

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ALINE SAMPAIO PINTO

INVESTIGAÇÕES ESTRUTURAIS DOS DOMÍNIOS

FUNCIONAIS DAS MIOSINAS CLASSES VIII E XI

PRESENTES EM PLANTAS

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

Aline Sampaio Pinto
Mário T. Murakami

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para a obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Dr. Mário Tyago Murakami

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

P658i Pinto, Aline Sampaio, 1988-
Investigações estruturais dos domínios funcionais das miosinas classes VIII e XI presentes em plantas / Aline Sampaio Pinto. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Mário Tyago Murakami.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Cristalografia de proteínas. 2. Biofísica. 3. Proteínas motores moleculares. 4. Miosinas. I. Murakami, Mário Tyago. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Structural investigations of the functional domains of plant myosins (classes VIII and XI)

Palavras-chave em Inglês:

Protein crystallography

Biophysics

Molecular motor proteins

Myosins

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Mário Tyago Murakami [Orientador]

Andrea Balan Fernandes

Claudio Chrysostomo Werneck

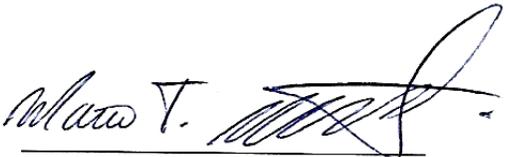
Data da defesa: 29-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

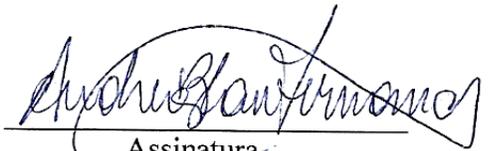
Campinas, 29 de fevereiro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mário Tyago Murakami (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Andrea Balan Fernandes


Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck


Assinatura

Profa. Dra. Carmem Verissima Ferreira

Assinatura

Profa. Dra . Sandra Martha Gomes Dias

Assinatura

“A maioria das ideias fundamentais da ciência são essencialmente sensíveis e, regra geral, podem ser expressas em linguagem compreensível a todos”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais por apoiarem e financiarem todos 84 km diários até o laboratório, bem como congressos, reuniões científicas e demais eventos que contribuíram para minha formação e para a conclusão desse trabalho. Mas principalmente, agradeço pela confiança no meu trabalho e por toda a torcida.

Aos meus irmãos que sempre apoiaram meus estudos e aprendizado, perguntando sempre o que eu fazia e nunca entendendo e nada e, mesmo assim, me deram muita força e torceram por mim.

Ao meu bebê, Nick, por sempre pedir atenção e querendo passear enquanto eu precisava estudar, mas nunca deixando de demonstrar tanto carinho e consolo em todos os momentos.

Ao Gustavo Cremonesi, por ser sempre um grande amigo, companheiro me apoiando em todas as etapas dessa jornada acadêmica. Agradeço por todas as vezes que você compreendeu minhas dificuldades, e mesmo aquelas que você não entendeu, agradeço por respeitar.

À Joice Helena e Carla Cristina por tamanha amizade, companheirismo em todos os momentos dentro e fora do laboratório. Por todas as risadas, aventuras e nos momentos difíceis, agradeço por estarmos sempre juntas e por fazerem dos meus dias mais animados.

Às minhas grandes amigas Laís, Juliana e Camila, que desde a universidade me deram todo apoio, carinho e amizade. Agradeço por ter vocês ao meu lado e por poder compartilhar cada etapa dessa jornada com vocês mesmo estando longe, porém, nunca ausente. Amo vocês.

Ao Daniel MT por todo conhecimento, compreensão, dedicação e apoio em todas as etapas do desenvolvimento desse trabalho.

Ao Andrey Nascimento, companheiro de grupo, agradeço pela amizade, pelos momentos de descontração, mas principalmente pelos conselhos e dicas que me deu todas as vezes que eu chegava com um problema ou uma dúvida.

A todos os membros do grupo BBE (Biofísica e Biologia Estrutural), pela amizade, pela contribuição nesse trabalho, seja ela de forma direta ou indireta. É com pesar que deixo o grupo nessa nova etapa, levando comigo apenas as boas lembranças.

À Priscila Giuseppe pela correção tão acurada desse trabalho que me ajudou a melhorá-lo nos âmbitos teórico e prático além de aprimorar meu conhecimento sobre as técnicas desenvolvidas.

Ao meu orientador Mário Murakami por todos os ensinamentos e conhecimentos me passados desde a iniciação científica. Agradeço por me apoiar mesmo quando até eu já não achava que teríamos bons resultados e por ter me dado essa oportunidade de participar do seu grupo por quase quatro anos. Todo conhecimento teórico e prático que adquiri, devo a experiência vivida nesse período.

À banca examinadora, Andrea Balan e Cláudio Werneck por aceitarem o convite de avaliar esse trabalho e por fazerem com tanto apreço e sutileza contribuindo para um resultado mais sofisticado e elaborado.

Às técnicas Andréia, Givanil, Teresa e Celisa pelo auxílio, orientações, por todos os favores e pela contribuição nesse trabalho.

Às meninas Fernanda Basei, Priscila Ferreira, Germana Righetto e Edmárica Sousa, não só pela amizade, mas também por todas as vezes que eu fui ao seu grupo pedir alguma coisa emprestada e vocês sempre me emprestaram de bom grado.

Aos amigos: Aline Santos, Alisson Cardoso, Ângela Saito, Carlos Paier, Caroline Bondarik, Cristiane Tambascia, Gustavo Mercaldi, Kelven Ulisses, Marcos Alborguetti, Rafael Canevarolo,

Renata Rocha, Sami Yokoo e Vanessa Pegos pelo dia-a-dia no laboratório, pela amizade, risadas, conversas e toda ajuda que eu pedi a vocês. Agradeço por tudo e desejo sucesso a todos.

Agradeço a Deus pelas bênçãos e proteção de cada dia, e também pela força, não me deixando desistir diante das dificuldades e por me permitir a realização de mais um sonho.

Aos técnicos e responsáveis pelos laboratórios de Espectrometria e Calorimetria (LEC) e Espectroscopia de Massas (MAS) por ceder o espaço e orientação para desenvolver os experimentos e análises que contribuíram para a realização desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron (ABTLuS – MCT) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Características gerais das Miosinas.....	1
1.2 Miosinas de plantas.....	4
1.2.1 Miosinas de classe VIII.....	5
1.2.2 Miosinas classe XI	5
1.3 Diversidade de genes de miosinas XI e a redundância funcional	6
2 – JUSTIFICATIVA.....	8
3 – OBJETIVOS.....	9
3.1 Objetivos gerais.....	9
3.2 Objetivos específicos	9
4 – METODOLOGIA	10
4.1 Análise <i>in silico</i>	10
4.2 Vetores utilizados nesse trabalho	11
a) pGEM T <i>easy</i> (<i>Promega</i>).....	11
b) pET28a (<i>Novagem</i>)	12
c) pET28a SUMO	13
d) pBTM116 (pLEXA)	14
d) pACT (<i>Promega</i>).....	15
4.3 Construção dos clones.....	15
4.3.1 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da Polimerase).....	15
4.3.2 Eletroforese em gel de agarose	16

4.3.4	Purificação de bandas a partir do gel de agarose	16
4.3.5	Clonagem em pGEM-Teasy.....	16
4.3.6	Subclonagem nos vetores de expressão	17
4.4	Nomenclatura adotada.....	18
4.5	Testes de expressão	18
4.6	Preparação de extratos e purificação.....	19
4.6.1	Domínio SH3 N-terminal da miosina XIa (6xHisSUMO-A11aSH3)	19
4.6.2	Domínio Dilute C-terminal da miosina XIa (6xHisSUMO-A11aDilute).....	20
4.6.3	Domínio cauda globular C-terminal da miosina XIg (6xHis-11gGT-f)	21
4.6.4	Domínio cauda globular C-terminal da miosina XIh (6xHis-A11hGT-ccd)	22
4.7	Técnicas de <i>refolding</i>	22
4.8	Quantificação e Pureza.....	23
4.9	Clivagem com SUMOprotease	24
4.10	<i>Western blot</i>	24
4.11	Dicroísmo Circular.....	25
4.12	Espalhamento dinâmico de luz (<i>Dynamic light scattering</i> - DLS)	26
4.13	Espectrometria de massas	26
4.14	Testes de cristalização.....	26
4.15	Confirmação de interação por duplo-híbrido	27
5	– RESULTADOS.....	30
5.1	Análise <i>in silico</i>	30
5.2	Desenho dos oligonucleotídeos.....	34
5.3	Clonagem, expressão, purificação e análises biofísicas.....	35
5.3.1	Construção A11aSH3.....	36
5.3.2	Construção 6xHisSUMO-A11aDilute	42
5.3.3	Construções 6xHis-A11gGT-f e 6xHis-A11gGT-cc	43
5.3.4	Construções A11hGT-ccp A11hGT-ccd.....	50
6	- CONCLUSÃO.....	56
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE ABREVIACÕES

°C	Grau Celsius
6xHisTag	Cauda de seis histidinas
ATM	<i>Arabidopsis thaliana myosin</i> - Miosina de <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BCIP	<i>5-Bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine</i> - 5-Bromo-4-Cloro-3'-indolifosfato Toluidina P
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> – Ferramenta de procura de alinhamento local básico
B-PER	<i>Bacterial-Protein Extraction Reagent</i> - Reagente de extração de proteína bacteriana
CD	<i>Circular Dichroism</i> - Dicroísmo Circular
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
C-terminal	Carboxi-terminal
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> - Espalhamento dinâmico de Luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirubonucleotídeos Fosfatados
DOC	<i>Deoxycholic</i> - Ácido deóxicólico
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> - Ácido etilenodiaminotetraacético
FF	<i>Fast Flow</i> - Fluxo rápido
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> - Cromatografia líquida rápida de proteína
<i>gor</i>	glutaciona redutase
GPA	Glicina, prolina e alanina
HP	<i>High Performance</i> - Alta performace
IgG	Imunoglobulina G
kDa	Quilodaltons
LB	Luria-Bertani
MYA	Miosina de <i>Arabidopsis thaliana</i>
Myo	Miosina
NBT	<i>Nitro-blue tetrazolium</i> - Nitro-azul tetrazolio
NPTN	Nefronectia

N-terminal	Amino-terminal
PAGE	<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> - Eletroforese em gel de Poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i> – Banco de dados de proteína
pI	Ponto isoelétrico
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> - Fenilmetilsulfonil fluorídrico.
PVDF	<i>Polyvinylidene Fluoride</i> - Polivinilideno Fluorídrico
RNA	ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SAXS	<i>Small Angle X-ray Scattering</i> - Espalhamento de Raio-X a baixos ângulos
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> - Docecil sulfato de sódio
TCEP	Tris(2-carboxietil)Fosfina
trxR	tio redoxina redutase
X-gal	X-galactose

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Arquitetura simplificada dos domínios de diferentes classes de miosinas.	p. 02
Figura 2: Representação das 35 classes de miosinas conhecidas.	p. 03
Figura 3: Esquema comparativo das miosinas classes VIII e XI.	p. 06
Figura 4: Mapa físico do vetor pGEM T <i>easy</i> .	p. 11
Figura 5: Mapa físico do vetor pET28a.	p. 12
Figura 6: Mapa físico do vetor pET28a SUMO.	p. 13
Figura 7: Mapa físico do vetor pBTM116 (pLEXA).	p. 14
Figura 8: Mapa físico do vetor pACT.	p. 15
Figura 9: Esquema explicativo do mecanismo de funcionamento do duplo híbrido.	p.28
Figura 10: Desenho esquemático das construções das miosinas de planta.	p. 30
Figura 11: Gráficos mostrando os níveis de ordenação ao longo das construções da cauda globular.	p. 32
Figura 12: Alinhamento das sequências das maiores construções da cauda globular das miosinas XIg e XIh.	p. 33
Figura 13: Alinhamento da região do domínio SH3 das miosinas classe XI.	p. 36
Figura 14: SDS-PAGE (8-18%) de tris glicina dos testes de expressão da proteína 6xHis-A11aSH3.	p. 38
Figura 15: SDS-PAGE e Western blot das frações da purificação de afinidade da proteína A11aSH3.	p. 39
Figura 16: SDS-PAGE 13% mostrando a clivagem com SUMOprotease da construção A11aSH3.	p. 39
Figura 17: Dados das análises por espectrometria de massas das bandas do gel da purificação da construção 6xHisSUMO-SH3.	p. 40
Figura 18: SDS-PAGE da clivagem da proteína HtSUMO-A11aSH3 com SUMOprotease na resina de níquel.	p. 41
Figura 19: Fotos do poços da placa de cristalização da proteína 6xHisSUMO-SH3.	p. 41
Figura 20: SDS-PAGE 13% da lise e cromatografia de afinidade da construção 6xHisSUMO-11aDilute em duas diferentes cepas.	p.43

Figura 21: SDS-PAGE do teste de expressão da construção 6xHis-11gGT-f.	p. 44
Figura 22: SDS-PAGE das frações da purificação de afinidade da proteína 6xHis11gGT-f.	p. 45
Figura 23: Análise da expressão do vetor pET28a vazio.	p. 47
Figura 24: Fragmento amplificado da construção 6xHis-11gGT-cc.	p. 48
Figura 25: SDS-PAGE do teste de expressão da proteína 6xHisTag-11gGT-cc em BL21 (DE3) Δ SlyD pRARE II.	p. 48
Figura 26: SDS-PAGE do <i>refolding</i> por chaperona artificial.	p. 49
Figura 27: SDS-PAGE e <i>western-blot</i> da proteína 6xHis-11gGT-cc solubilizada.	p. 49
Figura 28: Espectro de estrutura secundária e gráfico da desnaturação da proteína 6xHis-11gGT-cc solubilizada.	p. 50
Figura 29: Fragmento amplificado da construção 6xHis-11hGT-ccp.	p. 51
Figura 30: SDS-PAGE das frações da lise e da cromatografia afinidade da proteína 6xHis11hGT-ccp.	p. 52
Figura 31: Western blot das frações da afinidade da proteína 6xHis11hGT-ccp.	p. 52
Figura 32: Modelagem do domínio A11gGT-f identificando as alfa-hélices e a região do domínio dilute.	p. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Enzimas de restrição utilizadas para a sub-clonagem das construções nos vetores de expressão.	p. 18
Tabela 2: Dados dos clones selecionados que apresentaram interações com a Myo5a de humano.	p. 27
Tabela 3: Composição dos meios de cultura restridentes.	p. 29
Tabela 4: Relação de domínios selecionados após análises <i>in silico</i> .	p. 31
Tabela 5: Predições das característica físico-químicas das construções das miosinas XIa, XIg e XIh elaboradas pelo <i>ProtParam</i> .	p. 34
Tabela 6: Sequência e características dos oligonucleotídeos de iniciação de cada construção.	p. 35
Tabela 7: Condições de testes de expressão realizados para obtenção de proteína solúvel.	p. 37
Tabela 8: Condições de testes de expressão realizados para obtenção de proteína 6xHisSUMO-A11aDilute solúvel.	p. 42
Tabela 9: Dados obtidos na análise por DLS para a construção 6xHisSUMO-11aDilute.	p. 43
Tabela 10: Relação das condições de lise e purificação testadas para 6xHis-11gGT-f.	p. 46
Tabela 11: Dados físicoquímicos das proteínas 6His-11gGT-f e Fator de alongação de <i>E. coli</i>	p. 47
Tabela 12: Resultado do teste do gene <i>LacZ</i> (teste do azul) feito em duplicata.	p. 54
Tabela 13: Resultado do teste de crescimento em meio SD-WLH com concentração crescente de 3AT.	p. 55

RESUMO

As miosinas formam uma superfamília de proteínas de alto peso molecular com atividade mecanoquímica capaz de hidrolisar a molécula de ATP e de interagir com os filamentos de actina. A estrutura das miosinas pode ser dividida de modo geral em cabeça motora, pescoço e cauda. São conhecidas 35 classes de miosinas em eucariotos sendo a classe II de miosinas denominada miosinas convencionais e as demais chamadas de não convencionais. Em plantas são somente encontradas as miosinas não convencionais de classe VIII e XI. A classe VIII caracteriza-se por sua alta processividade sobre os filamentos de actina e a classe XI é a maior classe em número de genes, tendo uma estrutura muito semelhante às miosinas de classe V. Uma terceira classe, a classe XIII, foi posteriormente descoberta e somente foi encontrada no gênero *Acetabularia* apresentando dois genes, porém essa classificação é controversa havendo aqueles que dizem que as miosinas da classe XIII possuem tanta afinidade filogenética com as da classe XI que elas deveriam compor uma única classe. As miosinas VIII e XI desempenham papéis chave no transporte direcional de componentes intracelulares em plantas, principalmente devido às grandes dimensões das células de plantas que não sobrevivem utilizando somente a difusão como mecanismo de transporte intracelular. Neste trabalho, buscamos selecionar os melhores representantes de cada classe a partir de análises *in silico* para desenvolvermos os testes de expressão, purificação e análises biofísicas. Os domínios selecionados, cauda globular (GT), dilute e SH3, foram clonados em pET28a e pET28aSUMO, os testes de expressão com diversas cepas de *E coli*, mostraram que o domínio dilute expressa em grande quantidade na fração solúvel, porém forma agregados impedindo as análises biofísicas e os ensaios de cristalização. O domínio SH3 também foi obtido na forma solúvel, porém em pouca quantidade e apresentou migração anômala no gel, sendo identificado a partir de análises de espectrometria de massas. Foram realizados testes iniciais de cristalização para o domínio SH3, mas não resultou na formação de cristais adequados a difração de raios X. A cauda globular foi obtida apenas na fração insolúvel e submetida a procedimentos de *refolding* para sua solubilização. Mesmo conseguindo o reenovelamento da construção, a mesma se manteve agregada inviabilizando os testes de cristalização. Por outro lado foram analisadas as interações da cauda globular da miosina XIh com presas identificadas por duplo-híbrido realizado pelo nosso grupo com a miosina humana Va. Três

das proteínas que interagiram com a miosina Va humana também mostraram sinais de interação com a miosina XIh de *Arabidopsis*, indicando que mesmo havendo diferenças nas sequências polipeptídicas entre as classes de miosina, a estrutura terciária se mantém permitindo que ambas apresentem interações com algumas proteínas em comum.

ABSTRACT

Myosins belong to a superfamily of high molecular weight proteins, presenting mechanochemical activity by hydrolyzing ATP molecule and ability to interact with actin filaments. The myosin structure can be divided into motor head, neck and tail. 35 myosin classes are known in eukaryotic cells, where class II is known as conventional myosins and all others, as unconventional myosins. Plants possess only unconventional myosins including classes VIII and XI. The class VIII, is characterized by its high processivity on actin filaments while class XI possesses multiple genes and its protein structure is very similar to class V myosins. A third class, XIII, was later discovered and only found in *Acetabularia* genome presenting two genes. However this classification is controversial, because some studies shown that class XIII myosins share such high phylogenetic similarity with class XI that they should form the same class. Myosins VIII and XI play key roles on directional intracellular components transport in plants, mainly due to the large plant cell size which would not survive only by the diffusion mechanism for intracellular transport. In this work, we have selected the best representative targets of each class from *in silico* analyses to develop the protein expression, purification and biophysical characterization. The selected domains (globular tail (GT), dilute and SH3) were cloned into pET28a and pET28aSUMO expression vectors. Results of expression tests with several *E coli* strains, showed that dilute domain is expressed in large amounts in the soluble fraction; however, it aggregates preventing biophysical analysis and crystallization trials. The SH3 domain, expressed in low soluble concentration, presented an abnormal migration in SDS-PAGE and its identity was confirmed by mass spectrometry analysis. Initial crystallization tests were conducted with SH3 domain, but owing to the low protein concentration only clear drops have appeared, and no crystals or aggregates were observed. The globular tail domain, obtained only in insoluble fraction, was subjected to refolding procedures/ techniques in order to recover its native-like state; however, even the refolded protein displayed secondary structure, the protein remained aggregated. Furthermore, we analyzed the interactions between of myosin XIh globular tail with pre-identified proteins by yeast two-hybrid conducted by our group with human myosin Va. Three proteins that interacted with human myosin Va also showed interaction with *Arabidopsis* myosin XIh, indicating that despite of differences in polypeptide sequences between the classes XI and V, the tertiary structure may be maintained allowing both of them to have interactions with common proteins.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais das Miosinas

Miosinas são proteínas motoras que juntamente com os filamentos de actina formam o sistema actino-miosina que comumente é lembrado por sua ação na contração muscular. Contudo esse sistema está presente em uma série de atividades celulares (HASHIMOTO *et al.*, 2008), tais como migração e adesão celular, transporte e localização de macromoléculas, transdução de sinal, supressão tumoral (KRENDEL & MOOSEKER, 2005), morfogênese celular, contração e fluxo citoplasmático (REDDY & DAY, 2001). A miosina é capaz de caminhar ao longo dos filamentos de actina e ao mesmo tempo se ligar a alvos celulares denominados cargas (WALTER & HOLWEG, 2008).

As miosinas são constituídas de cadeias pesadas, sendo duas nas diméricas e uma nas monoméricas. As cadeias pesadas são a sequência polipeptídica da proteína e sua arquitetura geral compreende, de maneira simplificada, três regiões denominadas cabeça, pescoço e cauda. (Figura 1). A cabeça mecanoquímica (domínio motor) fica, na grande maioria das classes de miosinas, na região N-terminal e suas cadeias pesadas têm propriedades ATPásicas (KINKEMA *et al.*, 1994; BERNE *et al.*, 2004 e HASHIMOTO *et al.*, 2008) sendo que a hidrólise do ATP libera energia para a miosina se movimentar ao longo dos filamentos de actina (SHIMMEN & YOKOTA, 2004). O pescoço é uma região regulatória do domínio motor que consiste de um ou mais motivos IQ cuja sequência consenso é IQXXRGXXR. O motivo IQ tem como função a ligação de cadeias leves como calmodulina (REDDY & DAY, 2001), sendo que o número de motivos IQ presentes na região do pescoço entre as diferentes classes de miosinas varia entre zero e seis (SELLERS, 2000), havendo exceções como é o caso da miosina XXXIa que apresenta 17 motivos IQ, e a XXV que apresenta oito (ODRONITZ & KOLLMAR, 2007). O domínio cauda situado na região C-terminal da miosina, é extremamente variável em tamanho e estrutura. A região proximal e medial da cauda pode apresentar uma conformação de dupla α -hélice espiralada (*coiled-coil*), que coordena a dimerização das cadeias pesadas de miosina (KINKEMA *et al.*, 1994, SELLERS, 2000, SHIMMEN & YOKOTA, 2004 e GOLOMB *et al.* 2008). A região distal da cauda, também denominada de cauda globular, apresenta sequência e estrutura únicas responsáveis por determinar a especificidade no reconhecimento das cargas em cada classe de miosina (HASHIMOTO *et al.*, 2008).

Revisão recente sugere que as miosinas sejam agrupadas em 35 classes, além daquelas sem classe definidas (órfãs), presente nos mais diversos organismos (ODRONITZ & KOLLMAR, 2007). Durante décadas a única classe de miosinas conhecida era a encontrada em músculos. Posteriormente, com a descoberta das miosinas monoméricas, adotou-se a nomenclatura com algarismos romanos sendo I para as miosinas monoméricas e II para as diméricas. Contudo, com o advento de mais classes de miosinas estipulou-se a denominação das miosinas de classe II como “convencionais” e as demais classes como “não-convencionais” que foram classificadas em ordem cronológica de acordo com sua descoberta (SELLERS, 2000 e ODRONITZ & KOLLMAR, 2007).

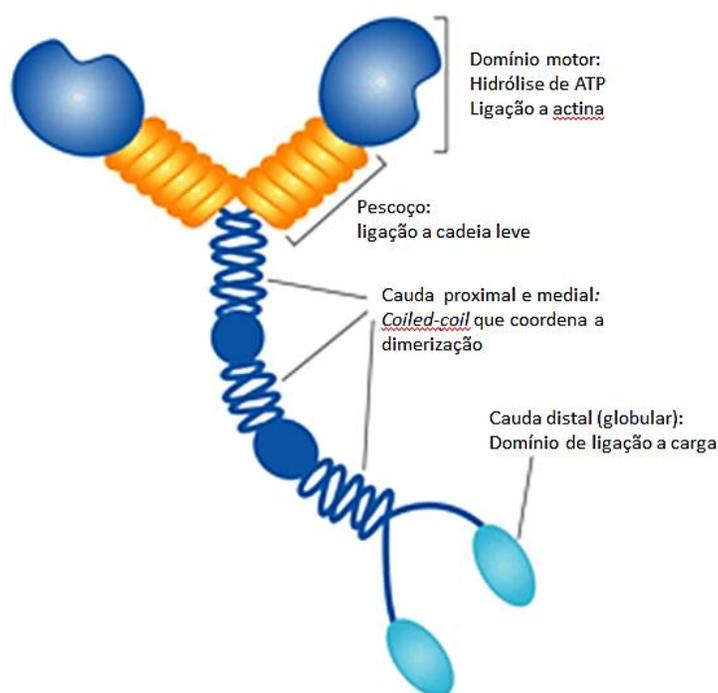


Figura 1: Arquitetura simplificada dos domínios de diferentes classes de miosinas. São mostradas representações de três diferentes classes de miosina. Destaque para a variação no número de cadeias leves do motivo IQ na região do pescoço, e a presença de regiões específicas na cauda da miosina V que permite a interação com o cargo (Adaptado de TÓTH *et al*, 2005).

