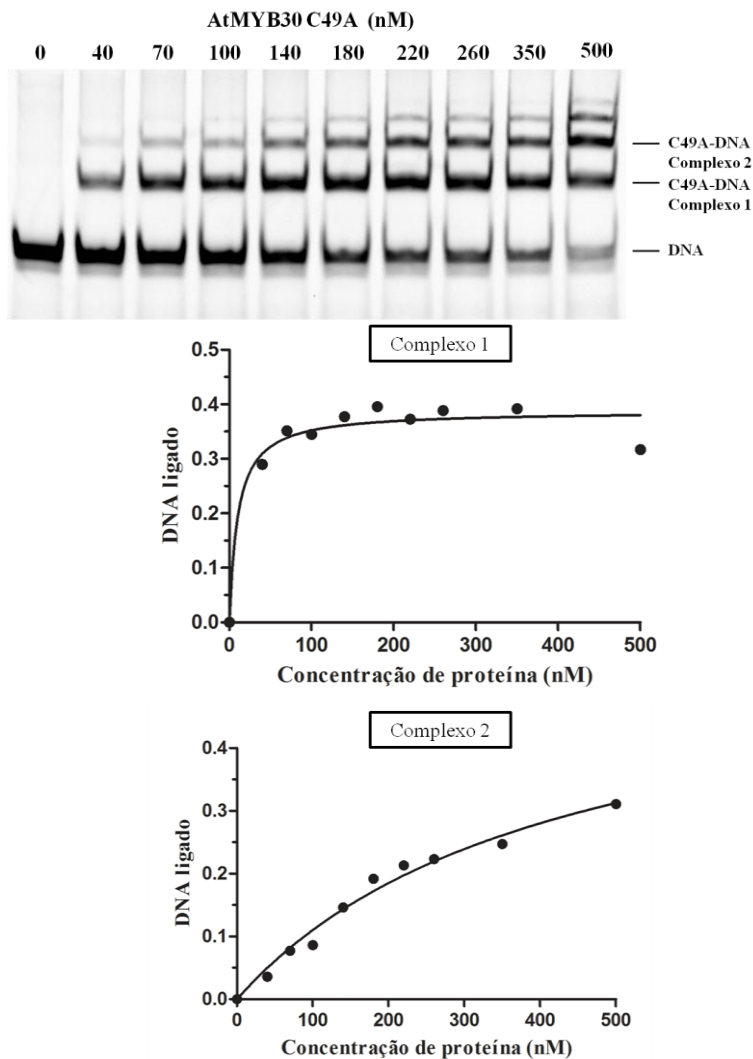


Complexo 2



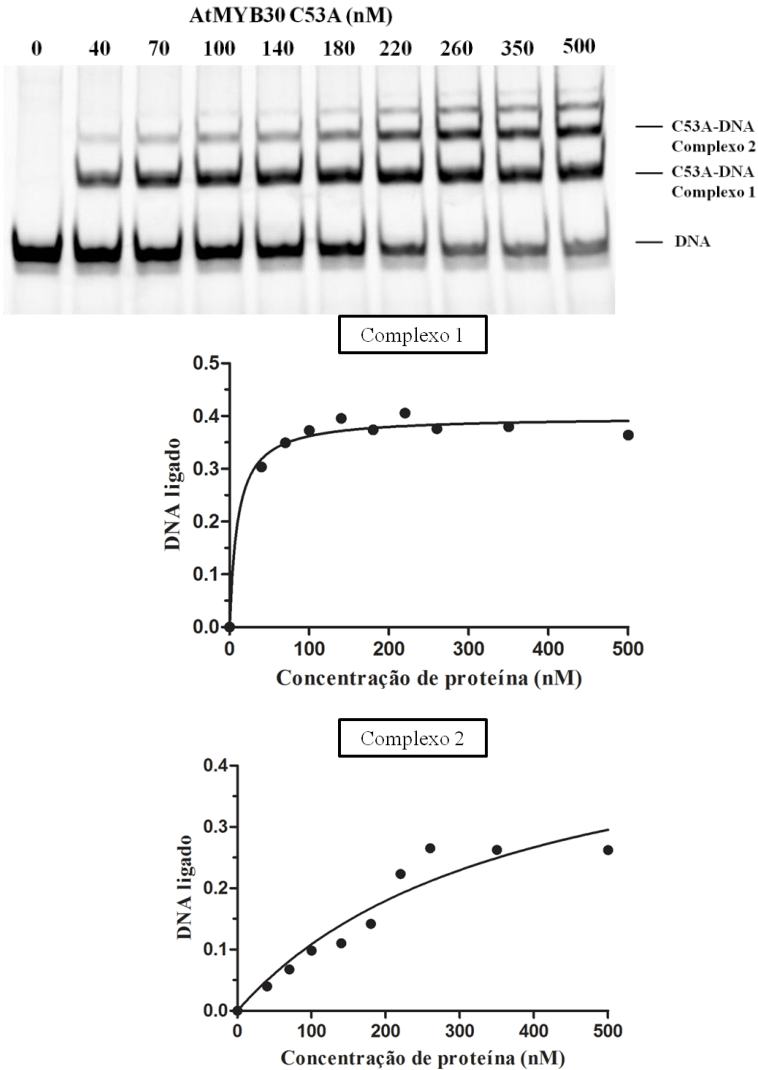
Os ensaios foram feitos com adições crescentes de AtMYB30 selvagem a 125 nM de sonda de DNA. A determinação dos valores de  $K_D$  para cada um dos três complexos formados e indicados da figura representativa foram feitos a partir dos gráficos mostrados.

**Figura 36.** Avaliação de afinidade de ligação de AtMYB30 C49A ao DNA por Ensaio de retardamento de migração eletroforética.



Os ensaios foram feitos com adições crescentes de AtMYB30 C49A a 125 nM de sonda de DNA. A determinação dos valores de  $K_D$  para cada um dos três complexos formados e indicados da figura representativa foi feita a partir dos gráficos mostrados.

**Figura 37.** Avaliação de afinidade de ligação de AtMYB30 C53A ao DNA por Ensaio de retardamento de migração eletroforética.



Os ensaios foram feitos com adições crescentes de AtMYB30 C53A a 125 nM de sonda de DNA. A determinação dos valores de  $K_D$  para cada um dos três complexos formados e indicados da figura representativa foi feita a partir dos gráficos mostrados.



Akashi et al., 2005 avaliaram a afinidade de ligação dos complexos formados entre um domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição c-Myb e diversos DNA de dupla fita por espectrometria de massa com ionização por “electrospray” com diferentes valores de  $K_D$  com variação de  $6.3 \times 10^{-7}$  M a  $2.8 \times 10^{-9}$  M, os quais são comparáveis com nossos resultados ( $10^{-8}$  M). Além disso, valores em torno de  $4,5 \times 10^{-9}$  M para pNgTRF1 (um fator de ligação telomérico com domínio Myb de *Nicotiana glutinosa*) (Yang et al., 2003) e  $3,2 \times 10^{-9}$  M para TRF1 humano (Konig et al., 1998) foram também relatados na literatura. Usando anisotropia de fluorescência para avaliar a afinidade de ligação do domínio de ligação ao DNA c-myb de *Drosophyla*, Madan et al., 1994 encontraram uma constante de dissociação de cerca de  $5,5 \times 10^{-7}$  M e Visacka et al., 2013 com valores de  $8,0 \times 10^{-8}$  M confirmados por experimentos com ITC para a proteína Tay1 (apresentando dois domínios Myb) da levedura *Yarrowia lipolytica*. Valores na faixa de  $2,8 \times 10^{-9}$  M to  $6.3 \times 10^{-7}$  M para c-Myb foram encontrados a partir de espectrometria de massa (Shi et al., 2006). Todos estes resultados confirmam que a afinidade de ligação de complexos de domínios Myb ao DNA apresentam uma constante de dissociação de aproximadamente  $10^{-8}$  M ( $10^{-9}$  M a  $10^{-7}$  M), similares aos nossos resultados para AtMYB30. Além disso, todas as comparações entre a proteína selvagem e mutantes simples mostraram que todas as mutações nos resíduos de cisteína causam uma redução na afinidade de ligação como o previsto.

**Tabela 1:** Constantes de dissociação na formação dos complexos DNA-AtMYB30.

	<b>AtMYB30 Selvagem</b>	<b>AtMYB30 C49A</b>	<b>AtMYB30 C53A</b>
	<b><math>K_D</math></b>	<b><math>K_D</math></b>	<b><math>K_D</math></b>
<b>Complexo 1</b>	10 nM	13 nM	23 nM
<b>Complexo 2</b>	378 nM	424 nM	456 nM

Constantes de dissociação ( $K_D$ ) calculadas a partir dos ensaios de retardamento de migração eletroforética de cada um dos complexos formados de AtMYB30 e mutantes com o DNA.

#### 4.8 Ensaio de biotilação para detecção de proteínas S-nitrosiladas

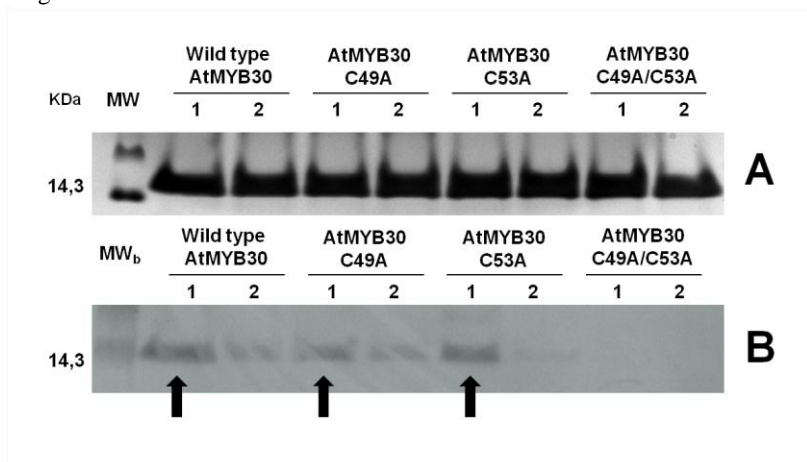
De forma geral, as modificações pós-traducionais em proteínas envolvem a adição covalente de grupos funcionais ou moléculas a um resíduo de aminoácido específico nas proteínas. Como exemplos destas modificações podemos citar a fosforilação, glicosilação, S-nitrosilação, acetilação, lipidação, entre outras. A análise global destas modificações tem sido reconhecida como uma importante área da proteômica, devido não apenas à criação de mapas protéicos que definam proteínas modificadas por EROs e ERNs, mas também por explorar a modulação envolvendo estas espécies reativas durante o processo (CKLESS, 2014). Os resíduos de cisteína são frequentemente encontrados nos sítios funcionais das proteínas, porém são os aminoácidos menos abundantes (MARINO E GLADYSHEV, 2010). Além disso, uma importante característica deste resíduo é a reversibilidade de suas oxidações, indicando potenciais mecanismos regulatórios nas proteínas (CKLESS, 2014) e caracterizando certa plasticidade química deste grupo funcional (MARINO E GLADYSHEV, 2012).

