

**IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS ESTs DE *Eucalyptus* RELACIONADOS A GENES RESPONSÁVEIS PELO ALONGAMENTO CELULAR (NOTA CIENTÍFICA)<sup>1</sup>**

**IDENTIFICATION OF POSSIBLE ESTs OF *Eucalyptus* RELATED TO GENES RESPONSIBLE FOR CELL ELONGATION (SCIENTIFIC NOTE)**

Léo ZIMBACK<sup>2, 6</sup>; Edson Seizo MORI<sup>3</sup>; Mario Luiz Teixeira de MORAES<sup>4</sup>;  
Daniel Dias ROSA<sup>3</sup>; Edson Luiz FURTADO<sup>3</sup>; Celso Luis MARINO<sup>5</sup>;  
Ivan de Godoy MAIA<sup>5</sup>; Carlos Frederico WILCKEN<sup>3</sup>;  
Edivaldo Domingues VELINI<sup>3</sup>; Iraê Amaral GUERRINI<sup>3</sup>; Hideyo AOKI<sup>2</sup>

**RESUMO** – O objetivo deste estudo foi buscar *in silico* os ESTs do Banco de dados do Genoma de *Eucalyptus* (FORESTs, 2001) correlacionados com genes de alongamento celular envolvidos com crescimento de forma geral. Utilizando bibliotecas de cDNA, nós identificamos agrupamentos de ESTs semelhantes às proteínas controlando alongamento celular registradas no National Center of Biotechnologies Information – NCBI (2002). A busca mostrou similaridade para os seguintes agrupamentos de ESTs: o agrupamento EGEZLV2207D07.g com a enzima esterol delta redutase, EGEQRT4200A01.g com a proteína LKB biossintética de brassinosteróide, EGJMLV2220C06.g com EMBL-transportador mitocondrial half ABC, EGACST6260F07.g e EGMCFB1086B12.g com esterol 22 alfa hidroxilase (CYP90) (P450) e EGEQSL1051D09.g com EGEZSL5201E08.g para a proteína copine.

Palavras-chave: cDNA; mRNA; alinhamento de sequência; similaridade protéica.

**ABSTRACT** – The objective of study was *in silico* mining of ESTs from *Eucalyptus* ESTs database (FORESTs, 2001) correlated with cell elongation genes of growth character. Using cDNA libraries, we identified similar EST clusters to the proteins involved on control of cell elongation have been registered on National Center of Biotechnologies Information – NCBI (2002). The data mining has shown similarities for the following ESTs clusters: EGEZLV2207D07.g with delta sterol reductase, EGEQRT4200A01.g with LKB brassinosteroid biosynthetic protein, EGJMLV2220C06.g with EMBL-transporter of mitochondrial half ABC, EGACST6260F07.g and EGMCFB1086B12.g with steroid 22- $\alpha$  hydroxylase, and EGEQSL1051D09.g with EGEZSL5201E08.g for copine protein.

Keywords: cDNA; mRNA; protein similarity; sequence alignments.

<sup>1</sup>Recebido para análise em 21.05.12. Aceito para publicação em 31.01.13.

<sup>2</sup>Instituto Florestal, Rua do Horto, 931, 02377-000 São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup>UNESP, Faculdade de Ciências Agronômicas, Caixa Postal 237, 18610-307 Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>4</sup>UNESP, Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio-Economia da Escola de Engenharia de Ilha Solteira, UNESP, Ilha Solteira, SP, Brasil.

<sup>5</sup>UNESP, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

<sup>6</sup>Autor para correspondência: lzimback@terra.com.br

## 1 INTRODUÇÃO

O caráter crescimento em plantas é extremamente complexo quanto ao número de genes e de passos metabólicos direta e indiretamente associados à sua expressão, tais como aqueles relacionados aos processos de fotossíntese, respiração e à síntese de carboidratos, aminoácidos e produtos secundários. O metabolismo vegetal pode envolver centenas de enzimas responsáveis isoladamente por pequenos efeitos no crescimento. A rigor, outros caracteres como tolerância a estresses bióticos e abióticos, florescimento e frutificação, morfologia de folhas, etc., também interferem no crescimento final da planta pela estreita conexão entre a maioria das rotas bioquímicas (Benincasa, 1988). A pesquisa realizada neste trabalho foi direcionada a proteínas reguladoras ou enzimas que mostraram alguma diferença na taxa de crescimento das plantas estudadas.