Revisão recente sugere que as miosinas sejam agrupadas em 35 classes, além daquelas sem classe definidas (órfãs), presente nos mais diversos organismos (ODRONITZ & KOLLMAR, 2007). Durante décadas a única classe de miosinas conhecida era a encontrada em músculos. Posteriormente, com a descoberta das miosinas monoméricas, adotou-se a nomenclatura com

algarismos romanos sendo I para as miosinas monoméricas e II para as diméricas. Contudo, com o advento de mais classes de miosinas estipulou-se a denominação das miosinas de classe II como “convencionais” e as demais classes como “não-convencionais” que foram classificadas em ordem cronológica de acordo com sua descoberta (SELLERS, 2000 e ODRONITZ & KOLLMAR, 2007).

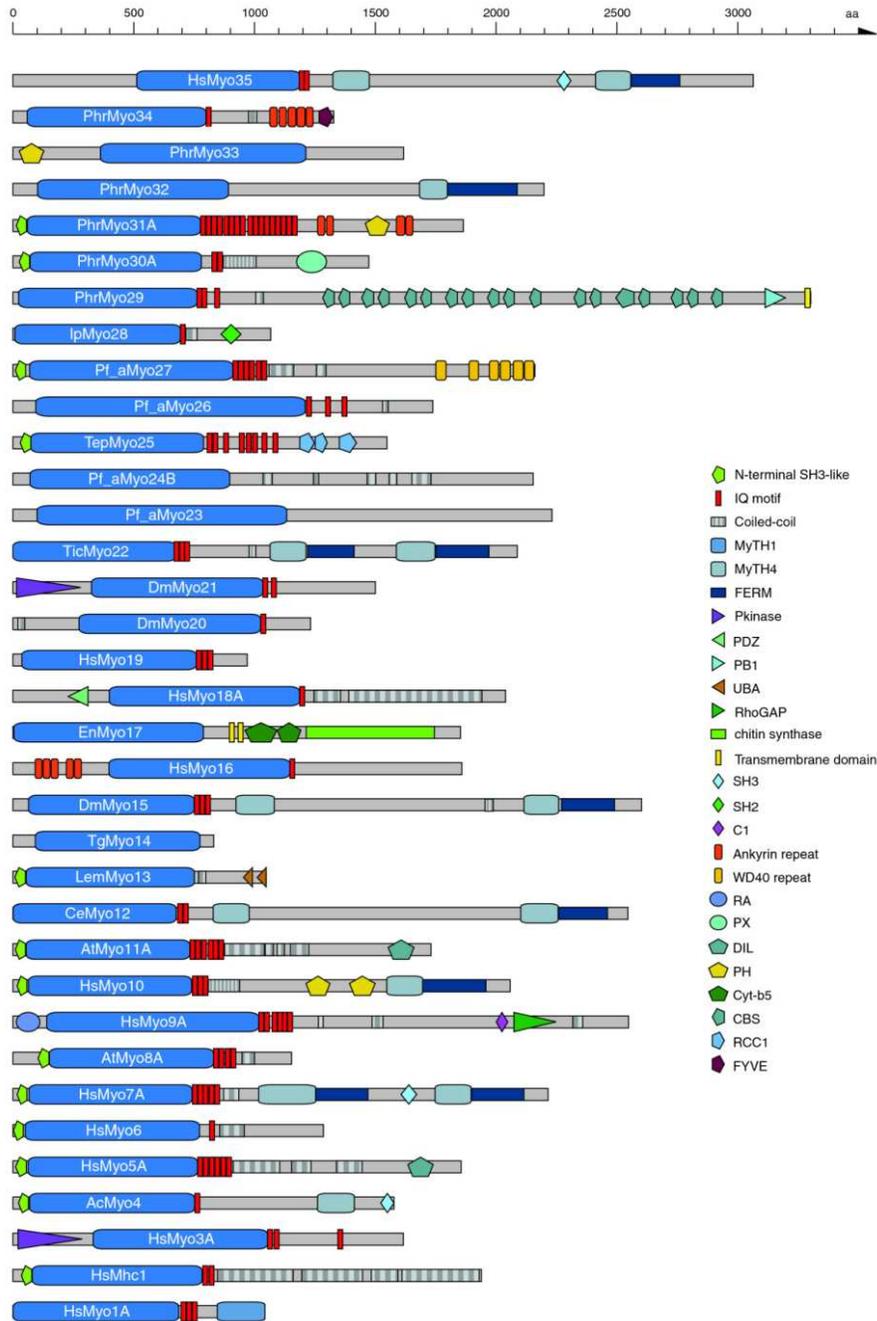


Figura 2: Representação das 35 classes de miosinas conhecidas. O esquema adaptado de ODRONITZ & KOLLMAR (2007) mostra a representação comparativa das classes de miosinas bem como os domínios presentes em cada classe.

1.2 Miosinas de plantas

Dentre as miosinas não-convencionais, estão aquelas pertencentes às classes VIII e XI encontradas apenas em plantas. A maioria dos estudos com essas classes de miosinas foram realizados com produtos gênicos de *Arabidopsis thaliana*, uma dicotiledônia considerada organismo modelo para estudo genéticos e moleculares por apresentar características bem delimitadas (BAKKER *et al.*, 2006), como genoma relativamente pequeno (cerca de 125 milhões de pares de base, 25 mil genes e 5 cromossomos), ciclo de vida curto e capacidade de autofecundação (GILMOUR *et al.*, 1988).

São descritas na literatura duas classes de miosinas exclusivas de plantas: classe VIII com 4 genes (MYO8-A, MYO8-B, MYO8-C ou ATM1 e MYO8-D ou ATM2), e classe XI formada por 13 genes (MYO11-A, MYO11-B, MYO11-C, MYO11-D, MYO11-E, MYO11-F, MYO11-G, MYO11-H, MYO11-I, MYO11-J, MYO11-K, MYO11-L ou MYA1 e MYO11-M ou MYA2). As miosinas em plantas assim como em outros organismos estão frequentemente associadas aos filamentos de actina (REDDY & DAY, 2001) e essa interação proporciona grande dinâmica intracelular denominada de fluxo citoplasmático que compreende o tráfego de organelas como retículo endoplasmático, mitocôndria, complexo de Golgi, peroxissomos e vesículas de endomembranas. (SHIMMEN & YOKOTA, 2004).

Ainda, pouco se sabe sobre as propriedades funcionais e estruturais das miosinas de planta quando comparado com outras classes onipresentes em mamíferos em geral (KINKEMA *et al.*, 1994). No gênero *Acetabularia*, foi caracterizada a miosina classe XIII (REDDY & DAY, 2001; VUGREK *et al.*, 2003), contudo devido a sua alta similaridade com a classe XI ainda existem controvérsias quanto a sua classificação em uma nova classe.

São descritos na literatura, dois domínios funcionais em miosinas de plantas: domínio Dilute e domínio SH3. O domínio Dilute, encontrado em diversas classes de miosina, consiste de uma região da cauda globular com cerca de 850 aminoácidos cuja função é desconhecida. Alguns grupos especulam sua participação na estabilidade da cauda e sua relevância na ligação à carga (LI & NEBENFÜHR, 2007; LI & NEBENFÜHR, 2008; HASHIMOTO *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2008).

O domínio SH3 (*Src homology 3 domains*) é um domínio pequeno, cerca de 160 aminoácidos, presentes em diferentes proteínas. Sua estrutura em *Caenorhabditis elegans* foi resolvida por cristalografia a 2.00 Å (LIM *et al.*, 1994), e posteriormente foi determinada sua

estrutura com diversos ligantes por ressonância magnética nuclear (FENG *et al.*, 1995). O domínio SH3 se liga em regiões ricas em prolina com moderada afinidade e seletividade, preferencialmente por motivos do tipo PxxP. Suas atividades conhecidas até o momento são: regulação de enzimas por interações intramolecular; mudança de localização subcelular dos componentes da via de sinalização; e auxílio na montagem de complexos multi-proteicos (NGUYEN *et al.*, 2000; FERGUSON *et al.*, 2004).

1.2.1 Miosinas de classe VIII

A primeira miosina de classe VIII foi identificada em *Arabidopsis thaliana*, e estudos com miosinas dessa classe revelaram propriedades físicas únicas como, por exemplo, a alta processividade ao longo dos filamentos de actina (SELLERS, 2000). Reddy e Day em 2001 descreveram quatro genes de miosinas para a classe VIII de *Arabidopsis thaliana*, todas com peso molecular de aproximadamente 130 kDa, apresentando 150 a 200 resíduos na região N-terminal (à montante do domínio mecanoquímico), três ou quatro motivos IQ no domínio pescoço, um pequeno segmento *coiled-coil* (figura 3a) e um pequeno domínio rico em glicina/prolina/alanina (GPA). Informações sobre a estrutura tridimensional e função dessa classe de miosinas são escassas, todavia, hipóteses sobre sua função incluem a regulação do tamanho do poro do plasmodesmo e translocação de vesículas endocíticas (GOLOMB *et al.*, 2008) uma vez que já mostrado em experimentos de fluorescência que domínio cauda da MyoVIIIId (ATM2) quando co-expresso *in vivo* com diversas organelas, se co-localiza com endossomos (SATTARZADEH *et al.*, 2008).

1.2.2 Miosinas classe XI

A classe XI de miosina foi a primeira a ser identificada em *Arabidopsis thaliana* e apresenta grande similaridade estrutural e funcional com a classe V (HASHIMOTO *et al.*, 2008). Uma característica que denota essa similaridade é que ambas as classes apresentam seis motivos IQ no domínio pescoço e uma cauda com segmentos de *coiled-coil* intercaladas com segmentos não-helicoidais (figura 3b) (SELLERS, 2000).

Das classes de miosinas presentes em plantas, os membros da classe XI estão frequentemente relacionados ao fluxo citoplasmático (WALTER & HOLWEG, 2008; TOMINAGA *et al.*, 2003). Já foram descritos 13 genes de miosinas para a classe XI em *Arabidopsis thaliana*, entre eles estão os mais estudados MYA1 e MYA2 (HACHIKUBO *et al.*, 2007). O grande número de miosinas na

classe XI pode ser resultado da duplicação de genes ou separação de função em diferentes tecidos ou diferentes fases do ciclo de vida (REDDY & DAY, 2001). Utilizando anticorpos contra miosinas XI purificadas foi observado sua co-localização com organelas no tubo polínico de *Lilium* sp (YOKOTA *et al.*, 1995), bem como feixes de actina em algas verdes do gênero *Acetabularia* (YAMAMOTO & KASHIYAMA, 1999). Estudos de imunolocalização indicam que duas diferentes miosinas XI, uma de 170 kDa e outra de 175 kDa, estão associadas a diferentes tipos de estruturas membranosas em tubos polínicos de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv bright yellow-2 [BY-2]) (YOKOTA *et al.*, 1999). Liu e colaboradores em 2001 demonstraram a interação com a membrana plasmática e de mitocôndrias e Holweg e Nick (2004) reportaram que o *knockout* do gene *Arabidopsis* MYA2 (miosina XI_m) causa severa inibição do crescimento, fertilidade e transporte do hormônio auxina.

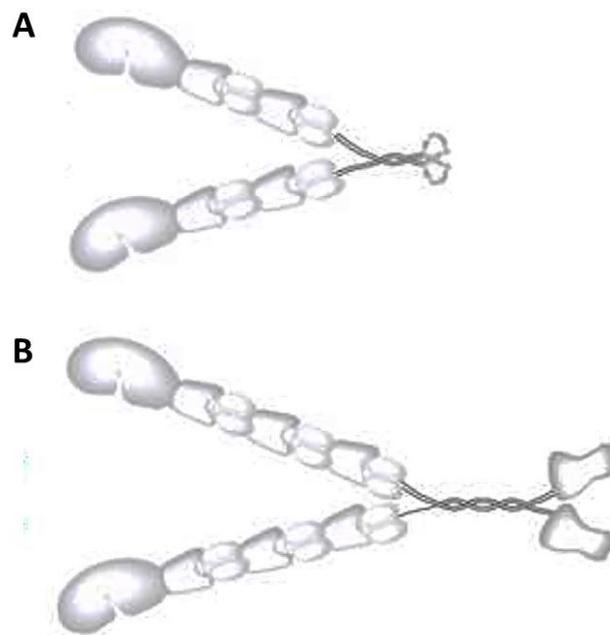


Figura 3: Esquema comparativo das miosinas classes VIII e XI. Em **A**: miosina classe VIII e **B**: miosina classe XI. O esquema mostra a região do domínio motor, *coiled-coil* e caudas proximal e distal.

1.3 Diversidade de genes de miosinas XI e a redundância funcional

Análises filogenéticas das miosinas indicam que a origem de plantas floríferas está associada com uma ruptura e duplicação na classe XI e uma única duplicação na classe VIII. Essas duplicações foram seguidas por sub-funcionalização de miosinas parálogas e especialização funcional adicional

em diferentes grupos de plantas, o que provavelmente resultou na duplicação de linhagens-específicas (PAREMYSLOV *et al.*, 2011).

Estudos com cada gene *knockout* da miosina classe XI de *Arabidopsis thaliana* mostraram que quando um único gene era inativado, o desenvolvimento da planta ocorria normalmente em condições ótimas de crescimento, sugerindo redundância funcional das miosinas de planta (PAREMYSLOV *et al.*, 2008). Sendo assim, PROKHNEVSKY e colaboradores em 2008 sugeriram que a inativação de mais de um gene de miosina é necessária para determinar o papel das miosinas no desenvolvimento da planta, uma vez que notaram que os genes de miosina XI-K, XI-L e XI-M contribuem para o transporte do complexo de Golgi; que para o transporte de peroxissomos, miosinas XI-K e XI-L aparecem para cooperar, e o envolvimento da miosina XI-M apenas ocorre se a miosina XI-K estiver presente, sugerindo a formação de um heterodímero. Já para o transporte de mitocôndrias as miosinas XI-K e XI-L têm moderada contribuição uma vez que as miosinas XI-M e XI-B, possivelmente, são majoritárias nessa função.

2 – JUSTIFICATIVA

As miosinas não-convencionais apresentam grande importância em diversos processos fisiológicos da célula como transporte de organelas e vesículas, formato celular, desenvolvimento embrionário e outros. No caso de plantas, existe um ponto crítico adicional que são as superdimensões celulares que não permitem a difusão como único mecanismo de transporte intracelular. Tais proteínas transportadoras usufruem de um sofisticado mecanismo de movimentação mecanoquímico e sua regulação e especificidade se baseiam em modificações e acoplamento de co-transportadores proteicos. Estudos estruturais e biofísicos são de grande valia nessa área para avançarmos na compreensão das miosinas de plantas, uma vez que tais estudos nos permite compreender melhor os mecanismos de interação entre tais domínios e os ligantes. Deste modo este trabalho visa fornecer caracterização biofísica, bioquímica e estrutural das miosinas de *Arabidopsis thaliana*.

Devido ao desafio de produzir essas proteínas na forma solúvel e em quantidades necessárias para os estudos estruturais, iniciamos com várias construções das diferentes miosinas de plantas visando à escolha de pelo menos um alvo para as caracterizações.

3 – OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Selecionar, caracterizar domínios das miosinas das classes VIII e XI de *Arabidopsis thaliana* que possam ser produzidos de forma solúvel para estudos biofísicos e estruturais e, se possível, determinar sua estrutura cristalográfica.

3.2 Objetivos específicos

- Seleção *in silico* de domínios possivelmente estruturados;
- Clonagem;
- Expressão em escala analítica e seleção das construções expressas na fração solúvel;
- Padronização da expressão em larga escala;
- Purificação dos domínios funcionais estruturados;
- Análises espectroscópicas (Dicroísmo circular [CD] e Espalhamento dinâmico de luz [DLS])
- Testes de cristalização

4 – METODOLOGIA

4.1 Análise *in silico*

A nomenclatura dos genes de miosinas de classe VIII e XI de *Arabidopsis thaliana* utilizada neste projeto segue a proposta de Odrionitz e Kollmar, e pode ser encontrada no banco de dados de miosinas *CyMoBase* (<http://www.cymobase.org/cymobase>). A sequência polipeptídica codificada por cada gene foi analisada nos bancos de dados *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *TAIR* (<http://www.arabidopsis.org/>) e *UNIPROT* (<http://www.uniprot.org/>). Para a identificação dos domínios presentes em cada um dos genes de miosinas classes VIII e XI foi utilizado o preditor *SMART* (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). A partir desses dados, foram realizadas análises de predição de regiões ordenadas e desordenadas das proteínas codificadas por cada gene utilizando os programas *Foldindex* (<http://bip.weizmann.ac.il/fldbin/findex/>), *IUPRED* (<http://iupred.enzim.hu/>) e *PRDOS* (<http://prdos.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi>) a partir das sequência polipeptídicas de cada proteína. Tais análises foram feitas com a sequência completa da proteína, e posteriormente apenas com a sequência equivalente a região de cada domínio de interesse. Os domínios preditos como ordenados foram submetidos à modelagem molecular através do programa *Modeller* (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>). As modelagens foram visualizadas no programa *Pymol* (DeLANO, 2002), onde foi feita a comparação dos modelos com a estrutura secundária dos domínios a fim de elaborar as construções. As análises *in silico* foram realizadas a fim de permitir uma seleção mais cautelosa dos alvos possibilitando a escolha daqueles que possam exibir melhores resultados. Os domínios foram selecionados de acordo com a predição de ordem/desordem e a sua importância nas funções da proteína. Utilizando o programa *Oligo Analyzer* (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer>) foram preditas as temperaturas de *melting* da região complementar ao cDNA e do oligonucleotídeo inteiro além de possíveis formações de grampos em cada oligonucleotídeo. Construções que foram elaboradas com a região do *coiled-coil* foram analisadas no preditor *Coils Server* (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html) que prediz possíveis picos *coiled-coil*. As características físico-químicas de cada construção foi predita pelo programa *ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam/>).

4.2 Vetores utilizados nesse trabalho

Foram utilizados nesse trabalho diferentes plasmídeos com finalidades distintas de acordo com as necessidades de cada técnica. Entre eles estão o vetor de clonagem (pGEM-T *easy*), vetores de expressão (pET28a e pET28aSUMO) além dos vetores utilizados para análises de duplo híbrido (pBTM116 e pACT).

a) pGEM T *easy* (Promega)

O sistema de vetor pGEM T-*easy* é largamente utilizado para a clonagem de produtos de PCR. O plasmídeo possui uma timina ligada a cada uma das extremidades 3', o que impede a recircularização do plasmídeo e melhora a eficiência de ligação de produtos de PCR, pois algumas polimerases termoestáveis, como a *Taq*, adicionam uma adenina nas extremidades 3' do fragmento amplificado (figura 4) (CLARK *et al*, 1988). Esse vetor possui 3,0 kb e apresenta o gene de resistência a ampicilina como marca de seleção, origem de replicação do fago F1 (*ori*), sítio múltiplo de clonagem e os promotores T7 e SP6 flanqueando a região de clonagem. Além disso, possui na sua constituição parte do gene *lacZ* que codifica o fragmento amino terminal da enzima β -galactosidase, utilizada para mecanismo de seleção nos procedimentos de clonagem. São adicionados para flanquear o sítio de inserção os sítios de reconhecimento das enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*.

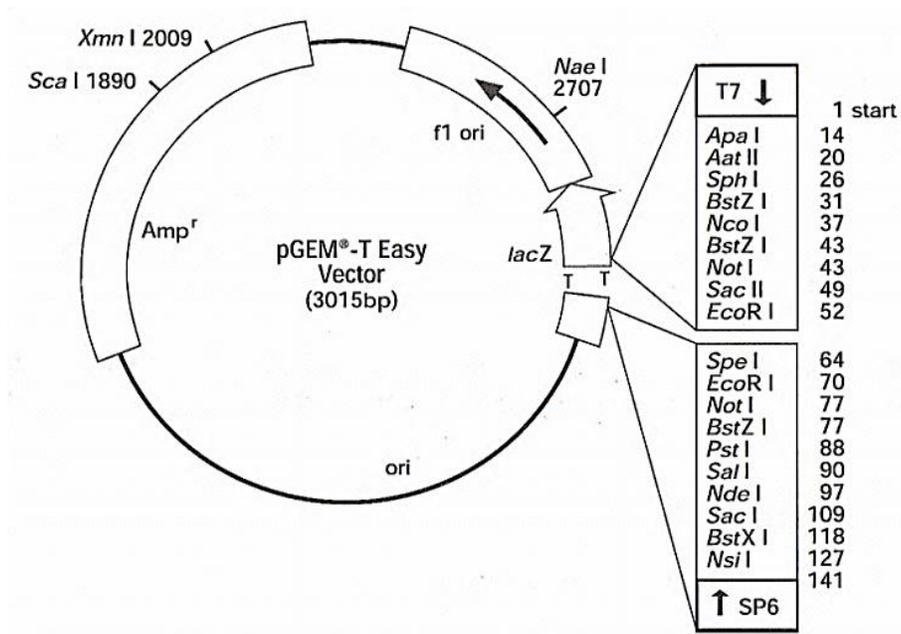


Figura4: Mapa físico do vetor Pgem T *easy*.

b) pET28a (Novagem)

O vetor pET28a (figura 5) é comumente usado para expressão heteróloga de proteínas em bactéria possuindo 5.369 pb. Apresenta um codificador para o marcador de seleção canamicina. Sob controle do promotor T7, esse vetor carrega uma região codificante para a cauda de histidina (6xHis) que é expressa fusionada a região N-terminal da proteína de interesse que será inserida no sítio múltiplo de clonagem. Estudos mostram que a eficiência da cauda de histidina como uma chaperona não é considerada como eficiente quando comparada as proteínas GroEL e GroES, entretanto a sua fusão a proteína alvo permite facilidades no isolamento desta durante a cromatografia de afinidade por níquel (HAACKE *et al.*, 2008). Há uma configuração opcional para quem deseja a fusão da cauda na região C-terminal. O vetor também trás uma sequência substrato para a ação de trombina.

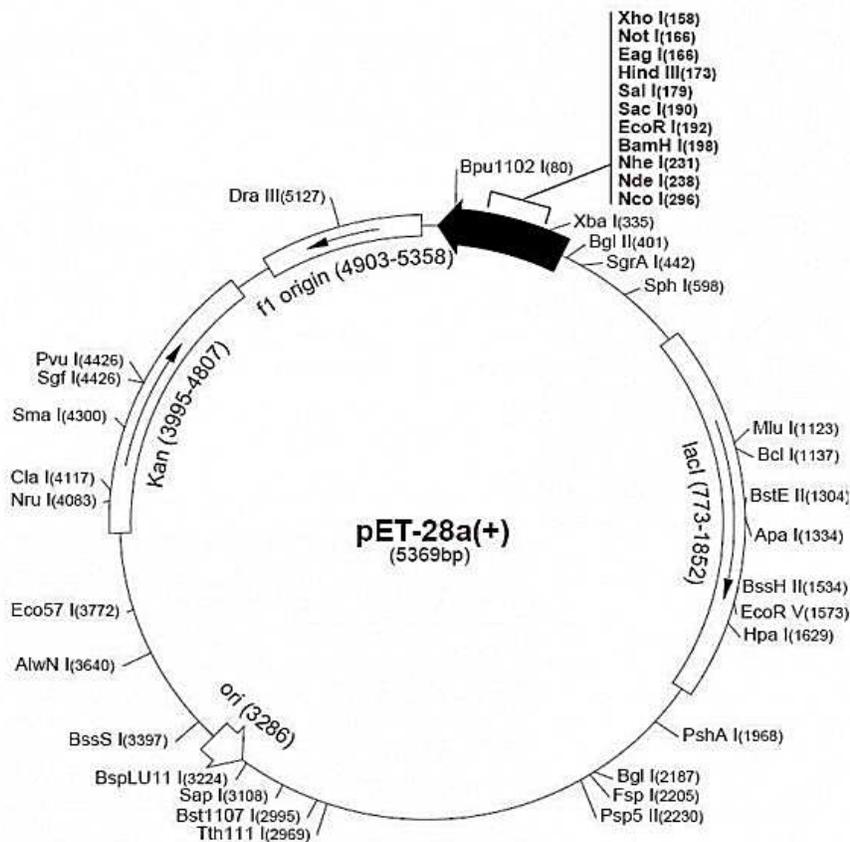


Figura 5: Mapa físico do vetor pET28a.

c) pET28a SUMO

O vetor pET28aSUMO não é um vetor comercial. Consiste de uma modificação no vetor pET28a no qual foi adicionada em sua sequência original, a sequência polinucleotídica que codifica a proteína SUMO entre os sítios de *NheI* e *BamHI*. Tal modificação confere um tag de SUMO para a proteína clonada nesse vetor (figura 6). Diversos estudos apontam tal fusão como responsável pela melhoria na solubilidade e no aumento do rendimento da expressão heteróloga de proteínas (BUTT *et al.*, 2005; MARBLESTONE *et al.*, 2005). Por tanto, esse vetor também foi utilizado para os testes de expressão desse trabalho a fim de melhorar a solubilidade e o rendimento das proteínas-alvo.