O NO e outras ERNs podem ativar a transcrição de genes relacionados à defesa e resposta imune em plantas e agem na regulação de proteínas por meio de modificações pós-traducionais (ECCO et al., 2010; PEDROSO et al., 2000). A modulação proteica pela ação do NO tem sido investigada em diversas proteínas e a S-nitrosilação, principal modificação dependente de NO, está relacionada à atividade microbicida desenvolvida pelo hospedeiro contra diversos patógenos (ECCO et al., 2010).

Assim, baseando-nos nos resultados discutidos anteriormente, foi avaliado se AtMYB30 selvagem e mutantes C49A, C53A e C49AC53A sofrem S-nitrosilação por ação do óxido nítrico usando o ensaio de biotilação (BST) (JAFFREY; SNYDER, 2001) para entender o papel de cada resíduo de cisteína nesta modificação por NO. O BST detecta se uma proteína é S-nitrosilada por meio da substituição da S-nitrosilação por uma molécula de biotina. Para tanto, as proteínas são expostas a um doador de NO e, em seguida, as cisteínas que forem S-nitrosiladas incorporam uma molécula de biotina, sendo esta modificação detectada por *Western blot* utilizando anticorpos anti-biotina (Figura 38). AtMYB30 possui duas cisteínas, C49 e C53, que precisam estar em estado reduzido para interagir com o DNA, como já discutido.

Em todos os testes, foi utilizado como controle positivo de S-nitrosilação a proteína PtpA de *Mycobacterium tuberculosis* (ECCO et al., 2010). É possível observar na figura 38 que AtMYB30 e os simples mutantes C49A e C53A foram S-nitrosilados pelo doador de NO SNAP (demonstrado por uma forte banda detectada pelos anticorpos anti-biotina no *Western blot*), quando comparado ao seu controle negativo DMSO e também ao duplo mutante C49AC53A, que não apresenta resíduos de cisteína. Estes resultados sugerem que ambas os resíduos de cisteína presentes no domínio de ligação ao DNA de AtMYB30 (C49 e C53) são alvos para a S-nitrosilação mediada pelo NO.

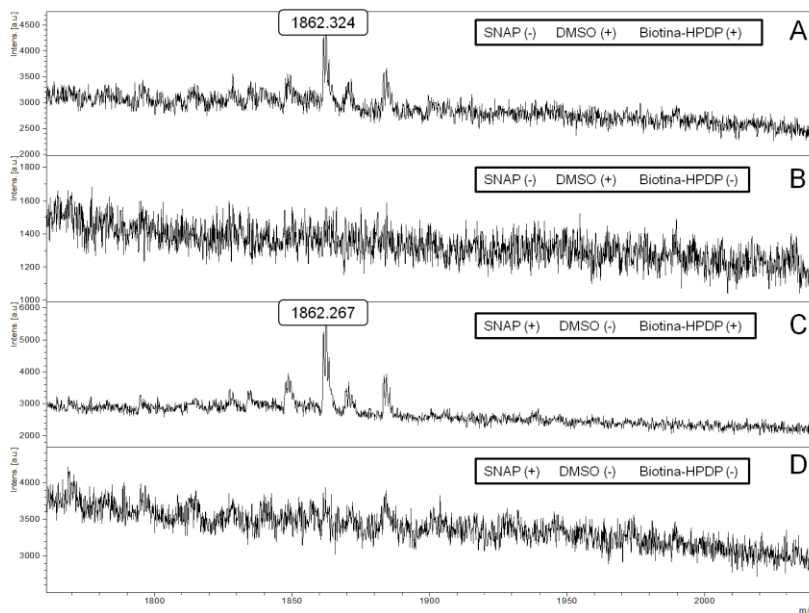
**Figura 38.** Ensaio de biotilação por Biotin-switch de AtMYB30 selvagem e mutantes.



A S-nitrosilação de AtMYB30 e mutantes foi detectada por Biotin-switch. (A) 50  $\mu$ g de proteínas recombinantes purificadas em tampão HEN foram tratadas separadamente com 1 mM do doador de NO SNAP (1) ou 1 mM de DMSO (2) como controle negativo. Em seguida, as amostras foram incubadas com MMTS para bloqueio dos resíduos de cisteínas livres, reduzidas com ascorbato de sódio e posteriormente submetidas à biotilação, separadas por SDS-PAGE e coradas com azul de Coomassie. (B) Detecção das proteínas S-nitrosiladas por *western-blot* com anticorpo anti-biotina das mesma amostras separadas por SDS-PAGE acima. O marcador de peso molecular (M) e o marcador de peso molecular biotilado (M<sub>b</sub>) são mostrados à esquerda. As setas indicam as proteínas AtMYB30 selvagem e mutantes simples biotiladas quando comparadas ao seu controle negativo logo ao lado.

A S-nitrosilação também foi confirmada em AtMYB30 selvagem por espectrometria de massa, com a detecção do peptídeo contendo o resíduo de cisteína C53 (1920 m/z; modificado por iodoacetamida), o qual foi sequenciado e sua identidade confirmada (Figura 27). Para tanto, a amostra de AtMYB30 selvagem foi tratada com o doador de NO para que os resíduos de cisteína fossem S-nitrosilados e, então submetido ao BST para substituição da ligação S-NO por S-biotina. Subsequentemente, a amostra de proteína já biotinizada e seu controle negativo com DMSO foram digeridas com a protease Lys-C para obtenção dos peptídeos, inclusive os peptídeos com a cisteína S-nitrosilada. Finalmente os peptídeos biotinizados foram isolados por cromatografia com neutravidina-agarose. Esta cromatografia permite o isolamento dos peptídeos biotinizados devido a sua alta afinidade com a molécula de neutravidina presente na resina e que são, posteriormente desligados da resina por um agente redutor forte como o  $\beta$ -mercaptoetanol. Assim, após enriquecimento da amostra com peptídeos biotinizados, como mostrado na figura 39, o peptídeo

**Figura 39.** Análise do peptídeo biotilado de AtMYB30 por espectrometria de massa MALDI-TOF.



A análise foi feita após a purificação dos peptídeos biotilados utilizando colunas de agarose-neutravidina para confirmação da S-nitrosilação de AtMYB30 (A) e (C). Ambas as amostras foram tratadas com biotina-HPDP por BS após tratamento com SNAP (C) ou DMSO (A). Amostras que não foram tratadas com biotina-HPDP foram também utilizadas como controle negativo. O pico de 1862  $m/z$  corresponde ao peptídeo contendo a cisteína 53 (SCRLRWNTNYLRPGIK) em seu estado reduzido. Estes resultados confirmam a biotilação do resíduo C53 de AtMYB30 após a S-nitrosilação mostrando o aumento de intensidade do pico de 1862  $m/z$  após o tratamento com SNAP.

contendo a cisteína 53 foi isolado devido a sua marcação com a biotina (anteriormente S-nitrosilado) apenas a partir da amostra tratada com o doador de óxido nítrico e ausente no não tratado, confirmando a modificação em NO por aumento de intensidade do pico no espectro de massas na amostra S-nitrosilada.

Portanto, esses resultados demonstram que a AtMYB30 sofre S-nitrosilação por ação de um doador de óxido nítrico, e esta modificação

pós-traducional seria a responsável pela inibição da formação do complexo DNA-proteína nos testes de EMSA .

Segundo Trapet e colaboradores (2014) existem hoje mais de 100 proteínas possivelmente S-nitrosiladas em plantas. Estas proteínas estão envolvidas em todos os tipos de funções celulares. Alguns exemplos que podem ser citados em *A. thaliana*: NADPH oxidase AtRBOHD (Yun et al., 2011), o fator de transcrição TGA1 (LINDERMAYR et al., 2010), Peroxiredoxina II E (ROMERO-PUERTAS et al., 2007), NPR1 (TADA et al., 2008) e SABP3 (WANG et al., 2009). Lindermayr e colaboradores (2010) mostraram que o tratamento com SNOG apresenta efeito na atividade de TGA1 e NPR1 e ambos são S-nitrosilados por este doador de NO e seus resultados sugerem que o NO é um regulador óxido-redutor do sistema NPR1/TGA1. NPR1 é um componente essencial da via de transdução de sinal mediada pelo ácido salicílico na aquisição de resistência (DURRANT E DONG, 2004) que se associa ao fator de transcrição TGA do grupo de fatores bZIP, resultando na ativação de TGA1 para ligar-se aos promotores da via do ácido salicílico. Outra proteína identificada como candidata a S-nitrosilação em plantas e também confirmada por MS foi a proteína CDC48 de tabaco, membro da família de AAA+ ATPase e via da criptogéina e que participa de processos envolvendo estresses bióticos em plantas (ASTIER et al., 2012.)

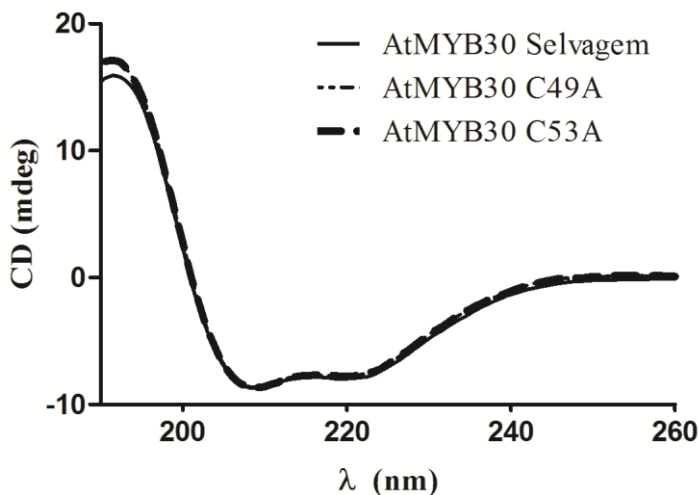
Estes são apenas alguns exemplos de como este mensageiro ubíquo é importante na resposta de defesa em plantas e, juntamente com os dados apresentados, há indícios de que AtMYB30 pode também ser modulado por NO via S-nitrosilação, regulando vias de defesa contra estresse bióticos por agentes oxidativos/nitrosativos.

#### 4.9 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) de AtMYB30 e mutantes

A estrutura secundária de AtMYB30 e mutantes foi avaliada por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) para analisar uma possível modificação estrutural causada pela mutação sítio-dirigida nos mutantes em cisteínas (Figura 40). O espectro de CD UV-distante obtido para AtMYB30 selvagem e simples mutantes exibiram o perfil de estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice com os picos negativos em 208 nm e 222 nm. É possível observar que as substituições da cisteína 49 e

cisteína 53 por alanina de forma independente não alterou este perfil de estrutura secundária da proteína. Assim, concluiu-se que as referidas mutações não interferem diretamente na estrutura secundária das proteínas recombinantes. Não foi possível avaliar da mesma maneira, assim como outros testes de CD, a estrutura do duplo mutante C49AC53A devido ao preparo da amostra para este experimento, o qual reduz a concentração de proteína deixando-a abaixo do mínimo necessário para comparação com a proteína selvagem e simples mutantes.

