

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

**ANÁLISE DAS INTERAÇÕES ENTRE PROTEÍNAS
ENVOLVIDAS NA BIOGÊNESE DE miRNAs EM
*ARABIDOPSIS THALIANA***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
ÉRIKA FRYDRYCH CAPELARI

PORTO ALEGRE

2016

ÉRIKA FRYDRYCH CAPELARI

**ANÁLISE DAS INTERAÇÕES ENTRE PROTEÍNAS
ENVOLVIDAS NA BIOGÊNESE DE miRNAs EM
*ARABIDOPSIS THALIANA***

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do Curso Biotecnologia, do Departamento de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, como requisito parcial para obtenção do título de biotecnologista.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Margis

Co-orientadora: Dra. Franceli Rodrigues Kulcheski

PORTO ALEGRE

2016

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genomas e População de Plantas, do Centro de Biotecnologia, na UFRGS. O trabalho teve financiamento do CNPq, da CAPES e da FAPERGS.

SUMÁRIO

Agradecimentos	III
Lista de figuras	IV
Lista de tabelas	V
Lista de abreviaturas	VI
Resumo	VII
Abstract	VIII
1. Revisão bibliográfica	1
1.1 Interferência por RNA	1
1.2 Regulação gênica mediada por microRNAs (miRNAs)	1
1.3 Biogênese de miRNAs em plantas	2
1.4 Proteínas DCL e AGO	3
1.5 Proteínas DRBs	5
1.6 Análise da interação de proteínas por Y2H	7
2. Justificativa	10
3. Objetivos	11
3.1 Objetivo geral:	11
3.2 Objetivos específicos:	11
4. Materiais e métodos	12
4.1 Material vegetal	12
4.2 Extração de RNA total	12
4.3 Síntese de cDNA	12
4.4 Amplificação das regiões codificadoras das proteínas DRBs, DCLs e AGOs	12
4.5 Ligação dos amplicons em vetor de entrada pCR/8GW/TOPO-TA	14
4.6 Confirmação das colônias transformadas	15
4.7 Recombinação com o vetores para o teste de Y2H	16
4.8 Co-transformação de levedura	17
4.9 Ensaio de Y2H	18
5. Resultados	20
5.1 Confirmação da amplificação das CDSs de DRBs, AGOs e DCLs.	20

5.2 Ligação dos amplicons em vetor de entrada pCR/8GW/TOPO-TA.....	20
5.3 Reações de recombinação	21
5.4 Co-transformação de levedura	22
5.5 Confirmação de interação pela técnica de Y2H em levedura	24
6. Discussão	26
7. Perspectivas	28
8. Referências	29

Agradecimentos

A Deus, por ter me permitido ingressar na UFRGS e sair dela formada. Por ter me concedido saúde, força e sabedoria para superar as dificuldades.

Aos meus pais, Everson e Tânia, por terem me apoiado desde o começo e em cada decisão. Obrigada por sempre me darem uma palavra de ânimo e incentivo nos momentos difíceis e por não terem me deixado desistir. Com certeza vocês fazem parte dessa conquista e sem vocês eu não estaria aqui.

Ao meu amado esposo, Gian. Obrigada por acreditar em mim e por me ouvir ao final de cada dia. Obrigada pelo teu amor, cuidado, dedicação, companheirismo e paciência, ainda mais nessa reta final. Obrigada por me ajudar a ser uma pessoa melhor, em todos os sentidos, e por me fazer a mulher mais feliz do mundo.

Ao meu orientador, Rogério, pela oportunidade que me deu de fazer parte do LGPP, de aprender e de crescer profissionalmente. Obrigada pelo exemplo de profissional que tu és.

À minha co-orientadora, Franceli, por ter compartilhado e me ensinado um pouco do que tu sabes. Obrigada pela paciência, pela parceria, pelos cafezinhos depois do almoço e também pelas chamadas de atenção. Vou levar comigo muito do que aprendi contigo.

Aos meus familiares e amigos, pelo carinho e por entenderem minha ausência em algumas épocas.

Aos meus colegas, pelo companheirismo, desabafos e conversas de corredor. Com vocês ir para a aula se tornou mais divertido.

Aos professores, pelos ensinamentos, por agregarem na nossa formação e por nos incentivarem a sermos ótimos profissionais.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte dessa conquista, meu muito obrigada!

Lista de figuras

Figura 1 – Biogênese de miRNAs em plantas.

Figura 2 – Família de proteínas DRB de *A thaliana*.

Figura 3 – Esquema ilustrativo do sistema duplo híbrido.

Figura 4 – Esquema ilustrando a ativação de genes repórter após a ligação dos dois domínios funcionais do fator de transcrição GAL4.

Figura 5 – Mapa do vetor de entrada pCR/8GW/TOPO-TA.

Figura 6 – Mapa do vetor de destino pDEST32.

Figura 7 – Mapa do vetor de destino pDEST22.

Figura 8 – Mapa de distribuição das diluições nas placas seletivas.

Figura 9 – Confirmação da amplificação das CDSs das DRBs de *A. thaliana* via eletroforese em gel de agarose a 1%.

Figura 10 – Confirmação das inserções em vetores de destino via alinhamento de sequências.

Figura 11 – Co-transformação confirmada via PCR de colônia e eletroforese em gel de agarose 1%.

Figura 12 – Análise da interação entre proteínas por meio de Y2H em levedura.

Figura 13 – Network das interações entre proteínas DRBs.

Lista de tabelas

Tabela 1 – Proteínas DRB e seus tamanhos e pesos moleculares.

Tabela 2 – Sequências dos *primers* projetados para amplificação da CDS de cada DRB, AGO e DCL, temperaturas de anelamento e tamanho dos amplicons.

Tabela 3 – Meios de cultura usados no teste de Y2H, com suas descrições.

Tabela 4 – Código dos plasmídeos dos quais tiveram sua ligação confirmada.

Tabela 5 – Códigos dos plasmídeos recombinados com vetores de destino pDEST32 e pDEST22.

Tabela 6 – Códigos das leveduras co-transformadas com os vetores de destino.

Tabela 7 – Grupo de leveduras selecionado para testar as interações.

Lista de abreviaturas

3AT – 3-amino-triazole

aa – aminoácidos

AGO – Argonauta

cDNA – complementary DNA (DNA complementar)

CDS – Coding Sequence (Sequência Codificadora)

DCL – Dicer-Like

DRB – double-stranded RNA binding protein (Proteínas de ligação à RNA fita dupla)

dsRBPs – Double-Stranded RNA-Binding Domain Proteins (Proteínas com domínio de ligação à RNA de fita dupla)

dsRNA – double stranded RNA (RNA de fita dupla)

GUS - β -glucuronidase

H – Histidina

L – Leucina

LB – Luria-Bertani (meio de cultura)

miRNA – microRNAs

mRNA – messenger RNA (RNA mensageiro)

nt – nucleotídeo

pb – pares de bases

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

PolIV – RNA Polimerase IV

pre-miRNA – precursor of microRNA (precursor do microRNA)

pri-miRNA – primary microRNA (microRNA primário)

PTGS – Post Transcription Gene Silencing (Silenciamento Gênico Pós-Transcricional)

RISC – RNA-Induced Silence Complex (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA)

RNA – ribonucleic acid (ácido ribonucleico)

RNAi – RNA interference (interferência por RNA)

siRNAs – short interfering RNAs (pequenos RNAs de interferência)

W – Triptofano

YNB – yeast nitrogen base (meio de cultura)

YPD – yeast peptone dextrose (meio de cultura)

Resumo

O silenciamento de RNA usa pequenas moléculas de RNA como mediadores de sequências específicas responsáveis por regular a expressão de genes a nível transcricional, pós-transcricional e/ou traducional. A interferência por RNA (RNAi) é um dos mecanismos celulares responsáveis pelo silenciamento gênico pós-transcricional, que atua sobre o mRNA. Dependendo do grau de complementaridade com o mRNA-alvo, poderá ocorrer um silenciamento por degradação do mRNA ou por inibição da tradução. Uma das principais vias de silenciamento de RNA de plantas é mediada por microRNAs (miRNAs). miRNAs são pequenas moléculas de RNA não-codificadoras de proteínas, de 21 a 25 nucleotídeos que são parcialmente complementares a uma ou mais moléculas de mRNA, tendo como principal função regular negativamente a expressão gênica. A biogênese dos miRNAs envolve diversas enzimas e proteínas. Dentre essas proteínas importantes são a DICER-LIKE (DCL), responsável pelo tamanho do RNA de fita dupla gerado, ARGONAUTA (AGO), responsável pela seleção da fita de miRNA que será incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) e as proteínas DRB, proteínas ligantes de RNA de dupla fita, que participam da biogênese de miRNAs. O RISC controla a expressão pós-transcricional de genes-alvo, através do pareamento entre a fita do miRNA, incorporada nesse complexo, com a região homóloga de seu mRNA-alvo. Em *Arabidopsis thaliana* já foram descritas 10 proteínas AGO, 4 proteínas DCL e 5 proteínas DRB. Diferentes combinações de proteínas que se ligam ao RNA resultam em diferentes respostas celulares. Dessa forma, entender como ocorre a interação entre proteínas DRB, bem como a interação destas com outras proteínas envolvidas na biogênese de miRNAs, pode auxiliar na compreensão de como este processo ocorre. Neste trabalho nós utilizamos duplo híbrido de levedura para investigar a interação entre as proteínas DRBs. Interessantemente, foram observadas interações entre as proteínas DRB1/DRB4, DRB2/DRB3 e DRB4/DRB3, trazendo novas perspectivas no cenário de processamento de miRNAs

Abstract

The RNA silencing uses small RNA molecules such as mediators of specific sequences responsible for regulating the gene expression at transcriptional, post-transcriptional and/or translational level. The RNA interference (RNAi) is one of the cellular mechanisms responsible for post-transcriptional gene silencing, which acts on the mRNA. Depending on the degree of complementarity with the target mRNA, it will cause silencing either by degradation or by inhibition of mRNA translation. One of the main pathways of plant RNA silencing is mediated by microRNAs (miRNAs). miRNAs are small RNA molecules encoding non-protein, from 21 to 25 nucleotides that are partially complementary to one or more mRNA molecules, whose main function negatively regulate gene expression. The biogenesis of miRNAs involves several enzymes and proteins. Among these important proteins are DICER-LIKE (DCL), responsible for the double-stranded RNA size generated, ARGONAUTA (AGO), responsible for the selection of the miRNA tape that will be incorporated into induced silencing complex RNA (RISC) and Double stranded RNA binding protein (DRB) which is known to participate in the miRNAs biogenesis. In *Arabidopsis thaliana* were identified 10 AGO proteins, 4 DCL proteins and 5 DRB proteins. Different combinations of RNA binding proteins can participate in different cellular responses. Thus, to discover the interactions between the DRBs proteins, as well as their interaction with others proteins involved in the biogenesis of miRNAs, can help to unveil how this process occurs. In this study, we employed two-hybrid system for DRBs interaction investigation. Interesting, interactions between DRB1/DRB4, DRB2/DRB3 and DRB4/DRB3 were observed, bringing new perspectives in the miRNAs processing scenario.

1. Revisão Bibliográfica

1.1 Interferência por RNA

A interferência por RNA (RNAi) é um mecanismo celular que utiliza pequenas moléculas de RNA não codificadoras para regular negativamente a expressão de diversos genes a nível transcricional, pós-transcricional e/ou traducional, de forma específica (Hammond et al., 2005). A ocorrência de silenciamento gênico associado a moléculas de RNA foi evidenciada inicialmente em plantas em 1990, em um estudo de Napoli e colaboradores, utilizando petúnias. Para designar o fenômeno citoplasmático constatado em petúnias e outras espécies vegetais, e diferenciá-lo do silenciamento transcricional de ocorrência nuclear observado em outros organismos, foi criado o termo PTGS (do inglês, *post transcription gene silencing*), também chamado de silenciamento gênico pós-transcricional.