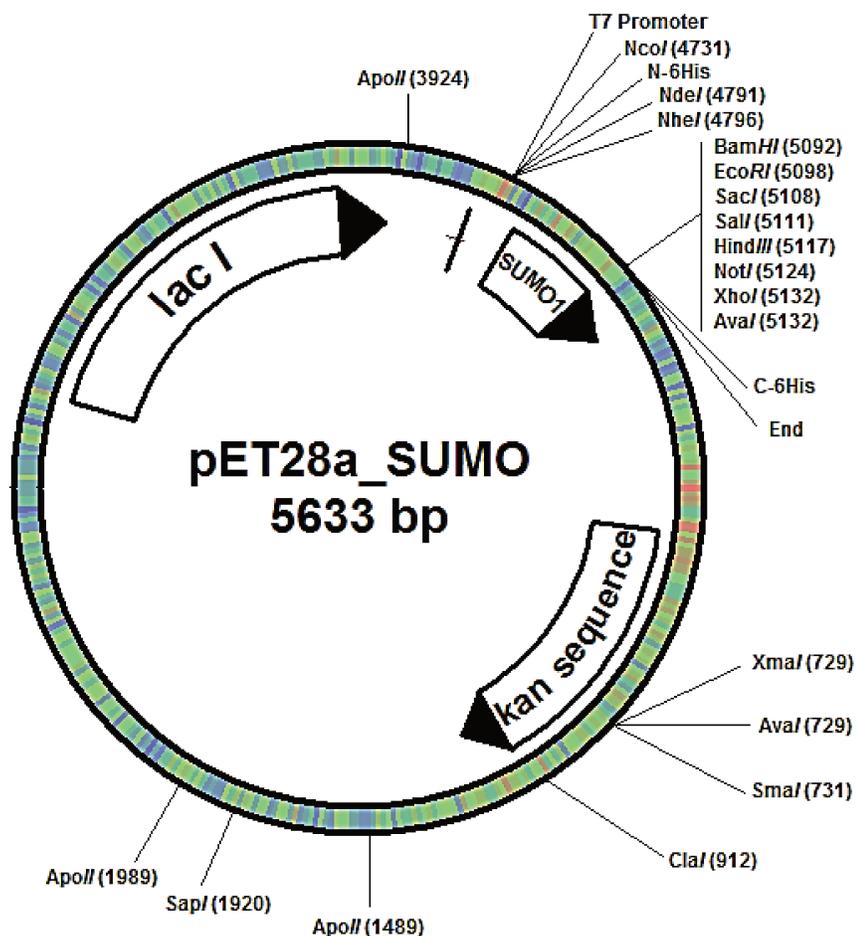


Figura 6: Mapa físico do vetor pET28a SUMO.

d) pBTM116 (pLEXA)

O vetor pBTM 116 (figura 7) é um plasmídeo comumente utilizado nos procedimentos de realização de sistema de Duplo-Híbrido em leveduras. Apresenta próximo ao sítio múltiplo de clonagem, uma sequência codificante para o domínio proteico de ligação ao DNA de do fator de transcrição que é transcrito fusionado à proteína de interesse e sob o controle do promotor de ADHI (*Alcohol deydrogenase I*). O plasmídeo apresenta 5.693 pb e contém o gene TRP que confere prototrofia às cepas de leveduras que são mutantes auxotróficos para triptofano, funcionando como um marcador de seleção, ou seja, leveduras transformadas com esse vetor são capazes de crescer em meio de cultura que não apresentam triptofano em sua constituição (VOJTEK *et al.*, 1993; BARTEL & FIELDS, 1995). Outro marcador de seleção é a ampicilina que, para o vetor utilizado neste trabalho, foi substituído por canamicina.

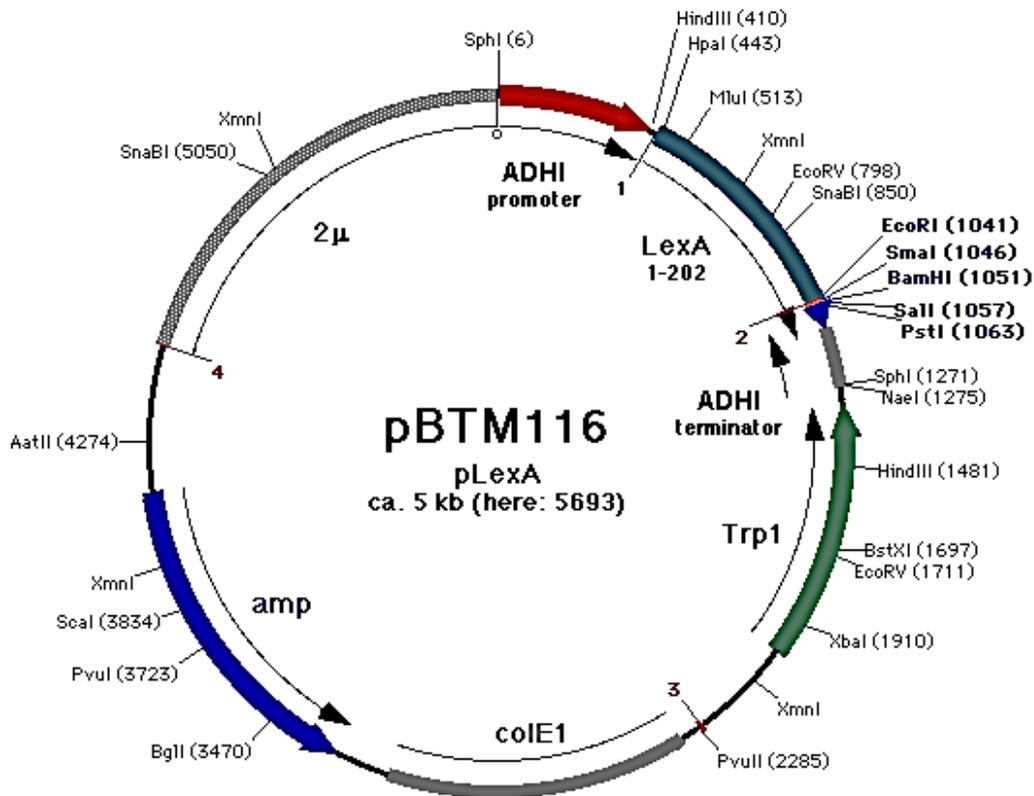


Figura 7: Mapa físico do vetor pBTM116 (pLEXA).

d) pACT (*Promega*)

O plasmídeo pACT (figura 8) é amplamente utilizado em metodologias de sistema de Duplo-Híbrido em leveduras, uma vez que permite a transcrição do domínio ativador transcricional, GAL 4, do fator de transcrição, fusionado a sequências codificantes de proteínas de uma biblioteca de cDNA de interesse. Apresenta 5.566 pb, o marcador de seleção é a ampicilina, e contém o gene LEU, que confere prototrofia às cepas de leveduras que são mutantes auxotróficos para leucina, ou seja, leveduras transformadas com esse vetor, são capazes de crescer em meio de cultura que não apresentam leucina em sua constituição

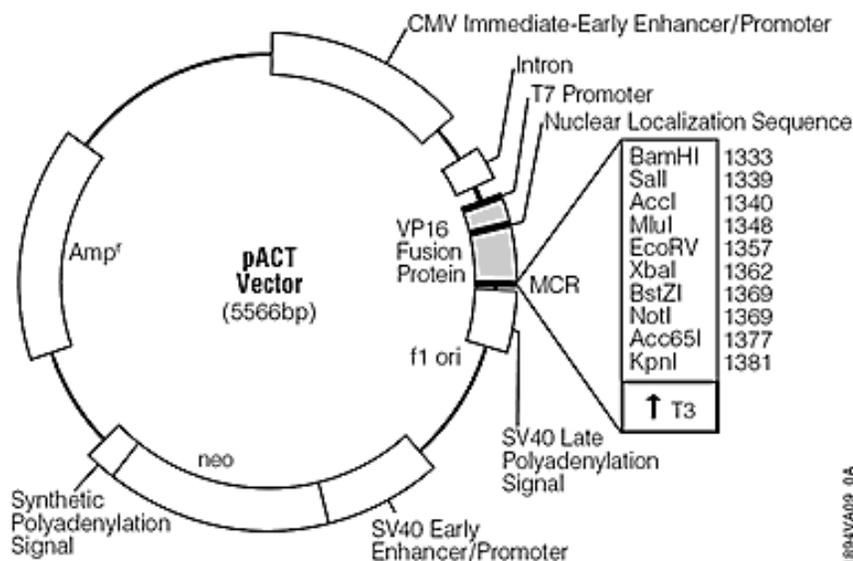


Figura 8: Mapa físico do vetor pACT.

4.3 Construção dos clones

4.3.1 PCR (*Polymerase Chain Reaction*- Reação em Cadeia da Polimerase)

Com base nas análises *in silico* foram desenhados oligonucleotídeos, contendo sítios de restrição, para amplificar as regiões selecionadas dos domínios escolhidos a fim de facilitar a clonagem nos vetores de expressão. O RNA total de flor e folha de *Arabidopsis thaliana* foi cordialmente cedido pelo professor Dr. Celso Benedeti, do Laboratório Nacional de Biociências. O RNA foi utilizado na síntese da primeira fita de cDNA com o kit da *Fermentas* de acordo com as

instruções do fabricante. Inicialmente, as amplificações do cDNA foram feitas para as construções Dilute, SH3 e todas as construções da cauda globular da miosina XIg. Em um segundo momento foram feitas as amplificações para as construções da cauda da miosina XIIh. As temperaturas usadas para a amplificação por PCR foram baseadas no seguinte cálculo: A primeira temperatura de anelamento foi resultado da média das temperaturas de melting específicas dos oligonucleotídeos sense e anti-sense, subtraindo 4°C. A terceira temperatura foi resultado da média das temperaturas de melting gerais dos oligonucleotídeos sense e anti-sense subtraindo 4°C. A segunda temperatura de anelamento foi a média da primeira e terceira temperaturas. Todo procedimento foi realizado com dNTP 0,2 mM, MgCl₂ ou MgSO₄ 1,5 mM, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo e 1.0 unidades de *Taq* DNA Polimerase *Platinum* ou *High Fidelity* em termociclador. As construções 11gGT-f e 11hGT-ccp foram amplificadas com ciclos diferenciados devido a dificuldade de amplificação nos procedimentos padrões. As temperaturas de anelamento usadas para a amplificação da construção 11gGT-f foram: 47 °C, 52 °C e 60 °C. Para a construção 11hGT-ccp foi usada apenas a média da maior temperatura de melting dos oligonucleotídeos sense e anti-sense, subtraindo 4 °C, resultando em temperatura de anelamento de 61,2 °C.

4.3.2 Eletroforese em gel de agarose

O resultado das PCRs foi confirmado pela análise dos fragmentos em géis de agarose 1% (massa/volume) em TAE (Tris-HCl 40mM; ácido acético 20mM; EDTA 1mM), também utilizado como tampão de corrida. Às amostras foi adicionado um quinto do volume de *loading buffer* (azul de bromofenol 25% e sacarose 40%) e um quinto do volume de *Gel Red*TM. Durante a corrida foi mantida a voltagem fixa de 100 Volts.

4.3.4 Purificação de bandas a partir do gel de agarose

As bandas referentes aos insertos amplificados, foram purificados com o uso do kit de purificação de gel da *Qiagen* conforme especificações do fabricante.

4.3.5 Clonagem em pGEM-Teasy

Os insertos amplificados e purificados foram clonado em pGEM-Teasy a fim de facilitar o sequenciamento dos mesmos. Para a reação de ligação foram utilizados 25 ng do vetor, 100 ng do produto de PCR e 0,3 unidades de T4 DNA ligase. A reação foi mantida de 14 a 18 horas a 4°C. Decorrido este período, a cepa *E coli* DH5α foi transformada com cada construção clonada em

pGEM-*Teasy* por choque térmico e a cultura foi plaqueada em meio LB sólido com ampicilina e X-gal. A presença de X-gal permite a seleção de colônias bacterianas que apresentem o inserto da construção de interesse inserido no vetor pGEM-*Teasy* uma vez que o vetor possui o gene LacZ que codifica a enzima β -galactosidase capaz de hidrolisar o X-gal produzindo um precipitado que confere cor azul às bactérias. Entretanto, quando um inserto é inserido no vetor pGEM-*Teasy*, ele interrompe o gene LacZ bloqueando a hidrólise de X-gal e conferindo às colônias bacterianas a cor branca. Dez colônias brancas de cada construção foram inoculada em 5 mL meio LB líquido com ampicilina. Após o crescimento por 14 a 18 horas a 37 °C, 200 rpm, foram retirados 5 μ L da cultura para uma varredura dos clones por PCR a fim de detectar clones que apresentam os insertos. Para a amplificação dos fragmentos foram utilizados o oligonucleotídeos M13 sense e anti-sense, utilizando colônias azuis como controle negativo, uma vez que a amplificação do vetor vazio resulta em uma banda de aproximadamente 250 pb. A presença dos insertos foi confirmada por análise em gel de agarose 1% e as amostras que apresentaram os fragmentos correspondentes às construções foram submetidas a uma mini preparação de DNA plasmidial utilizando o kit comercial *Mini-prep* da *Qiagen*, segundo instruções do próprio fabricante. Os insertos isolados tiveram sua sequência confirmada por sequenciamento automático utilizando oligonucleotídeos sense e anti-sense do próprio vetor (M13) utilizando o sistema de sequenciamento por sondas disponível no LNBio.

4.3.6 Subclonagem nos vetores de expressão

Para a sub-clonagem nos vetores de expressão pET28a e pET28aSUMO, os insertos foram clivados do pGEM-*Teasy* utilizando enzimas de restrição *Fast digest* da *Fermentas*, de acordo com os sítios inseridos nos oligonucleotídeos de cada construção (tabela 1). Para a clivagem dos vetores de expressão e dos fragmentos em pGEM-*Teasy* foram utilizados 500 ng do inserto, 1 μ g do vetor, 20 unidades de cada enzima do sítio de clonagem e tampão específico para enzimas *Fast digest*. As reações foram mantidas em banho seco a 37 °C por 3 horas. Após análise em gel de agarose 1%, os fragmentos e os vetores foram purificados de acordo com o item 4.2.4. A ligação dos insertos nos vetores de expressão digeridos foi feita utilizando a proporção 2:1 (inserto:vetor), 5 unidades/ μ L da enzima T4 DNA ligase e tampão específico da enzima a 4°C *overnight*. Para a confirmação das construções e análise de sua sequência, foi realizado um sequenciamento automático tendo como iniciadores os oligonucleotídeos sense e anti-sense de cada construção.

Tabela1: Enzimas de restrição utilizadas para a sub-clonagem das construções nos vetores de expressão. Para a clonagem das construções nos vetores pET28a e pET28aSUMO foi desenhado um único par de oligonucleotídeo contendo os sítios de restrição para as enzimas de ambos os vetores.

Construção	Clonagem em pET28a	Clonagem em pET28aSUMO	Clonagem em pBTM116
A11aSH3	<i>NdeI</i> e <i>XhoI</i>	<i>EcoRI</i> e <i>XhoI</i>	-
A11aDILUTE	<i>NdeI</i> e <i>XhoI</i>	<i>EcoRI</i> e <i>XhoI</i>	-
A11gGT-f	<i>NheI</i> e <i>XhoI</i>	<i>EcoRI</i> e <i>XhoI</i>	-
A11gGT-cc	<i>EcoRI</i> e <i>XhoI</i>	-	-
A11hGT-ccp	<i>NdeI</i> e <i>XhoI</i>	-	<i>EcoRI</i> e <i>SalI</i>
A11hGT-ccd	-	-	<i>EcoRI</i> e <i>SalI</i>

4.4 Nomenclatura adotada

Para as construções clonadas no vetor de expressão pET28a foi usada a abreviação *6xHis* antes do nome da construção, indicando a presença da cauda de histidina na região N-terminal da construção. Para construções clonadas em pET28aSUMO, foi utilizada a abreviação *6xHisSUMO* indicando a presença da cauda de polihistidina, também na região N-terminal seguida da proteína de fusão SUMO.

4.5 Testes de expressão

Os plasmídeos das construções dos domínios 11aSH3, 11aDilute, 11gGT e 11hGT nos vetores pET28a ou pET28-SUMO foram usados para transformarem diferentes cepas de *E. coli*. Foram realizados testes de expressão em escala analítica (50 mL de cultura) para determinar as melhores condições de indução da expressão variando temperatura, agente indutor, tempo de indução e cepa de *E. coli* para cada uma das construções. Além do meio LB, utilizado frequentemente para a cultura de bactérias, também foi testado o meio de auto-indução (ZYL 5052) composto por N-Z amina (caseína enzimática hidrolisada) 1%, extrato de levedura 0,5 %, no qual foi adicionado Na₂PO₄ 25 mM; MgSO₄ 1 mM; Mix de Metais traço (Fe 50 µM, Ca 20 µM, Mn 10 µM, Zn 10 µM, Co 2 µM, Cu 2 µM, Ni 2 µM, Mo 2 µM, Se 2 µM, B 2 µM) e solução 5052 (0,5% glicerol, 0,05% glicose e 0,2% de α-lactose). Foram realizados testes com os meios ZYM 5052 e ZYP 5052, cuja composição é igual ao ZYL 5052 exceto pela concentração de Na₂PO₄ de 50 mM no ZYM e 100 mM no ZYP. A indução da expressão nesse meio se dá pela lactose presente no próprio meio.

Após a determinação das melhores condições, a expressão foi conduzida em grande escala (de dois a cinco litros de cultura, dependendo do rendimento observado para cada construção).

4.6 Preparação de extratos e purificação

As proteínas produzidas na forma solúvel, foram purificadas utilizando-se um sistema de FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) disponíveis no laboratório da marca *Amersham Pharmacia (GE Healthcare)*. Devido a presença da cauda de seis histidinas (6xHis-tag) no N-terminal das proteínas recombinantes produzidas a partir dos vetores pET28a e pET28aSUMO, as amostras foram primeiramente submetidas à uma cromatografia de afinidade por metal (Ni^{2+}). Tal cromatografia ocorre a partir da interação da cauda de histidina fusiona a proteína, com o níquel que constitui a fase estacionária presente na matriz da coluna. Uma vez que a proteína se liga a coluna pela interação 6xHis- Ni^{2+} as proteínas que não apresentam afinidade pela coluna passam diretamente. No momento da eluição é adicionado um tampão com concentrações crescentes de imidazol que apresenta alta afinidade por níquel. Uma vez que a interação Imidazol- Ni^{2+} é mais forte que interação 6xHis- Ni^{2+} , a proteína se desprende e é eluída separada das proteínas contaminantes.

Posteriormente foram realizados outros passos de purificação conforme a necessidade e com base nas características bioquímicas da proteína como troca iônica, que seleciona as proteínas a partir de suas cargas, e exclusão molecular, que separa as proteínas a partir de seu peso molecular.

4.6.1 Domínio SH3 N-terminal da miosina XIa (6xHisSUMO-A11aSH3)

Após a expressão, a cultura foi centrifugada a 8.440 x g por quinze minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 ml de tampão de lise (Tris HCl 50mM pH 7,4; NaCl 300mM; Triton X-100 0,1%; Glicerol 5%; PMSF 0,5mM; lisozima 0,1mg/mL) por litro de cultura. A amostra foi incubada com agitação durante 30 minutos a 4°C. Em seguida foram realizados ciclos de sonicação: pulsos de 5 segundos e intervalos de 10 segundos, durante 15 minutos no gelo usando uma amplitude de 40%. A amostra foi centrifugada a 21.700 x g durante uma hora e o sobrenadante filtrado em filtro de 0,45 μm (*Millipore*).

O sobrenadante filtrado foi utilizado como amostra para a cromatografia de afinidade utilizando a coluna *HiTrap Chelating HP (GE Healthcare Life Sciences)*. A injeção da amostra e a lavagem da coluna foram feitas com tampão A (Tris-HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 300 mM; Glicerol 5%; PMSF 1mM). A eluição foi conduzida em duas etapas: **1-** gradiente de 0 a 100% do tampão B

(Tris-HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 300 mM; Glicerol 5%; PMSF 1mM; Imidazol 500 mM) em 20 volumes de coluna até sair o primeiro pico, considerado o pico de contaminante. Durante a eluição do primeiro pico, o gradiente foi estabilizado até que a UV baixasse; **2-** foi injetado 100% de tampão B para a eluição da proteína de interesse, uma vez que se mantivesse o gradiente crescente, a proteína saía de forma diluída e não na forma de um pico bem definido, como ocorre quando injetado 100% de B. A confirmação da presença da proteína 6xHisSUMO-11aSH3 foi feita a partir de análises por SDS-PAGE. As frações referentes a proteína alvo foram concentradas em filtros *amicon ultra* com porosidade de 10 kDa mediante adição de DTT 1 mM.

O segundo passo de purificação foi uma gel filtração em coluna *HiLoad Superdex 75 10/30* (*GE Life Science*), onde foram injetados 250 μ L da amostra. A corrida foi mantida a 0,4 mL/min utilizando o tampão contendo Tris-HCl 10 mM pH 7,4; NaCl 100 mM; Glicerol 5%, DTT 1mM. As frações cuja presença da proteína foi confirmada por SDS-PAGE foram concentradas nas mesmas condições descritas acima para análises de espalhamento dinâmico de luz e testes de cristalização.

4.6.2 Domínio Dilute C-terminal da miosina XIa (6xHisSUMO-A11aDilute)

Após a expressão, a cultura foi centrifugada a 8.440 x g por quinze minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 ml do tampão de lise (Tris HCl 50mM pH 8,0; NaCl 300mM; Triton X-100 0,1%; PMSF 0,5mM; lisozima 0,1mg/mL) por litro de cultura. A lise foi então realizada com agitação da amostra durante 30 minutos a 4°C, e posterior passagem da mesma por três vezes no sistema de lise por pressão, a *French Press*. O lisado foi centrifugado a 21.700 x g por uma hora e o sobrenadante foi filtrado em filtro de 0.45 μ m (*Millipore*).

O sobrenadante filtrado foi utilizado como amostra para a cromatografia de afinidade utilizando a coluna *HiTrap Chelating HP* (*GE Healthcare Life Sciences*). A injeção da amostra e a lavagem da coluna foram feitas com tampão A (Fosfato de Sódio 50 mM pH 7,4; NaCl 200 mM; Glicerol 5%; PMSF 1 mM; Benzamidina 5 mM; β -mercaptoetanol 2 mM). A eluição foi realizada com gradiente de 0 a 100% do tampão B (Fosfato de Sódio 50 mM pH 7,4; NaCl 200 mM; Glicerol 5%; PMSF 1 mM; Benzamidina 5 mM; β -mercaptoetanol 2 mM) em 10 volumes de coluna. Durante a eluição dos picos, o gradiente foi estabilizado até que a UV baixasse, garantido uma melhor resolução entre os mesmos. A confirmação da presença da proteína 6xHisSUMO-11aDilute foi feita a partir de análises por SDS-PAGE. As frações referentes a proteína foram concentradas em filtros

amicon ultra com porosidade de 10 kDa mediante adição de DTT 1 mM para análises de espalhamento dinâmico de luz.

4.6.3 Domínio cauda globular C-terminal da miosina XIg (6xHis-11gGT-f)

Foram realizados diversos testes com diferentes tampões e métodos de lise para a purificação da proteína 6His-11aGT-f. De modo geral, após a expressão, a cultura foi centrifugada a 8.440 x g por quinze minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 ml por litro de cultura do tampão de lise. Foram realizados dois tipos de lise:

a) Lise por pressão (*French press*)

Após ressuspensas em tampão de lise (variável a fim de encontrar aquele que garantisse maior estabilidade para a proteína) contendo 0,1 mg/mL de lisozima, as células foram mantidas sob agitação por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, o lisado foi passado três vezes no sistema de lise por pressão, a *French Press*. A amostra foi novamente centrifugada a 21.700 x g por uma hora e o sobrenadante filtrado em filtro de 0,45 µm (*Millipore*).

b) Lise química

Nas células ressuspensas foram adicionados na seguinte ordem para cada 20 mL de tampão: DOC 30 mg/mL diluído em água; Lisozima 60 mg/mL diluída em água; DNase 2 mg/mL diluída em glicerol. A amostra foi mantida sob agitação a 4°C por 90 min e em seguida foi centrifugada a 21.700 x g por uma hora a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,45 µm (*Millipore*).