**Figura 40.** Espectroscopia de dicroísmo circular de AtMYB30 selvagem e mutantes simples na avaliação comparativa da estrutura secundária.

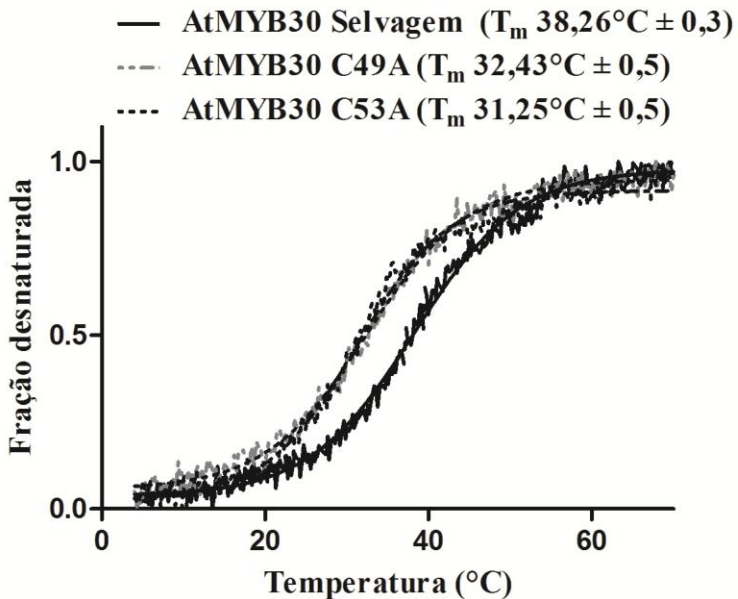


As análises de CD na região espectral de UV-distante foram feitas utilizando 10  $\mu$ M de cada proteína em 10 mM de tampão HEPES pH 7,4. O espectro representa a média de três escaneamentos e os dados de três experimentos independentes.

O perfil de desnaturação térmica de proteínas pode ser monitorado por dicroísmo circular e é normalmente usado para determinar a estabilidade estrutural da proteína. Assim, para investigar a estabilidade térmica de AtMYB30 e mutantes na presença e ausência da modificação pós-traducional S-nitrosilação, as amostras foram analisadas por espectroscopia de dicroísmo circular em diferentes

condições. A perda de sinal de CD a 222 nm foi monitorada entre 4 e 70 °C, com aumento gradual de 1 °C. O perfil de desnaturação térmica de AtMYB30 indicou uma curva sigmóide com um valor de temperatura de desnaturação ( $T_m$ ) de 38,26 °C enquanto os mutantes C49A e C53A foram menos estáveis estruturalmente, apresentando um menor  $T_m$  de 32,43 °C e 31,25 °C, respectivamente (Figura 41, Tabela 2).

**Figura 41.** Perfil de desnaturação térmica de AtMYB30 selvagem e mutantes simples.



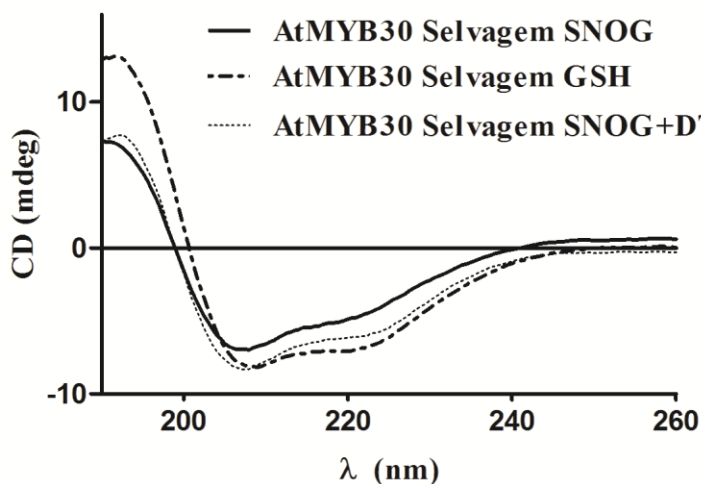
Os ensaios de desnaturação térmica foram realizados com 10 uM de cada uma das proteínas em tampão Hepes 10 mM, pH 7.4. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Além disso, com o intuito de avaliar a estabilidade estrutural de AtMYB30 frente a S-nitrosilação, também foram obtidos os espectros de CD para AtMYB30 selvagem e simples mutantes. Quando o doador de NO (SNOG) foi adicionado à proteína selvagem e mutantes o espectro de UV-distante global foi alterado, indicando que a S-



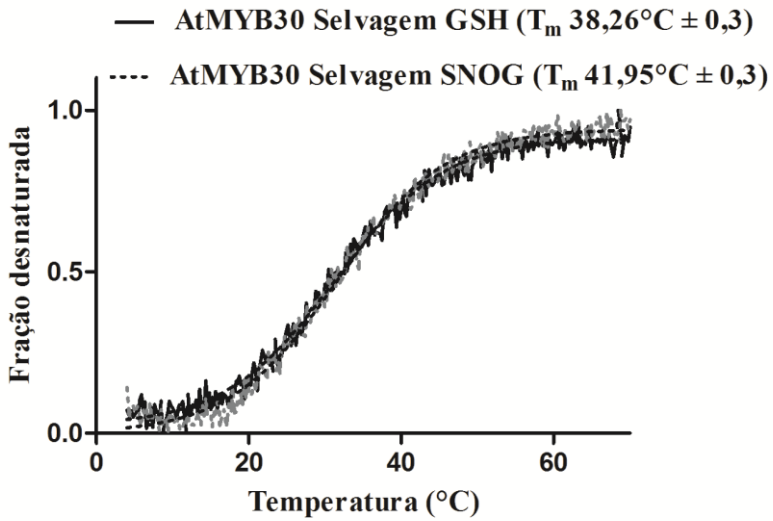
nitrosilação de cada uma das proteínas interfere nos perfis de estrutura secundária, reduzindo seu conteúdo (Figuras 42, 44 e 46). É importante ressaltar que após o tratamento com DTT, capaz de reduzir a cisteína e eliminar a ligação S-NO, o perfil original de estrutura secundária tratada com SNOG é parcialmente restaurado, sugerindo a reversibilidade da S-nitrosilação em C49 e C53. Além disso, é possível assumir que o efeito do NO no espectro de CD UV-distante é mais pronunciado no mutante C53A, possivelmente indicando que a mutação na cisteína 49 causa um menor efeito estrutural em AtMYB30 (Figuras 44 e 46). A partir destes resultados, é possível sugerir que, embora ambas as cisteínas C49 e C53 são potencialmente S-nitrosiladas, C49 parece ser mais importante na modificação estrutural do mutante C53A. Mاتيollo e colaboradores (2013) mostraram que a S-nitrosilação de uma tirosina fosfatase (PtpA) de *Mycobacterium tuberculosis* induz uma instabilidade estrutural e térmica da proteína, porém não afeta o perfil de estrutura secundária da mesma, diferente do que foi aqui demonstrado para AtMYB30.

**Figura 42.** Espectroscopia de dicroísmo circular de AtMYB30 selvagem na avaliação da estrutura secundária a partir da S-nitrosilação.



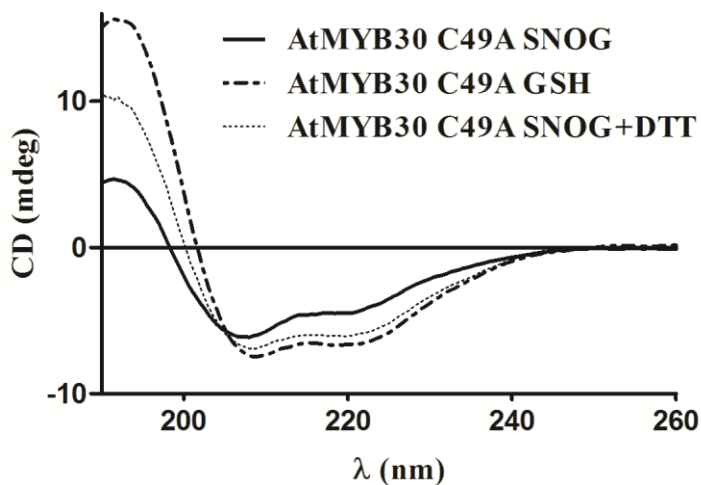
As análises de CD na região espectral de UV-distante foram feitas utilizando 10  $\mu$ M de cada proteína em tampão HEN pH 7,4, com a adição do doador de NO, SNOG (1 mM) ou seu controle negativo GSH (1 mM) ou 1 mM de SNOG e 1 mM de DTT. Os espectros representam a média de três escaneamentos e os dados de três experimentos independentes.

**Figura 43.** Perfil de desnaturação térmica de AtMYB30 S-nitrosilada.



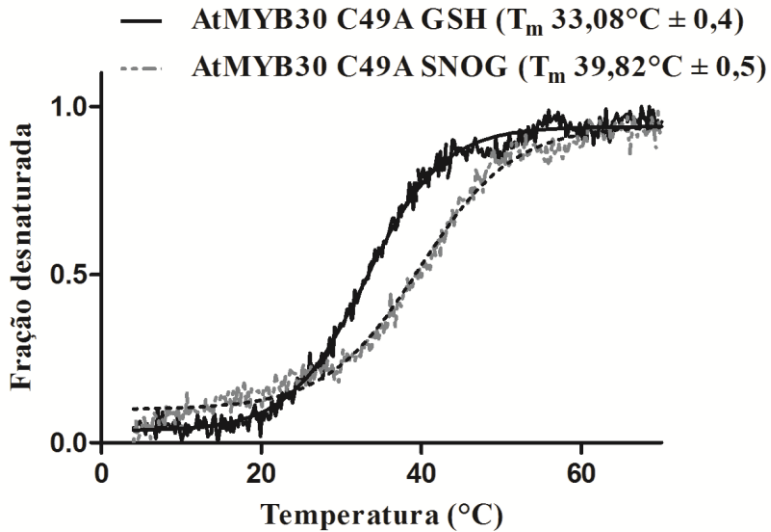
Os ensaios de desnaturação térmica foram realizados com 10  $\mu$ M de cada uma das proteínas com 1 mM de SNOG (linha tracejada) ou 1 mM de GSH (linha sólida) como controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

**Figura 44.** Espectroscopia de dicroísmo circular de AtMYB30 C49A na avaliação da estrutura secundária a partir da S-nitrosilação.