Nesse mecanismo, uma molécula de dsRNA tem como alvo um mRNA, e dependendo do grau de complementaridade entre as sequências de nucleotídeos dessas duas moléculas, irá ocasionar o silenciamento deste mRNA tanto pela sua degradação, quanto pela inibição da sua tradução. Há evidências de que dsRNAs estejam também envolvidos com a manutenção da condensação de regiões da cromatina e supressão da transcrição nas proximidades dessas regiões. Durante o silenciamento, as moléculas indutoras de dsRNA alvo são processadas em moléculas menores ao mesmo tempo que o RNA alvo é clivado em intervalos de 21 a 23 nt. Dessa forma, foi proposto um modelo em que as moléculas derivadas do processamento do dsRNA atuariam como moléculas guias e seriam responsáveis por recrutar um complexo de silenciamento para junto do RNA alvo a ser clivado, e que este, por sua vez, seria reconhecido pelo seu pareamento com tais moléculas guias. Essas moléculas efetoras foram denominadas de *small interfering RNAs* (siRNAs) ou pequenos RNAs de interferência.

1.2 Regulação gênica mediada por microRNAs (miRNAs)

Plantas utilizam uma sofisticada maquinaria de silenciamento de RNA para controlar a expressão de genes relacionados com os mais diversos processos moleculares que afetam diretamente o desenvolvimento e a fisiologia das mesmas. Uma das principais vias de silenciamento que ocorre após a transcrição é mediada por microRNAs (miRNAs). Cerca de dois terços dos miRNAs de plantas conhecidos

controlam a expressão de fatores de transcrição que regulam etapas cruciais do seu desenvolvimento (Rhoades et al., 2002; Jones-Rhoades e Bartel, 2004)

Os miRNAs constituem a principal classe de pequenos RNAs não-codificadores de proteínas e atuam em uma série de processos biológicos, como desenvolvimento (Lelandais-Briere et al., 2010; Yang et al., 2007), sinalização hormonal (Liu e Chen, 2009), floração e determinação sexual (Chuck et al., 2009) e adaptação a estresses diversos (Chen, 2005; Lu et al., 2008b; Mallory e Vaucheret, 2006; Shukla et al., 2008). São processados a partir de transcritos endógenos, com cerca de 21-25 nucleotídeos de comprimento e foram descritos pela primeira vez em 1993 em estudos realizados com *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993). Os miRNAs em plantas foram identificados e descritos pela primeira vez na planta modelo *A. thaliana* em 2002 (Reinhart e Bartel, 2002; Park et al., 2002). Atualmente, já foram identificadas 325 sequências nessa mesma espécie, de acordo com o miRBase, que é um banco de dados público. (Griffiths-Jones, 2004; Griffiths-Jones et al., 2006, 2008; Kozomara e Griffiths-Jones, 2010).

1.3 Biogênese de miRNAs em plantas

A biogênese dos miRNAs é iniciada pela transcrição do gene do miRNA, na maioria das vezes pela RNA polimerase II (Jones-Rhoades et al., 2006; Lee et al., 2004), gerando um longo transcrito de miRNA primário (pri-miRNA) contendo cap 5' e cauda poli A na região 3'. O pri-miRNA apresenta uma estrutura em formato de grampo (*hairpin*), que é clivada por uma RNase III Dicer-like (DCL) (Kurihara et al., 2006) e pela Hyponastic Leaves 1 (HYL 1), também nominada de Double Stranded RNA Binding Protein 1 (DRB1). Assim, gera uma molécula precursora do miRNA maduro denominada pré-miRNA, com cerca de 70 nucleotídeos (Lee et al., 2004). O pré-miRNA é novamente clivado pela DCL1 e origina uma dupla miRNA:miRNA* (Kurihara et al., 2006; Song et al., 2007; Song et al., 2011), que vai possuir dois nucleotídeos não pareados na região 3' de cada fita, o que o torna propenso a degradações por exonucleases. Para evitar essa degradação, o excesso de nucleotídeos de cada fita dupla é metilado pela metiltransferase específica de sRNA, Hua Enhancer 1 (HEN1) (Yu et al., 2005), e exportado para o citoplasma, onde a fita guia do miRNA é separada da fita passageira do miRNA (miRNA*) (Park et al., 2002) e introduzida a um Complexo de Silenciamento Induzido por RNA, RISC (do inglês, *RNA-induced silence complex*) (Figura 1). Esse complexo é responsável por mediar o pareamento

entre a fita do miRNA, previamente incorporada neste, e a região homóloga de seu mRNA-alvo através de uma alta complementaridade de bases (Rivas et al., 2005). Normalmente, quando a complementaridade é total, ocorre degradação do mRNA e quando é parcial, ocorre repressão da tradução e posterior degradação do mRNA (Bartel, 2004, 2009).

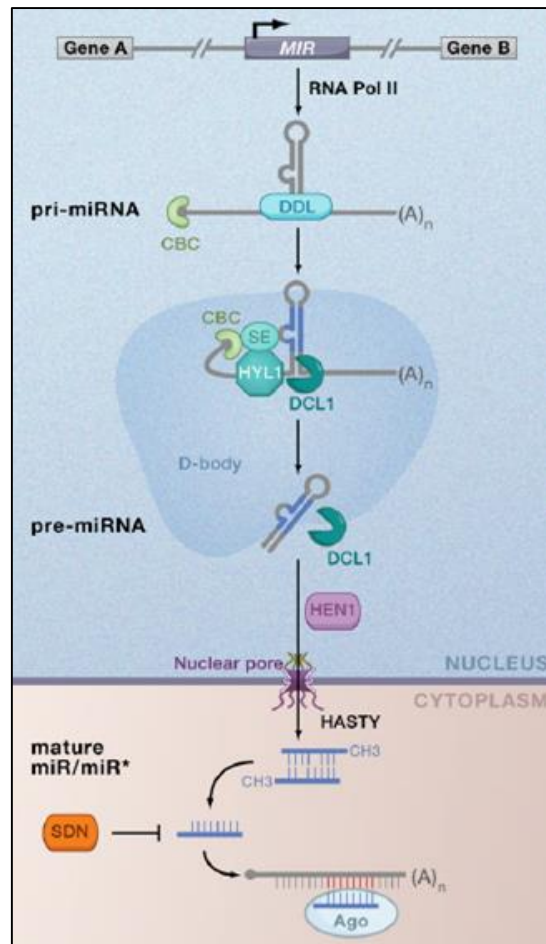


Figura 1. Biogênese de miRNAs em plantas. O gene de miRNA é transcrito pela RNA polimerase II. O pri-miRNA apresenta uma estrutura em forma de *hairpin*, que é processada pelas proteínas DCL1 e HYL1, formando o pré-miRNA de aproximadamente 70 nucleotídeos de comprimento, o qual será novamente processado por DCL1, gerando um miRNA fita dupla. Esse miRNA é metilado nas extremidades 3'OH por uma metiltransferase HEN1, e posteriormente exportado para o citoplasma. Ali, uma das fitas do miRNA se associa com o RISC, controlando a expressão pós-transcricional de genes alvo. Fonte: Voinnet, 2009.

1.4 Proteínas DCL e AGO

Outras proteínas envolvidas na biogênese de miRNAs são as proteínas Dicer-Like (DCL) e Argonaturas (AGO). Proteínas DCL são essenciais no processamento de

miRNAs e apresentam domínios de helicase e um domínio de ligação ao RNA, PAZ, que é responsável pelo tamanho do RNA fita dupla gerado. Um ano após a elucidação do papel dos siRNAs, a enzima responsável pela clivagem das moléculas de dsRNA foi identificada bioquimicamente (Bernstein et al., 2001), com posterior confirmação genética em diferentes organismos (Grishok et al., 2001; Ketting et al., 2001; Knight e Bass, 2001). Essa enzima denominada Dicer é uma RNase do tipo III que produz, dependendo da isoforma, dsRNAs de ~21 ou ~24 nucleotídeos (nts), denominados pequenos RNAs de interferência (siRNAs) (Hammond et al., 2000). A planta modelo *Arabidopsis thaliana* tem um conjunto básico de quatro tipos de proteínas Dicers (Bouche et al., 2006; Henderson et al., 2006; Mlotshwa et al., 2008; Liu et al., 2009) e tem sido muito especulado que cada uma requer a associação com uma proteína DRB, a fim de exercer sua função (Hiraguri et al., 2005; Margis et al., 2006; Nakazawa et al., 2007; Ding et al., 2007). Das quatro proteínas DCL codificadas pelo genoma de *A. thaliana*, o acúmulo de miRNA tem se mostrado quase que totalmente dependente da ação da DCL1. (Bouché et al., 2006; Park et al., 2002; Reinhart et al., 2002). A DCL1, localizada no núcleo, reconhece moléculas de RNA que têm a capacidade de formar estruturas em forma de grampo e clivá-las, liberando miRNAs de 21 nt que posteriormente serão usados no complexo RISC para silenciar a expressão de mRNAs alvo. (Kurihara et al., 2006; Xie et al., 2003). Alguns estudos sugerem que a DCL2 pode competir com a DCL1 pela ligação à DRB1, limitando assim, a produção de alguns miRNAs (Han et al., 2004). A principal atividade da DCL3 é processar longos dsRNAs de regiões da heterocromatina do genoma em siRNAs de 24 nt (Daxinger et al., 2009). Já a DCL4, de forma semelhante a DCL1, participa do processamento de pequenos RNAs de 21 nt. Para processar seus respectivos dsRNA em sRNA de forma eficiente e precisa, DCL1 e DCL4 requerem a assistência de dois membros de uma segunda família de proteínas que interagem com dsRNA e fazem parte de um grande domínio de proteínas, dsRBPs (do inglês, Double-Stranded RNA Binding Domain Proteins) (Curtin et al., 2008). É a família de proteínas DRB (do inglês, dsRNA BINDING PROTEINS).

Argonautas são proteínas caracterizadas pela presença de domínios funcionais conservados denominados PAZ (em N-terminal) e PIWI (em C-terminal). Elas se ligam aos siRNA e miRNA e apresentam atividade de endonuclease dirigida contra a fita de mRNA complementar ao miRNA. São elas as responsáveis pela seleção da fita de miRNA que será incorporada ao RISC (Rand et al., 2005; Höck, J. e Meister, G., 2008). Em *Arabidopsis thaliana* já foram descritas 10 proteínas Argonautas, sendo que o que

determina sua atividade e especificidade à cada miRNA é a identidade do nucleotídeo na região 5'-terminal de pequenos RNAs. Na planta modelo, as AGO1 e AGO10 se ligam à sRNAs com 5'-uracil, enquanto que AGO2, AGO4, AGO6, AGO7 e AGO9 se ligam com 5'-adenina e a AGO5, 5'-citosina (Mi, S., 2008; Takeda et al., 2008). Além disso, as AGOs estão relacionadas a diferentes vias de regulação gênica. Sabe-se que AGO1, AGO2, AGO7 e AGO10 estão envolvidas no silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) e as AGO4, AGO6 e AGO9 fazem parte da via de metilação do DNA mediada por RNA (RdDM). Já as AGO3 e AGO8 ainda não foram caracterizadas.