Foram testados como primeiro passo de purificação as cromatografias de afinidade e troca-iônica. Para a purificação de afinidade foi utilizada a coluna *HiTrap Chelating HP*, e o gradiente de eluição consistiu em passar de 0 a 100% do tampão B (contendo Imidazol 500 mM) em 20 volumes de coluna. Para a purificação com troca-iônica foram utilizadas as colunas *HiTrap SP FF* seguida da coluna *HiTrap Q FF* (ambas da *GE Life Science*) uma vez que a passagem da amostra pelas duas colunas poderia garantir maior pureza da proteína de interesse. A injeção da amostra e a lavagem foram realizadas com o tampão A (Fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; Glicerol 10%; PMSF 1mM; Benzamidina 5 mM; β-mercaptoetanol 2 mM) com as duas colunas conectadas, entretanto, a eluição

foi seguida apenas com a coluna Q, para garantir que apenas a proteína 6hHis-A11gGT-f fosse eluída. O gradiente de eluição foi de 0 a 100% de tampão B (Fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; NaCl 1M; Glicerol 10%; PMSF 1mM; Benzamidina 5 mM; β -mercaptoetanol 2 mM) em 20 volumes de coluna, sendo que o gradiente era estabilizado durante a saída de todos os picos.

4.6.4 Domínio cauda globular C-terminal da miosina XIh (6xHis-A11hGT-ccd)

Após a expressão, a cultura foi centrifugada a 8.440 x g por quinze minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 ml do tampão de lise (Fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; NaCl 200 mM; Triton X-100 0,1%; PMSF 1,0 mM; lisozima 0,3 mg/mL) por litro de cultura. A lise foi então realizada com agitação da amostra durante 60 minutos a 4°C. O lisado foi sonicado em amplitude de 60% durante 15 min e centrifugado a 21.700 x g por uma hora e o sobrenadante foi filtrado em filtro de 0.45 μ m (*Millipore*).

O sobrenadante filtrado foi utilizado como amostra para a cromatografia de afinidade utilizando a coluna *HiTrap Chelating HP (GE Healthcare Life Sciences)*. A injeção da amostra e a lavagem da coluna foram feitas com tampão A (Fosfato de Sódio 50 mM pH 7,0; NaCl 200 mM; Glicerol 5%; PMSF 1 mM; Benzamidina 5 mM; β -mercaptoetanol 2 mM). A eluição foi realizada com gradiente de 0 a 100% do tampão B (Fosfato de Sódio 50 mM pH 7,0; NaCl 200 mM; Glicerol 5%; PMSF 1 mM; Benzamidina 5 mM; β -mercaptoetanol 2 mM) em 10 volumes de coluna. Durante a eluição dos picos, o gradiente foi estabilizado até que a UV baixasse, garantido uma melhor resolução entre os mesmos. Análise das frações coletadas foi feita por SDS-PAGE.

4.7 Técnicas de *refolding*

a) Chaperona artificial

Esse procedimento visa renovar a proteína durante o processo de purificação por afinidade. Para o a solubilização da proteína 6xHis-11gGT-cc expressa apenas na fração insolúvel, as células provenientes de quatro litros de expressão em meio LB na cepa de *E coli* BL21 (DE3) Δ SlyD pRARE II, foram ressuspensas em 40 mL de tampão A (Fosfato de sódio 50 mM pH 7,4; NaCl 300 mM; Glicerol 10%; PMSF 1 mM; β -mercaptoetanol 1 mM; lisozima 0,3 mg/mL). A amostra foi incubada por 1 hora na câmara fria sob agitação. Em seguida a amostra foi sonicada em amplitude de 70%, pulsos de 5 segundos e intervalos de 10 segundos durante 20 minutos. O lisado foi centrifugado a 21.700 x g durante uma hora a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o

pellet foi ressuspensa em tampão B (Tris HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 200 mM; Ureia 8M). Foram adicionados à amostra ressuspensa, 2 mL de resina Ni-NTA equilibrada com tampão B. A amostra mais a resina foram incubadas a 4°C, por uma hora, sob agitação. Após a incubação, a resina e a amostra foram transferidas para uma coluna e foi esperado até que a resina sedimentasse para deixar que a amostra passasse. A resina foi posteriormente lavada com os seguintes tampões: C (Tris HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 200 mM; Ureia 8M; Imidazol 10 mM) a fim de remover possíveis contaminantes, D (Tris HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 200 mM; Ureia 8M; β -mercaptoetanol 1 Mm), E (Tris HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 200 mM; Ureia 8M; Triton X-100 0,1%), F (Tris HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 200 mM; Triton X-100 0,1%) e G (Tris HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 200 mM; Ureia 8M; β -ciclodextrina 5 mM) cuja presença da β -ciclodextrina garante que as regiões hidrofóbicas da proteína seja estabilizada contribuindo para o reenovelamento da proteína. A eluição da amostra foi feita com o tampão H (Tris HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 200 mM; Imidazol 300 mM).

b) Diálise

Esse método visa reenovelar a proteína a partir de trocas de tampão com concentrações decrescentes do agente desnaturante. Parte da amostra foi diluída a 0,2 mg/mL em tampão 1 (Fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; NaCl 200 mM; Ureia 8M). A primeira troca foi feita com tampão com 6M de ureia durante 2 horas. A segunda troca havia 4M de ureia e foi mantida *overnight*. No dia seguinte foram usados tampões com 2M, 1M, 0,5M de ureia e as trocas foram mantidas durante duas horas cada. A última troca foi feita *overnight* no tampão contendo Fosfato de sódio 10 mM pH 7,0 e NaCl 100 mM. A concentração de sal foi diminuída na última troca a fim de se obter uma amostra ideal para análises de dicroísmo circular. Todas as trocas foram feitas a 4°C sob agitação.

4.8 Quantificação e Pureza

Após os passos de purificação, a concentração da proteína foi estimada por absorvância de 280 nm utilizando o espectrofotômetro *nanodrop* (Thermo Scientific). A partir dos valores dos coeficientes de extinção molar (ϵ) obtidos através do programa *ProtParam* (<http://ca.expasy.org>) e dos valores de absorvância a 280 nm, foi determinada a concentração molar da proteína através da Lei de Beer-Lambert:

$$A_{280} = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

onde A_{280} é a absorvância medida a 280 nm, l é o caminho ótico (cm), C é a concentração molar da amostra de proteína e ε é coeficiente de extinção molar em 280 nm ($M^{-1}cm^{-1}$).

A pureza da amostra foi analisada tanto por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante sob condições redutoras (SDS-PAGE) como também através de análises de espalhamento dinâmico de luz (DLS).

4.9 Clivagem com SUMOprotease

A proteína 6xHisSUMO-11aSH3, foi submetida a clivagem em solução pela SUMOprotease para ensaios de cristalização. Para cada 1 mg de proteína recombinante foram adicionados 100 μ g de SUMOprotease e a reação foi mantida a 4°C por 30 minutos no tampão da própria proteína.

Para a clivagem da proteína de fusão durante purificação por afinidade, foram utilizados 4 mL da resina em suspensão Ni-NTA superflow (*Qiagen*). A resina foi centrifugada a 400 x g durante cinco minutos e o etanol foi retirado. Foram adicionados 2 mL de água miliQ e foi realizada uma nova centrifugação nas mesmas condições. Em seguida, a água foi removida e a resina foi equilibrada com 2 mL do tampão A (Tris-HCl 50 mM pH 7.4; NaCl 300 mM; Glicerol 5%; PMSF 1mM; Benzamidina 5 mM). A fração solúvel do lisado foi adicionado e ficou incubado com a resina por uma hora agitando a 4°C. Em seguida, foi adicionado 1 mg/mL de SUMOprotease e a resina foi incubada novamente a 4°C por meia hora. A resina com a amostra e a protease foram transferidas para uma coluna para a sedimentação da resina e em seguida a coluna foi aberta para a passagem do das amostras que não interagiram com a resina. A resina foi lavada com 2 mL de tampão A e logo em seguida foi feita a eluição com 4 mL do tampão B (Tris-HCl 50 mM pH 7.4; NaCl 300 mM; Glicerol 5%; PMSF 1 mM; Benzamidina 5 Mm; imidazol 500 mM) para retirada da proteína SUMO que está fusionada a cauda de histidina. As frações foram coletadas manualmente em *ependorfs* de 2 mL.

4.10 Western blot

A partir de um gel 13% de poliacrilamida contendo as amostras, foi montada a transferência das amostras do gel para a membrana PVDF. Antes da transferência, a membrana foi ativada com

metanol em banho de 10 segundos, seguido de um banho de água miliQ durante 5 minutos. A reação transferência foi preparada em cuba específica utilizando três papeis cromatográficos abaixo do gel, sobre o gel foi colocada a membrana de PVDF seguindo a orientação da corrente elétrica aplicada que dever seguir do gel para a membrana. Por fim, foram adicionados mais três papeis cromatográficos sobre a membrana. O aparato foi banhado pelo tampão Taubin (Tris Base 25 mM; glicina 192 mM; metanol 10%; SDS 0,1%). A amperagem utilizada para a transferência foi proporcional a área do gel (1 mA/cm^2).

Para o tratamento da membrana após a transferência, a mesma foi banhada por três vezes de cinco minutos em TBS-Tween (Tris Base 50 mM, NaCl 150 mM, 0,5% *Tween* 20, pH 8,4). A inativação de ligações inespecíficas foi realizada com a solução com 5% de leite em TBS-Tween (p/v). A membrana foi incubada *overnight* agitando a 4°C. No dia seguinte, a solução de leite foi descartada e a membrana lavada com TBS-Tween duas vezes de 5 minutos a temperatura ambiente. A membrana foi banhada com a solução de anticorpo anti-poliHistidina na proporção de 1:5000 em TBS-Tween e mantida sob agitação por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi lavada novamente com tampão TBS-Tween por cinco vezes de cinco minutos para a posterior adição do anticorpo secundário (Anti IgG conjugado a fosfatase alcalina) na proporção de 1:3500 diluído em TBS-Tween. A membrana foi mantida por uma hora agitando em temperatura ambiente.

A revelação da membrana foi feita incubando-a na solução reveladora, que apresenta substratos da fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl_2 5 mM; BCIP 0,02 % e NBT 0,03 %) mantida sob agitação em temperatura ambiente por até uma hora. Para parar a reação foi adicionada a solução de EDTA 10 mM em TBS-Tween por 5 minutos.

4.11 Dicroísmo Circular

Foram realizados experimentos de CD para acessar informações sobre o enovelamento da proteína, fornecendo dados preliminares sobre a estrutura secundária e as propriedades dinâmicas da mesma. Os espectros para análise da estrutura secundária foram realizados com a amostra a $3,64 \mu\text{M}$, e as leituras foram feitas na faixa de 260 a 197 nm, a 50 nm/min com 20 acumulações para a mostra e 10 acumulações para o tampão antes e depois da desnaturação térmica. O aumento da temperatura para a desnaturação ocorreu de 10 °C a 103 °C a uma taxa de 1 °C/min. Uma vez que as proteínas do presente trabalho são predominantemente ricas em alfa-hélices, o comprimento de onda para a

análise foi 208 nm. Os dados foram analisados e tratados no programa *OriginPro 8* (Origin Lab Corporation, Copyright 1991-2007).

4.12 Espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic light scattering - DLS*)

DLS fornece informações quanto ao raio hidrodinâmico da proteína e à monodispersividade populacional (homogeneidade estrutural) a qual tem sido demonstrada como essencial para o sucesso dos ensaios de cristalização (WÄRDELL *et al.*, 1993; GOLDBURG, 1999). As análises foram realizadas a 18 °C, utilizando 70 µL da amostra com pelo menos 1 mg/mL.

4.13 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica largamente utilizada na análise de moléculas de tamanhos pequeno ou médio na forma gasosa. O método é bastante sensível permitindo a análise dessas moléculas em baixa concentração a partir das diferenças de massa e carga (COLNAGO *et al.*, 2002). As bandas para análise foram extraídas do gel de poliacrilamida e digeridas com tripsina conforme protocolo descrito por Shevchenko e colaboradores em 1996. Os peptídeos foram analisados pelo sistema Esi-Quad-Tof no laboratório de espectrometria de massas do LNBio.

Os dados foram processados e analisados pelo algoritmo *Mascot Daemon*. Os bancos de dados utilizados na busca foram *Arabidopsis_Sep_2009*, *NCBI-Arabidopsis_thaliana* e *NCBI* para todas as entradas.

4.14 Testes de cristalização

Foram testados os seis kits iniciais baseados nos kits comerciais (*Crystal Screen*, *Crystal Screen 2* e *SaltRx* da *Hampton Research*; *Precipitant Synergy* e *Wizar I e II* da *Emerald Biosystems*; *PACT* e *JCSG+* da *Nextal/Qiagen*) disponíveis no laboratório de cristalização do LNBio. As placas de 96 poços foram montadas pelo robô *HoneyBee*. Gotas contendo 0,5 µL da solução do poço foram equilibradas contra 0,5 µL da solução do poço por difusão de vapor usando-se método *sitting drop*. As placas foram incubadas a 17 °C. A visualização das placas foi feita por meio de lupas e a partir de fotos tiradas pelo robô *Rock Imager (Formulatrix)* que também fotografa com zoom, e com emissão de luz UV. A incidência de luz UV permite diferenciar cristais de proteína uma vez que a luz UV é absorvida pelos triptofanos fazendo com que o cristal fique iluminado na gota, diferenciando de um cristal de sal que não absorve a UV.

4.15 Confirmação de interação por duplo-híbrido

O sistema de duplo-híbrido foi inicialmente desenvolvido conhecer as interações entre duas proteínas. Subsequentemente, ele foi aplicado como um método de identificação de possíveis interações proteína-proteína, usando livrarias de cDNA fusionadas a um domínio de ativação (WALHOUT *et al.*, 2000).

Membros do nosso grupo realizaram um duplo-híbrido para analisar a interação das presas de uma biblioteca de cérebro fetal humano com o domínio cauda globular da miosina humana Va (H5aGT-f). A fim de investigar a conservação de parceiros moleculares entre as miosinas H5aGT-f e A11hGT-ccd, foram selecionados os clones que tiveram a interação com a miosina humana confirmada a partir da atividade, ou do repórter LacZ, ou do HIS3 (tabela 2), para analisar sua interação com a miosina de planta.

Tabela 2: Dados dos clones selecionados que apresentaram interações com a Myo5a de humano.

PRESA XYZ	Proteína Identificada no <i>Screening</i> (nome original em inglês)	Validação em Levedura					Interação <i>isca-presa</i>	
		Ativação do gene LacZ	Crescimento em SD-WLH Concentração de 3AT / mM					
			5	10	20	30		50
AC10	Coiled-Coil And C2 Domain Containing	Positivo	X	X	X	X	X	Sim
AB3	Ferritin, Heavy Polypeptide 1	Positivo	X	X				Sim
AD1	Nephronectin Isoform CRA_B	Positivo	X	X	X	X		Sim
AA10	Protein Phosphatase 1, Regulatory (<i>Inhibitor</i>) Subunit 1A	Positivo	X	X				Sim
BA4	Ribosomal Protein S7	Positivo	X					Sim
AC2	RPGRIP1-Like	Positivo	X	X				Sim
AC6	Secretory Carrier Membrane Protein 1	Positivo	X	X	X	X	X	Sim
AF9	U3 Small Nucleolar Ribonucleoprotein (<i>Homolog Yeast</i>)	Positivo	X					Sim
AC7	WD Repeat Domain 6	Positivo	X	X	X	X	X	Sim
BA6	Zinc Finger Protein 428	Positivo						Sim

A interação entre a miosina e a presa é avaliada a partir da reconstituição do fator de transcrição (figura 9). Fusionado a miosina está o domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição. Fusionado as presas, está o domínio ativador do mesmo fator de transcrição. Quando separados, tais domínios permanecem inativos. Uma vez que ocorre a interação entre a miosina e a presa, o fator de transcrição é reconstituído, pois o domínio de ligação ao DNA e o domínio de ativação agora estão unidos em uma mesma estrutura. Assim que o fator de transcrição se reconstitui ele se liga a uma região promotora para a ativação da transcrição de um gene específico (CHIEN *et al.*, 1991; YANG *et al.*, 1995; BRÜCKNER *et al.*, 2009). No teste de auxitrofia a histidina, o fator de transcrição ativa o gene que codifica a histidina, permitindo que a levedura cresça em meio com ausência desse aminoácido, permitindo que haja crescimento apenas de colônias que tiveram a ligação da miosina com a presa. No teste do gene LacZ, quando o fator de transcrição é reconstituído, ele se liga ao promotor que ativa o gene LacZ que produz um pigmento que confere com azul às colônias. Aquelas colônias que não se apresentarem azul, indicam que não houve reconstituição do fator de transcrição e portanto, não houve interação miosina-presa.

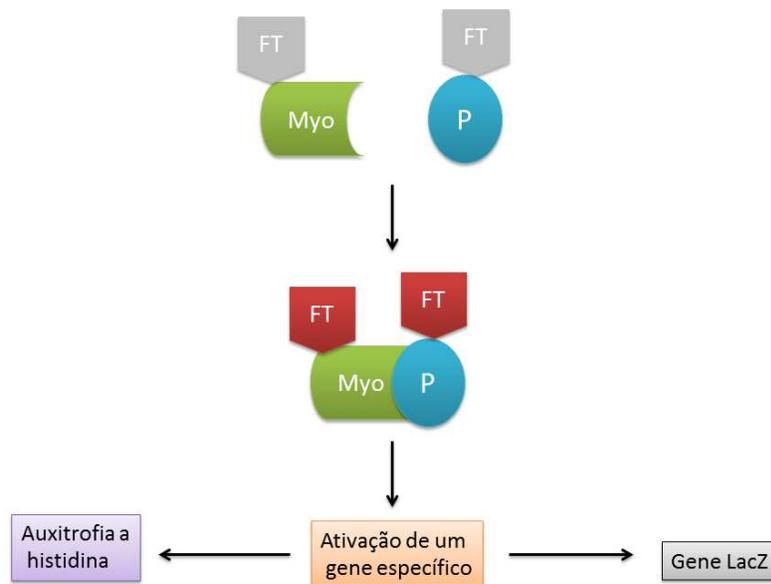


Figura 9: Esquema explicativo do mecanismo de funcionamento do duplo híbrido. O esquema mostra a reconstituição do fator de transcrição (FT) a partir da interação da miosina (Myo) com a presa (P) e os experimentos utilizados para a detecção dessa interação (Adaptado de Brückner e colaboradores em 2009).

Células da cepa L40 da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram transformadas inicialmente com as miosinas H5aGT-f e A11hGT-ccd clonadas em pBTM116 que permite o crescimento da levedura em meio sem triptofano (meio SD-W). Para controle, uma colônia da levedura foi transformada com o vetor pBTM116 vazio e outra com a proteína FEZ-pBTM116, para ser usada como controle positivo, uma vez que esta é capaz de se auto ativar. Após o crescimento das placas, as células transformadas foram transformadas pela segunda vez, agora com as presas clonadas em pACT. O plaqueamento foi realizado em meio SD-WL, devido a capacidade do vetor pACT de conferir auxotrofia a leucina, permitindo o crescimento da levedura na ausência deste. A partir das células crescidas, foram realizados dois experimentos para a confirmação da interação (figura 8):

a) Teste de auto-ativação do gene LacZ (Teste do Azul)

As colônias de L40 crescidas em meio SD-W foram cobertas com papel de filtro a fim de que essas se aderissem a ele. O papel filtro foi posteriormente imerso em nitrogênio líquido por duas vezes de 90 segundos para a lise celular. O papel foi retirado do nitrogênio líquido e secado na bancada. Em seguida, foi colocado com as colônias voltadas para cima sobre um segundo papel filtro previamente umedecido com 10 mL de solução reveladora (KCl 1,334 g L⁻¹, MgSO₄ 0,334 g L⁻¹, NaH₂PO₄ 7,334 g L⁻¹ e Na₂HPO₄ 23,334 g L⁻¹), 167 µL x-Gal 20 mg mL⁻¹ e 27 µL β-mercaptoetanol). Os papeis foram colocados em uma placa de petri e incubados a 37°C durante 4 horas.

b) Testes da placa SD-WLH

As colônias de L40 crescidas em meio SD-WL foram ressuspensas em 50 µL de água miliQ e foram plaqueadas em meio restritivo SD-WLH (tabela3) contendo 3AT como substrato, em concentrações de 0 mM a 50 mM.

Tabela 3: Composição dos meios de cultura restritivos. Composição utilizada para a produção dos meios de cultura para o crescimento de cepas de L40.

Componente	Composição do Meio Restringente / g L ⁻¹			
	SD-W	SD-WL	SD-WLH	SD-L
Fonte de nitrogênio	1,4	1,4	1,4	1,4
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0	5,0	5,0	5,0
Glicose	20,0	20,0	20,0	20,0
Adenina (A)	0,02	0,02	0,02	0,02
Leucina (L)	0,10	---	---	---
Histidina (H)	0,02	0,02	---	0,02
Triptofano (W)	---	---	---	0,02
Ágar	18,0	18,0	18,0	18,0

5 – RESULTADOS

5.1 Análise *in silico*

Foram analisadas todas as 13 miosinas da classe XI e as quatro miosinas da classe VIII. São descritos na literatura, os domínios Dilute, SH3 e GrpE em miosinas de *Arabidopsis thaliana*. As construções elaboradas a partir das análises *in silico* estão esquematizadas na figura 10. Apesar de não ter sido anotado por Odrionitz e Kollmar 2007, o domínio GrpE foi encontrado pelo banco de dados do *NCBI* nas miosinas da classe XI e por ter sido predito como ordenado pelo preditor *foldindex*, foi selecionado como alvo embora não tenham sido realizados experimentos com ele. O domínio GrpE é homólogo a proteína de mesmo nome com função de chaperona que é bastante utilizada em fusões para melhorar a solubilidade de proteínas humanas expressas em *E. coli* (HAACKE *et al.*, 2008; HAMMARSTRÖM *et al.*, 2001).

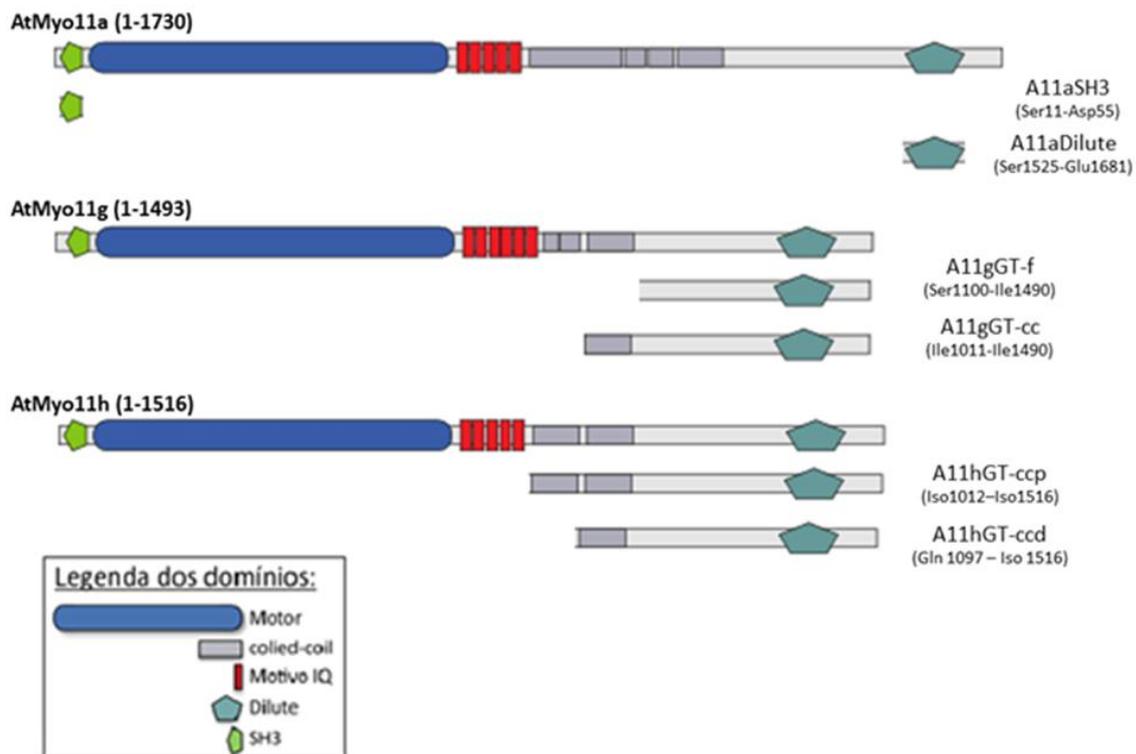


Figura 10: Desenho esquemático das construções das miosinas de planta. A representação esquemática é baseada no banco de dados *CyMoBase* (www.cymobase.org). São representados quatro membros das miosinas de classe XI de *Arabidopsis thaliana* (AtMyo11a, AtMyo11g, AtMyo11h e AtMyo11m). Abaixo de cada gene está representada a porção nas construções elaboradas.

Uma vez encontrados os domínios das miosinas de *A. thaliana*, as sequências polipeptídicas das proteínas inteiras e dos seus domínios foram submetidas à predição de ordem/desordem para encontrar alvos cuja estrutura apresente maior ordenação e consequente estabilidade. Durante as análises foi possível perceber que há divergências entre diferentes preditores em relação ao nível de ordem/desordem dos domínios de uma mesma sequência polipeptídica, porém foi estabelecido um consenso para selecionar os alvos (tabela 4).