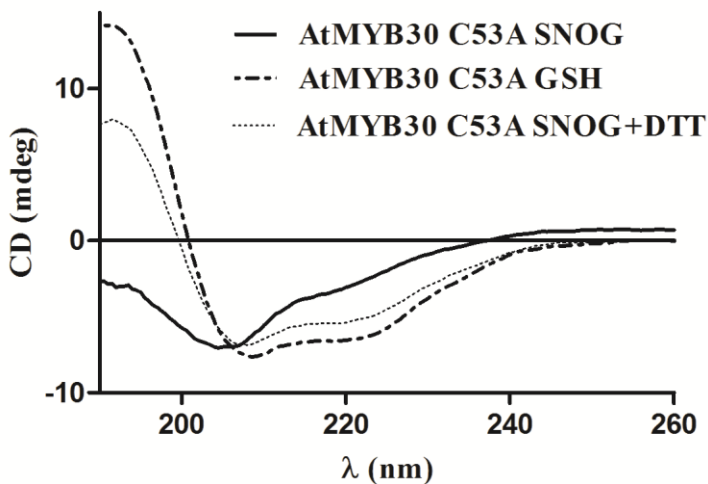
As análises de CD na região espectral de UV-distante foram feitas utilizando 10  $\mu\text{M}$  de cada proteína em tampão HEN pH 7,4, com a adição do doador de NO, SNOG (1 mM) ou seu controle negativo GSH (1 mM) ou 1 mM de SNOG e 1 mM de DTT, a 25°C. Os espectros representam a média de três escaneamentos e os dados de três experimentos independentes.

**Figura 45.** Perfil de desnaturação térmica de AtMYB30 C49A S-nitrosilada.



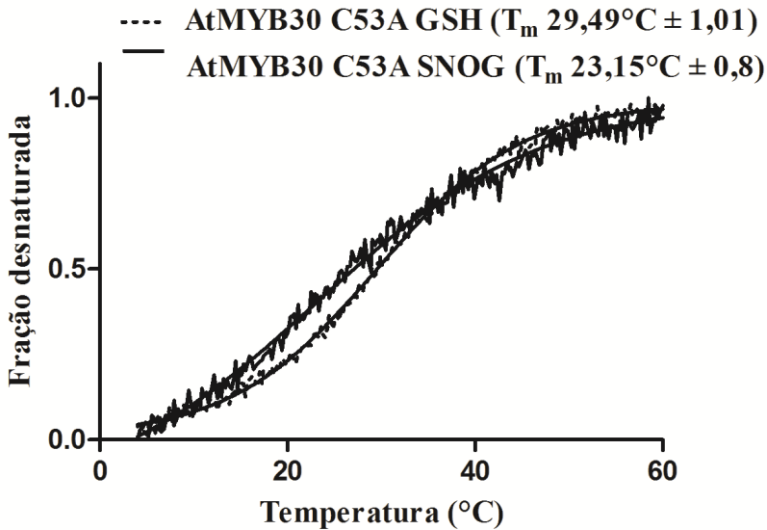
Os ensaios de desnaturação térmica foram realizados com 10  $\mu$ M de cada uma das proteínas com 1 mM de SNOG (linha tracejada) ou 1 mM de GSH (linha sólida) como controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

**Figura 46.** Espectroscopia de dicroísmo circular de AtMYB30 C53A na avaliação da estrutura secundária a partir da S-nitrosilação.



As análises de CD na região espectral de UV-distante foram feitas utilizando 10  $\mu\text{M}$  de cada proteína em tampão HEN pH 7,4, com a adição do doador de NO, SNOG (1 mM) ou seu controle negativo GSH (1 mM) ou 1 mM de SNOG e 1 mM de DTT, a 15°C. Os espectros representam a média de três escaneamentos e os dados de três experimentos independentes.

**Figura 47.** Perfil de desnaturação térmica de AtMYB30 C53A S-nitrosilada.



Os ensaios de desnaturação térmica foram realizados com 10  $\mu$ M de cada uma das proteínas com 1 mM de SNOG (linha tracejada) ou 1 mM de GSH (linha sólida) como controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Na avaliação da desnaturação térmica das proteínas que sofreram S-nitrosilação ocorreram algumas alterações do perfil anterior. Quando AtMYB30 selvagem sofreu S-nitrosilação após a incubação com o doador de NO SNOG, o perfil de desnaturação térmica apresentou um leve aumento de  $3,69 \pm 1,01$  °C na  $T_m$  quando comparado à proteína não S-nitrosilada (Figura 43, Tabela 2) e a  $T_m$  de C49A também aumentou na presença de SNOG de 33,08 °C a 39,82°C;  $\sim 6$  °C (Figura 45, Tabela 2). É importante salientar que apenas para o mutante C53A a  $T_m$  diminuiu na presença do doador de NO SNOG, apresentando valores de 29,49°C a 23,15°C (Figura 47, Tabela 2). Mais uma vez, como indicado na discussão acima sobre o efeito da S-nitrosilação no espectro de CD global, a S-nitrosilação do resíduo C49 (presente no mutante C53A) promoveu o efeito mais pronunciado na sensibilidade térmica. O resultado oposto (maior estabilidade térmica devido à S-nitrosilação) foi observado em AtMYB30 selvagem e mutante C49A, o que sugere que o resíduo C49 pode ser responsável

pelas modificações estruturais causadas pela adição do NO à proteína. Estes resultados suportam as evidências que o ambiente ao redor dos resíduos de cisteína nas proteínas afeta a reatividade ao NO (MARINO E GLADYSHEV, 2010; SPADARO et al., 2010). Estudos prévios sugerem que cisteínas S-nitrosiladas podem estar flanqueadas por áreas hidrofóbicas, apresentarem baixo *pKa* e alta exposição do átomo de enxofre, os quais aumentam a reatividade a esta modificação. Contudo, Marino e Gladyshev (2010) mostraram que há bastante heterogeneidade nestas características e suas análises revelaram que a ocorrência de resíduos carregados (normalmente aminoácidos básicos) na proximidade de cerca de 6 Å da cisteína S-nitrosilada e outro carregado negativamente até 8 Å da cisteína descrevem melhor um possível sítio de nitrosilação.

**Tabela 2.** Valores médios de temperatura de desnaturação térmica ( $T_m$ ) (°C) de AtMYB30 selvagem e mutantes após o tratamento com GSH ou SNOG (1 mM). Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

Proteínas		Temperatura de desnaturação ( $T_m$ )
AtMYB30 Selvagem	GSH	38,26°C $\pm$ 0,3
	SNOG	41,95°C $\pm$ 0,3
AtMYB30 C49A	GSH	33,08°C $\pm$ 0,4
	SNOG	39,82°C $\pm$ 0,5
AtMYB30 C53A	GSH	29,49°C $\pm$ 1,01
	SNOG	23,15°C $\pm$ 0,8

Como já mencionado anteriormente (TAVARES et al., 2014) AtMYB30 e suas mutantes simples em cisteína são S-nitrosiladas e esta modificação pós-traducional inibe a ligação ao DNA com influência na estrutura secundária deste fator de transcrição. Assim, com o objetivo de aprofundar o conhecimento sobre a interação entre AtMYB30 e o DNA e seus efeitos em suas respectivas estruturas foram utilizadas técnicas como EMSA quantitativo, análise de fluorescência e dicróismo circular e que serão abordadas em seguida.

#### 4.10 Fluorescência intrínseca de AtMYB30 e mutantes na análise da interação com o DNA

O sítio de interação entre AtMYB30 e o DNA específico para este fator de transcrição foi avaliado por técnicas espectroscópicas. A comparação entre o espectro de emissão intrínseca obtido a partir da proteína livre e do complexo DNA-proteína é considerado bastante informativo em relação ao ambiente em que estão localizados os triptofanos (W17, W37, W57, W89, W108) da proteína e para determinar esta fluorescência o comprimento de onda de emissão foi monitorado nestas situações. Além disso, a fluorescência do triptofano é amplamente usada na avaliação da polaridade deste ambiente local do aminoácido devido a sua alta sensibilidade (FAVICCHIO et al., 2009; POWERS et al., 2004). Em um ambiente polar a fluorescência do triptofano causa um aumento no comprimento de onda enquanto o ambiente de baixa polaridade ocasiona uma redução do comprimento de onda.

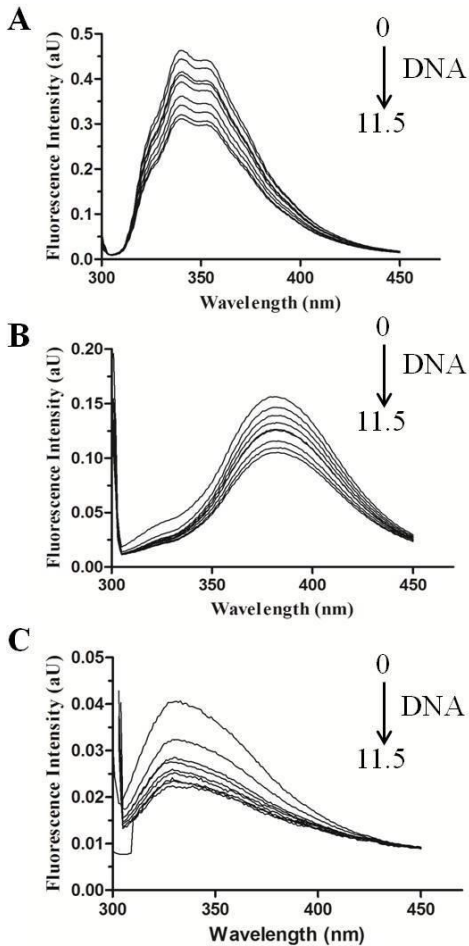
O efeito do DNA nos espectros de fluorescência de AtMYB30 é mostrado na figura 46 e é possível observar a redução da intensidade de fluorescência no espectro de emissão intrínseca e uma alteração no comprimento de onda máximo quando na ligação entre AtMYB30 e o DNA. Na ausência do DNA, o comprimento de onda máximo da emissão da fluorescência do triptofano foi de 330 nm para a proteína selvagem (Figura 48A) e o mutante C53A (Figura 48C) e 380 nm para o mutante C49A (Figura 48B). Estes dados confirmam o ambiente hidrofílico da proteína já que o máximo de emissão de triptofano livre varia de 330 nm em um ambiente hidrofóbico até 355 nm em um ambiente hidrofílico (FAVICCHIO et al., 2009). A emissão máxima da fluorescência do triptofano de AtMYB30 mostrou ser dependente da adição de concentrações crescentes de DNA (Figura 48). Para a proteína selvagem e ambos os mutantes o complexo DNA-proteína mostrou uma redução de intensidade de fluorescência assim como no comprimento de onda quando comparada à proteína livre. Além disso, a intensidade de fluorescência reduziu linearmente com o aumento de concentração do DNA, como esperado, devido a alta afinidade de ligação entre AtMYB30 e o DNA (testado nos testes anteriores) indicando que o DNA pode reduzir a fluorescência intrínseca da proteína. É importante ressaltar que em altas concentrações de DNA a intensidade de fluorescência do triptofano pode resultar a partir de complexos específicos, assim como dos complexos não específicos. O declínio de



fluorescência a partir da intensidade máxima até a saturação de DNA foi de cerca de 30% para a proteína selvagem e o mutante C49A e de aproximadamente 50% para o mutante C53A. Estes dados confirmam que a extensão na qual a fluorescência de uma proteína é reduzida pela interação ao DNA é proporcional à concentração do agente que causa esta redução de fluorescência (*Quencher*), neste caso o DNA, e a extensão desta alteração é proporcional à quantidade de proteína ligada. Assim, como esta proteína possui a região de ligação ao DNA na região N-terminal com os três resíduos de triptofano conservados, é possível sugerir que a redução da fluorescência destes aminoácidos é devido ao seu envolvimento na ligação entre AtMYB30 e o DNA. E como cada uma destas repetições características de triptofanos é conservada evolutivamente, sugere-se que este domínio de ligação é organizado em um arranjo estequiométrico, no qual os triptofanos poderiam ocupar uma posição estrutural e funcional bastante importante (ZARGARIAN et al., 1999).