1.5 Proteínas DRBs

DRBs foram isoladas de vírus, procariotos e eucariotos e regulam os diversos aspectos da biologia de RNA, incluindo síntese de RNA, transporte, processamento, tradução e degradação (Gale et al., 2000; Fierro-Monti, I. e Mathews, M.B., 2000; Saunders, L.R. e Barber, G.N., 2003). Além disso, essa família de proteínas tem um papel muito importante no silenciamento de RNAs. Em *A. thaliana*, foi primeiramente descoberto por Han e colaboradores em 2004, onde passou a ser denominada HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1, também chamada DRB1). A partir desta, foram identificadas outras 4 proteínas com alta homologia à DRB1 e passaram a ser designadas de DRB2, DRB3, DRB4 e DRB5 (Tabela 1).

Tabela 1. Proteínas DRB e seus tamanhos e pesos moleculares.

Proteína	Tamanho *	Peso Molecular **
DRB1	420	45547
DRB2	435	47441
DRB3	360	40074
DRB4	356	38416
DRB5	394	43636

* aminoácidos
** Da

As DRBs possuem dois motivos de ligação a RNAs de fita dupla na sua porção amino-terminal, que consistem de, em média, 70 resíduos de aminoácidos, nenhum motivo de ligação a dsRNA na região carboxi-terminal, possuem tamanho de 35-40 kDa e formam dobras do tipo α - β - β - β - α , cujas duas α -hélices interagem com a molécula dsRNA (St Johnston et al., 1992; Ryter, J.M. e Schultz, S.C.;1998; Curtin et al., 2008).

Além disso, análises de cristalografia revelaram que estas proteínas interagem com o RNA dupla fita, ligando-se preferencialmente a apenas um lado (e não em todo o redor) do seu substrato (B. Tian et al, 2004).

A DRB mais estudada e a que mais se tem informação é a DRB1, também chamada de HYL1. Essa proteína tem 6 resíduos repetidos de 28 aminoácidos na região C-terminal, cuja função ainda é desconhecida (Lu, C. e Fedoroff, N., 2000) e tem origem nuclear, onde interage com a DCL1 auxiliando-a nas clivagens do miRNAs precursores, liberando o duplex miRNA/miRNA* (Qi et al, 2013). Dessa forma, processam os transcritos primários de miRNA e subsequentemente formam os miRNAs maduros (Han et al., 2004), além de estar envolvida na seleção da fita guia para o complexo RISC (Han et al., 2004; Hiraguri et al., 2005; Eamens et al., 2009). Outra DRB bem descrita em *A. thaliana* é a DRB4, que assim como a DRB1, também se encontra no núcleo. De forma semelhante, a DRB4 interage funcionalmente (Nakazawa et al., 2007; Qu et al. 2008) e exclusivamente com a DCL4, sendo esta a primeira DCL envolvida no processamento de dsRNA virais (Hiraguri et al., 2005; Deleris et al., 2006).

A DRB2 apresenta localização nuclear e auxilia no processamento específico de miRNAs no meristema apical. Como a DRB1, esta também é capaz de se ligar a DCL1 *in vitro*, mas diferente da DRB1, ela não interage preferencialmente com esta DCL quando comparada com as DCL2, 3 ou 4 (Hiraguri et al., 2005). Ela é considerada antagonista à DRB4 na produção de siRNAs dependente da RNA Polimerase IV e sinérgica à DRB4 na biogênese de miRNAs dependentes de DRB4 (Pe lissier T, 2011). Além disso, a DRB2 é considerada antagonista e sinérgica à DRB1 na biogênese de miRNA específicos (Eamens et al., 2012).

Em relação às DRB3 e DRB5 poucas informações existem até o momento sobre suas funções. Em contraste às DRB1, DRB2 e DRB4, as DRB3 e DRB5 são expressas no citoplasma, e embora as DRB3 e DRB5 sejam dispensáveis para o processamento de miRNA, por não estarem envolvidas nos estágios de processamento de dsRNA, acredita-se que contribuem para silenciar transcritos alvo de miRNAs associados à DRB2 (Eamens et al., 2012). Além disso, estas três proteínas DRBs são muito semelhantes. À nível de aminoácidos, as DRB2, DRB3 e DRB5 formam um único *cluster* filogenético e esse *cluster* é mais próximo à DRB4 do que à DRB1. Essa relação também ocorre à nível de estrutura genômica, onde todos os cinco genes de DRB apresentam três éxons, separados por dois íntrons e flanqueados por uma região 5' e 3' não traduzidas (Figura 2). Entretanto, o primeiro éxon da DRB1 não codifica o motivo

ligante a RNA dupla-fita como ocorre nos genes das DRB2, DRB3, DRB4 e DRB5. Nestes quatro membros da família DRB, os primeiros éxons codificam dois motivos N-terminais ligantes a RNA de fita dupla, sugerindo que DRB2, DRB3 e DRB5 possam ter evoluído a partir da DRB4 (Eamens et al., 2012). Sendo assim, esses três membros da família podem ser funcionalmente redundantes (Curtin et al., 2008).

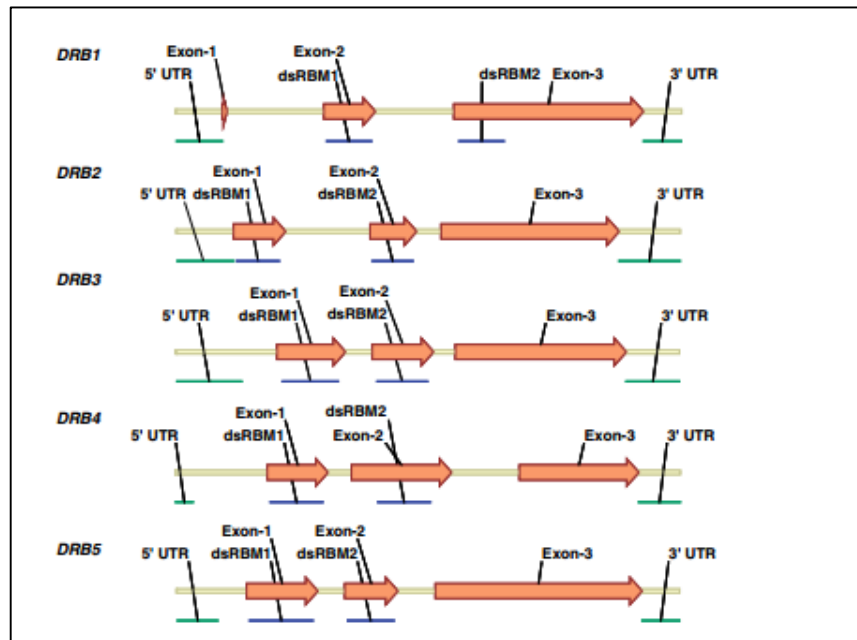


Figura 2. Família de proteínas DRB de *A. thaliana*. Esquema da estrutura gênica dos membros da família DRB. As regiões 5' e 3' UTR estão representadas por linhas verdes, os éxons por setas laranjas e os dsRBMs por linhas azuis. Como se pode ver também em a), as DRB2, 3 e 5 estão mais próximas e parecidas com a DRB4 do que com a DRB1 (Fonte: Adaptado de "The *Arabidopsis thaliana* Double-Stranded RNA Binding (DRB) Domain Protein Family". Eamens, A.L., 2011).

1.6 Análise da interação de proteínas por Y2H

O sistema de duplo-híbrido em levedura (*Yeast Two Hybrid* – Y2H) é uma técnica que possibilita o estudo de possíveis interações entre proteínas (Young, K. 1998) e/ou proteína/DNA (Joung, J. et al., 2000) *in vivo*. Este sistema foi inicialmente descrito por Fields e Song (1989) e desenvolvido com base no princípio de que várias proteínas, incluindo fatores de transcrição de organismos eucarióticos (Keegan et al., 1986), são constituídas de múltiplos domínios com funções independentes. Quando expressos isoladamente e aproximados por meio de interações não covalentes, domínios

individuais podem funcionar conjuntamente para reconstituir a atividade da proteína intacta. O principal fator de transcrição utilizado é o GAL4, da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Este fator de transcrição possui dois domínios: (i) domínio de ligação ao DNA (*DNA Binding Domain* – DBD) e também chamado de “isca”, localizado na porção N-terminal e (ii) domínio de ativação transcricional (*Activation Domain* – AD) e também chamado de “presa”, localizado na porção C-terminal da proteína. Com isso, ocorre a formação de duas proteínas quiméricas (Figura 3).

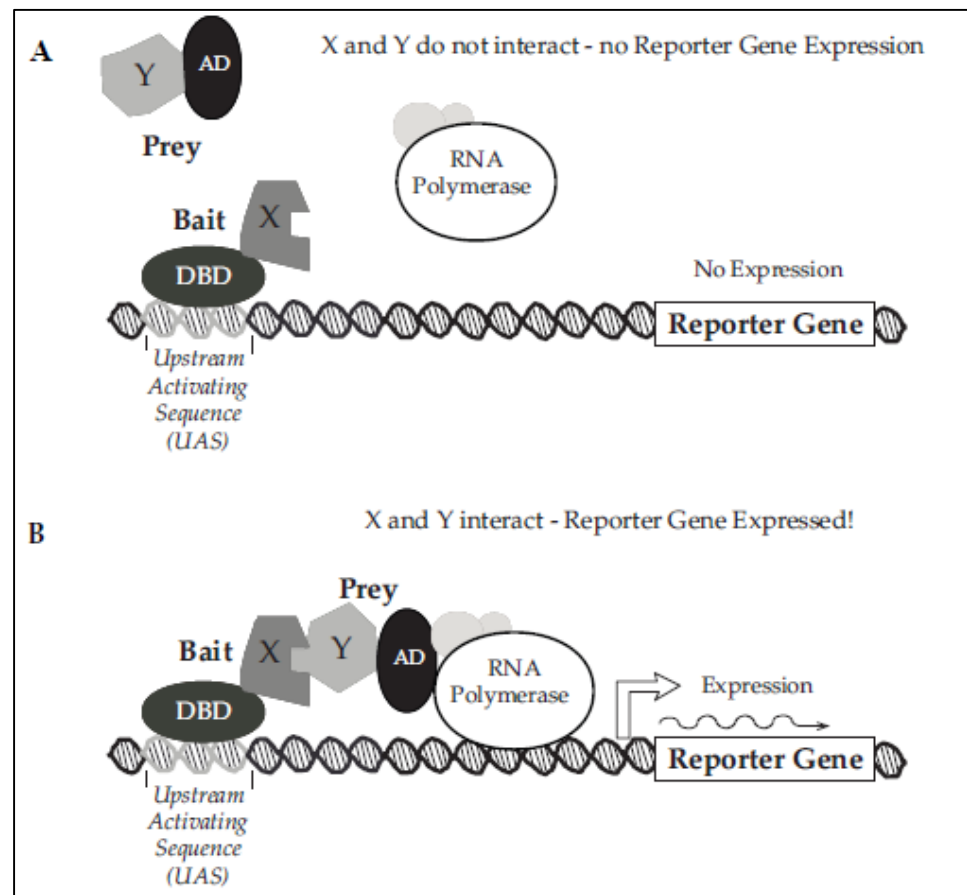


Figura 3. Esquema ilustrativo do sistema duplo híbrido. A) No caso de células de levedura expressando duas proteínas híbridas (DBD-X e AD-YY) que não interagem, AD-Y não estará fisicamente localizada no promotor e não ativará a transcrição dos genes repórteres do sistema. B) Caso as proteínas híbridas sejam parceiras de interação, DBD-X e AD-Y estarão localizadas na região promotora de genes repórteres e a transcrição é ativada. Fonte: Manual do Kit ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway Technology, Invitrogen.