Deu-se preferência em trabalhar inicialmente com os domínios que apresentam maior dados na literatura sobre sua importância no funcionamento das miosinas de planta. Estas construções tiveram seu oligonucleotídeos de iniciação sintetizados para dar início aos experimentos. Aqueles cujos oligonucleotídeos não foram sintetizados nessa primeira etapa seriam estudados mais adiante quando acabado os experimentos com os primeiros alvos selecionados.

Tabela 4: Relação de domínios selecionados após análises *in silico*. O nome da construção se baseou na seguinte organização: **A:** *Arabidopsis thaliana*, em seguida a classe da miosina, o nome ou abreviação do domínio, onde **GT (globular tail)**: cauda globular, e em seguida o número da construção ou se o domínio foi selecionado por inteiro: **f (full)**.

Miosina	Região	Domínio	Construção	Resíduos	Oligonucleotídeos sintetizados
8c	Cabeça	Domínio motor (inteiro)	A8cMOTOR	V ₁₅₁ -G ₈₃₀	
11a	Cabeça	SH3 N-terminal (inteiro)	A11aSH3	S ₁₁ -D ₅₅	✓
11a	Cauda	Dilute (inteiro)	A11aDIL	S ₁₅₂₅ - E ₁₆₈₁	✓
11g	Cauda	Cauda globular (inteiro)	A11gGT-f	S ₁₁₀₀ -I ₁₄₉₀	✓
11g	Cauda	Cauda proximal e globular (fragmento)	A11gGT-cc	S ₁₁₀₀ -I ₁₄₉₀	✓
11g	Cauda	GRPE (N-Terminal)	A11mGRPE- 1	L ₉₀₆ -E ₉₇₇	
11g	Cauda	GRPE (C-Terminal)	A11mGRPE- 2	L ₉₃₈ -E ₁₀₀₈	
11h	Cauda	Cauda proximal e globular (fragmento)	A11hGT-ccp	I ₁₀₁₂ -I ₁₅₁₆	✓
11h	Cauda	Cauda proximal e globular (fragmento)	A11hGT-ccd	Q ₁₀₉₇ - I ₁₅₁₆	✓

Análises de ordenação de estrutura previstas pelo programa *foldindex*, mostraram que a região da cauda globular das miosinas XIg e XIh apresenta alto grau de ordenação com regiões de sutis desordens (figura 11). Tais níveis de ordenação são ideais para a expressão heteróloga de proteínas, garantindo maior eficiência no procedimento. Entretanto, como já esperado, as construções da cauda que apresentam uma parte do *coiled-coil* N-terminal, exibem uma quantidade maior de regiões desordenadas, justamente na região de dimerização da miosina. Mesmo com tais dados, essas construções foram selecionadas a fim de induzir a dimerização da miosina para conferir maior estabilidade para a mesma. O domínio dilute da miosina XIa, se encontra na região C-terminal da cauda, em uma porção com maior grau de ordenação.

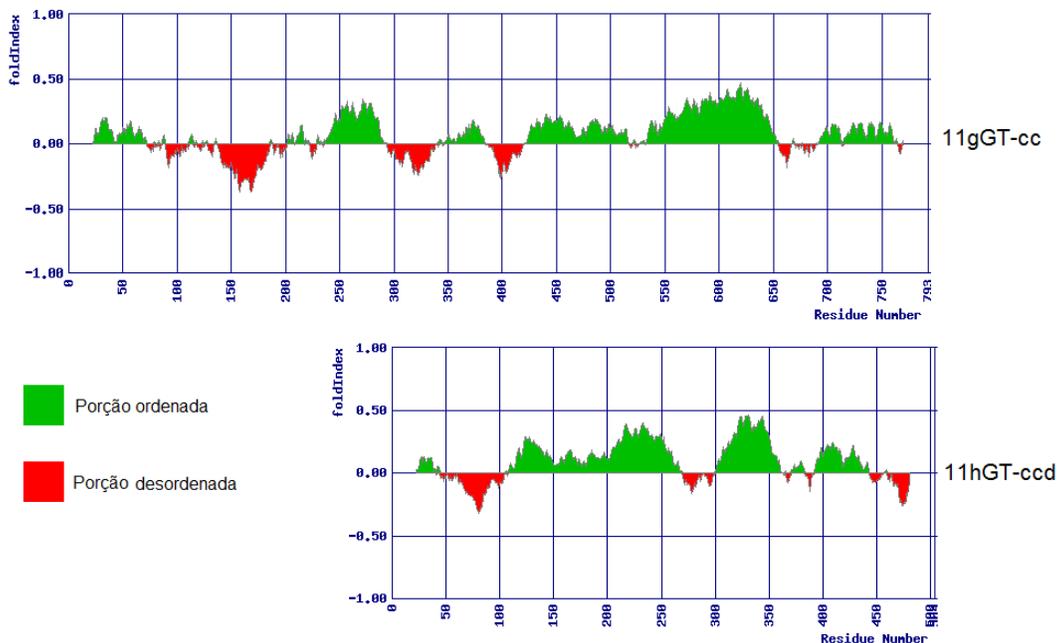


Figura 11 Gráficos mostrando os níveis de ordenação ao longo das construções da cauda globular. Predição feita pelo programa *foldindex*. É possível notar que a cauda globular, tanto da XIg, quanto da XIh, mantém um nível ideal de ordenação que possivelmente permite maior solubilidade e estabilidade para a construção durante os procedimentos de expressão heteróloga e purificação. Era esperado que as regiões referentes ao *coiled-coil* (porção N-terminal) tivessem um grau de desordem maior.

A comparação entre as sequências das maiores construções da cauda globular das miosinas XIg e XIh pelo programa *ClustalW* (figura 12), indicou que, embora as regiões de conservação fossem numerosas, a homologia de cerca de 60% se deu devido à região N-terminal da construção da miosinas XIg ser maior que a da construção da XIh.

```

XIgGT-cc      DKSSDEKAACKKLETVGLNGFQIGKTKVFLKAGQMAELDDRRTTEVLGRAACIIQWKFRS 60
XIhGT-ccp    -----

XIgGT-cc      YLTRQSFIMLRNAAINIQAVYRGQVARYRFENLRREAAALKIQALRIHLDRKRSYIEAV 120
XIhGT-ccp    -----

XIgGT-cc      VTVQSGLRGMAARVVLRKTKATTVIQSHCRRLRAELHYKLLKKAAITTQSAWRARLARK 180
XIhGT-ccp    -----

XIgGT-cc      ELRKLKTDARDTVVLQAAKSMLAEKVEELTWRLDLEKRMVDMDEVSKAQENAKLQLALEE 240
XIhGT-ccp    -----

XIgGT-cc      IQLQFEETKVSLLKEVEAAKKTAAIVPVVKEVPVVDTVLMEKLTSENEKLSLVTSLLEK 300
XIhGT-ccp    -----

XIgGT-cc      IDETEKFFEEKKIISEERLKKALDAENKIDNLKTAMHNLEEKLEKVKLENNFLKESVLT 360
XIhGT-ccp    -----INEERLKQAI EAETTIVNLKTAVHELQEKILDVESENKILRQKSLIQ 47
                * .*****: : : * . * *****: : : * : : * : : : : *

XIgGT-cc      PVKTASGRFLSTPLKLNQGLFTSEESQLSGAEFTTPPRIQESGSDTKSRGSHIDPQHED 420
XIhGT-ccp    ---ASGHLPPFPVKGSGNGHFSSKESPFNGSEIETLARTQE QESDAKTRRYHLDRQREN 103
                ***: : .*: * . *** *: : * : .*: : * . * * . * : : * * : : * : :

XIgGT-cc      VDALINSVTKNVGFSGKPVAAFTIYKLLHWKSF EAERTNVFDRLVQMIGSAIKDEDND 480
XIhGT-ccp    IGALINCVVNNIGFNQKPVAAFTIYKLLHWKSF EAERTSVFDRLVQMIGSAIKDEGDN 163
                : .*** . * . : : * : * .***** .***** .***** .***** . : :

XIgGT-cc      ANLAYWLSNTSTLLFMLQQSLKSGGTGATPLRQSPSLVRWMTKGFRRSP----- 528
XIhGT-ccp    EHLAYWLSNTSTLLFMIQQSLKPGATPQQKTPVSTSLFGRMAMGFRSAPSSAETSAAAAEA 223
                :*****:*****: * . * . * . * : : * . * .

XIgGT-cc      -AAEAI R PVDAKDPALHFKQQL EAYVEKILGIWDLNKKELNTVLALCIQAPKTFKGNAL 587
XIhGT-ccp    AAAAVIRPVVAKDPALLFKQQLTAYVEKIFGMIRDNLKNEQLTLLSLCIQAPRTSTGRSL 283
                * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

XIgGT-cc      ISITTAN-----YWDIIEGLDALLSTLKESEFVPPVLIQKIFSQAFLINVQVCNS 638
XIhGT-ccp    RSFRSSK TMRNNSPLDHWNGIYDGLNAILSTLQENFVPPVLIQNIIFIQTFSFINVQLFNS 343
                * : : : : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

XIgGT-cc      LVTRPDNCSFINGEYKSGLEKLEKWCETKEEYAGSSWDELKHTRQAVGFLLIHKKYNI 698
XIhGT-ccp    LLLRRECCTFSNGEFVKSGLALLEEWCNETTEEYAGSSWDELKHIRQAVGMVIHKKYRI 403
                * : * : * : * * : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

XIgGT-cc      SYDEIANDLCPNLQIQHFKLCTLYKDEIYNTKSVSQDVIASMTGVMT-----DSSDFL 752
XIhGT-ccp    SYDDIAHDLCPILSVQQLYRICTLYWDDSYNTRSVSQDVIANMRVLMTEDSNNADSSAFL 463
                * * : * : * * * * * * : : * * * : * : * : * : * : * : * : * * * * *

XIgGT-cc      LKEDSSNIISLSIDDLCSMQDKDFAQVKPAEELLENPSFI-- 793
XIhGT-ccp    LDEDSS--IPFSADDLSSMKEKDFAEKPAEELLENPAFSFL 504
                * . * * * * * . * : * * * . * * : : * * : : * * * * * * * * * * *

```

Figura 12: Alinhamento das sequências das maiores construções da cauda globular das miosinas XIg e XIh. Nota-se que a sequência apresenta regiões similares, porém não há regiões de grande conservação na estrutura primária da cauda globular das miosinas analisadas.

Predições das características físico-químicas de cada construção feitas pelo *ProtParam* (tabela 5) mostram a composição de aminoácidos, peso molecular, ponto isoelétrico teóricos.

Tabela 5: Predições das características físico-químicas das construções das miosinas XIa, XIg e XIh elaboradas pelo *ProtParam*. Os dados são predições referentes ao número de aminoácidos (**AA**) peso molecular (**FW**), ponto isoelétrico (**pI**), porcentagem de triptofano (**W%**) e porcentagem de cisteína (**C%**). Os dados levam em consideração a cauda de histidina e a presença/ausência da proteína SUMO na construção.

Construção	AA	FW (kDa)	pI	W%	A%
6xHis11aSH3	63	7,32	5,43	3,0	1,5
6xHisSUMO11aSH3	171	19,38	5,13	1,2	0,6
6xHis11aDilute	178	20,46	5,52	2,2	2,8
6xHisSUMO11aDilute	183	32,49	5,23	1,4	1,8
6xHis11gGT-f	414	46,22	5,87	1,7	2,2
6xHis11gGT-cc	516	57,64	5,88	1,4	1,7
6xHis11hGT-ccp	527	59,16	5,89	1,1	1,5

5.2 Desenho dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos para as construções: A8cMOTOR, A11mGrpE N- e C-terminal, A11aDilute, A11aSH3, A11gGT-f e A11gGT-cc foram desenhados de modo que um par de oligonucleotídeos de cada construção possuísse os sítios de restrição necessários para a subclonagem nos dois vetores de expressão a serem utilizados (pET28a e pET28a+SUMO). Para as construções da cauda da miosina 11h foram feitos um conjunto de oligonucleotídeos com sítios para clonagem em pET28a e outro conjunto de oligonucleotídeos com sítios para clonagem em pBTM116. A construção A11hGT-ccp e A11hGT-ccd foram as únicas a serem clonadas em pBTM116 porque apresentam uma extensão maior que as demais e foram utilizadas para a confirmação de interação com presas pescadas no duplo-híbrido da miosina humana Va realizado pelo nosso grupo (seção 4.15). A construção A11hGT-ccd é equivalente a construção da miosina Va-pBTM116 utilizada no experimento de duplo híbrido. A sequência, e informações de cada oligonucleotídeo de iniciação estão descritas na tabela 6.

Tabela 6: Sequência e características dos oligonucleotídeos de iniciação de cada construção. Os dados foram obtidos a partir de análises no site *Oligo Analyzer*. **Tm**: temperatura de melting. A Tm geral (**TmG**) compreende toda a sequência do oligonucleotídeo, já a Tm específica (**TmE**) compreende apenas a região do oligonucleotídeo que é complementar a fita de DNA molde. As regiões sublinhadas indicam os sítios de restrição e (‘) indica a região de clivagem em cada sítio.

Oligonucleotídeo	Sítios de restrição	TmG (°C)	TmE (°C)
A8cMOTOR			
Sense: <u>G’GATCC G’CTAGC</u> GTCATATCAGAGACTCTAGTACCT GCAAATCCT	BamHI e NheI	74,8	67,3
Anti-sense: <u>C’TCGAG</u> TTACCAATCTGGCCAGTTCTGAAAAACAA	XhoI	71,2	67,0
A11aSH3			
Sense: <u>G’AATTC</u> TCTCATGTCTGGGTGGAGGAT C	EcoRI	66,7	64,2
Anti-sense: <u>GAGCT’C</u> TTAGTCCTTGGGGTAGACATTATTTAAC	SacI	66,9	60,7
A11aDilute			
Sense: <u>G’AATTC CA’TATG</u> AGCTCTTGGCAAAGCATTATTGAG	EcoRI e NdeI	68,5	63,3
Anti-sense: <u>C’TCGAG</u> TTATTCATCTTCATTGTCAATAGAAAGTTTAAAGTTGG	XhoI	68,5	65,0
A11gGT-f			
Sense: <u>G’AATTC G’CTAGC</u> TCAGGATCTGACACTAAGTCAAGGGG	EcoRI e NheI	62,0	66,1
Anti-sense: <u>C’TCGAG</u> TTATATGAAAGATGGATTTCCAGAAGTTCCTCAGC	XhoI	70,3	67,5
A11gGT-cc			
Sense: <u>G’AATTC</u> ATTAGTGAAGAGAGGCTGAAGAAGGC	EcoRI	67,5	65,3
Anti-sense: <u>C’TCGAG</u> TTATATGAAAGATGGATTTCCAGAAGTTCCTCAGC	XhoI	70,3	67,5
A11hGT-ccp			
Sense: <u>CA’TATG</u> ATAAATGAGGAGAGACTGAAGCAG	NdeI	62,2	61,4
Anti-sense: <u>G’TCGAC</u> TTATATCAAGAACTGAAAGCTGGG	SalI	66,2	59,9
A11hGT-ccd			
Sense: <u>G’AATTC</u> CAAGAATCTGATGCAAAGACTCG	EcoRI	65,3	61,0
Anti-sense: <u>G’TCGAC</u> TTATATCAAGAACTGAAAGCTGGG	SalI	66,2	59,9
A11mGrpE1			
Sense: <u>G’GATCC CA’TATG</u> TTAGAGAAACGGATAAGGACTGACCTG	BamHI e NdeI	70,7	64,7
Anti-sense: <u>C’TCGAG</u> TTATTCATTCGTGATCTTATCCATTAATTCCTGATC	XhoI	68,5	64,9
A11mGrpE2			
Sense: <u>G’GATCC CA’TATG</u> GAAACGGAGGCATTGCTTATTAAGAACGTG	BamHI e NdeI	72,6	67,3
Anti-sense: <u>C’TCGAG</u> TTAATCCTGGCTAATCTTGGTGGTCTCTTG	XhoI	70,3	66,9

5.3 Clonagem, expressão, purificação e análises biofísicas

Inicialmente a cepa de *E. coli* BL21 (DE3) Δ SlyD pRARE II foi transformada com os plasmídeos contendo as construções. Quando necessário, os testes de expressão foram conduzidos em outras cepas, como Origami II, SHuffle e Arctic Express.

5.3.1 Construção A11aSH3

O domínio A11aSH3 foi amplificado por PCR a partir do RNA de flor gerando um fragmento de aproximadamente 150 pb conforme esperado. Esse fragmento foi excisado do gel, purificado com o kit de purificação de gel da *Qiagen* e utilizado para a ligação no vetor de clonagem pGEM-*Teasy*.

Análises por sequenciamento identificaram uma mutação na construção A11aSH3 do tipo transição (A→G) não sinônima (Thr 26 Ala) na base de número 76 da construção. Contudo, como mostrado da figura 13, a região onde se encontra a mutação não é altamente conservada e não foi encontrado nos bancos de dados nenhum polimorfismo. Para confirmar que essa mutação não foi um artefato de técnica, foi realizado uma PCR utilizando-se a DNA polimerase “*proof reading*” (Taq DNA polimerase *Platinum - Invitrogen*) e em seguida, o produto da PCR foi sequenciado. Os resultados mostraram que a mutação estava presente no fragmento amplificado indicando a existência de uma possível variação no aminoácido 26 da construção. Dessa forma, os experimentos foram conduzidos com esta variante.

Para a sub-clonagem nos vetores de expressão pET28a e pET28aSUMO, o fragmento da construção A11aSH3 foi clivado do pGEM-*Teasy* com *NdeI* e *XhoI* ou *EcoRI* e *XhoI* respectivamente e a construção foi novamente sequenciada confirmando a mutação notada anteriormente.

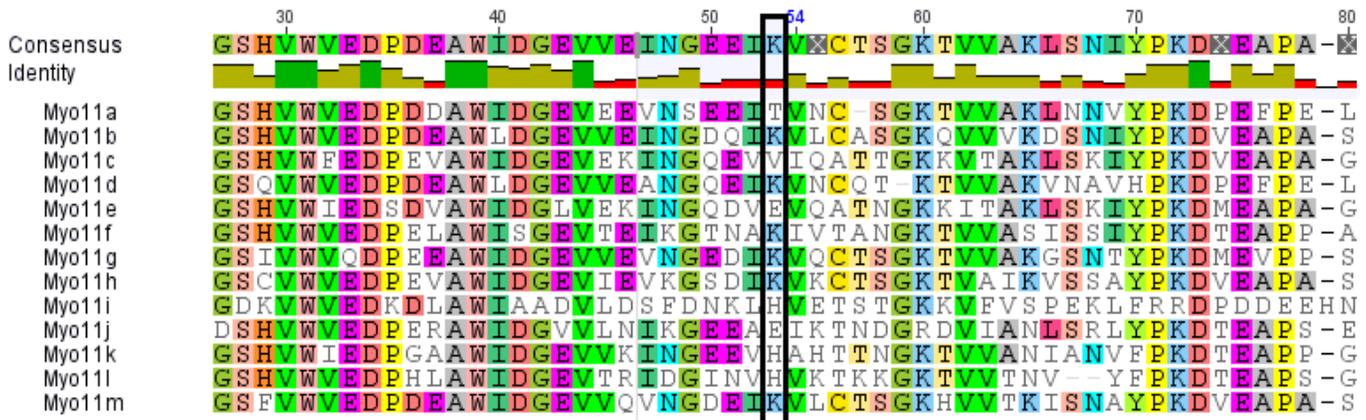


Figura 13: Alinhamento da região do domínio SH3 das miosinas classe XI. No destaque nota-se que há predominância de quase 50% de Lisina (K) na posição do aminoácido mutado. Não há padrão de conservação nessa região que permita concluir que seria pouco provável que a atual mutação causasse perdas na estrutura e função do domínio.

Os testes de expressão foram conduzidos em diversas cepas de *E. coli* e em diferentes meios de cultura descritos na tabela 7. Os resultados dos testes foram analisados por SDS-PAGE uma vez que a proteína recombinante fusionada com 6HisTag (pET28a) ou 6HisTag-SUMO (pET28aSUMO) possui massa molecular calculada de 7,32 e 19,38 kDa respectivamente, de acordo com a predição dos parâmetros da proteína no site *ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Tabela 7: Condições de testes de expressão realizados para obtenção de proteína solúvel. Nota-se que, para a construção A11aSH3, a melhor condição foi a expressão na cepa Origami II, em meio ZY 5052 quando fusionada a SUMO. Os resultados tidos como “não detectado” indicam que não foi possível ver de forma clara, uma banda no SDS-PAGE na altura esperada para a construção.

Vetor	Cepa de <i>E. coli</i>	Meio	Temp.	IPTG (mM)	Tempo de ind.	OD	Resultado
pET28a	BL21 (DE3) ΔSly D pRARE 2	LB	20 °C	0.2	18 hs	0.8 – 1.0	Não detectado
	BL21 (DE3) ΔSly D pRARE 2	LB	30 °C	0.2	4 hs	0.8 – 1.0	Não detectado
	BL21 (DE3) ΔSly D pRARE 2	LB	37 °C	0.2	4 hs	0.8 – 1.0	Não detectado
	Arctic express	LB	30 °C – 12° C	0.5	18 hs	0.8 – 1.0	Não detectado
pET28aSUMO	BL21 (DE3) ΔSly D pRARE 2	LB	20 °C	0.5	18 hs	0.6 – 0.8	Pouco solúvel
	BL21 (DE3) ΔSly D pRARE 2	LB	30 °C	0.5	4 hs	0.6 – 0.8	Pouco solúvel
	BL21 (DE3) ΔSly D pRARE 2	LB	37 °C	0.5	4 hs	0.4 – 0.6	Pouco solúvel
	Origami II	ZYL 5052	20 °C	-	72 hs	-	Solúvel
	Origami II	ZYM 5052	20 °C	-	72 hs	-	Solúvel
Origami II	ZYP 5052	20 °C	-	72 hs	-	Solúvel	

Análises da expressão da proteína 6xHis-11aSH3 em SDS-PAGE (figura 14) revelaram a ausência de bandas na altura esperada para a construção, dessa forma não foi possível caracterizar a expressão uma vez que não se pode concluir se a proteína realmente não foi expressa, ou se ela, por ter baixo peso molecular, difundiu do gel. Para tentar contornar esse problema, foi feito um novo gel e este foi fixado com uma solução de glutaraldeído 5% em água, e em paralelo, a amostra também foi analisada em gel de tricina (SHÄGGER, 2006) visando melhorar a resolução da análise de proteínas pequenas. Em ambos os casos não foi possível visualizar a expressão dessa construção em pET28a.

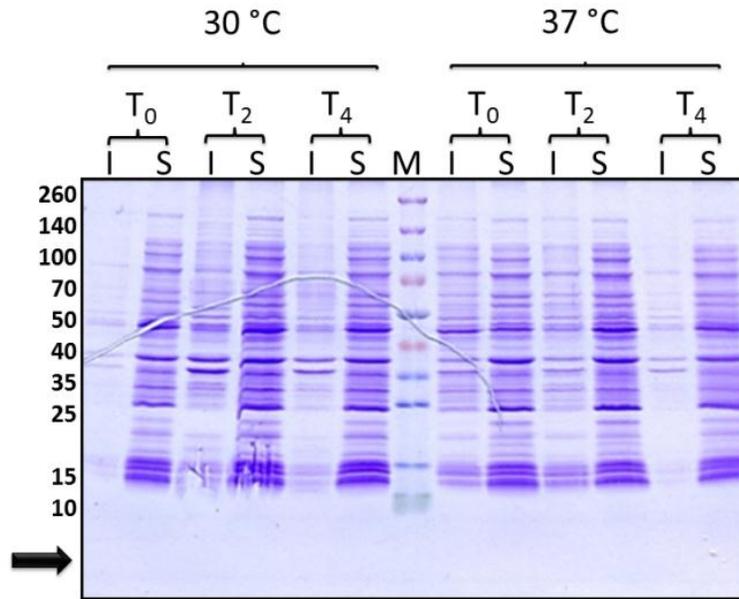


Figura 14: SDS-PAGE (8-18%) de tris glicina dos testes de expressão da proteína 6xHis-A11aSH3. Expressão com a cepa de *E. coli* BL21 (DE3) Δ SlyD pRARE II a 30 e 37 °C e 0,5 mM IPTG, do domínio SH3 clonado em pET28a. Abaixo da banda do marcador de 10 kDa não é possível visualizar nenhuma banda. A seta indica a região aproximada onde deveria aparecer a banda da proteína expressa. Entretanto, esse gel não foi fixado com glutaraldeído 5%. **M:** marcador de peso molecular; **I:** fração insolúvel; **S:** fração solúvel; **T:** Tempo de indução em horas.