Além disso, a redução desta fluorescência pode ser também, em parte, devido à alteração conformacional da proteína quando em ligação ao DNA na formação do complexo e não apenas devido à fluorescência intrínseca dos triptofanos. Finalmente, esta observação é uma indicação que o domínio, que consiste em três repetições imperfeitas dos resíduos de triptofano, exibe importante significado na atividade de ligação ao DNA de AtMYB30.

**Figura 48.** Análise da fluorescência intrínseca de AtMYB30 e mutantes a 25°C.

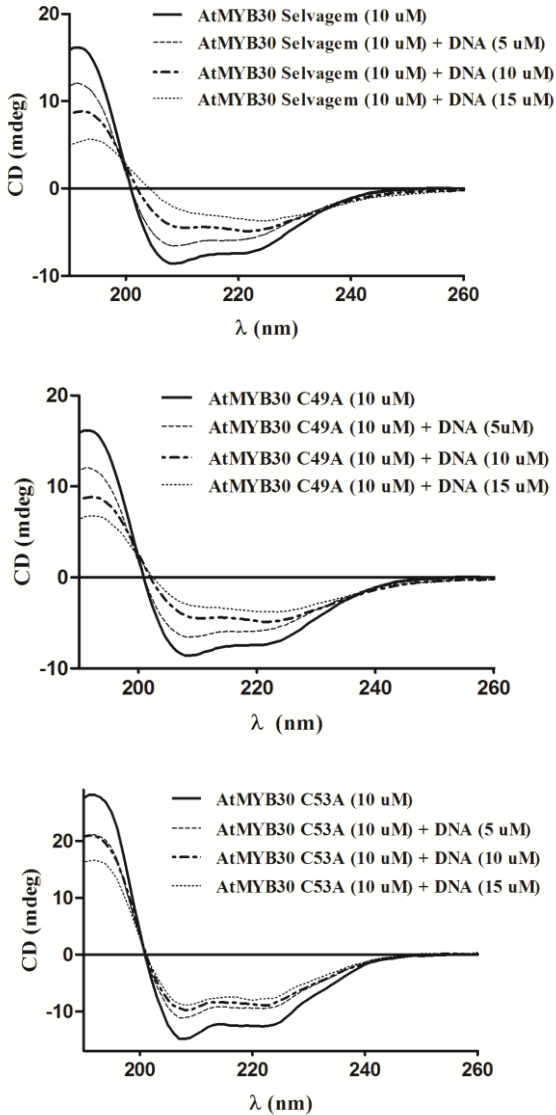


Espectro de emissão de fluorescência de AtMYB30 selvagem (A) e mutantes C49A (B) e C53A (C), a 10  $\mu\text{M}$ , excitação a 295 nm com titulação da sonda de DNA nas concentrações de 1;2,5; 4; 5,5; 7; 8,5; 10 e 11,5  $\mu\text{M}$ . Os espectros foram adquiridos a 20 °C.

#### 4.11 Espectroscopia de Dicroísmo Circular de AtMYB30 e mutantes na análise da interação com DNA

A alteração na estrutura secundária da proteína na presença do DNA foi avaliada por dicroísmo circular (CD) e os resultados são mostrados na figura 49. O espectro de UV-distante de AtMYB30 medido a 15°C foi caracterizado por dois mínimos, 208 e 222 nm e um máximo a 190 nm (Figura 49A, B e C Linha contínua), em concordância com a proteína enovelada corretamente. Estes dois mínimos são indicativos de proteínas com estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice (SAMANTA et al., 2014). Com a adição crescente de DNA (Figura 49), a intensidade da banda aumenta regularmente sem alteração significativa dos picos apenas no mutante C53A, enquanto que para a proteína selvagem e o mutante C49A a ligação ao DNA parece alterar mais a proteína estruturalmente reduzindo seu conteúdo de estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice. Assim, a partir destes resultados, é possível assumir que, embora as duas cisteínas (C49 e C53) sejam importantes neste tipo de interação, a cisteína 53 parece interagir mais com o DNA (visualizado no mutante C49A), corroborando com alguns dos valores de  $K_D$  encontrado anteriormente, no qual o mutante C49A ( $K_D \sim 13$  nM) exibiu mais afinidade com o DNA que C53A ( $K_D \sim 23$  nM).

**Figura 49.** Espectroscopia de dicroísmo circular na região espectral do UV-distante na avaliação do efeito estrutural da interação de AtMYB30 selvagem e mutantes ao DNA.



As análises de CD na região espectral de UV-distante foram feitas utilizando 10  $\mu\text{M}$  de cada proteína em tampão 10 mM Tris pH7,5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA e adições crescentes (5 a 25  $\mu\text{M}$ ) da sonda de DNA. Os espectros representam a média de três escaneamentos e os dados de três experimentos independentes.

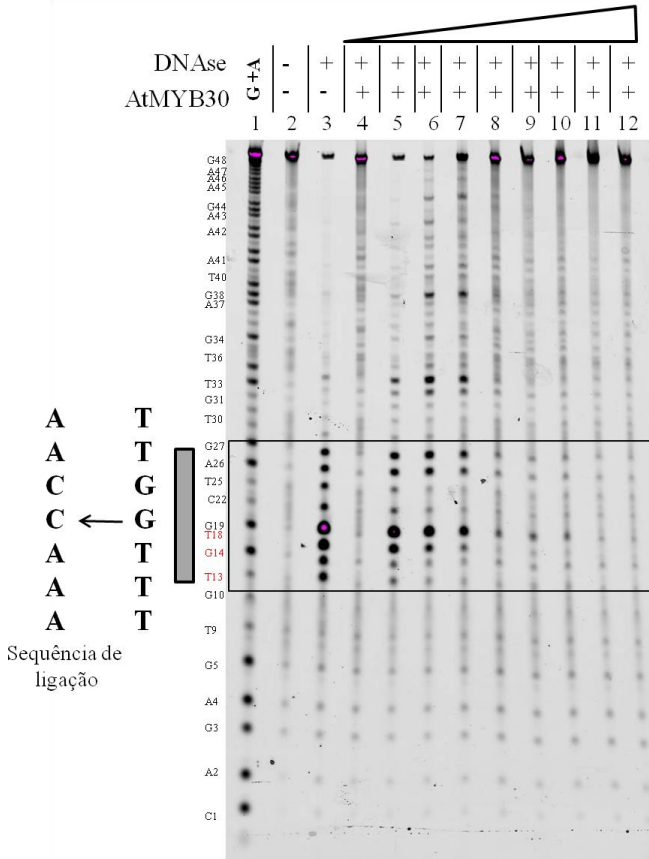
A análise quantitativa do conteúdo de  $\alpha$ -hélice não pôde ser estimada, provavelmente, devido ao fato que todas as análises foram feitas apenas com a proteína contendo o domínio de ligação ao DNA e não a proteína na sua forma completa. Apesar disso, é bastante claro a redução do conteúdo de  $\alpha$ -hélice e alterações conformacionais com a formação do complexo DNA-proteína. O aumento do conteúdo de  $\alpha$ -hélice pode ser explicado pelo fato de o DNA combinar, possivelmente, com os resíduos de aminoácidos da cadeia polipeptídica de AtMYB30 e perturbar a rede eletrostática interior da proteína. Estes dados estão de acordo com a espectroscopia de fluorescência, que mostrou que o DNA interage com AtMYB30 causando um leve desenovelamento da proteína e alterando a estrutura secundária de AtMYB30  $\alpha$ -hélice e sua conformação.

#### 4.12 Análise dos sítios de interação no DNA por *DNAse I Footprint*

Com o intuito de investigar as interações do complexo AtMYB30-DNA e confirmar experimentalmente a localização dos sítios de ligação teóricos no DNA, foi utilizado o teste de *DNAse I footprint* com uma sonda marcada com fluorescência.

Os dados obtidos a partir desta interação mostraram que a sequência AAACCAA do fragmento completo de 48 pb foi protegido no experimento e que corresponde à sequência do sítio de ligação de proteínas MYB rico em AC (TAVARES et al., 2014) e mesma sequência utilizada nos experimentos de EMSA que comprovaram a atividade de ligação de AtMYB30 (Figura 50). Assim, esta proteção corresponde à sequência prevista, na qual AtMYB30 liga-se à sonda específica, na qual a DNase não pôde clivar o DNA durante a reação de clivagem em que esta molécula forma complexo com a proteína. Com

**Figura 50.** Análise de interação AtMYB30 e o DNA por *DNase I Footprint*.



Linha 1, controle contendo o sequenciamento G+A (Maxam-Gilbert); Linha 2, controle contendo o DNA sem tratamento; Linha 3, Controle positivo contendo o DNA obtido após a clivagem com DNaseI; Linhas 4-12, padrão de DNA obtido após a clivagem com DNase I quando formando complexo com AtMYB30 selvagem em concentrações crescentes como descrito em materiais e métodos (10, 110, 300, 500 nM; 1, 5, 10, 50, 100  $\mu$ M, respectivamente). Os pontos de clivagem gerados a partir do teste (Maxam-Gilbert) são mostrados ao lado de sua respectiva banda. Bases do DNA envolvidas na ligação à proteína estão indicadas à esquerda provenientes dos sítios de clivagem mostrados em vermelho.

concentrações crescentes de AtMYB30 a proteção do DNA é ampliada, como mostrado na figura 50 , linhas 5, 6 e 7. Esta sequência consenso rica em bases AC é provavelmente a região do DNA que liga-se ao fragmento R2R3 de AtMYB30 e que contém dois motivos HVH consecutivos (GABRIELSEN et al., 1991). Além disso, a proteção observada pela redução da clivagem pela DNase é observada mais claramente na sequência específica de ligação do que quando comparada ao restante da fita de DNA. A mesma técnica foi utilizada para identificar sequências de interação de MIDA1 (proteína de mamíferos), a qual regula o crescimento celular e possui sequência de aminoácidos com repetições de triptofano, característica comum entre as proteínas MYB e sua região de interação (INOUE, SHOJI, OBINATA, 2000). Zobel e colaboradores (1991) identificaram 8 sítios de ligação de c-Myb humana com diferentes afinidades utilizando *DNase I footprint*: AACXGTT ou AACGTT (sítios diferentes do que havia sido previsto como sequência consenso) e mostraram que regiões flanqueadoras ricas em AT aumentam a afinidade de ligação dos sítios.