O principal fator que possibilita a utilização o sistema de duplo híbrido em levedura para estudar interações entre proteínas é a capacidade dos domínios N e C

terminais da proteína GAL4 ativarem a transcrição gênica quando estão próximos, sem necessariamente precisarem estar ligados. Dessa forma, é possível testar a interação entre duas proteínas clonando cada uma em cada um dos domínios mencionados acima. Essas duas construções recombinantes são inseridas na levedura, devidamente modificada para isso, e caso exista a interação entre as duas proteínas, a transcrição de um gene repórter presente na própria levedura é ativado (Figura 4).

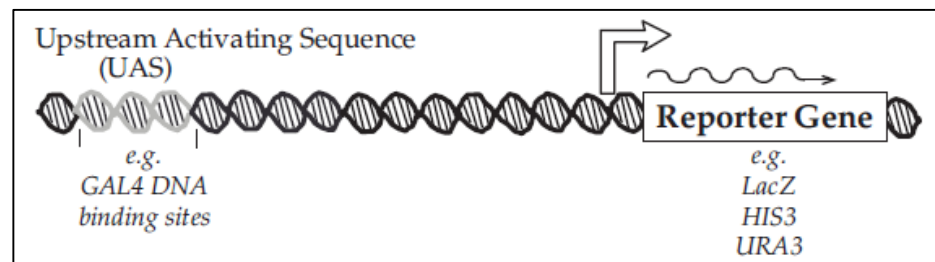


Figura 4. Esquema ilustrando a ativação de genes repórter após a ligação dos dois domínios funcionais do fator de transcrição GAL4. Fonte: Manual do Kit ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway Technology, Invitrogen.

Os genes repórter mais comumente utilizados em ensaio de Y2H são genes auxotróficos, como Leu2, Ade2, Ura3, Lys2 e His3, que permitem o crescimento em meio mínimo. Atualmente, mais de um gene repórter são utilizados em paralelo, a fim de aumentar o rigor dos ensaios. Isso porque um dos problemas comuns de Y2H é a geração de falsos positivos devido a interações não específicas. A seleção com dois genes repórter ativos requer uma ativação da transcrição mais concreta e, portanto, aumenta o rigor do ensaio, mas concomitantemente dificulta a detecção de interações fracas e transientes. Outra possibilidade para ajustar o rigor do ensaio é a inibição parcial da atividade enzimática codificada pelo gene repórter. Por exemplo, o produto do repórter HIS3, imidazol glicerol fosfato desidratase, é inibido competitivamente por concentrações crescentes de 3-aminotriazole. Nos ensaios de Y2H, a alta afinidade entre as proteínas irá permitir que a célula sobreviva em meio contendo altas concentrações de 3AT. Dessa forma, é feita a seleção em meio de cultura específico para a complementação de cada um dos mutantes auxotróficos.

2. Justificativa

As interações entre distintos componentes da via de biogênese e ação de miRNAs resultam em uma ampla gama de respostas celulares. Desta forma, identificar as possíveis interações entre diferentes proteínas presentes neste cenário é de extrema importância para o esclarecimento destas vias de regulação gênica.

Na literatura, algumas interações entre proteínas envolvidas na biogênese de miRNAs já foram bem elucidadas, como a interação entre a DRB1 e a DCL1, na etapa de processamento do pri- e pre-miRNA. Além disso, estudos recentes têm proposto localizações divergentes para as proteínas DRBs, sugerindo possíveis novos mecanismos de atuação.

Assim, entender quais proteínas DRBs interagem entre si, bem como, com outras proteínas envolvidas na biogênese de miRNAs, e como ocorre essa interação, poderá auxiliar-nos no entendimento do processamento e funcionamento destes pequenos RNAs.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral:

Analisar a interação entre proteínas DRBs, e destas com outras proteínas envolvidas na via de biogênese e ação de miRNAs.

3.2 Objetivos Específicos:

3.2.1 Amplificar e clonar em vetor de entrada pCR/8GW/TOPO-TA as sequências codificadoras de proteínas DRBs, proteínas AGO 1 e 2 e DCL1 e 3;

3.2.2 Analisar interação das proteínas DRBs entre si por meio de ensaio de duplo híbrido;

3.2.3 Analisar interação entre proteínas DRBs e proteínas do tipo DLC por meio de ensaio de duplo híbrido;

3.2.4 Analisar interação entre proteínas DRBs e proteínas do tipo AGO por meio de ensaio de duplo híbrido;

4. Materiais e métodos

4.1 Material vegetal

Para a obtenção das sequências codificadoras das proteínas DRBs, foram crescidas sementes de *Arabidopsis thaliana*, ecótipo Columbia, acesso 0 (Col-0), em solo turfado sob temperatura de 23°C, com fotoperíodo de dia longo (16h de luz/ 8h de escuro) em salas de crescimento com 65% de umidade relativa do ar.

4.2 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi feita utilizando o reagente TRIZOL, de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA para a síntese de cDNA para amplificação das DRBs 3 e 5 foi extraído de inflorescências de *A. thaliana*, enquanto que o RNA para a síntese de cDNA para amplificação das DRBs 1, 2 e 4, AGO1 e 2 e DCL1 e 3 foi extraído de folhas. Para cada 100 mg de tecido macerado foi adicionado 1 mL de TRIZOL. A solução foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente e em seguida foram adicionados 100 µL de clorofórmio. Depois de misturar bem por 15 segundos e incubar por 3 minutos a temperatura ambiente, a solução foi centrifugada por 15 minutos, a 12.000 rpm, a 4°C. A fase aquosa foi transferida, com cuidado, para outro tubo de 1,5 mL e então foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico gelado. Após incubar por 10 minutos a temperatura ambiente, foi feita a centrifugação por 15 minutos, a 12.000 rpm, a 4°C e o sobrenadante foi removido. Foram feitas três lavagens com etanol 75% gelado e depois de evaporado o excesso, o *pellet* foi solubilizado em 50 µL de água destilada. Por fim, a solução foi exposta à temperatura de 60°C por 10 minutos e armazenada no freezer. Após a extração, a análise da integridade do RNA foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1% e visualizada sob luz UV e imagem digital gerada por meio do sistema Gel-Doc (Bio-Rad).

4.3 Síntese de cDNA

Após a verificação da qualidade e da quantidade do RNA extraído, foi realizada a síntese do cDNA. Para isso, 9 µL do RNA total extraído juntamente com 1 µL de oligodT (100 µM) foram incubados por 5 minutos à 70°C. À essa solução foram adicionado 6 µL de Tampão 5X, 2 µL de dNTP (5 µM), 1 µL da Enzima Transcriptase Reversa M-MLV e 11 µL de água destilada. Após a incubação por 60 minutos a 40°C, o produto foi diluído 10X e utilizado nas reações em cadeia da polimerase (PCR).

4.4 Amplificação das regiões codificadoras das proteínas DRBs, DCLs e AGOs

Para amplificar as sequências codificadoras (CDS) dos genes das 5 proteínas DRBs, 2 proteínas AGOs e 2 proteínas DCLs, nove pares de *primers* foram projetados utilizando o *software* Primer3plus v2.3.5, baseado nas sequências depositadas no banco de dados Phytozome v.10. Os pares de *primers* utilizados para amplificar cada sequência, bem como os tamanhos dos fragmentos amplificados estão descritos na Tabela 2. Para a amplificação das regiões codificadoras das cinco proteínas DRBs, foram realizadas reações de PCR partindo de um *input* inicial de 5 µL de cDNA 1:10. As reações foram realizadas em um volume total de 20 µL, constituídas de 4 µL de tampão 5X, 0,8 µL de 5mM dNTP, 1 µL do primer direto (10 µM) e 1 µL do primer reverso (10 µM), 0,2 µL da enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB). A enzima DNA polimerase de alta fidelidade Phusion possui uma taxa de erro 50 vezes menor que a *Taq* DNA polimerase sendo indicada para clonagem gênica. A temperatura de anelamento para os *primers* das DRBs, AGOs e DCLs permaneceu o mesmo, visto que as proteínas têm a mesma temperatura de anelamento. O que variou para cada amostra foi o tempo de reação para a extensão dos *primers*. Para cada reação foi utilizado o seguinte programa de PCR: 94°C por 2 minutos para a etapa da primeira desnaturação, 94°C por 30 segundos para demais desnaturações do ciclo, 60°C / 72°C por 30 segundos para a etapa do anelamento dos *primers*, 72°C, com tempo variante de acordo com o tamanho do fragmento, para a etapa de extensão dos *primers*. Estas etapas passaram por 35 ciclos. Após os produtos de amplificação foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados sob luz UV e imagem digital gerada por meio do sistema Gel-Doc (Bio-Rad). As bandas corretas foram extraídas do gel e purificadas via Wizard SV gel and PCR clean-up System (Promega).

Tabela 2. Sequências dos *primers* projetados para amplificação das CDS de cada DRB, AGO e DCL, temperaturas de anelamento e tamanho dos amplicons.

Primer ID		Sequência 5' → 3'	T (°C)	Amplicon (pb)
DRB1	F	TATCTCgAgAAAAGAAATgACCTCCACTgATgTTTCC	60	1257
DRB1	R	AATAggATCCTCAATggTgATggTgATggTgTgCgTggCTTgCTTCTgTCTC	60	

DRB2	F	TATCTCgAgAAAAgAATgTATAAgAACCAgCTACAAGgT	60	1302
DRB2	R	AATAggATCCTCAATggTgATggTgATggTggATCTTTAggTTCTCCAgTCgCTC	60	
DRB3	F	TATCTCgAAAAgAATgTATAAAgAATCAgTTgCAAgAgC	60	1077
DRB3	R	AATAggATCCTCAATggTgATggTgATggTgATTTggTAATgACTTCTTCTCTTg	60	
DRB4	F	TATCTCgAgAAAAgAATggATCATgTATACAAAggTCAAC	60	1065
DRB4	R	AATAggATCCTCAATggTgATggTgATggTgTggCTTCACAAgACgATAggC	60	
DRB5	F	TATCTCgAgAAAAgAATgTATAAgAATCAgCTTCAAgAgC	60	1190
DRB5	R	AATAggATCCTCAATggTgATggTgATggTgACTATCATgggTTTgATCCAAAAT	60	
AGO1	F	ATggTgAgAAAgAgAAgAACggA	56	3153
AGO1	R	TCAgCAgTAgAACATgACACg	57	
AGO2	F	ATggAgAgAggTggTTATCgAg	56	3045
AGO2	R	TCAgACgAAgAACATAACATTCTCA	54	
DCL1	F	ATggTAATggAggATgAgCC	54	5730
DCL1	R	TCAAgAAAAgTTTTATTTAAAAGCTC	50	
DCL3	F	ATgCATTCgTCgTTggAgC	56	4743
DCL3	R	CTACTTTTgTATTATgACgATCTTgCg	54	

4.5 Ligação dos amplicons em vetor de entrada pCR/8GW/TOPO-TA

Após as sequências codificadoras das DRBs terem sido amplificadas, a cada uma destas foi adicionada uma adenina na região 3' terminal, com a enzima Taq DNA polimerase. Para isso, foram misturados 7,8 µL de PCR purificado, 1,0 µL de tampão da Taq DNA polimerase, 1,0 µL de dATP (2 mM) e 0,2 µL da Taq DNA polimerase. A solução foi incubada por 20 minutos a 72°C. Esse passo foi realizado porque o vetor de entrada pCR/8GW/TOPO-TA possui uma timina em excesso em ambas terminações 3'. Dessa forma, possibilita a ligação do fragmento no vetor de entrada. Para isso, 2,3 µL do produto de PCR, 0,2 µL do vetor de interesse (pCR/8GW/TOPO-TA) e com 0,5 µL de solução salina foram misturados e incubados a temperatura *overnight*. Esse vetor proporciona a recombinação através do sistema Gateway, o qual será recombinado com um vetor binário através dos sítios de recombinação *attL/attR* (Figura 5). Bactérias *Escherichia coli* termocompetentes, linhagem Omnimax, foram transformadas com os produtos de ligação através de choque térmico. Depois de descongeladas em gelo, em cada tubo contendo bactérias *E. Coli* foi adicionado 1 µL do vetor de interesse. Depois de incubadas por 30 minutos em gelo, as bactérias foram submetidas a uma temperatura de 42°C por 1,5 minuto. Imediatamente, foram transferidas para o gelo por 5 minutos e então adicionado 1mL de meio Luria-Bertani

(LB) líquido. O tubo ficou sob agitação por 1 hora, a 180 rpm a 37°C. A cultura foi centrifugada por 3 minutos a 3.000 g para formar um concentrado das bactérias no fundo do tubo. Após retirar aproximadamente 600 µL do sobrenadante, as células foram ressuspensas no meio restante e plaqueadas em meio LB-ágar com os respectivos antibióticos de interesse. Como modo de seleção de células transformadas foi utilizado o antibiótico espectinomicina (100 µg/mL). Por fim, a placa foi mantida na estufa a 37°C entre 16 e 20 horas.