Testes de expressão da construção 6xHisSUMO-11aSH3 foram feitos na cepa Origami II nos meios de auto-indução ZYL5052, ZYM5052 e ZYP5052 em grande escala (2 litros) para melhorar a visualização da expressão da proteína em SDS-PAGE. Em seguida, foram realizados passos de purificação (afinidade por níquel e exclusão molecular) a fim de isolar a proteína recombinante. Apesar da massa esperada da construção 6xHisSUMO-11aSH3 ser de 19,38 kDa, o gel de poliacrilamida da purificação (figura 15) mostrou uma banda majoritária referente a uma proteína com o peso molecular de aproximadamente 35 kDa. Todavia a identidade da proteína foi confirmada através de análises de espectrometria de massas e, paralelamente, por uma análise por imunodeteção em membrana. Uma vez que a proteína SUMO migra de forma anômala no SDS-PAGE, tal comportamento deve influenciar a migração da proteína fusionada a ela.

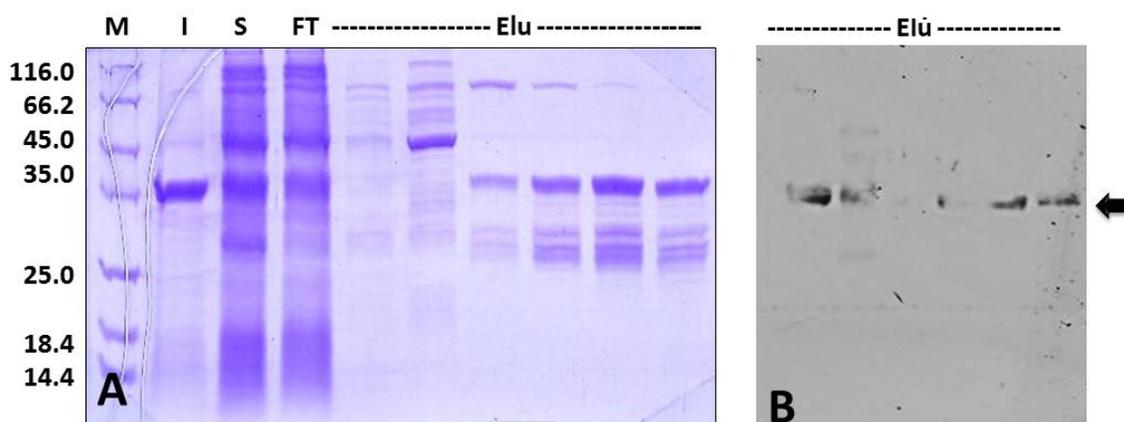


Figura 15: SDS-PAGE e Western blot das frações da purificação de afinidade da proteína A11aSH3. Em A: SDS-PAGE 13%, é possível notar que não há bandas referente ao peso esperado (cerca de 20 kDa) da proteína 6xHisSUMO-A11aSH3. Todavia, há uma banda com um peso de aproximadamente 35 kDa. Em B: Revelação de imunodeteção em membrana com anticorpo anti-His das mesmas frações presentes em A. **M:** Marcador de peso molecular; **I:** Fração insolúvel; **S:** Fração solúvel; **FT:** *Flow-through*; **Elu:** frações do gradiente de eluição.

Em seguida foi realizado o teste de clivagem com SUMOprotease. Analisando o SDS-PAGE (figura 16) da amostra purificada por afinidade, antes e depois da clivagem, nota-se a presença de duas bandas (15 e 20 kDa) sendo a de maior tamanho mais abundante. Ambas as bandas foram recortadas e submetidas a análise por espectrometria de massas para identificar quais proteínas representam essas bandas. Tal análise mostrou que a banda de massa molecular maior é a proteína SUMO (SMT3 de levedura) como esperado, com score alto (459).

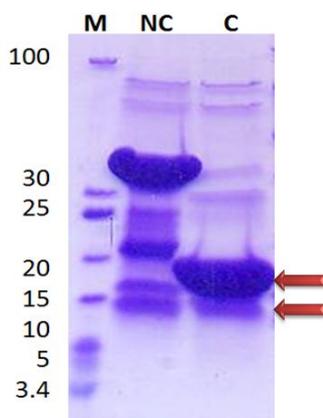


Figura 16: SDS-PAGE 13% mostrando a clivagem com sumoprotease da construção A11aSH3. Nota-se a presença de duas bandas entre 15 e 20 kDa (indicadas pelas setas) como produtos dessa clivagem e nenhuma banda na altura de 5 kDa onde seria esperada uma banda referente ao SH3 clivado. **M:** marcador de peso molecular; **NC:** amostra não clivada; **C:** amostra clivada.

A proteína SUMO também foi encontrada na análise feita para a banda de menor peso molecular indicando possível degradação (score 428). Mesmo com menor intensidade (score 102), foi encontrado um peptídeo referente ao final da proteína 6xHisSUMO-A11aSH3 também na banda de tamanho molecular menor, indicando que os métodos de expressão e purificação foram eficientes para o isolamento da proteína (figura 17).

Suspeitas de interação entre a proteína A11aSH3 e a SUMO após a clivagem, foram levantadas ao analisarmos o comportamento das mesmas durante a purificação de afinidade com a resina Ni-NTA ocorrendo simultaneamente com a clivagem com SUMOprotease. Durante a passagem da amostra, é possível ver no gel da figura 18 que a proteína 6xHisSUMO-A11aSH3 não passou direto pela coluna como era esperado, uma vez que, clivada, a proteína perde a cauda de histidina que interage com a coluna. Entretanto, na eluição com imidazol 500 mM tanto a proteína A11aSH3 como a SUMO eluem juntas.

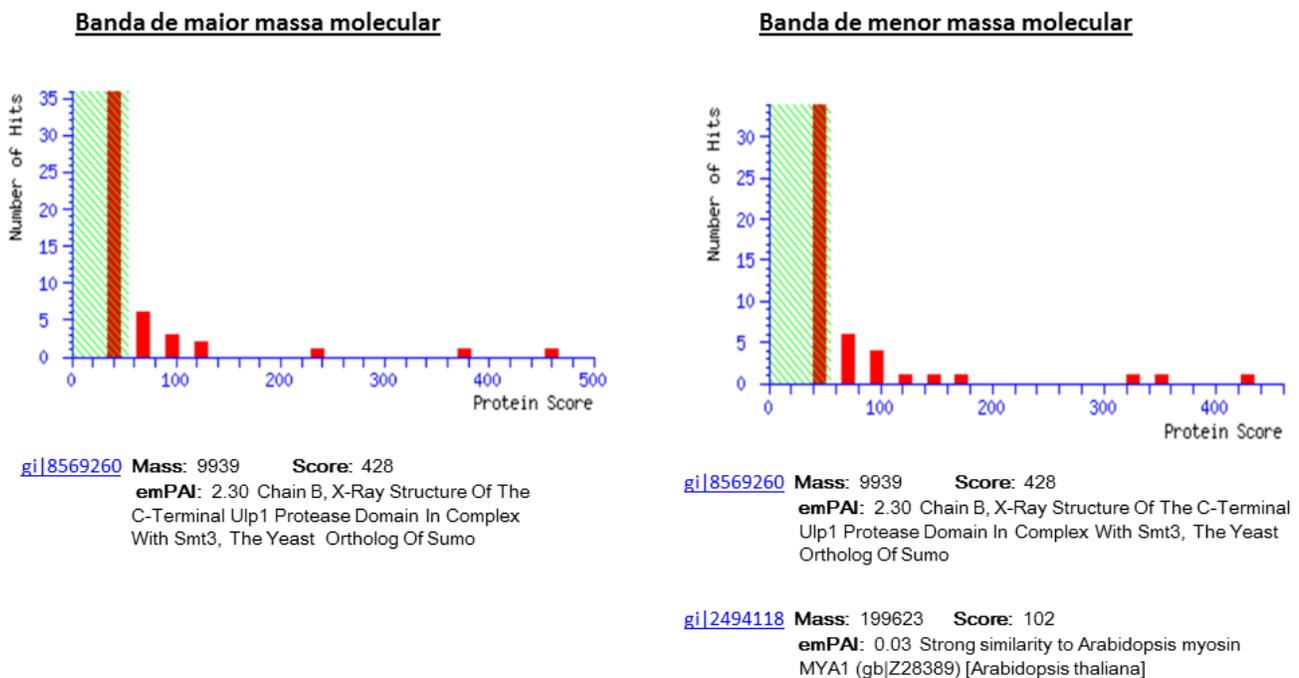


Figura 17: Dados das análises por espectrometria de massas das bandas do gel da purificação da construção 6xHisSUMO-SH3. Os dados mostram o gráfico com número de proteínas encontradas em relação ao seu score, e os peptídeos que identificaram cada proteína (A11aSH3 e SUMO).

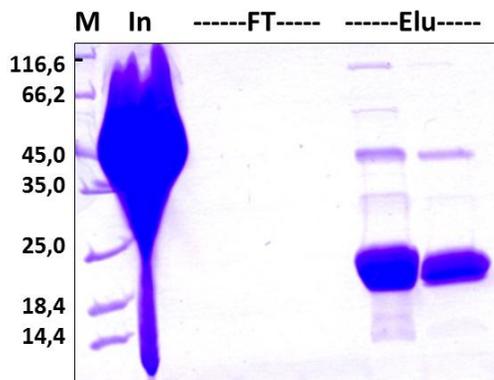


Figura 18: SDS-PAGE da clivagem da proteína HtSUMO-A11aSH3 com SUMOprotease na resina de níquel. Nota-se que na injeção (**In**) há uma banda de aproximadamente 35 kDa. Após a clivagem esperava-se que a proteína clivada saísse no *Flow-through* (**FT**), porém, a mesma saiu na eluição (**Elu**) com imidazol junto com a proteína SUMO, sendo clara a presença de duas bandas sobrepostas na altura de aproximadamente 20 kDa.

Devido à proximidade do peso molecular da proteína SUMO com a proteína A11aSH3, a separação das mesmas por filtração em gel torna-se inviável. Dessa forma foram feitos testes de cristalização da construção sem clivagem. Nos ensaios iniciais foram visualizados um total de 51,48% de gota clara, 36,39% de precipitados e 12,13% de separação de fase (Figura 19). A alta incidência de gotas claras indica que a concentração da proteína pode estar baixa para a formação de cristais.

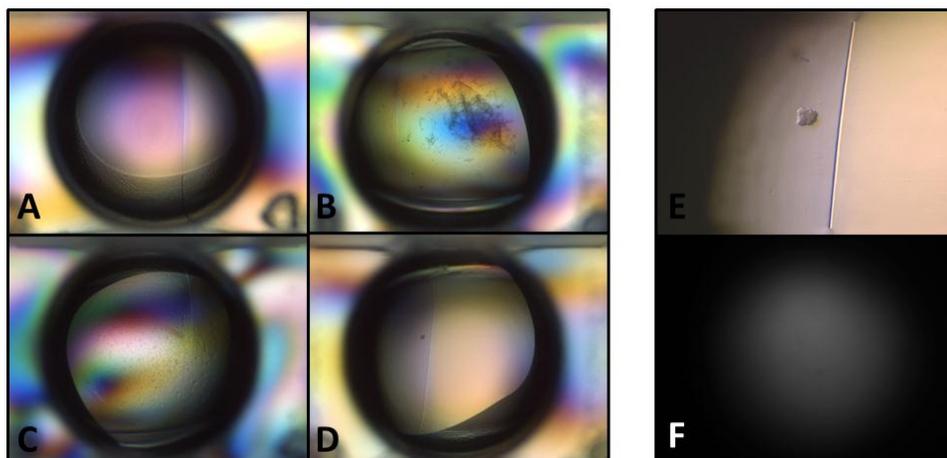


Figura 19: Fotos do poços da placa de cristalização da proteína 6xHisSUMO-SH3. Em **A**: Gota clara; **B**: precipitado, **C**: separação de fase; **D**: suposto cristal malformado. Em **E**: zoom do suposto cristal malformado utilizando o robô Rock Maker, permitindo uma melhor visualização da estrutura sendo, então definida, como precipitado. Em **F**: a mesma região de **E**, tirada utilizando luz UV, comprovando que a formação em questão trata-se de um precipitado e não de um cristal.

Devido à ausência de cristais nos testes de cristalização iniciais, e na dificuldade de obter uma concentração maior de proteína, não foram realizados mais testes de cristalização para esta construção.

5.3.2 Construção 6xHisSUMO-A11aDilute

Para os testes de expressão da proteína 6xHisSUMO-A11aDilute, foram usadas condições descritas na tabela 8. Os resultados dos testes foram analisados a partir de SDS-PAGE tendo como referência o peso molecular estimado da proteína recombinante (32,49 kDa).

Os resultados das cromatografias de afinidade por níquel da proteína recombinante expressa na cepa Origami II e BL21(DE3) Δ SlyD pRARE II foram semelhantes (figura 20). Parte da proteína se encontra na fração insolúvel, entretanto nas frações da eluição, é possível encontrar a proteína recombinante com razoável grau de pureza. Análise por DLS indicou que independentemente da cepa de *E. coli* e da presença/ausência de TCEP, todas as amostras analisadas o raio hidrodinâmico e a polidispersividade estavam muito altos sugerindo a presença de agregados (tabela 9)

Tabela 8: Condições de testes de expressão realizados para obtenção de proteína 6xHisSUMO-A11aDilute solúvel. Os resultados mostram que, para a construção A11aDilute em pET28aSUMO, tanto a expressão em Origami II em meio ZY 5052 (L, M ou P), como em BL21 (DE3) Δ SlyD pRARE II em meio LB foram ideais para a obtenção da proteína solúvel. Dessa forma, testes de espalhamento dinâmico de luz foram feitos para determinar a condição onde a proteína se encontrava monodispersa e de forma monomérica.

Vetor	Cepa de <i>E. coli</i>	Meio	Temperatura	[] IPTG	Tempo de ind.	OD	Resultado
pET28a	BL21 (DE3) Δ Sly D pRARE 2	LB	20 °C	0.2	18 hs	0.8 – 1.0	Pouco solúvel
	BL21 (DE3) Δ Sly D pRARE 2	LB	30 °C	0.2	4 hs	0.8 – 1.0	Pouco solúvel
	BL21 (DE3) Δ Sly D pRARE 2	LB	37 °C	0.2	4 hs	0.8 – 1.0	Pouco solúvel
	BL21 (DE3) Δ Sly D pRARE 2	LB	37 °C	0.2	6 hs	0.8 – 1.0	Pouco solúvel
	BL21 (DE3) Δ Sly D pRARE 2	LB	20 °C	0.5	18 hs	0.4 – 6.0	Insolúvel
	BL21 (DE3) Δ Sly D pRARE 2	LB	20 °C	1.0	18 hs	0.4 – 6.0	Insolúvel
	BL21 (DE3) Δ Sly D pRARE 2	LB	37 °C	0.2	4 hs	1.2	Pouco solúvel
	BL21 (DE3) Δ Sly D pRARE 2	LB	37 °C	0.5	4 hs	1.2	Insolúvel
	Arctic express	LB	30 °C – 12° C	0.5	18 hs	0.8 – 1.0	Não expressa
	pET28a SUMO	BL21 (DE3) Δ Sly D pRARE 2	LB	20 °C	0.5	18 hs	0.6 – 0.8
BL21 (DE3) Δ Sly D pRARE 2		LB	30 °C	0.5	4 hs	0.6 – 0.8	Não expressa
SHuffle		LB	30 °C	0.4	4 hs	0.4 – 0.6	Pouco solúvel
BL21 (DE3) Δ Sly D pRARE 2		LB	37 °C	0.5	4 hs	1.2	Insolúvel
BL21 (DE3) Δ Sly D pRARE 2		LB	37 °C	0.5	4 hs	0,4_0,6	Solúvel
Origami II		ZY5052	20°C	--	72 hs	--	Solúvel

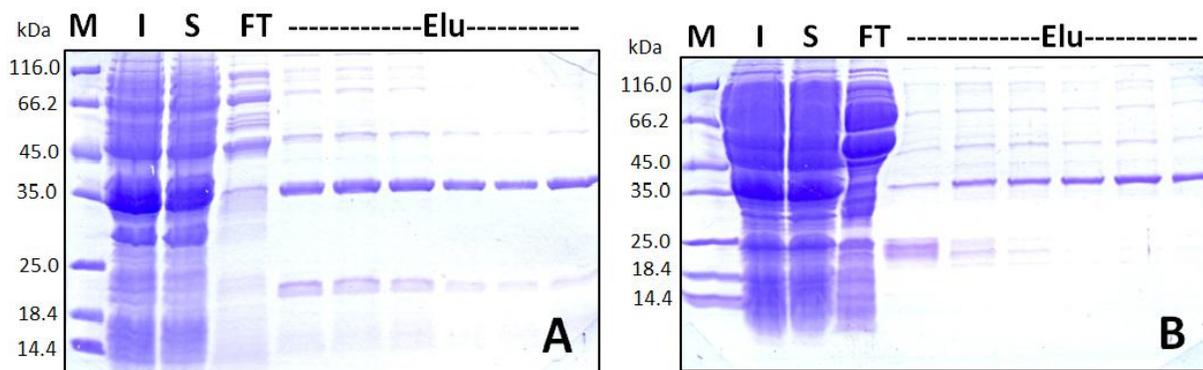


Figura 20: SDS-PAGE 13% da lise e cromatografia de afinidade da construção 6xHisSUMO-11aDilute em duas diferentes cepas. Em **A**: Origami II em meio ZY5052, e em **B**: BL21(DE3) Δ SlyD pRARE II em meio LB. A análise mostra que em Origami II há mais proteína que em BL21(DE3) Δ SlyD pRARE II, porém, a pureza da proteína está maior nesta que na anterior. Em ambos os casos há quantidade significativa de proteína na fração insolúvel. **M**: Marcador de peso molecular; **I**: fração insolúvel; **S**: fração solúvel; **FT**: *flow through*; **Elu**: frações da eluição.

Tabela 9: Dados obtidos na análise por DLS para a construção 6xHisSUMO-11aDilute. Foi visto que em ambas as cepas a proteína está polidispersa e agregando mesmo na presença de TCEP. **Polid**: Polidispersividade.

Cepa	Intensidade	Raio (nm)	% Polid	MW-R (kDa)
Origami II	315276	54.3	26.3	38603
Origami II + TCEP	279035	56.4	29.0	42125
BL21(DE3)	172299	31.8	57.1	11047
BL21(DE3) + TCEP	148485	32.1	57.1	11234

Esses dados corroboram com WEI em 2011 e WU em 2011 e seus colaboradores que, ao analisarem fragmentos da cauda globular da miosina X e VII, respectivamente, verificaram que esses fragmentos são instáveis quando isolados e que os experimentos devem ser conduzidos com a cauda completa que garante maior estabilidade para a construção. Com base nisso, os experimentos com a construção 6xHisSUMO-A11aDilute foram encerrados uma vez que uma amostra agregada diminui as chances de sucesso dos testes de cristalização.

5.3.3 Construções 6xHis-A11gGT-f e 6xHis-A11gGT-cc

a) Construção A11gGT-f (Ser1100-Ile1490)

A clonagem da construção A11gGT-f foi diferenciada devido às características do oligonucleotídeo de iniciação dessa construção. Embora fosse de 50°C a temperatura de anelamento predita para a formação de grampos (*Hairpin*) para os oligonucleotídeos da construção 11gGT-f, os

ciclos para a amplificação partiram de temperaturas de anelamento baixas até uma temperatura mais específica (47°C, 55°C e 60°C) pois houve dificuldade para a amplificação da construção utilizando o protocolo estabelecido para as demais construções. Para evitar a formação de dimerização dos oligonucleotídeos, foi adicionado DMSO 2% na reação. Após a amplificação, a construção foi clonada em pET28a e pET28aSUMO, porém, os testes de expressão foram conduzidos apenas em pET28a devido às desvantagens do pET28aSUMO analisadas nos experimentos realizados com outras construções.

Os testes de expressão foram conduzidos inicialmente na cepa Origami II devido a presença de 2,2% de cisteínas na construção, valor esse considerado alto podendo dificultar o dobramento correto da proteína devido a formação não-específica de pontes dissulfeto. A cepa Origami II, apresenta mutações nos genes *trxR* e *gor*, que são responsáveis pelo aumento da formação de pontes dissulfeto no citoplasma, dessa forma, evitando a formação incorreta de pontes dissulfeto e a formação de agregados. A figura 21 mostra o teste de expressão a 20, 30, 37°C e um teste onde a temperatura de crescimento foi 30°C e a temperatura de indução foi 25°C. A lise foi realizada com B-PER e sonicação. A proteína apresentou-se na fração insolúvel, contudo, como o teste 30-25°C rendeu uma quantidade maior de proteína, ele foi repetido em larga escala utilizando método de pressão para a lise. Nesse caso foi visto que a proteína estava na fração solúvel indicando que o método de lise influencia na solubilidade da proteína.

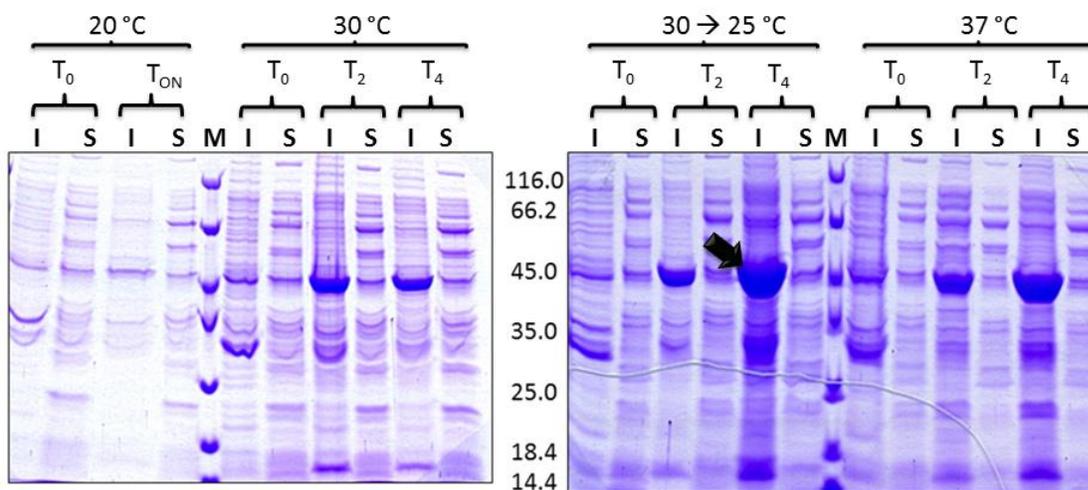


Figura 21: SDS-PAGE do teste de expressão da construção 6xHis-11gGT-f. Os testes mostraram a proteína na fração insolúvel, porém, em grande quantidade no teste realizado a 30-25°C. A seta destaca a banda da melhor condição de expressão com ~ 45 kDa, o esperado para a construção seria 46 kDa. Onde **I**: fração insolúvel; **S**: fração solúvel; **M**: Marcador de peso molecular; **T**: tempo de indução em horas.

Foram realizadas diversas técnicas de lise (descritas na tabela 10) e de purificação a fim de estabelecer um protocolo onde a proteína estivesse solúvel, pura e monodispersa. A figura 22 mostra o SDS-PAGE das frações da purificação de afinidade onde foi visto que parte das proteínas passaram diretamente pela coluna (fração chamada de *Flow-through*). Durante o gradiente de eluição, a proteína foi observada em três picos distintos. Tendo em vista que a proteína não interage devidamente com a resina de afinidade, foi realizada uma identificação por espectrometria de massa que revelou que a proteína em questão era o Fator de alongação de *E. coli*, cuja estrutura cristalográfica já foi obtida por SONG e colaboradores em 1999. Os dados fisicoquímicos da construção A11gGT-f e do fator de alongação de *E. coli* estão descritos na tabela 11, onde é possível ver que ambas apresentam peso molecular parecido o que fez com que fossem confundidas em gel de poliacrilamida. O pI teórico também é próximo, o que permitiu a purificação do fator de alongação por troca iônica.

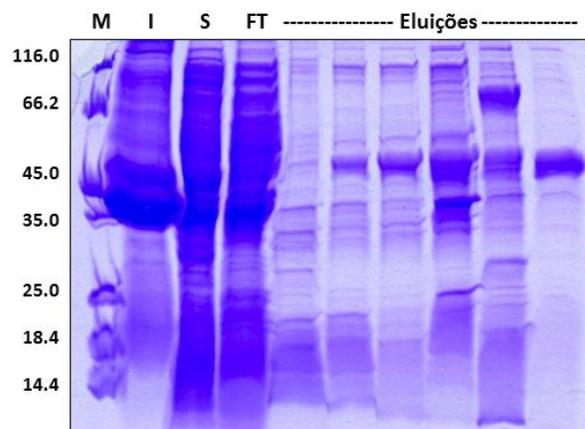


Figura 22: SDS-PAGE das frações da purificação de afinidade da proteína 6xHis11gGT-f. Em A: SDS-PAGE das frações da purificação por afinidade, onde é possível ver uma banda acima de 45 kDa na fração insolúvel indicando que a proteína não foi expressa completamente solúvel e que parte da proteína passa diretamente pela coluna sem se aderir como mostrado na fração FT. **M:** marcador de peso molecular; **I:** fração insolúvel; **S:** fração solúvel; **FT:** *flow-throug*.