Apesar da sequência de DNA para AtMYB30 não apresentar estas sequências flanqueadoras ricas em AT, a interação apresentou alta afinidade nos experimentos de EMSA comparáveis a diversos fatores da família MYB. Por outro lado, foi observado por análise mutacional e por *footprint*, que o sítio de ligação do DNA para c-Myb é funcionalmente bipartite, enquanto a primeira metade é responsável pela ligação (reconhecida pela repetição R3), a segunda metade do sítio é apenas modulatória (interage com a repetição R2) (ORDING et al., 1994). Em plantas há poucos estudos que utilizam esta mesma técnica para analisar a interação DNA-proteína como, por exemplo, para PcMYB1 e que mostrou a interação com o seu promotor (FELDBRUGGER et al., 1997). Atualmente novas técnicas têm surgido para identificar e analisar sítios de ligação para fatores de transcrição, como a amplificação cíclica e seleção de alvos conhecida como CASTing (PROUSE E CAMPBELL, 2013) ou regulações combinatórias utilizando técnicas de bioinformática associadas a técnicas experimentais (WANG et al., 2013). Apesar dos novos métodos, a técnica de *footprint* tradicional ou adaptada como o sequenciamento de nova geração (DNase-seq) continua sendo amplamente utilizada como uma técnica *in vitro* para determinar regiões específicas nas quais o DNA interage com proteínas e definir elementos cis e trans desta ligação (BAROZZI et al., 2014).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As vias de transdução de sinais podem ser utilizadas como ferramentas importantes nos estudos de mecanismos em células vegetais e animais, assim como na biotecnologia para manipulação de organismos vivos e manipulação de DNA recombinante na obtenção de melhorias nas respectivas áreas. Na agricultura, o controle baseado em produtos químicos, além de ser dispendioso, causa impactos indesejáveis ao homem e ao ambiente, criando a necessidade de buscar formas alternativas e também eficazes de controle de pragas, por exemplo. A compreensão dos mecanismos de defesa e resistência de plantas, bem como a busca de genes ligados a esses processos, representam um caminho para encontrar formas de se transpor os problemas causados por diversos patógenos. Análises de interação entre plantas e alguns patógenos indicam que fatores de transcrição da família MYB são expressos diferencialmente em plantas mais resistentes. Em *Arabidopsis*, as proteínas MYB são amplamente estudadas, sendo que muitas delas apresentam funções bem determinadas, incluindo o controle sobre as respostas de defesa. Apesar das análises destas vias transcricionais mostrarem evidências da possível participação destes fatores de transcrição no controle de processos em vegetais, como a resposta de defesa, devido ao grande número e diversidade destas proteínas, ainda há um longo caminho a percorrer nesta área. Ou seja, os fatores de transcrição apresentam um grande potencial como candidatos no controle de processos fundamentais nas respostas de adaptação e defesa.

É neste contexto que o fator de transcrição da família MYB, AtMYB30 de *Arabidopsis thaliana*, pode ser de fundamental importância nesta aplicação. Com o objetivo de aumentar o conhecimento sobre este fator de transcrição, bem como sua atividade funcional e alterações estruturais sob o efeito do óxido nítrico, molécula fundamental em processos de defesa, o presente estudo analisou o domínio de ligação ao DNA desta proteína.

Utilizando técnicas como o Biotin-Switch, CD e EMSA foi observado que as cisteínas 49 e 53 são S-nitrosiladas por 1 mM de SNAP, inibindo a ligação ao DNA. Por mutagênese sítio dirigida dos resíduos de cisteína foi possível confirmar que a S-nitrosilação ocorre nestes aminoácidos específicos. A interação DNA-proteína foi fortemente inibida por outro agente nitrosilante, como o SNP, e a inibição da atividade de interação com a proteína selvagem e mutantes



foi revertida por DTT, sugerindo que as cisteínas 49 e 53 são S-nitrosiladas e o estado reduzido é necessário para a atividade de ligação ao DNA. Além disso, usando dicroísmo circular, foi observado que a S-nitrosilação afeta a estrutura secundária do domínio de ligação AtMYB30 e mutantes C49A e C53A. Todos estes resultados sugerem que a nitrosilação é um dos mecanismos que induzem a inibição da interação de AtMYB30 e o DNA mediada pelo NO. Nossos resultados demonstram a importância desta modificação pós-traducional para AtMYB30 e suporta outras evidências de que a S-nitrosilação é um importante regulador desta proteína no metabolismo vegetal. Tem sido demonstrado que AtMYB30 é um regulador positivo da resposta de hipersensibilidade, a qual é acompanhada por uma intensa produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio induzindo a morte celular em plantas. É possível propor que a S-nitrosilação de AtMYB30 e a subsequente inibição de sua ligação ao DNA pode estar agindo durante a RH, limitando o dano decorrente da morte celular de forma descontrolada, uma vez induzida pela atividade de AtMYB30. Este é o segundo fator de transcrição da família MYB de *A. thaliana* que demonstra ser inibido por ação do NO. Recentemente publicadas, algumas evidências indicam que AtMYB30 é uma proteína multi-regulada ligada a diversas respostas frente a estímulos ambientais e age como um importante regulador sendo, por isso, suscetível a diferentes modificações (fosforilação, sumoilação, ubiquitinação). Este trabalho traz evidências de uma quarta modificação covalente em AtMYB30 *in vitro*.

## 6 PERSPECTIVAS

A clonagem e a caracterização bioquímica de AtMYB30 de *A. thaliana* é o início de uma série de estudos que ainda podem ser realizados neste tema.

Para a continuação deste estudo tem-se como perspectivas:

- Investigar os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da interação de AtMYB30 ao DNA por outras técnicas como Calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e Ressonância plasmônica de superfície (SPR).
- Determinar a estrutura cristalina de AtMYB30 sozinha e/ou associada ao DNA por Difração de Raio-X.
- Investigar a implicação biológica de AtMYB30 e o efeito do NO na fisiologia de *A. thaliana*.

## 7 ESTÁGIO DOUTORAL

Através do projeto CAPES-COFECUB SV553/07, coordenado pelo prof. Dr. Paulo E. Lovato, foi possível que eu participasse de um estágio doutoral pelo período de 6 meses (outubro 2010-abril/2011) sob orientação da pesquisadora Dra. Eliane Dumas Gaudot no Instituto de pesquisa em Dijon/França (Unité Mixte de Recherches Plantes-Microbes-Environnement INRA-Université de Bourgogne). Durante este período analisei interações simbióticas do tipo micorriza entre *Medicago truncatula* e *Glomus intraradices* na busca da identificação de proteínas envolvidas nesta interação para elucidação do processo. Para tanto, as plantas foram cultivadas quando em interação com o respectivo fungo, suas raízes coletadas e submetidas à técnica de Microdissecção a Laser para o isolamento destas regiões de interação de forma bastante específica para posterior identificação das proteínas por espectrometria de massa. Este período foi bastante importante, já que, além de praticar a língua nativa e conhecer diversas culturas, pude conhecer a pesquisa científica em outro âmbito, já que a infraestrutura dos laboratórios era excelente e todo o material e equipamento necessário para a execução do projeto estava disponível. Acredito que o período de estágio foi primordial para minha vivência científica como um todo e acrescentou um aprendizado de técnicas fundamentais com o manuseio de plantas para o doutorado.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. *Plant Pathology*. 5. Ed. San Diego, Califórnia: Elsevier Academic Press, 2004. 922p.

AKASHI, S.; OSAWA, R.; NISHIMURA, Y. Evaluation of protein-DNA binding affinity by electrospray ionization mass spectrometry. **J Am Soc Mass Spectrom**. v.16, n.1, p.116-125, 2005.

AMBAWAT, S.; SHARMA, P.; YADAV, N.R.; YADAV, R.C. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. **Physiol Mol Biol Plants**. v. 19, n. 3, p. 307-321, 2013.

ASTIER J. et al. Nitric oxide inhibits the ATPase activity of the chaperone-like AAA+ ATPase CDC48, a target for S-nitrosylation in cryptogean signalling in tobacco cells. **Biochem J**. v.447, n.2, p.249-60, 2012.

ASTIER,J. et al. S-nitrosylation: an emerging post-translational protein modification in plants. **Plant Sci**. v.181, n.5, p.527-533, 2011.

AUSUBEL, F. M. et al. **Short protocols in molecular biology**. 2. 1992. 740

BAROZZI, I.; BORA, P.; MORELLI, M.J. Comparative evaluation of DNase-seq footprint identification strategies. **Front Genet**. v.5, 278. eCollection 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAUN, E.L.; GROTEWOLD, E. Newly discovered plant c-myb-like genes rewrite the evolution of the plant myb gene family. **Plant Physiol**, v. 121, p. 21-24, 1999.

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**.v. 425, p.52-56, 1998.

CENTURY, K.; REUBER, T.L.; RATCLIFFE, O.J. Regulating the regulators: the future prospects for transcription-factor based agricultural biotechnology products. **Plant Physiol**. v.147, p.20-29, 2008.

CHRISTENSEN, A. B. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. **Molecular Plant Pathology**, v. 3, n. 3, p. 135-144, 2002.

CKLESS, K. Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research Advances in Experimental Medicine and Biology Redox. **Proteomics: From Bench to Bedside**, v.806, p 301-317, 2014.

CLEMENCIA M. et al. Front. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. **Plant Sci.**, eCollection 2014.

COLL, N.S.; EPPL, P.; DANGL, J.L. Programmed cell death in the plant immune system. **Cell Death Differ.** v.18, p.1247-1256, 2011.

CORPAS, F.J. et al. Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. **Planta**, v.224, n.2, p.246-254, 2006.

CRAWFORD, N.M.; GUO, F.Q. New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. **Trends Plant Sci.** v.10, n.4, p.195-200, 2005.

DANIEL, X.; LACOMME, C.; MOREL, J.B.; ROBY, D. A novel myb oncogene homologue in *Arabidopsis thaliana* related to hypersensitive cell death. **Plant J.**, v. 20(1), p. 57-66, 1999.