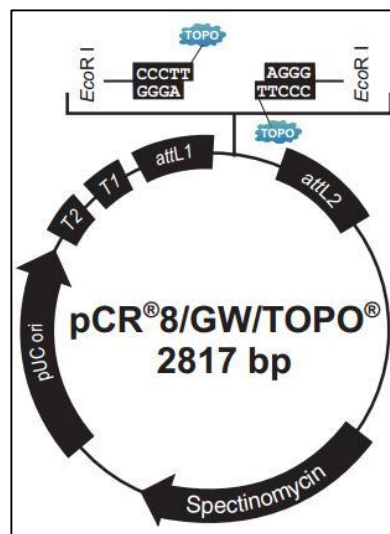


Figura 5. Mapa do vetor de entrada pCR/8GW/TOPO-TA. Vetor utilizado na inserção dos produtos de PCR e utilizado para posterior recombinação. Possui 2817 pb e apresenta gene que confere resistência a espectinomicina. Os sítios *attL* são reconhecidos por recombinases. Fonte: Manual pCR™8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit.

4.6 Confirmação das colônias transformadas

A fim de comprovar a transformação das bactérias com o vetor de interesse, foi realizado um PCR de colônia. As reações foram realizadas em um volume total de 20 µL, sendo 2 µL de tampão 10X, 0,6 µL de 1,2 mM MgCl₂, 0,4 µL de 5 mM dNTP, 0,4 µL do primer Direto (10 µM) e 0,4 µL do primer Reverso (10 µM), 0,2 µL da enzima Taq DNA polimerase, água destilada em quantidade suficiente para o volume final e uma colônia de interesse. A seguir, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1%. A corrida foi realizada em tampão TAE 1X (Tampão Tris-Acetate – Tris 40 mM, Ácido Acético 20mM, EDTA 0,5 M pH 8.0), a 100 V por 40 minutos. Após o término, o gel foi visualizado sob radiação ultravioleta.

As colônias positivas foram então incubadas *overnight* a 37°C em 5 mL de meio LB, contendo espectinomicina, para posterior extração do DNA plasmidial. Destes 5 mL da cultura bacteriana, 1 mL foi transferido para um microtubo e centrifugado por 3 minutos a 12.000 g. O sobrenadante foi descartado e o processo repetido, a fim de obter maior volume de cultura. O precipitado foi ressuspensionado em 100 µL de tampão TE 1X (10 mM Tris-HCl pH:8, 1 mM EDTA) e misturado em agitador. Em seguida, foram adicionados 100 µL do tampão de lise (0,2 M NaOH, SDS1%). O tubo foi agitado 10 vezes por inversão e depois de aguardar 5 minutos, foram adicionados 300 µL da solução de neutralização (3 M acetato de potássio/sódio pH:4-8,5-3). Após a solução ser novamente misturada por inversão até formar um precipitado branco, foi centrifugada por 10 minutos a 12.000g e o sobrenadante transferido, por inversão, para outro tubo. Foram adicionados 2 volumes de etanol 95% e após centrifugar por 15 minutos a 12.000 g, o sobrenadante foi descartado e o último passo repetido. Após seco à temperatura ambiente, o precipitado foi solubilizado em 100 µL de água. Para confirmar a correta inserção do cDNA de cada DRB no vetor de entrada foi realizado o sequenciamento por Sanger, e as sequências obtidas foram alinhadas via Clustal W, programa Mega 6.0, com a sequência esperada predita pela correta inserção do amplicon no vetor pCR/8GW/TOPO-TA.

4.7 Recombinação com os vetores para o teste de Y2H

Os vetores que foram confirmados as corretas inserções dos amplicons, foram então recombinados com os vetores binários pDEST para os teste de Y2H. Foram utilizados os dois vetores pDEST32 (contendo o domínio de ligação de Gal4) e pDEST22 (contendo o domínio de ativação de Gal4) (Figuras 6 e 7). Como o vetor de entrada pCR/8GW/TOPO-TA possui o sítio *attL*, foi utilizada a enzima clonase para a recombinação LR. A reação foi incubada a temperatura ambiente *overnight* 1 µL do plasmídeo linearizado, 2 µL de TE 1X, 1 µL do vetor de destino e 1 µL da enzima clonase LR. Na sequência, o volume total da reação foi utilizado na transformação de bactérias *E. Coli* Omnimax por choque térmico, conforme descrito no item 4.5. Como modo de seleção das colônias positivas para os produtos de recombinação, foram utilizados os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) para o vetor de destino pDEST22 e gentamicina (10 µg/mL) para o vetor de destino pDEST32.

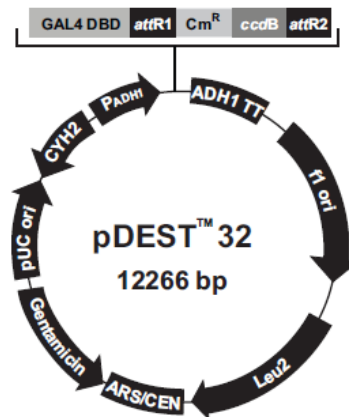


Figura 6. Mapa do vetor de destino pDEST32. Esse vetor possui 12266 pb e genes que conferem resistência à gentamicina e cloranfenicol, além de genes importantes (LEU2) para a biossíntese de leucina. É utilizado para produzir proteínas de interesse com o domínio BD de Gal4 fusionado em sua extremidade N-terminal. Os sítio *attR1* e *attR2* são reconhecidos por recombinases. Fonte: Manual Gateway® Technology.

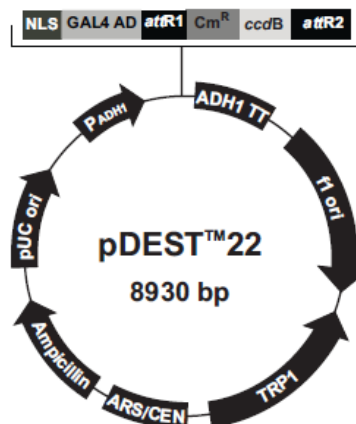


Figura 7. Mapa do vetor de destino pDEST22. Esse vetor possui 8930 pb e genes que conferem resistência à ampicilina e cloranfenicol, além de genes importantes (TRP1) para a biossíntese de triptofano. É utilizado para produzir proteínas de interesse com o domínio AD fusionado em sua extremidade N-terminal. Os sítio *attR1* e *attR2* são reconhecidos por recombinases. Fonte: Manual Gateway® Technology.

4.8 Co-transformação de levedura

Para posterior *screening* em meios seletivos, células competentes de *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Mav203, foram co-transformadas com as construções recombinadas. Uma colônia fresca da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, da linhagem Mav203, foi inoculada em 10 mL de meio YPD (*yeast peptone dextrose*)

e mantida sob agitação a 30°C até o dia seguinte. Depois de determinar a densidade óptica – OD (600 nm) e diluir a cultura para uma OD de 0,4 em 50 mL de meio YPD, a cultura permaneceu crescendo entre 2 e 4 horas. As células foram centrifugadas a 2.500 rpm por 4 minutos e o *pellet* foi ressuscitado em 40 mL de TE 1X. Novamente, as células passaram por esses processos e o *pellet* foi ressuscitado em 2 mL de LiAc 1X com TE 0,5X. As células foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Para cada transformação, foram misturados 1 µg do DNA plasmidial e 100 µg de DNA de espermatozoides de salmão denaturado, com 100 µL da suspensão de levedura do passo anterior. À essa solução foram acrescentados 700 µL de LiAc 1X/40% PEG3350/TE 1X. Após misturar bem, a solução foi incubada por 30 minutos a 30°C sob agitação de 200 rpm. Foram adicionados 88 µL de DMSO, para permeabilizar a parede celular, e a solução foi homogeneizada cuidadosamente. O passo seguinte foi dar choque térmico a 42°C por 7 minutos, seguido de centrifugação por 10 segundos/10.000rpm. O sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuscitado em 1 mL de TE 1X. Novamente, foi realizada a centrifugação e dessa vez o *pellet* foi ressuscitado em 100 µL de TE 1X. Cada célula recebeu dois vetores diferentes, cada um contendo a sequência codificadora de alguma DRB fusionada a um domínio, ora de ligação ao promotor, ora de ativação da RNA polimerase. Dessa forma, as células foram plaqueadas em meio de seleção YNB (*yeast nitrogen base*) sem os aminoácidos leucina (L) e triptofano (W). Após a co-transformação as células foram mantidas na estufa a 30°C por 3 dias. A confirmação de cada co-transformação foi realizada via PCR de colônia, de acordo com o item 4.6. O PCR foi realizado com *primers* anelando no vetor e o outro que anela no fragmento de interesse.

4.9 Ensaio de Y2H

A interação entre as proteínas DRBs através do ensaio de duplo híbrido foi realizada de acordo com o protocolo disponível no manual do Kit ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway Technology, Invitrogen. A partir de uma placa fresca da levedura co-transformada, uma colônia foi inoculada em 2 mL de meio líquido YNB sem aminoácidos. Depois de homogeneizar por agitação, 100 µL foram reservados. A densidade óptica (OD), em comprimento de onda de 600 nm, foi medida com os 1,9 mL restantes. Os valores das OD foram aproximados através de diluições com o meio YNB sem aminoácidos. Em uma placa de 96 poços foram feitas diluições seriadas de 5 pontos. Partindo de 100 µL das leveduras com OD's aproximadas, a cada 10 µL de

diluição foram acrescentados 90 μ L de meio YNB sem aminoácidos. Com a pipeta multi-canal, 7 μ L de cada poço da placa de 96 foram aplicados nas respectivas placas seletivas (Figura 8). Cada levedura co-transformada foi submetida a diferentes meios seletivos, como mostra a Tabela 3, e então as placas foram incubadas na estufa a 30°C por 4 dias.

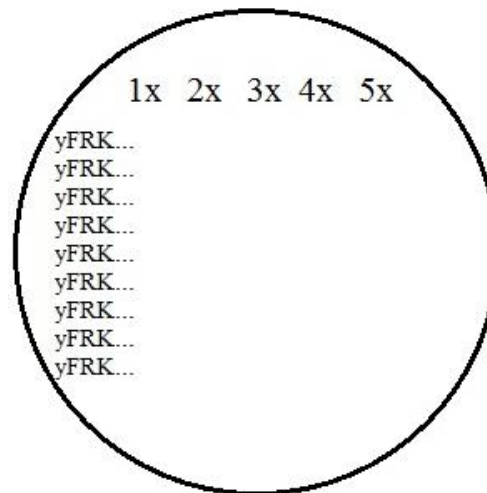


Figura 8. Mapa de distribuição das diluições nas placas seletivas. Utilizada para análise de interação entre proteínas via sistema de duplo híbrido. Nas linhas estão as diluições seriadas de cinco pontos (1:10) e nas colunas são as diferentes co-transformações testadas quanto à interação das proteínas.