Para confirmar a expressão do fator de alongação de *E. coli* no lugar da 11gGT-f, foi realizada a expressão do vetor pET28a vazio, nas mesmas condições de expressão e lise determinadas para a construção 6xHis-11gGT-f. Os resultados (figura 23) mostraram que na expressão do vetor vazio é encontrada apenas uma banda de aproximadamente 45 kDa na fração solúvel. Contudo, na expressão da construção 6xHis-A11gGT-f, há a mesma banda na fração solúvel, porém, além de uma banda, também na altura de 45 kDa na fração insolúvel, confirmando que a construção em questão é

expressa na fração insolúvel. Devido a presença de outra proteína de tamanho semelhante na fração solúvel, os experimentos com essa construção foram encerrados.

Tabela 10: Relação das condições de lise e purificação testadas para 6xHis-11gGT-f. Os testes mostraram que a maioria das condições não proporcionaram o resultado esperado com relação à pureza e homogeneidade da amostra. Entretanto duas condições, marcadas em negrito, resultaram em uma amostra com as características necessárias para a continuidade dos experimentos.

Cepa de <i>E. coli</i>	Lise	Purificação	Tampão	Agente redutor	Observações	
BL21 (DE3) Δ SlyD Prare II	<i>French press</i>	Afinidade	25 mM Fosfato de Sódio pH 7,4; 300 mM NaCl; 5% Glicerol	-	Grande parte da proteína no <i>flow-through</i> .	
			50 mM Fosfato de Sódio pH 7,0; 300 mM NaCl; 5% Glicerol	-	Apenas parte da proteína no <i>flow-through</i>.	
	Química	Afinidade	50 mM Fosfato de Sódio pH 7,0; 300 mM NaCl; 10% Glicerol	2 mM β -mercaptoetanol	.	Parte da proteína no <i>flow-through</i> e amostra em pico único com baixa concentração de B.
			50 mM HEPES pH 7,5; 300 mM NaCl; 10% Glicerol			
			25 mM Fosfato de Sódio pH 7,4; 300 mM NaCl; 5% Glicerol			
		Troca-iônica	50 mM HEPES pH 7,5; 10% Glicerol	2 mM β -mercaptoetanol	.	Presença de muitos contaminantes.
	50 mM Fosfato de Sódio pH 7,0; 10% Glicerol				Parte da proteína no <i>flow-through</i> e baixo grau de contaminação	
	Origami II	<i>French press</i>	Afinidade	25 mM HEPES pH 7,5; 300 mM NaCl; 5% Glicerol	-	Pouca proteína e polidispersa.
50 mM Fosfato de sódio pH 7,0; 300 mM NaCl; 5% Glicerol				-	Pouca proteína saindo ao longo da purificação.	
50 mM Fosfato de sódio pH 7,0; 300 mM NaCl; 5% Glicerol				2 mM β -mercaptoetanol	.	Eluição da proteína em três picos diferentes.
Química		Afinidade	50 mM Fosfato de Sódio pH 7,0; 300 mM NaCl; 5% Glicerol	.	Grande parte da proteína no <i>flow-through</i> .	

Tabela 11: Dados fisicoquímicos das proteínas 6His-11gGT-f e Fator de alongação de *E. coli*. A tabela mostra que ambas as proteínas apresentam características muito semelhantes o que permitiu a confusão durante os métodos de análises.

Proteína	Nº aminoácidos	Peso molecular	pI Teórico
6His-11gGT-f	414	46225.5 Da	5.87
Fator de alongação	393	43182.3 Da	5.30

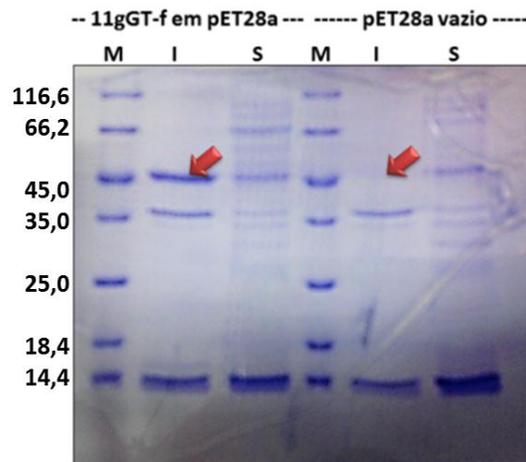


Figura 23: Análise da expressão do vetor pET28a vazio. SDS-PAGE 13% mostrando que na expressão da construção 6xHis-11gGT-f há uma banda de aproximadamente 45 kDa na fração insolúvel (no destaque), que não aparece na expressão do vetor pET28a vazio. Por outro lado, tanto na expressão do vetor vazio, quanto na expressão da construção, há uma banda também na altura de 45 kDa na fração solúvel referente ao fator de alongação de *E. coli*. **M:** marcador de peso molecular; **I:** fração insolúvel; **S:** fração solúvel.

b) Construção A11gGT-cc (Ile1011-Ile1490)

Também foi produzida uma construção para a miosina XIg que apresenta uma porção do *coiled-coil*, visando que a presença da região de dimerização na construção que permita uma maior estabilidade a proteína. A nova construção recebeu o nome de A11gGT-cc.

Essa construção compreende não apenas a região da cauda como também uma parte do *coiled-coil*, uma vez que experimentos realizados pelo nosso grupo com a miosina humana Va, mostraram que a presença do *coiled-coil* permite a dimerização da proteína deixando-a mais estável. A construção foi amplificada (figura 24) utilizando apenas como temperatura de anelamento a média da temperatura de melting geral dos oligonucleotídeos subtraindo 4°C. Foram realizados 35 ciclos na presença da enzima *Taq DNA polimerase HiFi*.

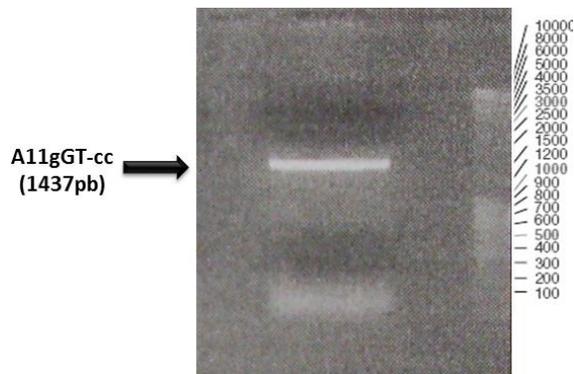


Figura 24: Fragmento amplificado da construção 6xHis-11gGT-cc. A seta indica a banda amplificada utilizando apenas a maior temperatura de anelamento do oligonucleotídeo de iniciação.

Os testes de expressão foram conduzidos a 30 e 37 °C. A expressão do gene alvo foi induzida com IPTG 0,1 mM nas seguintes cepas de *E. coli*: BL21 (DE3) Δ SlyD pRARE II, C41, C43, e *Rosetta-gami II* pLysS. Em todos os testes, é notável uma banda com a massa estimada da construção 6xHis-11gGT-cc (57 kDa) na fração insolúvel (figura 25).

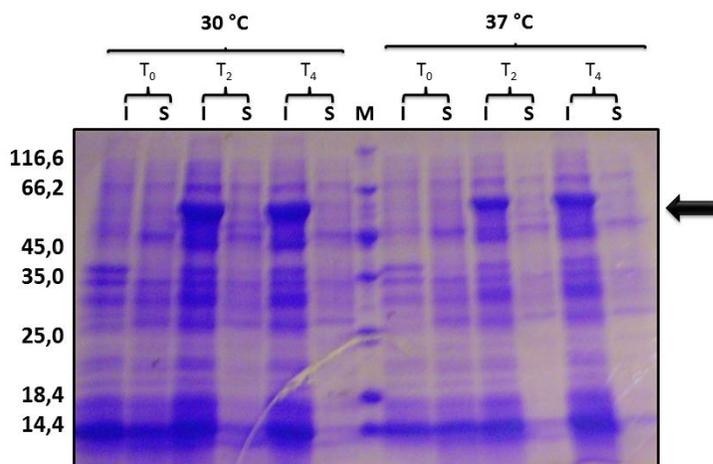


Figura 25: SDS-PAGE do teste de expressão da proteína 6xHisTag-11gGT-cc em BL21 (DE3) Δ SlyD Prare II. A seta indica a altura esperada para a construção onde são encontradas bandas apenas na fração insolúvel (I). Não é possível ver bandas significativas, referente a construção na fração solúvel (S). **M**: marcador de massa molecular; **T**: Tempo de indução em horas.

Os testes de *refolding* foram feitos a fim de solubilizar a proteína. O procedimento de chaperona artificial não foi eficiente uma vez que a proteína não se ligou a resina (figura 26) mesmo quando o volume de resina foi duplicado.

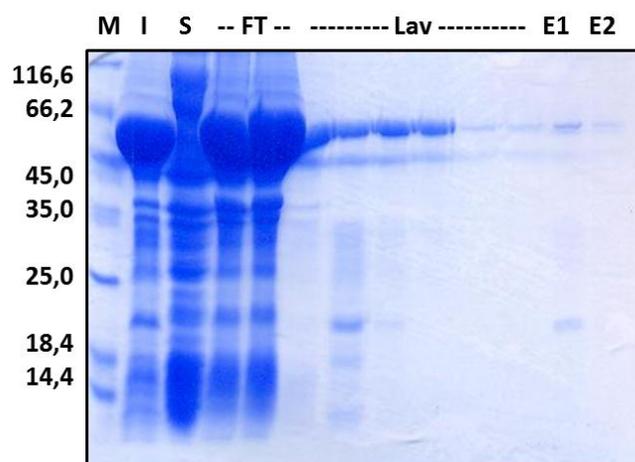


Figura 26: SDS-PAGE do *refolding* por chaperona artificial. Nota-se uma banda com o peso estimado para a proteína 6xHis-11gGT-cc (~56kDa) no insolúvel e no *flow-through*. A proteína saiu nas diferentes etapas de lavagem e na eluição, porém em quantidades menos significativas. **M:** Marcador de peso molecular, **I:** fração insolúvel, **S:** fração solúvel, **Lav:** lavagens, **E1:** fração 1 da eluição, **E2:** fração 2 da eluição.

No teste de *refolding* por diálise houve precipitação de grande parte da amostra nas trocas finais do tampão (figura 27a). Entretanto, após a concentração da proteína dialisada, foram obtidos 3,64 μ M de proteína solubilizada confirmada por *western blot* (figura 27b) para estudos biofísicos da mesma.

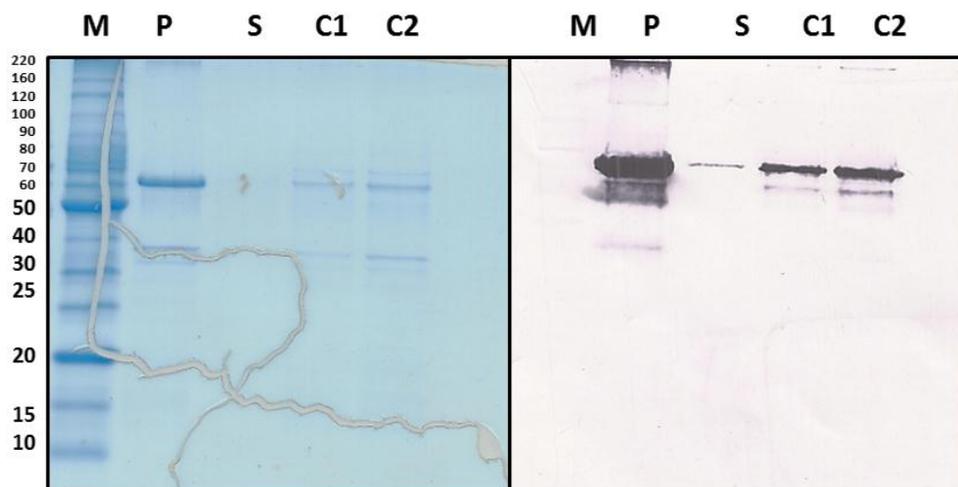


Figura 27: SDS-PAGE e *western-blot* da proteína 6xHis-11gGT-cc solubilizada. Nota-se uma banda majoritária com o peso estimado para a proteína 6xHis-11gGT-cc (~56kDa) na fração referente ao precipitado. A mesma banda é vista nas demais frações, indicando que mesmo após a precipitação, havia proteína para concentração e estudos biofísicos. **M:** marcador de peso molecular, **P:** *Pellet* da amostra dialisada, **S:** sobrenadante da amostra dialisada, **C1:** Amostra concentrada a 1,84 μ M, **C2:** Proteína concertada a 3,64 μ M.

O DLS da proteína 6xHis-11gGT-cc solubilizada e posteriormente concentrada indicou um raio de 70,2 nm e polidispersividade de 40,5%. Tais dados indicam altos níveis de agregação e heterogeneidade da amostra, inviabilizando os estudos estruturais. Para confirmar o reenovelamento da proteína, a amostra foi submetida a uma análise por dicroísmo circular. Os resultados de CD (figura 28a) mostraram que a proteína foi reenovelada e apresenta estrutura secundária de α -hélice, como previsto nas análises *in silico*. Além disso, os experimentos de desnaturação térmica (figura 28b) mostraram que a proteína não adotou um comportamento típico de desnaturação, confirmando os dados de DLS que a proteína está agregada.

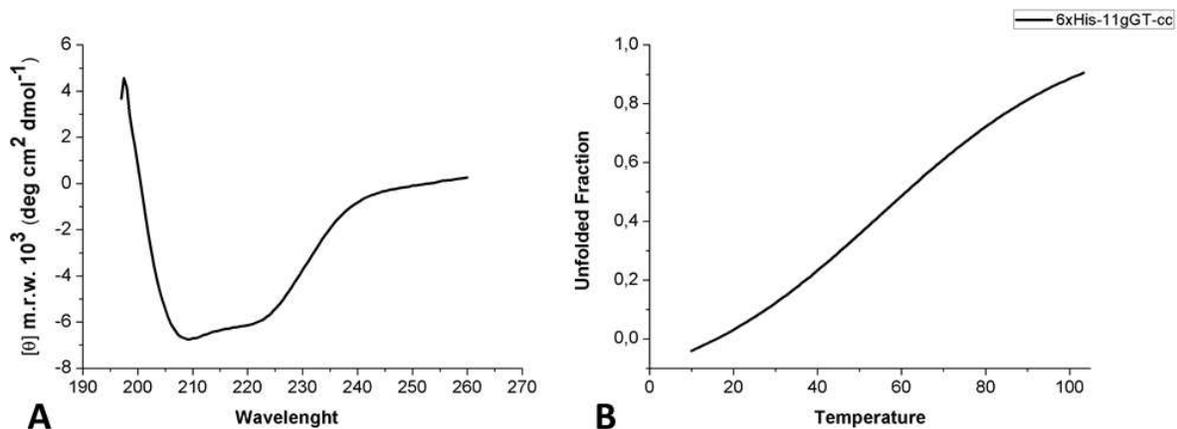


Figura 28: Espectro de estrutura secundária e gráfico da desnaturação da proteína 6xHis-11gGT-cc solubilizada. Em **A**: espectro de dicroísmo circular da proteína 6xHis-11gGT-cc após *refolding* por método de diálise. Nota-se que a proteína está estruturada em α -hélice comprovando a eficiência da técnica para esta construção. Em **B**: Gráfico da desnaturação térmica da proteína 6xHis-11gGT-cc mostrando que mesmo em altas temperaturas a proteína não se desnatura completamente, comprovando seu estado agregado.

5.3.4 Construções A11hGT-ccp A11hGT-ccd

No decorrer deste trabalho, PARAYSLOV et al. (2011) mostraram que a miosina XIg, inicialmente escolhida como alvo, apresentava baixíssima expressão e somente nas raízes. Então, foram também elaborados oligonucleotídeos para novas construções contendo *coiled-coil* para a miosina XIIh. A partir de dados obtidos por microarranjo a miosina XIIh foi apontada por PARAYSLOV e colaboradores em 2011, como a segunda miosina mais expressa por *Arabidopsis*

thaliana, seguindo a miosina XIi , que somente não foi selecionada para a nova fase de experimentos devido à presença de três *splicing* alternativos.

Foram elaboradas duas construções da miosina XIh, a primeira denominada A11hGT-ccp, apresenta na sua composição grande extensão do *coiled-coil*, por isso recebe o nome de “ccp” (*coiled-coil* proximal). A segunda construção A11hGT-ccd apresenta uma região menor de *coiled-coil*, e recebeu o nome de “ccd” (*coiled-coil* distal) (figura 8).

a) A11hGT-ccp

A construção foi amplificada por PCR utilizando temperaturas de anelamento crescentes em cada ciclo (figura 29). A subclonagem foi feita em pET28a para testes de expressão.

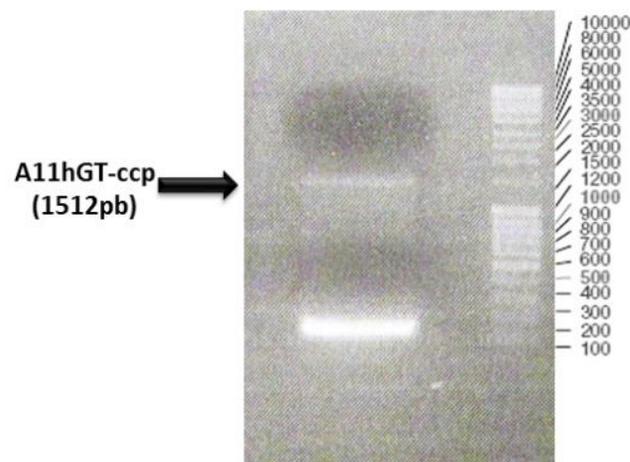


Figura 29: Fragmento amplificado da construção 6xHis-11hGT-ccp. A seta indica a banda amplificada com sucesso utilizando temperatura de anelamento crescente.

O teste de expressão foi realizado em grande escala (2 litro de cultura) seguido de uma purificação de afinidade. Análises do SDS-PAGE das frações da purificação indicaram uma banda na altura esperada para a construção (60 kDa) no *Flow-through*, lavagem e no primeiro pico de eluição, com 12,0 % de tampão B (figura 30). Para confirmar se houve expressão da proteína alvo, foi feito um western blot com algumas frações da purificação. O blot não revelou nenhuma banda de forma específica (figura 31), indicando que possivelmente não houve expressão da proteína, por motivos ainda não esclarecidos.

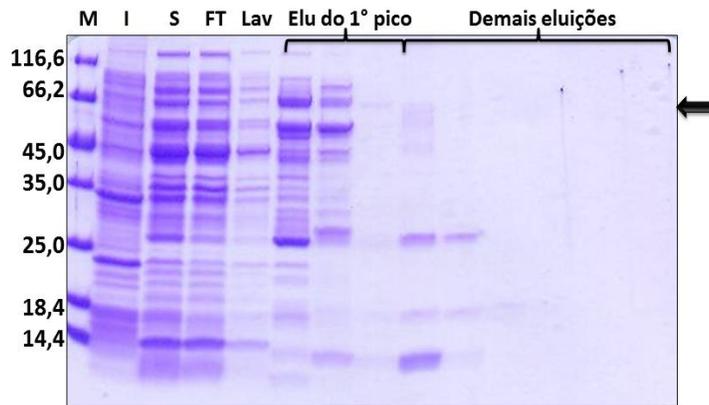


Figura 30: SDS-PAGE das frações da lise e da cromatografia afinidade da proteína 6xHis11hGT-ccp. São encontradas várias bandas próximas a região esperada para a construção, entretanto, elas não são encontradas em concentrações maiores de imidazol. Nas frações solúvel e insolúvel, também não fica nítida a presença de bandas com massa molecular estimada para a construção (indicado pela seta). **M:** marcador de massa molecular; **I:** fração insolúvel; **S:** fração solúvel; **FT:** *flow-through*; **Lav:** lavagem; **Elu:** eluição.

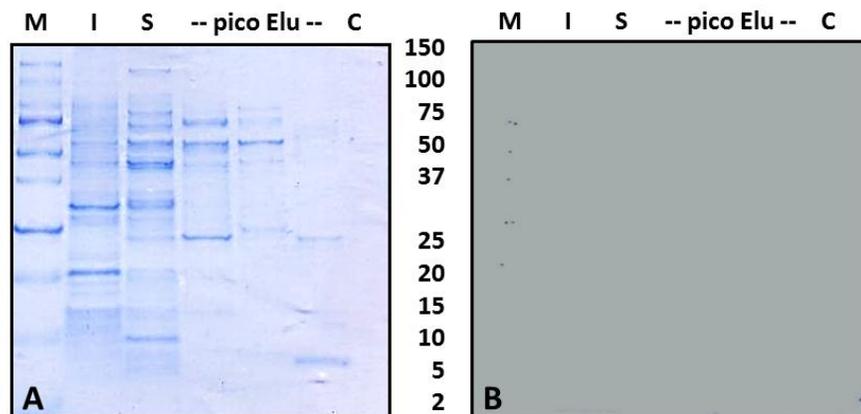


Figura 31: Western blot das frações da afinidade da proteína 6xHis11hGT-ccp. Em **A:** SDS-PAGE das frações que foram transferidas para a membrana de PVDF. Em **B:** Membrana após transferência e reação da fosfatase alcalina. Nenhuma banda acendeu na membrana e, embora o marcador tenha ficado fraco, foi marcado com lápis, após a transferência, a altura das bandas do marcadores na membrana, que aparecem na forma de pequenos pontos. **M:** marcador de massa molecular; **I:** fração insolúvel; **S:** fração solúvel; **Elu:** eluição; **C:** frações da eluição do primeiro pico concentradas.

b) A11hGT-ccd – duplo híbrido em levedura

O resultado completo dos testes do gene LacZ (teste do azul) e em meio SD-WLH está descrito nas tabelas 12 e 13, porém a partir desses dados é sugerida a interação da miosina de planta 11hGT-ccd com as proteínas :

➤ coiled-coil and C2 domain containing 1A [Homo sapiens]

Esse gene codifica um repressor transcricional que se liga a um elemento repressor com 14 pares de bases conservadas na região 5', e regula a expressão do receptor 1A de serotonina em células neurais. Atividades ligadoras de DNA e repressora transcricional da proteína são inibidas por cálcio. Mutação nesse gene resulta em retardo mental do tipo não sindrômica. A proteína CC2DA contém mais de 1620 aminoácidos (dependendo do éxon usado) e o domínio C2 é predito situando-se entre os resíduos 1042-1202 (NOOR *et al.*, 2008) . A busca no *Blast* contra o PDB encontrou uma proteína de *Arabidopsis thaliana* desconhecida com porcentagem de cobertura de sequência de apenas 10%.

➤ WDR6 WD repeat domain 6 [Homo sapiens]

Esse gene codifica um membro da família de proteínas com WD repetitivo que consiste de regiões conservadas de aproximadamente 40 aminoácidos que podem facilitar a formação de complexos heterotrimérico ou mutiproteico. A proteína codificada interage com quinase 11 serina/treonina, e é implicada na repressão do crescimento celular. O domínio WD é constantemente encontrado em diversas proteínas até mesmo em miosina da classe II (STEIMLE *et al.*, 2001). O *blast* contra o PDB da sequência polipeptídica do domínio WD encontrou diversas proteínas de *Arabidopsis thaliana*, entretanto, a Transducina foi encontrada com 93% de cobertura de sequência, seguida pela β -glicosidase com 81%, essa última encontrada em caule, siliques e raízes e está diretamente ligada à lignificação (ESCAMILLA-TREVIÑO *et al.*, 2006).

➤ NPNT nephronectin [Homo sapiens]

Nefronectina (NPNT) é uma proteína da matriz extracelular associada com a regeneração do epitélio tubular da necrose tubular nefrotóxica aguda (CHENG, 2008). Além disso, NPNT foi associada com melanoma maligno onde sua superexpressão constante em linhagens de células com de melanoma aumenta a adesão celular e diminui a migração das células (KUPHAL *et al.*, 2008). Outros estudos apontam NPNT responsável por um papel importante na via de sinalização da MAP quinase, na migração celular e ativação da diferenciação de integrinas (KAHAI *et al.* 2010). Além disso, em 2007 Linton e colaboradores associaram a NPNT um dos precursores da formação de brotos utéricos do ducto de Wolffian. Já em 2011, Patra e colaboradores identificaram que a NPNT está criticamente envolvida na diferenciação do canal atrioventricular durante o desenvolvimento do coração do peixe-

zebra (*Danio rerio*). Curiosamente, nenhum desses sistemas está relacionado com plantas, dessa forma, a sequência polipeptídica da nefronectina de humanos foi analisada por *blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) a fim de encontrar uma proteína com sequência similar em *Arabidopsis thaliana*. Não foram encontradas proteínas com identidade e similaridade de sequência significativa. O teste do azul foi feito em duplicata e do meio SD-WLH foi feito apenas uma vez, entretanto, em todas as análises o resultado foi positivo para a interação da 11hGT-ccd com a Nefronectina. O plasmídeo contendo a nefronectina juntamente com o vetor pBTM116 vaizio, não apresentou resultado positivo, descartando uma possível auto-ativação da nefronectina.