DEY, B. et al. DNA-protein interactions: methods for detection and analysis. **Mol Cell Biochem.** v. 365, n.(1-2), p.279-299, 2012.

DEXHEIMER, T.S.; POMMIER, Y. DNA cleavage assay for the identification of topoisomerase I inhibitors. **Nat Protoc.** v.3, n.11, p.1736-1750, 2008.

DOREY, S.; BAILLIEUL, F.; PIERREL, M. A.; SAINDRENAN, P.; FRITIG, B.; KAUFFMANN, S. Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v. 10, p. 646-655, 1997.

DU, H. et al. Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. **Biochemistry (Mosc)**. v.74, n.1, p.1-11, 2009.

DU, H. et al. Genome-wide analysis of the MYB transcription factor superfamily in soybean. **BMC Plant Biol**. v.9, n.12, p.106, 2012.

DURNER, J.; KLESSIG, D.F. Nitric oxide as a signal in plants. **Curr Opin Plant Biol**. v.2, n.5, p.369-74, 1999.

DURNER, J.; SHAH, J.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid and disease resistance in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, p. 266-274, 1997.

DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annu Rev Phytopathol**. v.42, p.185-209, 2004.

ECCO, G. et al. Mycobacterium tuberculosis tyrosine phosphatase A (PtpA) activity is modulated by S-nitrosylation. **Chemical Communications**, v. 46, n. 40, p. 7501-7503, 2010.

EDELHOCH, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. **Biochemistry**, v. 6, n. 7, p. 1948-1954, 1967.

FARES, A.; ROSSIGNOL, M.; PELTIER, J.B. Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in Arabidopsis. **Biochem Biophys Res Commun**. v,416(3-4), p.:331-336, 2011.

FAVICCHIO, R.; DRAGAN, A.I.; KNEALE, G.G., CHRISTOPHER, M. Fluorescence Spectroscopy and Anisotropy in the Analysis of DNA-Protein Interactions. **Read Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**. v.121, p.23-34, 2014.

FEECHAN, A., et al. A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, v.102, p.8054-8059, 2005.

FELDBRÜGGE, M.; SPRENGER, M.; HAHLBROCK, K.; WEISSHAAR, B. (1997). PcMYB1, a novel plant protein containing a DNA-binding domain with one MYB repeat, interacts in vivo with a light-regulatory promoter unit. *Plant J*. 11(5), 1079-1093.

FERNANDES, C.F. et al. Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Porto Velho, RO, 2009.

FOSTER, M.W. Methodologies for the characterization, identification and quantification of S-nitrosylated proteins. **Biochim Biophys Acta**, v.1820, n.6, p.675-83, 2012.

FOSTER, M.W. Methodologies for the characterization, identification and quantification of S-nitrosylated proteins. **Biochim Biophys Acta**. v.1820, n.6, p.675-83, 2012.

FROIDURE, S.; ROBY, D.; RIVAS, S. Expression of the Arabidopsis transcription factor AtMYB30 is post-transcriptionally regulated. **Plant Physiol Biochem**. v.48, n.8, p.735-739, 2010.

GABRIELSEN, O.S.; SENTENAC, A.; FROMAGEOT, P. Specific DNA binding by c-Myb: evidence for a double helix-turn-helix-related motif. **Science**. v.253, n.5024, p.1140-1143, 1991.

GASTON, K.; JAYARAMAN, P.S. Transcriptional repression in eukaryotes: repressors and repression mechanisms. **Cell Mol Life Sci**. v.60, n.4, p.721-741, 2003.

GAUPELS, F.; KURUTHUKULANGARAKOOLA, G.T.; DURNER, J. Upstream and downstream signals of nitric oxide in pathogen defence. **Curr Opin Plant Biol**. v.14, n.6, p.707-14, 2011.

GOULD, N.; DOULIAS, P.T.; TENOPOULOU, M.; RAJU, K.; ISCHIROPOULOS, H. Regulation of protein function and signaling by reversible cysteine S-nitrosylation. **J Biol Chem**. v.288, n.37, p.26473-26479, 2013.

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**, v. 76, p. 543-553, 1994.

GUPTA, K.J. et al. The emerging roles of nitric oxide (NO) in plant mitochondria. **Plant Sci**. v.181, n.5, p.520-526, 2011.

HAGER, G.L.; MCNALLY, J.G.; MISTELI, T. Transcription dynamics. **Mol Cell**. v.24, n.35(6), p.741-53, 2009.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W., JONES, R. (Ed.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, Maryland, **American Society of Plant Physiologists**. cap. 21, p. 1102-1157, 2000.

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.

HENGGEN, P.N. Methods and reagents – Carriers for precipitating nucleic acids. **TIBS**. v.21, p. 224-225, 1996.

INOUE, T.; SHOJI, W.; OBINATA, M. MIDA1 is a sequence specific DNA binding protein with novel DNA binding properties. **Genes Cells**. v.5, n.9, p.699-709, 2000.

JAFFREY, S. R.; SNYDER, S. H. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. **Science's STKE [electronic resource]: signal transduction knowledge environment**, v. 2001, n. 86, 2001.

JIA, L. et al. Evolutionary dynamics of the DNA-binding domains in putative R2R3-MYB genes identified from rice subspecies indica and japonica genomes. **Plant Physiol**. v. 134, p. 575-585, 2004.

JIANG, C. et al. Ordered origin of the typical two- and three-repeat Myb genes. **Gene**.v.4, n.326, p.13-22, 2004.

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** . v. 31, p. 453-463, 1982.

KÖNIG, P.; FAIRALL, L.; RHODES, D. Sequence-specific DNA recognition by the myb-like domain of the human telomere binding protein TRF1: a model for the protein-DNA complex. *Nucleic Acids Res*. v.26, n.7, p.1731-1740, 1998.

KOSMA, D.K. AtMYB41 activates ectopic suberin synthesis and assembly in multiple plant species and cell types. **Plant J.**, v.80, n.2, p.216-29, 2014.

KRANZ, H.; SCHOLZ, K.; WEISSHAAR, B. c-MYB oncogene-like genes encoding three MYB repeats occur in all major plant lineages.



- KWON, E. et al. AtGSNOR1 function is required for multiple developmental programs in Arabidopsis. **Planta**. v.236, n.3, p.887-900, 2012.
- LEITNER, M. NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence. **Curr Opin Plant Biol**. v.12, n.4, p.451-458, 2009.
- LEWIN, B. Regulation of transcription: factors that activate the basal apparatus IN: **Genes V**. Oxford, p. 879-910, 1994.
- LI, H.; WAN, A. Apoptosis of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes: possible roles of nitric oxide and the thioredoxin. **Mediators Inflamm**. v.2013, p.953462-9, 2013.
- LI, L.; YU, X.; THOMPSON, A.; GUO, M.; YOSHIDA, S.; ASAMI, T. CHORY, J.; YIN, Y. Arabidopsis MYB30 is a direct target of BES1 and cooperates with BES1 to regulate brassinosteroid-induced gene expression. **The Plant Journal**, v. 58, p.275–286, 2009.
- LIN, J.C.; BARBOSA, A.S. Técnicas de análise da regulação da transcrição gênica e suas aplicações na endocrinologia molecular. **Arq. Bras. endocrinol. Metab**. v. 46, n.4, p. 330-340, 2002.
- LINDERMAYR C. et al. Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of Arabidopsis thaliana by nitric oxide. **Plant Cell**. v.22, n.8, p.2894-907, 2010.
- LINDERMAYR, C.; DURNER, J. S-nitrosylation in plants: pattern and function, **J. Proteomics**, v. 73, p. 1-9, 2009.
- LIP, S., KUROWSKA, M., SZAREJKO, I. NAC transcription factors family and increased tolerance to water deficiency in plants. **Postepy Biochem**, v.59,n.3, p.295-304, 2014.
- LIPSICK, J. S. One billion years of Myb. **Oncogene**, v. 13, p. 223-235, 1996.
- LIU, M. et al. Site-specific proteomics approach for study protein S-nitrosylation, **Anal. Chem**, v. 82, p.7160-7168, 2010.
- MAJMUDAR, J.D.; MARTIN, B.R. Strategies for profiling native S-nitrosylation. **Biopolymers**. v, 101(2), p.173-179, 2013.

MARINO, D. Arabidopsis ubiquitin ligase MIEL1 mediates degradation of the transcription factor MYB30 weakening plant defence. **Nat Commun.** v.4, p.1476, 2013.

MARINO, S. M.; GLADYSHEV, V. N. Analysis and functional prediction of reactive cysteine residues. **J. Biol. Chem.** v.287, p.4419-4425, 2012.

MARINO, S. M.; GLADYSHEV, V. N. Cysteine function governs its conservation and degeneration and restricts its utilization on protein surfaces. **J. Mol. Biol.** v.404, p. 902–916, 2010.

MARTÍNEZ-RUIZ, A.; CADENAS, S.; LAMAS, S. Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. **Free Radic Biol Med.** v. 51, n.1, p.17-29, 2011.

MATIOLO, C.; et al. S-nitrosylation of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase A (PtpA) induces its structural instability. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 1, p. 191-196, 2013.

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

MURPHY, E. et al. Signaling by S-nitrosylation in the heart. **J Mol Cell Cardiol.** v.73, p.18-25, 2014.

NAGANO, T.; YOSHIMURA, T. Bioimaging of nitric oxide. **Chem Rev.** v.102, n.4, p.1235-70, 2002.

NAKAMURA, T. et al. Aberrant protein s-nitrosylation in neurodegenerative diseases. **Neuron.** v. 22, n. 78, p. 596-614, 2013.

NAKASHIMA, K.; ITO, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. **Plant Physiol.**, v.149, n.1, p.88-95, 2009.

NARITA, I.Y. Análise do óxido nítrico produzido durante a indução da organogênese adventícia em bases foliares de abacaxizeiro. 2010. Dissertação (Ciências/Botânica) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

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

OGATA, K. et al. The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA binding domain is reserved for DNA recognition and trans-activation. **Nat. Struct. Biol.** v. 3, p. 178-1875, 1996.

OKADA, S. Reconstitution of *Arabidopsis thaliana* SUMO pathways in *E. coli*: functional evaluation of SUMO machinery proteins and mapping of SUMOylation sites by mass spectrometry. **Plant Cell Physiol.** v.50, n.6, p.1049-1061, 2009.

OPPENHEIMER, D.G. et al. A *myb* gene required for leaf trichome differentiation in *Arabidopsis* is expressed in stipules. *Cell.* v. 67(3), p. 483-493, 1991. ORDING, E.; KVÁVIK, W.; BOSTAD, A.; GABRIELSEN, O.S. Two functionally distinct half sites in the DNA-recognition sequence of the Myb oncoprotein. **Eur J Biochem.** v.222, n.1, p.113-20, 1994.