Tabela 3. Meios de cultura utilizados no teste de Y2H, com suas descrições.

Meio de Cultura	Características
YNB -L -W	Meio sem aminoácidos Leucina e Triptofano
YNB -L -W -H	Meio sem aminoácidos Leucina, Triptofano e Histidina
YNB -L -W -H 1 mM 3AT	Meio sem aminoácidos Leucina, Triptofano e Histidina, com 1 mM de 3AT
YNB -L -W -H 5 mM 3AT	Meio sem aminoácidos Leucina, Triptofano e Histidina, com 5 mM de 3AT
YNB -L -W -H 10 mM 3AT	Meio sem aminoácidos Leucina, Triptofano e Histidina, com 10 mM de 3AT
YNB -L -W -H 50 mM 3AT	Meio sem aminoácidos Leucina, Triptofano e Histidina, com 50 mM de 3AT
YNB -L -W -H 100 mM 3AT	Meio sem aminoácidos Leucina, Triptofano e Histidina, com 100 mM de 3AT

5. Resultados

5.1 Confirmação da amplificação das CDSs de DRBs, AGOs e DCLs.

Os fragmentos de cada uma das cinco DRBs, amplificados por PCR, foram examinados em gel de agarose a 1%. Em relação às AGOs e DCLs, vários parâmetros, como diferentes temperaturas de anelamento dos primers (testando um gradiente), bem como diferentes polimerases (testadas as enzimas Taq e Phusion), foram modificados a fim de obter a amplificação. Entretanto, não foi possível amplificar os fragmentos e, dessa forma, o trabalho deu continuidade somente com as DRBs. As bandas que corresponderam ao tamanho esperado da região codificadora (CDS) de cada gene de DRB foram extraídas e purificadas do gel (Figura 9).

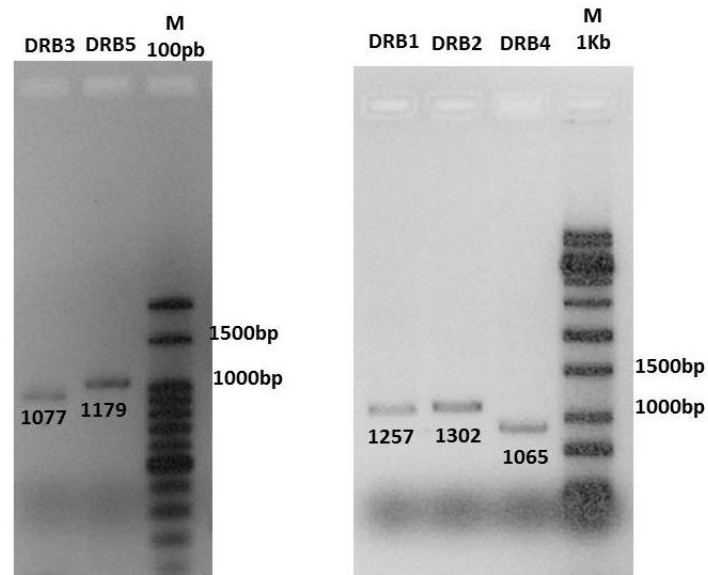


Figura 9. Confirmação da amplificação das CDSs das DRBs de *A. thaliana* via eletroforese em gel de agarose a 1%. O tamanho dos fragmentos esperados em pares de bases (pb) estão indicados abaixo de cada banda. M representa o marcador de peso molecular de 100 pb e 1 kb.

5.2 Ligação dos amplicons em vetor de entrada pCR/8GW/TOPO-TA

As sequências codificadoras das DRBs foram clonadas no vetor de entrada pCR/8GW/TOPO-TA e os plasmídeos nos quais foram confirmadas as clonagens corretas receberam códigos (Tabela 4). Estes novos plasmídeos foram utilizados para a recombinação com vetores binários.

Tabela 4. Códigos dos plasmídeos dos quais tiveram sua ligação confirmada.

ID	Vetor	Descrição
pFRK030	pCR8GW TOPO	CDS_DRB4
pFRK031	pCR8GW TOPO	CDS_DRB5
pFRK032	pCR8GW TOPO	CDS_DRB1
pFRK033	pCR8GW TOPO	CDS_DRB2
pFRK034	pCR8GW TOPO	CDS_DRB3

5.3 Reações de recombinação

As colônias que cresceram na placa contendo meio LB e espectinomicina como marca de resistência foram verificadas quanto a presença do inserto por PCR de colônia e análise em eletroforese em gel de agarose 1%. Posteriormente, foi feita a extração do DNA plasmidial (miniprep), seguido de sequenciamento a fim de confirmar a inserção correta (Figura 10). Os plasmídeos nos quais foram confirmadas as recombinações corretas receberam códigos (Tabela 5) e foram utilizados para as análises de interação via duplo híbrido de levedura.

Tabela 5. Códigos dos plasmídeos recombinados com vetores de destino pDEST32 e pDEST22.

Proteína	Vetor	Resistência	Descrição	Novo plasmídeo
DRB4	pDEST22	Ampicilina	CDS_DRB4 + GAL4AD	pFRK042
DRB4	pDEST32	Gentamicina	CDS_DRB4 + GAL4BD	pFRK043
DRB1	pDEST22	Ampicilina	CDS_DRB1 + GAL4AD	pFRK044
DRB3	pDEST32	Gentamicina	CDS_DRB3 + GAL4BD	pFRK045
DRB2	pDEST32	Gentamicina	CDS_DRB2 + GAL4BD	pFRK046
DRB3	pDEST22	Ampicilina	CDS_DRB3 + GAL4AD	pFRK047
DRB2	pDEST22	Ampicilina	CDS_DRB2 + GAL4AD	pFRK048
DRB5	pDEST32	Gentamicina	CDS_DBR5 + GAL4BD	pFRK049
DRB5	pDEST22	Ampicilina	CDS_DRB5 + GAL4AD	pFRK050
DRB1	pDEST32	Gentamicina	CDS_DRB1 + GAL4BD	pFRK051

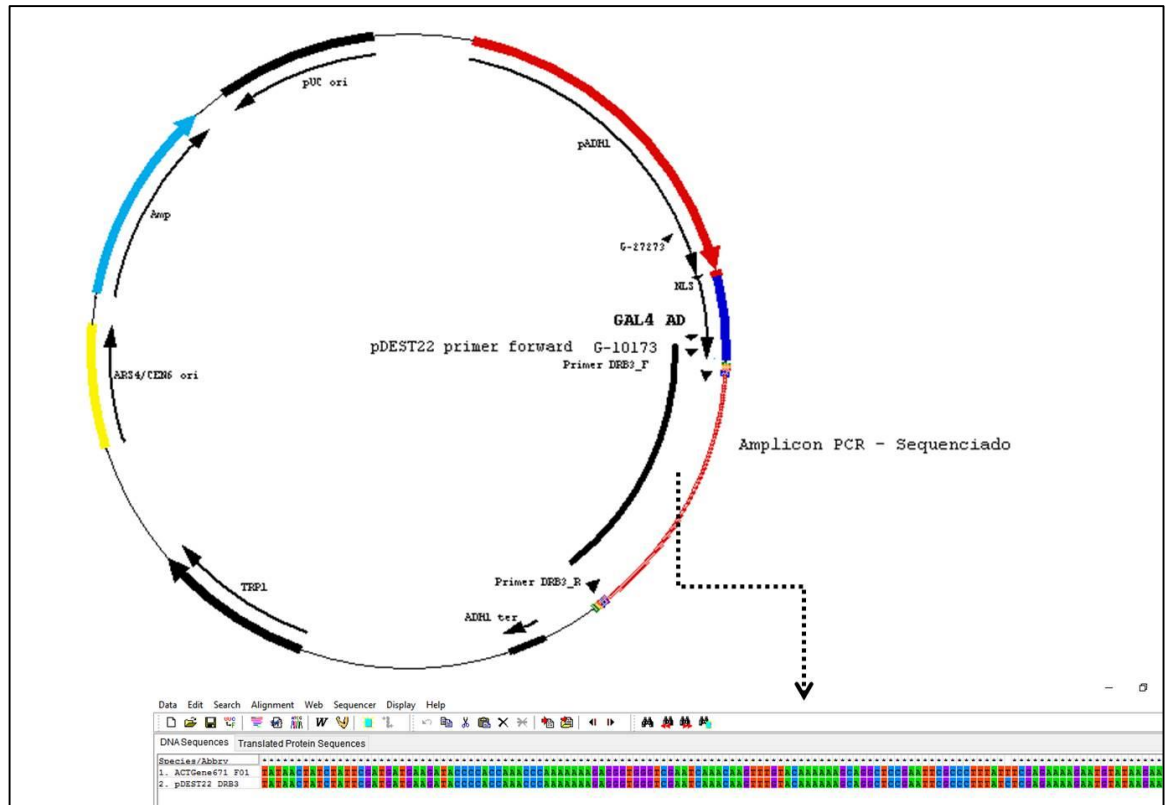


Figura 10. Confirmação das inserções em vetores de destino via sequenciamento.

Os novos plasmídeos foram sequenciados e confirmados quanto à correta inserção do amplicon. Após o sequenciamento, o alinhamento foi realizado no programa Mega 6.0, via Clustal W.

5.4 Co-transformação de levedura

Após feitas todas as combinações possíveis entre as sequências codificadoras das 5 DRBs e os vetores de expressão do sistema duplo híbrido (pDEST32 e pDEST22), foram obtidas 23 leveduras co-transformadas (Figura 11). Cada nova construção recebeu um código. Como houve interação entre DRB2/pDEST32 + DRB2/pDEST22 e DRB4/pDEST32 + DRB4/pDEST22, foram construídos dois controles negativos, onde o domínio de ativação da RNA polimerase não possuía nenhuma DRB fusionada a si (Tabela 6).

Tabela 6. Códigos das leveduras co-transformadas com os vetores de destino.