Tabela12: Resultado do teste do gene LacZ (teste do azul) feito em duplicata. O sinal (+) indica que houve interação entre a isca e a presa em questão. O resultado não foi igual para os dois experimentos, sendo assim, julgamos como verdadeira aquela interação que ocorreu nas duas repetições.

Nº	Presa	Isca	Teste 1	Teste 2
01	Protein Phosphatase 1, Regulatory (<i>Inhibitor</i>) Subunit 1A	pBTM116		
02	Protein Phosphatase 1, Regulatory (<i>Inhibitor</i>) Subunit 1A	HsMyoVa		
03	Protein Phosphatase 1, Regulatory (<i>Inhibitor</i>) Subunit 1A	AtMyoXIh	+	
04	Ferritin, Heavy Polypeptide 1	pBTM116		
05	Ferritin, Heavy Polypeptide 1	HsMyoVa		
06	Ferritin, Heavy Polypeptide 1	AtMyoXIh		
07	WD Repeat Domain 6	pBTM116		
08	WD Repeat Domain 6	HsMyoVa	+	+
09	WD Repeat Domain 6	AtMyoXIh	+	+
10	Coiled-Coil And C2 Domain Containing	pBTM116	+	
11	Coiled-Coil And C2 Domain Containing	HsMyoVa	+	
12	Coiled-Coil And C2 Domain Containing	AtMyoXIh	+	+
13	Nephronectin Isoform CRA_B	pBTM116		
14	Nephronectin Isoform CRA_B	HsMyoVa	+	
15	Nephronectin Isoform CRA_B	AtMyoXIh	+	+
16	U3 Small Nucleolar Ribonucleoprotein (<i>Homolog Yeast</i>)	pBTM116		
17	U3 Small Nucleolar Ribonucleoprotein (<i>Homolog Yeast</i>)	HsMyoVa		
18	U3 Small Nucleolar Ribonucleoprotein (<i>Homolog Yeast</i>)	AtMyoXIh		
19	Ribosomal Protein S7	pBTM116		
20	Ribosomal Protein S7	HsMyoVa		
21	Ribosomal Protein S7	AtMyoXIh		

Tabela13: Resultado do teste de crescimento em meio SD-WLH com concentração crescente de 3AT. O sinal (+) indica que houve interação entre a isca e a presa em questão. O aumento da concentração de 3AT deve diminuir a força de interação entre a isca e a presa, garantindo que o resultado mostre quais interações são realmente fortes.

Nº	Presa	Isca	5 mM	10 Mm	15 mM	25 mM	50 mM
01	Protein Phosphatase 1, Regulatory (<i>Inhibitor</i>) Subunit 1A	pBTM116					
02	Protein Phosphatase 1, Regulatory (<i>Inhibitor</i>) Subunit 1A	HsMyoVa					
03	Protein Phosphatase 1, Regulatory (<i>Inhibitor</i>) Subunit 1A	AtMyoXIh					
04	Ferritin, Heavy Polypeptide 1	pBTM116					
05	Ferritin, Heavy Polypeptide 1	HsMyoVa	+				
06	Ferritin, Heavy Polypeptide 1	AtMyoXIh					
07	WD Repeat Domain 6	pBTM116					
08	WD Repeat Domain 6	HsMyoVa	+	+	+	+	+
09	WD Repeat Domain 6	AtMyoXIh	+	+	+	+	
10	Coiled-Coil And C2 Domain Containing	pBTM116	+	+	+		
11	Coiled-Coil And C2 Domain Containing	HsMyoVa	+	+	+		
12	Coiled-Coil And C2 Domain Containing	AtMyoXIh	+	+	+	+	
13	Nephronectin Isoform CRA_B	pBTM116					
14	Nephronectin Isoform CRA_B	HsMyoVa	+	+	+	+	
15	Nephronectin Isoform CRA_B	AtMyoXIh	+				
16	U3 Small Nucleolar Ribonucleoprotein (<i>Homolog Yeast</i>)	pBTM116	+				
17	U3 Small Nucleolar Ribonucleoprotein (<i>Homolog Yeast</i>)	HsMyoVa					
18	U3 Small Nucleolar Ribonucleoprotein (<i>Homolog Yeast</i>)	AtMyoXIh					
19	Ribosomal Protein S7	pBTM116					
20	Ribosomal Protein S7	HsMyoVa	+	+	+	+	
21	Ribosomal Protein S7	AtMyoXIh					

6 - CONCLUSÃO

Apesar do domínio SH3 da miosina XIa fusionado a SUMO ter sido expresso na fração solúvel e em quantidades razoáveis (cerca de 5mg/mL), não foi possível a obtenção de cristais nas condições testadas. Além disso, o domínio SH3 pode estar interagindo com a proteína SUMO dificultando a purificação e clivagem da mesma. Além do mais, foi detectado por espectrometria de massas, pequenos fragmentos do domínio indicando possível degradação, tornando a construção inviável para estudos cristalográficos. Como alternativa, podem ser realizados estudos estruturais por ressonância magnética que permite a resolução da estrutura com a proteína em solução.

O domínio Dilute ocupa praticamente metade da cauda globular da miosina XIg conforme mostrado na modelagem da figura 32. Li e Nebenfür em 2007 modelaram a cauda globular da miosina XIk de *Arabidopsis thaliana* a partir da miosina de levedura Myo2p e identificaram, a partir de duplo-híbrido, uma interação entre as hélices 1 e 15 na miosina de planta que é necessária para a sua funcionalidade. Isso nos sugere que a cauda globular das miosinas permanece estável quando o domínio se encontra completo, e que partes isoladas desse domínio perdem a estabilidade e possivelmente a funcionalidade, justificando os altos níveis de agregação da construção A11aDilute. Também não se pode desconsiderar a fusão do domínio Dilute a SUMO, que pode estar exercendo uma influência sobre a estabilidade da construção.

Embora o resultado da identificação por espectrometria de massas tenha identificado a proteína recombinante como o fator de alongação de *E coli*, concluímos que o a proteína 6xHis-A11gGT-f, expressa na fração insolúvel possivelmente devido a alta porcentagem de cisteínas na construção. Outro motivo seria a forma monomérica da proteína que seria instável. Entretanto, estudos realizados com a proteína 6xHis-11hGT-ccp, que apresenta grande parte do *coiled-coil* para dimerização, não apresentaram sinais de expressão diante dos testes realizados. Por outro lado, houve melhoria no rendimento da expressão da proteína 6xHis-11gGT-cc que apresenta uma pequena parte do *coiled-coil* embora essa ainda se mantivesse na fração insolúvel. Dessa forma, foram testadas diferentes técnicas de *refolding* onde o método por diálise se mostrou eficiente para o reenovelamento da proteína desnaturada como comprovado por espectros tirados por dicroísmo circular. Assim, tornam-se necessários novos testes para otimizar essa técnica a fim de obter além da proteína reenovelada, proteínas monoméricas.

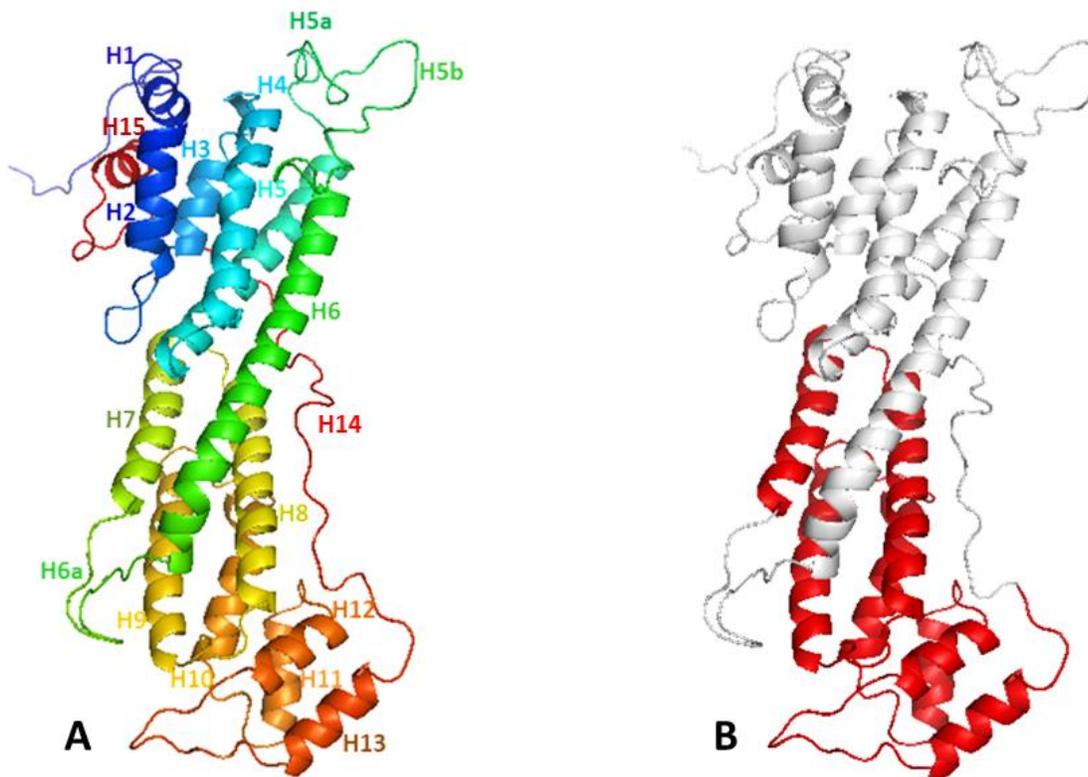


Figura 32: Modelagem do domínio A11gGT-f identificando as alfa-hélices e a região do domínio dilute. Em **A**: modelagem da cauda globular da miosina XIg identificando a alfa-hélices (indicadas pela letra H e seu respectivo número) presentes no domínio de acordo com a modelagem da miosina XIk de *Arabidopsis thaliana* elaborada por Li e colaboradores em 2007, usando como modelo a miosina Myo2p de *Streptomyces cerevisiae*. Nota-se a proximidade das hélices 1 e 15 que interagem entre si garantindo a funcionalidade do domínio. Em **B**: destaque em vermelho para o domínio dilute ocupando grande parte da cauda globular. Mesmo sendo um domínio relativamente grande dentro do domínio cauda, a sua expressão isolada do resto do domínio resulta em uma proteína instável com forte tendência a agregação.

Os resultados de interação por duplo-híbrido sugeriram que embora haja diferenças significativas quanto a estrutura primária das miosinas Va humana e XIh de *Arabidopsis thaliana*, ambas apresentam parceiros de interação intracelular em comum, revelando que independente da sequência, a estrutura se mantém semelhante mantendo algumas regiões de interação conservadas. Mesmo havendo esses parceiros de interação em comum entre as miosinas classes Va e XIh, não foi possível encontrar um parceiro equivalente de humano em *Arabidopsis*. As análises utilizando o recurso por *blast* não encontrou proteínas conhecidas equivalentes às presas que apresentaram interação com a XIh. Apenas foi visto que a sequência polipeptídica da proteína WD-Domain que apresentou interação com a XIh, tem sequência similar às proteínas transducina e β -glicosidase, que

são proteínas encontradas em *Arabidopsis thaliana* desempenhando funções vitais para a planta (ESCAMILLA-TREVIÑO *et al.* 2006).

Uma intrínseca ressalva do sistema de duplo híbrido é o potencial de detecção de interações falsas que não apresentam significância biológica. Isso se dá devido a uma artificialidade no sistema. Portanto, as interações devem ser vistas como hipóteses até que sejam validadas no sistema biológico adequado. (WALHOUT *et al.*, 2000). Tais validações podem ser feitas por meio de técnicas como fluorescência (PARK *et al.*, 2007) ou *pull down* (WALHOUT *et al.*, 2000). Dessa forma, ainda se fazem necessários os experimentos de validação das interações observadas entre as presas e a miosina XI a fim de confirmar as interações e eliminar os falsos positivos uma vez que não foram encontrados equivalentes da miosina Va na miosina XIh.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKKER, E. G., STAHL, E. A., TOOMAJIAN, C., NORDBORG, M., KREITMAN, M., BERGELSON, J. Distribution of genetic variation within and among local populations of *Arabidopsis thaliana* over its species range. *Molecular Ecology*, v.15, p. 1405-1418, 2006.
- BARTEL, P.L.; FIELDS, S. Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods in Enzymology*, v.254, p. 241-263, 1995.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. *Physiology 5ª medical*. Rio de Janeiro, Mosby, 2004. 1082p.
- BRÜCKNER, A.; POLGE, C.; LENTZE, N.; AUERBACH, D., SCLATTNER, U. Yeast Two-Hybrid, a Powerful Tool for Systems Biology. *Molecular Sciences*, v.10, p. 2763-2788, 2009.
- BUTT, R. T.; EDAVETTAL, S. C.; HALL, J. P.; MATTERN, M. R. SUMO Fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein expression and purification*, v. 43, p. 1-9, 2005.
- CHENG, C.W. Nephronectin expression in nephrotoxic acute tubular necrosis. *Nephrology Dial Transplant*, v. 23(1), p. 101-109, 2008.
- CHIEN, C.; BARTEL, P.L.; STERNGLANZ, R.; FIELDS, S. The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *PNAS Biochemistry*, v.88, p. 9578-9582, 1991.
- COLNAGO, L.A.; ALMEIDA, F.C.L.; VALENTE, A.N. Espectrometria de massas e RMN Multidimensional e multinuclear. *Atualidade em Química*, v.16, p. 9-14, 2002.
- DELANO, W. L., The PyMOL Molecular Graphics System. *DeLano Scientific*, 2002.
- ESCAMILLA-TREVIÑO, L.L.; CHEN, W.; CARD, M.L.; SHIH, M.C.; CHENG, C.L.; POULTON, J.E. *Arabidopsis thaliana* β -Glucosidases BGLU45 and BGLU46 hydrolyze monolignol glucoside. *Phytochemistry*, v. 67, p. 1651-1660, 2006.
- FENG, S., KASAHARA, C., RICKLES, R.J., SCHREIBER, S.L. Specific interactions outside the proline-rich core of two classes of Src homology 3 ligands. *PNAS*, v.92 (26), p. 12408-12415, 1995.
- FERGUSON, M.R., FAN, X., MUKHERJEE, M., LUO, J., KHAN, R., FERREON, J.C., HILSSER, V.J., SHOPE, R.E., FOX, R.O. Directed discovery of bivalent peptide ligands to an SH3 domain. *Protein Science*, v. 13, p. 626-632, 2004.
- GILMOUR, S. J., HAJELA, R. K., THOMASHOW, M. F. Cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, v.87, p.745-750, 1988.
- GOLDBURG, W.I. Dynamic Light Scattering. *American Journal of Physics*, v. 67, p. 1152-1164, 1994.
- GOLOMB, L., ABU-ABIÉD, M., BELAUSOV, E., SADOT, E. Different subcellular localization and functions of *Arabidopsis* myosin VIII. *BioMed Central Plant Biology*, v.8, p.1-13, 2008.
- HAACKKE, A.; FENDRICH, G; RAMAGE, P; GEISER, M. Chaperone over-expression in E coli: Apparent increased yields of soluble recombinant protein kinases are due mainly to soluble aggregates. *Protein Expression and Purification*, v.64, p.185-193, 2009.

- HACHIKUBO, Y., ITO, K., SCHIEFELBEIN, J., MANSTEIN, D.J., YAMAMOTO, K. Enzymatic activity and motility of recombinant *Arabidopsis* myosin XI, MYA1. *Plant Cell Physiology*, v.48, p.886-891, 2007.
- HAMMARSTRÖM, M.; HELLGREN, N.; BERG, S. V. D.; BERGLUND, H.; HÅRD, T. 2001 Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *E coli*. *Protein Science*, v.11, p.313-321, 2001.
- HASHIMOTO, K.; IGARASHI, H.; MANO, S.; TAKENAKA, C.; SHIINA, T.; YAMAGUCHI, M.; DEMURA, T.; NISHIMURA, M.; SHIMMEN, T.; YOKOTA, E. An isoform of *Arabidopsis* myosin XI interacts with small GTPases in its C-terminal tail region. *Journal of Experimental botany*, p.1-9, 2008.
- HOLWEG, C.; NICK, P. *Arabidopsis* myosin XI mutant is defective in organelle movement and polar auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.101, p.10488-10493, 2004 .
- KAHAI, S., LEE, S.C., SETH, A., YANG, B.B. Nephronectin promotes osteoblast differentiation via the epidermal growth factor-like repeats. *FEBS Letters* v. 584(1), p.233-238, 2010.
- KINKEMA, M.; WANG, H.; SCHIEFELBEIN, J. Molecular analysis of the myosin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, v.26, p.1139-1153, 1994.
- KRENDEL, M.; MOOSEKER, M.S. Myosins: Tails (and Heads) of Functional Diversity. *Physiology*, v. 20, p. 239-251, 2005
- KUPHAL, S., WALLNER, S., BOSSERHOFF, A.K. Loss of nephronectin promotes tumor progression in malignant melanoma. *Cancer Science*, v. 99(2), p. 229-233, 2008.
- LI, J. F.; NEBENFÜHR, A. Organelle targeting of myosin XI is mediated by two globular tail subdomains with separate cargo binding sites. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, p.20593-20602, 2007.
- LI, J. F.; NEBENFÜHR, A. The Tail that Wags the Dog: The Globular Tail Domain Defines the Function of Myosin V/XI. *Traffic*, v.9, p. 290-298, 2008.
- LI, X-D., JUNG, H.S., WANG, Q., IKEBE, R., CRAIG, R., IKEBE, M. The Globular Tail Domain puts the brake to stop the ATPase Cycle of Myosin Va, *PNAS*, v.105, p. 1140-1145, 2008.
- LIM, W.A., RICHARDS, F.M., FOX, R.O. Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains. *Nature*, v. 372, p. 375-379, 1994.
- LINTON JM, MARTIN GR, REICHARDT LF. The ECM protein nephronectin promotes kidney development via integrin $\alpha 8 \beta 1$ -mediated stimulation of Gdnf expression. *Development* , v. 134, p. 2501–2509, 2007.
- LIU, B., ZHOU, J. AND PESACRETA, T. Maize myosins: diversity, localization, and function. *Cell Motility Cytoskeleton*, v.48, p.130–148, 2001.
- MARBLESTONE, J. G.; EDAVETTAL, S. C.; LIM, Y; LIM, P.; BUTT, T.R. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: Enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Science*, v. 15, p. 182-189, 2005.
- NGUYEN, J.T., PORTER, M., AMOUI, M., MILLER, W.T., ZUCKERMANN, R.N., LIM, W.A. Improving SH3 domain ligand using a non-natural scaffold. *Chemistry e Biology*, v. 7, p. 463-473, 2000.
- NOOR, A., WINDPASSINGER, C., PATEL, M., STACHOWIAK, B., MIKHAILOV, A., AZAM, M., IRFAN, M., SIDDIQUI, Z.K., NAEEM, F., PATERSON, A.D., LUTFULLAH, M., VICENT, J.B., AYUB, M. CC2D2A, Encoding A

- Coiled-Coil and C2 Domain Protein, Causes Autosomal-Recessive Mental Retardation with Retinitis Pigmentosa *The American Journal of Human Genetics*, v, 82, p. 1011–1018, 2008.
- ODRONITZ, F.; KOLLMAR, M. Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biology*, v.8, R196.1-R196.24, 2007.
- PAREMYSLOV, V.V.; PROKHNEVSKY, A.I.; AVISAR, D.; DOLJA, V.V. Two class XI myosins function in organelle trafficking and root hair development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, v.146, p. 1109-1116, 2008.
- PAREMYSLOV, V.V.; MOCKER, S.A.F.; FOX, S.E., JAISWAL, P.; MAKAROVA, K.S.; KOONIN, E.V.; DOLJA, V. Expression, Splicing and Evolution of the Myosin Gene Family in Plants. *Plant Physiology*, v.155, p.1191-1204, 2011.
- PARK, K.; YI, S.Y.; LEE, C.S.; KIM, K.E.; PAI, H.S.; SEOL, D.W.; CHUNG, B.H.; KIM, M. A Split Green Fluorescent Protein-BaSED Reporter in Yeast Two-Hybrid System. *The Protein Journal*, v.26, p.107-116, 2007.
- PATRA, C., DIEHL, F., FERRAZZI, F., AMERONGEN, M.J., NOVOYALTLEVA, T., SCHAEFER, L., MÜHLFELD, C., JUNBLUT, B., ENGEL, F.B. Nephronectin regulates atrioventricular canal differentiation via Bmp4-Has2 signaling in zebrafish. *Development*, v.138, p.4499-4509, 2011.
- PROKHNEVSKY, A.I; PAREMYSLOV, V.V.; DOLJA, V.V. Overlapping functions of the four class XI myosins in Arabidopsis growth, root hair elongation, and organelle motility. *PNAS*, v. 105, p. 19744-19749, 2008.
- REDDY, A. S. N.; DAY, I. S. Analysis of the myosins encoded in the recently completed *Arabidopsis thaliana* genome sequence. *Genome Biology*, v.2, n.7, p.0024.1-0024.17, 2001.
- SATTARZADEH, A., FRANZE, R., SCHMEIZER, E. The Arabidopsis Class VIII Myosin ATM2 Is Involved in Endocytosis. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, v. 65, p. 457-468, 2008.
- SELLERS, J. R. Myosins: a diverse superfamily. *Biochemica et Biophysica Acta*, p. 3-22, 2000.
- SHÄGGER, H. Tricine-SD-PAGE. *Nature Protocols*, v1, p16-22, 2006.
- SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Analytical Chemistry*, v.68, p. 850-858, 1996.
- SHIMMEN, T., YOKOTA, E. Cytoplasmic Stream in plant. *Cell Biology*, v. 16, p. 68-72, 2004.
- SONG, H.; PARSONS, M.R.; ROWSELL, S.; LEONARD, G.; PHILLIPS, S.E.V. Crystal structure of intact elongation factor EF-Tu from Escherichia coli in GDP conformation at 2.05 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, v.285, p. 1245-1256, 1999.
- STEIMLE, P.A.; NAISMITH, T.; LICATE, L.; EGELHOFF, T.T. WD Repeat Domains Target Dictyostelium Myosin Heavy Chain Kinases by Binding Directly to Myosin Filaments. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 6853-6860, 2001
- TOMINAGA, M., KOJIMA, H., YOKOTA, E., ORII, H., NAKAMORI, R., KATAYAMA, E., ANSON, M., SHIMMEN, T., OIWA, K. High plants myosin XI moves processively on actin with 35 nm steps at high velocity. *The European Molecular Biology Organization Journal*, v.22, p.1263-1272, 2003.
- VOJTEK, A.B., HOLLENBERG, S.M., COOPER, J.A. Mammalian RAS interacts directly with the serine/threonine kinase RAF. *Cell*, v.74, p. 205-214, 1993.

- VUGREK O, SAWITZKY H, MENZEL D. Class XIII myosins from the green alga *Acetabularia*: driving force in organelle transport and tip growth? *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, v.24, p.87–97, 2003.
- WALTER, N., HOLWEG, C.L. Head-neck domain of *Arabidopsis* myosin XI, MYA2, fused with GFP produces F-actin patterns that coincide with fast organelle streaming in different plant cell. *BioMed Central Plant Biology*, v.8, 2008.
- WALHOUT, A.J.M.; BOULTON, S.J.; VIDAL, M. Yeast two-hybrid systems and protein interaction mapping projects for yeast and worm. *Yeast*, v.17, p. 88-94, 2000.
- WÄRDELL, K., JAKOBSSON, A., NILSSON, G.E. Laser Doppler perfusion imaging by dynamic light scattering. *Biomedical Engineering*, v.40 (4), p. 309-316, 1993.
- WEI, Z.; YAN, J.; LU, Q.; PAN, L.; ZHANG, M. Cargo recognition mechanism of myosin X revealed by structure of its tail MyTH4-FERM tandem in complex with the DDC P3 domain. *PNAS*, v.108, n°9, p. 3572-3577, 2011.
- WU, L.; PAN, L.; WEI, Z.; ZHANG, M. Structure of MyTH4-FERM domains in myosin VII tail bound to cargo. *Science*, v. 331, p. 757-760, 2011.
- YAMAMOTO, K., KASHIYAMA, T. Myosins from plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.56, p.227-232, 1999.
- YANG, M.; WU, Z.; FIELDS, S. Protein-peptide interactions analyzed with the yeast two-hybrid system. *Oxford Journals Nucleic Acids Research*, v. 23, p. 1152-1156, 1995.
- YOKOTA, E., MCDONALD, A. R., LIU, B., SHIMMEN, T. AND PALEVITZ B. A. Localization of a 170kDa myosin heavy chain in plant cells. *Protoplasma*, v.185, p.178–187, 1995.
- YOKOTA, E., YUKAWA, C., MUTO, S., SONOBE, S., AND SHIMMEN, T. Biochemical and immunocytochemical characterization of two types of myosins in cultured tobacco bright yellow-2. *Cells Plant Physiology*, v.121, p.525–534, 1999.