PACE, C. N. et al. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein Science,** v. 4, n. 11, p. 2411-2423, 1995.

PAZ-ARES, J. et al. The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to *myb* proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. **EMBO Journal.** v. 6, p. 3553-3558, 1987.

PEDROSO, M.C.; MAGALHAES, J.R.; DURZAN, D. A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. **J Exp Bot.** v.51, n.347, p.1027-1036, 2000.

POWERS, J.P.; ROZEK, A.; HANCOCK, R.E. Structure-activity relationships for the beta-hairpin cationic antimicrobial peptide polyphemusin I, **Biochim. Biophys. Acta.** v.1698, p.239-250, 2004.

PROUSE, M.B.; CAMPBELL, M.M. The interaction between MYB proteins and their target DNA binding sites. **Biochim Biophys Acta,** 1819:67-77, 2012.

PROUSE, M.B.; CAMPBELL, M.M. Interactions between the R2R3-MYB transcription factor, AtMYB61, and target DNA binding sites. **PLoS One.** v.31, 8(5): Print 2013.

PTASHNE, M. How eukaryotic transcriptional activators work. **Nature,** v. 335, n. 6192, p. 683-689, 1988.

RABINOWICZ, P.D. et al. Maize R2R3 Myb genes: Sequence analysis reveals amplification in the higher plants. **Genetics**, v. 153, p. 427-444, 1999.

RAFAELLE, S.; RIVAS, S.; ROBY, D. An essential role for salicylic acid in AtMYB30-mediated control of the hypersensitive cell death program in Arabidopsis. **FEBS Letters**, v. 580, p. 3498–3504, 2006.

RAFFAELE, S. et al. A MYB transcription factor regulates very-long-chain fatty acid biosynthesis for activation of the hypersensitive cell death response in Arabidopsis. **Plant Cell**. v.20, n.3, p.752-67, 2008.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira** 28:123-130. 2003.

RIECHMANN, J.L. et al. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. **Science**. v.15, n.290(5499), p.2105-2110, 2000.

ROCKEL, P. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. **J Exp Bot**, v.53, n.366, p.103-110, 2002.

ROMERO-PUERTAS, M.C. , S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. **Plant Cell**, v.19, n.12, p.4120-4130, 2007.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; RODRÍGUEZ-SERRANO, M.; SANDALIO, L.M. Protein S-nitrosylation in plants under abiotic stress: an overview. **Front Plant Sci**. v.20, n.4, p.373, 2013.

RUSTERUCCI, C. et al. S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in Arabidopsis, both locally and systemically. **Plant Physiol**, v. 143, p.1282–1292, 2007.

SAMANTA, A.; JANA, S.; RAY, D.; GUCHHAIT, N. Modulated photophysics of a cationic DNA-staining dye inside protein bovine serum albumin: study of binding interaction and structural changes of protein. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**. v.121, p. 23-34, 2014.

SERPA, V. et al. Inhibition of AtMYB2 DNA-binding by nitric oxide involves cysteine S-nitrosylation. **Biochem Biophys Res Commun.** v.361, n.4, p.1048-1053, 2007.

SETH, D.; STAMLER, J.S. The SNO-proteome: causation and classifications, *Curr.Opin. Chem. Biol.*, v.15, p.1–8, 2010.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.O.; VORM, M. Mann Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Anal. Chem.**, v.68, p. 850-858, 1996.

SHI, X. et al. Evaluation of binding affinity of protein-mutant DNA complexes in solution by laser spray mass spectrometry. **J Am Soc Mass Spectrom.** v.17, n.4, p.611-620, 2006.

SPADARO, D. et al. The redox switch: dynamic regulation of protein function by cysteine modifications. **Physiol Plant.** v.138, n.4, p.360-371, 2010.

STAMLER, J. S.; LAMAS, S.; FANG, F. C. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. **Cell**, v. 106, p.675–683, 2001.

STAMLER, J.S.; TOONE, E.J.; LIPTON, S.A.; SUCHER, N.J. (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. **Neuron.** v. 18, p. 691–696, 1997.

STRACKE, R.; WERBER, M.; WEISSHAAR, B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Curr Opin Plant Biol.** v.4, n.5, p.447-456, 2001.

TADA, Y. et al. Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. **Science.** v.321, p.952–956, 2008.

TAHIROV, T.H. Mechanism of c-Myb-C/EBP beta cooperation from separated sites on a promoter. **Cell.** v.11, n.108(1), p.57-70, 2002.

TAVARES CP. et al. S-nitrosylation influences the structure and DNA binding activity of AtMYB30 transcription factor from *Arabidopsis thaliana*. **Biochim Biophys Acta.**v.1844, n.4, p.810-7, 2014.

THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 408(6814), p. 796-815, 2000.

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

TRAPET, P. et al. NO signaling in plant immunity: A tale of messengers. **Phytochemistry**. 2014 Apr 5. pii: S0031-9422(14)00134-4. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.03.015. [Epub ahead of print].

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**, v. 5, p. 1529-1539, 1993.

VAILLEAU, F. et al. A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. **Plant biology**, v. 99, n. 15, p. 10179–10184, 2002.

VERBENE, M. C. et al. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 779-783, 2000.

VILARRASA-BLASI, J. Regulation of plant stem cell quiescence by a brassinosteroid signaling module. **Dev Cell**. v.14, n.30, p.36-47, 2014.

VISACKA, K. Synergism of the two Myb domains of Tay1 protein results in high affinity binding to telomeres. **J Biol Chem**. v.287. n.38, p.32206-15, 2012.

WANG, H. et al. A valid strategy for precise identifications of transcription factor binding sites in combinatorial regulation using bioinformatic and experimental approaches. **Plant Methods**. v.24; n.9, p.34, 2013.

WANG, Y. et al. Loake, S-nitrosylation: an emerging redox-based post-translational modification in plants. **J. Exp. Bot**, v.57, p. 1777–1784, 2006.

WANG, Y.Q. et al. S-nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity. **J Biol Chem**, v. 23, n.284, p.2131-2137, 2009.

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

XIAO, Q. et al. Protein N-terminal processing: substrate specificity of *Escherichia coli* and human methionineaminopeptidases. **Biochemistry**. v.6, n.49(26): 5588-5599, 2010.

XUE, Y. et al. GPS-SNO: computational prediction of protein S-nitrosylation sites with a modified GPS algorithm, **PLoS ONE**, v. 5, 2010.

YANG, S.W. et al. Expression of the telomeric repeat binding factor gene NgTRF1 is closely coordinated with the cell division program in tobacco BY-2 suspension culture cells. **J Biol Chem**. v. 278, n.24, p.21395-21407, 2003.

YANG, Y.; KLESSIG, D.F. Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus-inducible myb oncogene homolog from tobacco. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1 v. 93(25), p. 14972-14977, 1996.

YANHUI, C. et al. The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. **Plant Mol Biol**. v.60, n.1, p.107-24, 2006.

YU, M. et al. A sleigh ride through the SNO: regulation of plant immune function by protein S-nitrosylation. **Curr Opin Plant Biol**, v.15, n.4, p.424-430, 2012.

YUN, B.W. S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. **Nature**, v.478, n.7368, p.264-8, 2011.

ZARGARIAN, L. et al. Myb-DNA recognition: role of tryptophan residues and structural changes of the minimal DNA binding domain of c-Myb. **Biochemistry**. v.38, n.6, p. 1921-1929, 1999.

ZHANG, L. et al. Molecular characterization of 60 isolated wheat MYB genes and analysis of their expression during abiotic stress. **J Exp Bot**. v.63(1), p.203-214, 2012.

ZHENG, Y.; SCHUMAKER, K.S.; GUO, Y. Sumoylation of transcription factor MYB30 by the small ubiquitin-like modifier E3 ligase SIZ1 mediates abscisic acid response in *Arabidopsis thaliana*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.31, p.109-31, 2012.

ZOBEL, A., et al. Interaction of the v- and c-Myb proteins with regulatory sequences of the human c-myc gene. **Oncogene**. v.6, n.8, p.1397-407, 1991.





## 8. ANEXO A - Artigo relacionado à tese

TAVARES, C.P.; VERNAL, J., DELENA, R.A.; LAMATTINA, L.; CASSIA, R.; TEREZZI H. S-nitrosylation influences the structure and DNA binding activity of AtMYB30 transcription factor from *Arabidopsis thaliana*. **Biochim Biophys Acta - Proteins and Proteomics**. v. 1844, n. 4, p. 810-817, 2014.

doi: 10.1016/j.bbapap.2014.02.015. Epub 2014 Feb 26.

Biochimica et Biophysica Acta 1844 (2014) 810–817



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbapap](http://www.elsevier.com/locate/bbapap)



### S-nitrosylation influences the structure and DNA binding activity of AtMYB30 transcription factor from *Arabidopsis thaliana*



Carolina Pereira Tavares<sup>a</sup>, Javier Vernal<sup>a</sup>, Ricardo Alexandre Delena<sup>a</sup>, Lorenzo Lamattina<sup>b</sup>, Raul Cassia<sup>b</sup>, Hernán Terenzi<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Biologia Molecular Estrutural-INBEB, Departamento de Bioquímica, CCR, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

<sup>b</sup> Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, CCI245 (7600) Mar del Plata, Argentina

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 28 September 2013

Received in revised form 14 February 2014

Accepted 19 February 2014

Available online 26 February 2014

##### Keywords:

MYB transcription factors

Nitric oxide

Nitrosylation

AtMYB30 DBD

*Arabidopsis*

Biotin switch assay

#### ABSTRACT

MYB proteins are a family of transcription factors that play an important role in plant development and regulatory defense processes. *Arabidopsis thaliana* MYB30 (AtMYB30), a member of this protein family, is involved in cell death processes during the hypersensitive response (HR) of plants. HR is characterized by a vast production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO). NO may thus influence the binding of AtMYB30 to DNA. In this work we evaluated the effect of NO on AtMYB30 DNA binding activity, and also in the protein structural properties. A fully active minimal DNA-binding domain (DBD) of AtMYB30 (residues 11–116) containing two cysteine residues (C49 and C53) was overexpressed and purified. Site-directed mutagenesis was used to obtain AtMYB30 DBD mutants C49A and C53A. The DNA binding activity of AtMYB30 DBD, and Cys single mutants is clearly inhibited upon incubation with a NO donor, and S-nitrosylation was confirmed by the biotin switch assay. Finally, in order to understand the mechanism of NO effect on AtMYB30 DNA binding activity we performed circular dichroism analysis, to correlate the observed protein function inhibition and a potential structural impairment on AtMYB30 DBD. Indeed, NO modification of C49 and C53 residues promotes a subtle modification on the secondary structure of this transcription factor. We thus demonstrated, using various techniques, the *in vitro* effect of NO on AtMYB30 DBD, and thus the potential consequences of NO activity on plant metabolism influenced by this transcription factor.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.