Proteína	Vetor		Proteína	Vetor	Nova construção
DRB 3	pDEST32	+	DRB 3	pDEST 22	yFRK 050
DRB 4	pDEST32	+	DRB 4	pDEST 22	yFRK 051
DRB 3	pDEST32	+	DRB 4	pDEST 22	yFRK 052
DRB 2	pDEST32	+	DRB 2	pDEST 22	yFRK 053
DRB 5	pDEST32	+	DRB 1	pDEST 22	yFRK 054
DRB 2	pDEST32	+	DRB 1	pDEST 22	yFRK 055
DRB 4	pDEST32	+	DRB 1	pDEST 22	yFRK 056
DRB 1	pDEST32	+	DRB 1	pDEST 22	yFRK 057
DRB 3	pDEST32	+	DRB 1	pDEST 22	yFRK 058
DRB 4	pDEST32	+	DRB 2	pDEST 22	yFRK 059
DRB 3	pDEST32	+	DRB 2	pDEST 22	yFRK 060
DRB 5	pDEST32	+	DRB 4	pDEST 22	yFRK 061
DRB 5	pDEST32	+	DRB 2	pDEST 22	yFRK 062
DRB 4	pDEST32	+	DRB 3	pDEST 22	yFRK 063
DRB 5	pDEST32	+	DRB 5	pDEST 22	yFRK 064
DRB 5	pDEST32	+	DRB 3	pDEST 22	yFRK 065
DRB 1	pDEST32	+	DRB 3	pDEST 22	yFRK 066
DRB 2	pDEST32	+	DRB 3	pDEST 22	yFRK 067
DRB 1	pDEST32	+	DRB 4	pDEST 22	yFRK 068
DRB 2	pDEST32	+	DRB 4	pDEST 22	yFRK 069
DRB 3	pDEST32	+	DRB 4	pDEST 22	yFRK 070
DRB 4	pDEST32	+	DRB 5	pDEST 22	yFRK 071
DRB 3	pDEST32	+	DRB 5	pDEST 22	yFRK 072
DRB 4	pDEST32	+	-	pDEST 22	yFRK 073
DRB 2	pDEST32	+	-	pDEST 22	yFRK 074

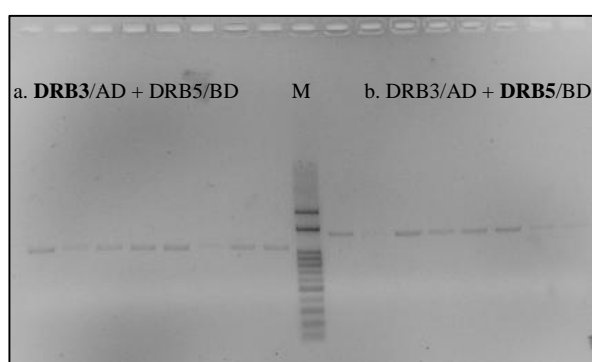


Figura 11. Co-transformação confirmada via PCR de colônia e eletroforese em gel de agarose 1%. Para o PCR de colônia, foi utilizado um *primer* para anelar no fragmento de interesse (em a. DRB3 e em b. DRB5) e o outro *primer* para anelar no vetor. Tamanho da banda esperada em a.~1.200 pb e da banda em b.~1500 pb. M= marcador de peso molecular de 100 pb.

5.5 Confirmação de interação pela técnica de Y2H em levedura

O método utilizado nesse trabalho para analisar as interações entre as proteínas DRBs foi o de duplo híbrido em levedura. Nessa técnica, quando há interação proteína-proteína o fator de transcrição GAL4 é ativado e possibilita a transcrição do aminoácido histidina. Dessa forma, as leveduras co-transformadas foram crescidas em placas com meios seletivos sem os aminoácidos leucina (L), triptofano (W) e histidina (H). Além disso, foram submetidas em placas com diferentes concentrações de 3-amino-triazole (3AT): 1 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM. Num primeiro momento foi analisado um grupo de interações. Das 23 novas construções de leveduras geradas, foram escolhidas 16 para se testar a interação. Como cada uma das 5 DRBs foi fusionada ora no domínio de ligação ao DNA (BD) ora no domínio de ativação da RNA polimerase (AD), com apenas 16 construções foi possível testar todas as possíveis combinações entre as diferentes duplas domínio/proteína, de forma que não houvesse repetições entre os domínios com as proteínas fusionadas. O TESTE 1 foi feito em triplicata, em dias diferentes, e as leveduras que cresceram indicando interações entre as DRBs testadas, foram selecionadas para o TESTE 2, onde as sequências das DRBs foram fusionadas a domínios contrários ao teste 1, a fim de observar se a ordem afetaria as interações. Desta vez o teste foi feito em apenas uma replicata. (Tabela 7). Os pares de proteínas que, independente da ordem de fusão, se desenvolveram nos meios seletivos (Figura 12), foram considerados como interação proteína-proteína positiva. A Figura 13 é uma ilustração simbólica para ilustrar as interações descobertas no presente trabalho.

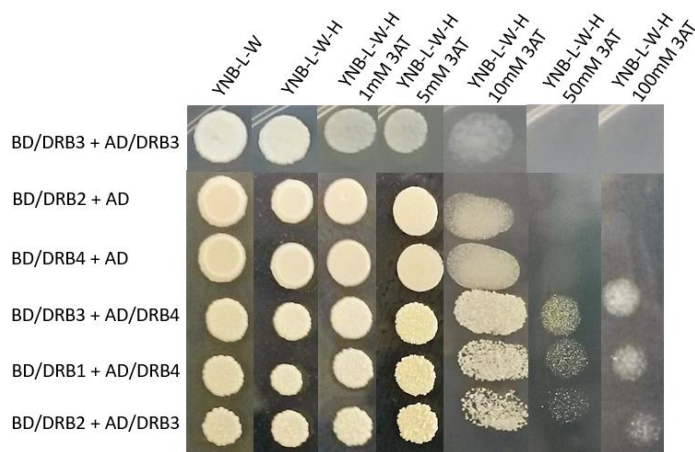


Figura 12. Análise da interação entre proteínas por meio de Y2H em levedura. Cada linha representa diferentes co-transformações. Cada coluna representa o crescimento dessa levedura, em diferentes meios e concentrações de 3AT, na diluição de 1X.

Tabela 7. Grupo de leveduras selecionado para testar as interações.

TESTE 1						TESTE 2			
Binding Domain (BD)	Activation Domain (AD)	yFRK....	1 ^a	2 ^a	3 ^a	Binding Domain (BD)	Activation Domain (AD)	yFRK....	1 ^a
pDEST 32	pDEST 22					pDEST 32	pDEST 22		
DRB1	DRB1	yFRK 057							
DRB2	DRB1	yFRK 055							
DRB2	DRB2	yFRK 053	✓	✓	✓				
DRB3	DRB1	yFRK 058		✓	✓	DRB1	DRB3	yFRK066	
DRB3	DRB2	yFRK 060			✓	DRB2	DRB3	yFRK067	✓
DRB3	DRB3	yFRK 050							
DRB3	DRB4	yFRK 052							
DRB4	DRB1	yFRK 056		✓	✓	DRB1	DRB4	yFRK068	✓
DRB4	DRB2	yFRK 059			✓	DRB2	DRB4	yFRL069	
DRB4	DRB3	yFRK 063		✓	✓	DRB3	DRB4	yFRK070	✓
DRB4	DRB4	yFRK 051		✓	✓				
DRB5	DRB1	yFRK 054							
DRB5	DRB2	yFRk 062							
DRB5	DRB3	yFRK 065							
DRB5	DRB4	yFRK 061							
DRB5	DRB5	yFRK064							

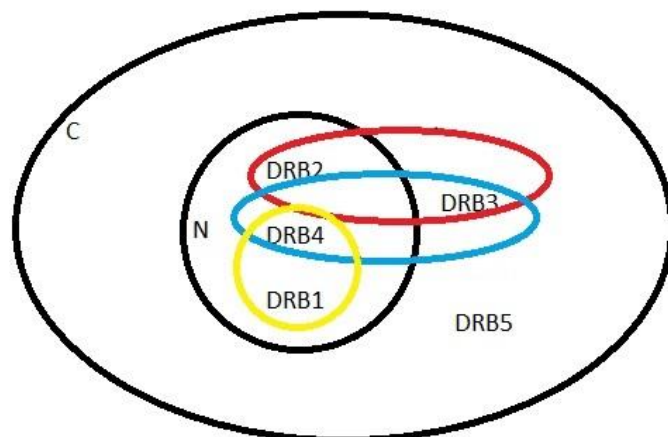


Figura 13. Network das interações entre proteínas DRBs. Interações detectadas via Y2H entre a cinco DRBs (elipses) e localizações sub-celulares previamente previstas para estas proteínas (N: núcleo; C: citoplasma).

6. Discussão

Um dos mecanismos celulares responsáveis pelo silenciamento gênico é a interferência por RNA (RNAi), que tem como alvo uma molécula de mRNA e pode ocasionar o silenciamento gênico pela degradação deste, ou pela inibição da tradução. Em plantas, uma das principais vias de silenciamento de RNA é mediada por miRNAs, que são pequenas moléculas de RNA (21~25 nt) não codificadoras de proteínas. A biogênese dos miRNAs envolve diversas proteínas e enzimas, dentre elas, DCL e AGO. Na planta modelo, *A. thaliana* já foram descritas 10 proteínas AGO, 4 proteínas DCL e 5 proteínas DRBs. Já que diferentes combinações de proteínas que se ligam ao RNA podem resultar em diferentes respostas celulares, é importante compreender como é a interação entre estas proteínas e como isto irá afetar a regulação da expressão gênica. Neste trabalho, as sequências codificadoras somente das proteínas DRB foram inseridas em vetor de entrada. Não foi possível amplificar as sequências codificadoras das AGO nem das DCL, mesmo quando testadas sob diferentes condições de temperatura e com duas enzimas diferentes (Taq e Phusion). Um dos possíveis fatores a dificultar esta amplificação pode ser devido o grande tamanho (bp) das sequências CDS de DCL e AGO. Com as sequências das DRBs contidas no vetor de entrada pCR/8GW/TOPO-TA, este foi recombinado com os vetores de destino pDEST32 e pDEST22, através da recombinação LR. Das 23 novas construções das leveduras, testamos pelo Y2H 16 combinações, para que não houvesse repetição entre elas. Estas leveduras foram submetidas a diferentes meios, tanto com o aminoácido histidina, quanto sem a presença deste, como forma de controle de crescimento das colônias. Além disso, foram testadas em diferentes concentrações (1 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM e 100 mM) de 3AT, que é um inibidor que compete pelo produto do gene HIS3, cujo produto é a histidina. Das possíveis interações positivas provenientes dessas 16, fizemos o mesmo teste, porém com as CDSs das DRBs fusionadas ao outro domínio. Isso foi feito como uma prova real da interação, para confirmar que, independente do domínio nos quais estão fusionadas, elas interagem. Três pares de proteínas interagiram, independentes dos domínios fusionados, e mesmo em altas concentrações de 3AT. Foram eles: DRB1 com DRB4 (ambas encontradas no núcleo), DRB2 com DRB3 (encontradas no núcleo e no citoplasma, respectivamente) e DRB4 com DRB3 (encontradas no núcleo e no citoplasma, respectivamente). O mais interessante foi no que se trata à DRB3, visto que na literatura pouco se sabe sobre ela e sobre suas interações com outras proteínas. Em 2012, Eamens e colaboradores sugeriram que as

DRB3 e DRB5 são necessárias para a regulação da expressão de genes alvo de miRNAs associados à DRB2. Além disso, propuseram uma via “não-clássica” para o silenciamento de RNA, no qual a proteína DRB que interage com a DCL1 no núcleo, no lugar da DRB1, que leva à clivagem do mRNA, seria a DRB2. Esse modelo ainda propôs que a fita guia de miRNA poderia se associar a outra AGO e/ou com outras proteínas DRBs, entre elas DRB3 e DRB5, que até então são ditas proteínas citoplasmáticas. De acordo com o presente trabalho, pôde-se comprovar que realmente há interação entre a proteína DRB3 e DRB2, e talvez a localização sub-celular previamente descrita para a proteína DRB3 seja passiva de correção. Dessa forma, é possível que DRB2 e DRB4 recrutem a DRB3 para auxiliar na via de biogênese de miRNAs, ou que a DRB3 “atraia” as DRBs nucleares para o citoplasma. Entretanto não se pode afirmar isso para a relação DRB3-DRB1, visto que não houve interação entre estas. Assim, a DRB3 possui uma atuação estática, quando no citoplasma, e dinâmica, quando se desloca para o núcleo. Dessa forma, como próximos passos têm-se de comprovar a localização exata da interação dessas proteínas e saber quais os impactos e as consequências que a falta dessa interação proteína-proteína poderá trazer para a planta.

7. Perspectivas

1. Amplificação e clonagem das proteínas AGO1, AGO2, DCL1 e DCL3;
2. Testar se há interação dessas proteínas entre si e com as DRBs, por meio da técnica de duplo híbrido.
3. Analisar as interações entre as DRBs por ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC).
4. Localizar sub-celularmente estas proteínas.

8. Referências

- Bartel, D.P. (2004). **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell* 116, 281-297.
- Bartel, D.P. (2009). **MicroRNAs: target recognition and regulatory functions.** *Cell* 136, 215-233.
- Bernstein E, Caudy A.A., Hammond S.M., Hannon G.J. (2001). **Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference.** *Nature* 409 (6818):363-6.
- Borges, F. e Martienssen, R.A. (2015). **The expanding world of small RNAs in plants.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 16, 727-41.
- Bouche, N., Laressergues, D., Gascioli, V., Vaucheret, H. (2006). **An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs.** *EMBO J* 25:3347–3356.
- Chen, X. (2005). **MicroRNA biogenesis and function in plants.** *FEBS Lett* 579, 5923-5931.
- Chuck, G., Candela, H., and Hake, S. (2009) **Big impacts by small RNAs in plant development.** *Curr Opin Plant Biol* 12, 81-86.
- Curtin, S.J., Watson, J.M., Smith, N.A., Eamens, A.L., Blanchard, C.L. (2008). **The roles of plant dsRNA-binding proteins in RNA-like pathways.** *FEBS Letts* 582:2753–276.
- Daxinger, L., Kanno, T., Bucher, E., van der Winden, J., Naumann, U., Matzke, A.J. and Matzke, M. (2009) **A stepwise pathway for biogenesis of 24-nt secondary siRNAs and spreading of DNA methylation.** *EMBO J.* 28, 48–57.
- Deleris A., Gallego-Bartolome, J., Bao J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., and Voinnet, O. (2006). **Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense.** *Science* 313, 68-71.
- Ding, S.-W. and Voinnet, O. (2007). **Antiviral immunity directed by small RNAs.** *Cell* 10, 413–426.
- Eamens, A.L., Curtin, S., Waterhouse, P.M. (2011). **The Arabidopsis thaliana Double-Stranded RNA Binding (DRB) Domain Protein Family.** *RNA Technologies* pp385-406.
- Eamens, A.L., Kim, W.K., Curtin, S.J., Waterhouse, P. (2012). **DRB2 Is Required for MicroRNA Biogenesis in Arabidopsis thaliana.** *Plos One* 7(4):e35933.

- Eamens, A.L., Smith, N.A., Curtin, S., Wang, M-B, Waterhouse, P.M. (2009). **The Arabidopsis thaliana double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes.** *RNA* 15, 2219-35.
- Eamens, A.L., Wook, K.K., Waterhouse, P.M. (2012). **DRB2, DRB3 and DRB5 function in a non-canonical microRNA pathway in Arabidopsis thaliana.** *Plant Signal Behav* 7:1224-1229.
- Fierro-Monti, I. and Mathews, M.B. (2000). **Proteins binding to duplexed RNA: one motif, multiple functions.** *Trends Biochem. Sci* 25, 241–246.
- Gale, M.Jr., Tan, S.L., Katze, M.G. (2000). **Translational control of viral gene expression in eukaryotes.** *Microbiol Mol Biol* 64, 239-80.
- Griffiths-Jones, S. (2004). **The microRNA Registry.** *Nucleic Acids Res* 32, D109-11.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., and Enright, A.J. (2006). **miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature.** *Nucleic Acids Res* 34, D140-144.
- Griffiths-Jones, S., Saini, van Dongen, S., and Enright, A.J. (2008). **miRBase: tools for microRNA genomics.** *Nucleic Acids Res* 36, D154-158.
- Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., Mello, C.C. (2001). **Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. elegans developmental timing.** *Cell* 106, 23-34.
- Hammond, S. M. (2005). **Dicing and slicing: The core machinery of the RNA interference pathway.** *FEBS Lett* 579, 5822–582.
- Hammond, S. M.; Bernstein, E.; Beach, D.; Hannon, G. J. (2004). **An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells.** *Nature* v.404, p.293-296.
- Han, M.H., Goud, S., Song, L. and Fedoroff, N. (2004). **The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation.** *Proc Natl Acad* 101(4), 1093-8
- Henderson, I.R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B.C., Green, P.J., Jacobsen, S.E. (2006). **Dissecting Arabidopsis thaliana DICER function in small RNA processing, gene silencing, and DNA methylation patterning.** *Nat Genet* 38, 721–725.

Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., Koiwa, H., Seki, M., Shinozaki, K., Fukuhara, T. (2005). **Specific interactions between dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana***. *Plant Mol Biol* 57, 173–188.

Höck, J., Meister, G. (2008). **The Argonaute protein family**. *Genome Biol* 9(2),210.

Jones-Rhoades, M.W., and Bartel, B. (2004). **Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA**. *Mol Cell* 14(6),787-99.

Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Bartel, B. (2006). **MicroRNAs and their regulatory roles in plants**. *Annu Rev Plant Biol* 57, 19-53.

Joung, J., Ramm, E., Pabo, C. (2000), “**A bacterial two hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions**”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* v. 97, n. 13, p. 7382-7387.

Keegan, L., Gill, G., Ptashne, M. (1986). **Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein**. *Science* v. 231, p. 699-704.

Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., Plasterk, R.H. (2001). **Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*** *Genes* 15(20): 2654–2659.

Knight, S.W., and Bass, B.L. (2001). **A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans***. *Science* 293(5538),2269-71.

Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2010). **miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data**. *Nucleic Acids Res* 39, D152–D157.

Kurihara, Y., Takashi, Y., and Watanabe, Y. (2006). **The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis**. *RNA* 12, 206-212.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). **The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14***. *Cell* 75, 843–854.

- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H. (2004). **MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.** *Embo J* 23(20):4051-60.
- Lelandais-Briere, C., Sorin, C., Declerck, M., Benslimane, A., Crespi, M., and Hartmann, C. (2010) **Small RNA Diversity in plants and its impact in development.** *Curr Genomics* 11, 14-23.
- Liu, Q., and Chen, Y.-Q. (2009) **Insight into the mechanism of plant development: interactions of miRNA pathway with phytohormone response.** *Biochem Biophys Res Commun* 384, 1-5.
- Liu, Q., Feng, Y., and Zhu, Z. (2009). **Dicer-like (DCL) proteins in plants.** *Funct Integr Genomics* 9, 277–286.
- Liu, Q., Yan, Q., Liu, Y., Hong, F., Sun, Z., Shi, L., and Fang, Y. (2013). **Complementation of Hyponastic Leaves1 by Double-Strand RNA-Binding Domains of Dicer-Like1 in Nuclear Dicing Bodies.** *Plant Physiology* Vol. 163, No. 1. pp. 108-117.
- Lu, C. and Fedoroff, N. (2000). **A mutation in the Arabidopsis HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin.** *Plant Cell* 12, 2351–2366.
- Lu, Y.D., Gan, Q.H., Chi, X.Y., and Qin, S. (2008b). **Roles of microRNA in plant defense and virus offense interaction.** *Plant Cell Rep* 27, 1571-1579.
- Mallory, A.C., and Vaucheret, H. (2006). **Functions of microRNAs and related small RNAs in plants.** *Nat Genet* 38 *Suppl*, S31-36.
- Margis, R., Fusaro, A.F., Smith, N.A., Curtin, S.J., Watson, J.M., Finnegan, E.J., and Waterhouse, P.M. (2006). **The evolution and diversification of dicers in plants.** *FEBS Lett.* 580, 2442–2450.
- Meister, G., and Tuschl, T. (2004). **Mechanisms of gene silencing by double stranded RNA.** *Nature* 431,343-9.
- Mi, S. (2008). **Sorting of small RNAs into Arabidopsis Argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide.** *Cell* 133, 116–127.
- Mlotshwa, S., Pruss, G.J., Peragine, A., Endres, M.W., Li J., Chen X, Poethig, R.S., Bowman, L.H., Vance, V. (2008). **DICER-LIKE2 plays a primary role in transitive silencing of transgenes in Arabidopsis.** *Plos One* 3: e1755.
- Nakazawa, Y., Hiraguri, A., Moriyama, H. and Fukuhara, T. (2007). **The dsRNA-binding protein DRB4 interacts with the dicer-like protein DCL4 in vivo and functions in the trans-acting siRNA pathway.** *Plant Mol Biol* 63, 777–785.

- Park, W., Li J, Song, R., Messing, J., Chen X. (2002). **CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*.** *Curr Biol* 12, 1484–1495.
- Pe'lissier T., Clavel, M., Chaparro, C., Pouch-Pe'lissier M-N, Vaucheret, H. (2011). **Double-stranded RNA binding proteins DRB2 and DRB4 have an antagonistic impact on polymerase IV-dependent siRNA levels in *Arabidopsis*.** *RNA* 17, 1502–1510.
- Qu, F., Ye, X., Morris, T.J. (2008). ***Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1.** *Proc Natl Acad Sci* 105(38):14732-7.
- Rand, T.A., Petersen, S., Du F, Wang X. (2005). **Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation.** *Cell* 123(4):621-9.
- Reinhart, B.J., and Bartel, D.P. (2002). **Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats.** *Science* 279, 1831.
- Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lee P. Lim, Burge, C.B., Bartel, B. (2002). **Prediction of Plant MicroRNA Targets.** *Cell* Vol. 110, 513–520.
- Rivas, F.V., Tolia, N.H., Song, J.J., Aragon, J.P., Liu, J., Hannon, G.J. (2005). **Purified Argonaute2 and a siRNA form recombinant human RISC.** *Nat Struct Mol Biol* 12(4):340-9.
- Ryter, J.M. and Schultz, S.C. (1998). **Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA.** *EMBO J* 17,7505–7513.
- Saunders, L.R. and Barber, G.N. (2003). **The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions.** *FASEB* 17, 961–983.
- Shukla, L.I., Chinnuasamy, V., and Sunkar, R. (2008). **The role of microRNAs and other endogenous small RNAs in plant stress responses.** *Biochim Biophys Acta* 1779, 743-748.
- Song, L, Han, M.H., Lesicka, J., and Fedoroff, N. (2007). ***Arabidopsis* primary microRNA processing proteins HYL1 and DCL1 define a nuclear body distinct from the Cajal body.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5437-5442.
- Song, Q.W., Liu, Y.F., Hu, X.Y., Zhang, W.K., Ma, B., Chen, S.Y., and Zhang, J.S. (2011). **Identification of miRNAs and their target genes in developing soybean seeds by deep sequencing.** *BMC Plant Biol* 11, 5.

- St Johnston, D., Brown, N.H., Gall, J.G. and Jantsch, M. (1992). **A conserved double-stranded RNA-binding domain.** *Proc Nat Acad Sci* 89, 10979–1098.
- Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M. & Watanabe, Y. (2008). **The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins.** *Plant Cell Physiol.* 49, 493–500.
- Tian, B., Bevilacqua P.C., Diegelman-Parente A., and Mathews M.B. (2004). **The double-stranded-RNA-binding motif: interference and much more.** *Nat Ver Mol Cell Biol* 5, 1013-23.
- Xie, Z., Kasschau, K.D., and Carrington, J.C. (2003). **Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation.** *Curr Biol* 13, 784-789.
- Yang, T, Xue, L., and An, L. (2007) **Functional diversity of miRNA in plants.** *Plant Science* 172, 423-432.
- Young, K. (1998). **“Yeast two-hybrid: so many interactions, (in) so little time.”** *Biology of Reproduction* v. 58, n. 2, p. 302-311.
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R, and Chen, K. (2005). **Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis.** *Science* 307, 932-935.