Trabalhos realizados no estudo de genes envolvidos com crescimento encontraram: alteração na enzima esterol delta redutase, causando nanismo em *Arabidopsis* (Choe et al., 2000), bloqueio da síntese de brassinosteroides no gene BONZAI1 em *Arabidopsis* com efeito homeostático no crescimento (Hua et al., 2001); proteínas envolvidas no caráter dwarf1 em arroz (Tao et al., 1997) e *Arabidopsis* (Takahashi et al., 1995) afetando o alongamento celular; a deficiência da proteína CYP90 do citocromo P450, promovendo alteração de síntese de brassinosteroides para alongamento celular (Szekeres et al., 1996); a mutação no half-ABC transportador de elétrons da mitocôndria causando nanismo e clorose em *Arabidopsis* (Kushnir et al., 2001). Esses trabalhos mostram alguns dos mecanismos que afetam o caráter crescimento provocando nanismo que é um sintoma da diminuição do alongamento celular sendo, portanto, alvo de estudo na identificação *in silico* de ESTs relacionados.

Com os projetos de sequenciamento de genes de plantas, milhares deles estão sendo depositados no National Center of Biotechnologies Information – NCBI. O objetivo deste trabalho foi então identificar ESTs no eucalipto através do banco de dados produzido pelo projeto FORESTs –

FAPESP, com alta similaridade para genes depositados que afetam o alongamento celular e conseqüentemente o crescimento, para futuros ensaios de validação e uso em seleção genômica.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto genoma do eucalipto (FORESTs, 2001) foi desenvolvido por um consórcio de quatro empresas ligadas ao setor florestal em convênio com a FAPESP. Foi realizado com a participação de 20 laboratórios paulistas da Rede AEG (<https://forest.esalq.usp.br>), obtendo 123.889 leituras, a partir de ESTs das bibliotecas de cDNA derivadas de tecidos principalmente de *E. grandis*, de diferentes órgãos da planta, condições de crescimento e ambiente. As bibliotecas foram constituídas a partir de amostras de madeira (WD), casca (BK), botão floral (FB), folha (LV), muda (SL), caule (ST), raiz (RT) e calos (CL). As leituras foram reunidas estatisticamente em agrupamentos por similaridade dentro de cada tecido de origem. As sequências podem ser acessadas com a devida autorização do Coordenador do Consorcio de empresas para estudos científicos.

A busca das proteínas envolvidas com mecanismos de alongamento celular foi efetuada no Laboratório de Genética Florestal da FCA/UNESP em Botucatu, SP, através da ferramenta BLAST (Altschud et al., 1997), que identificou mutantes que tinham o alongamento celular alterado publicados nos trabalhos citados na Introdução. O “drive” de cada sequência de nucleotídeo para comparação foi o NCBI (National Center Biotechnologies Information, 2002) ou geneBank, a partir do qual foram buscadas as sequências homólogas e alinhadas aos agrupamentos e gerado um valor de probabilidade (“e-value”) de não serem diferentes. As árvores foram construídas utilizando o método do vizinho mais próximo, utilizando o programa Clustal-X com 1.000 reamostragens para análise da consistência dos nós, e visualizado pelo programa Tree View.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta pesquisa de banco de dados de proteínas, foram identificadas proteínas envolvendo o controle do alongamento celular, quando comparadas aos “clusters” de cDNA obtidos de mRNAs do *Eucalyptus* do Projeto FORESTs. A Tabela 1 mostra o resultado da pesquisa considerando os valores de probabilidade abaixo de  $e^{-80}$ . Foram identificados agrupamentos com alta similaridade entre sequências de nucleotídeos

relacionados com a proteína biossintética do esteroide delta-redutase, proteína LKB biossintética de brassinosteróide, esteroide 22 alfa hidroxilase (CYP90) e o gene COPINE ou BONZAI1, que foram relatados no NCBI como variantes alélicas indutoras de nanismo, sendo, portanto, os genes de proteínas que têm a função de controlar o alongamento celular, com alta probabilidade dos “clusters” de mRNAs de *Eucalyptus* corresponderem a estes genes que serão discutidos a seguir.

Tabela 1. E-values obtidos entre agrupamentos de ESTs em *Eucalyptus* do projeto FORESTs e a busca de proteínas controlando alongamento celular.

Table 1. E-values obtained between “clusters” of *Eucalyptus* project FORESTs and the search for proteins controlling cell elongation.

Proteína	Organismo	Gene	Acesso	Agrupamentos ESTs	e-value	Consensus
Enzima esteroide delta redutase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	DWARF5	AAF63498	EGEZLV2207D07.g	6e -90	5
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ST7R	AAC49278	EGEZLV2207D07.g	6e -89	5
	<i>Castanea sativa</i>	SR	AAL14611	EGEZLV2207D07.g	e -81	5
Proteína LKB biossintética de brassinosteróide	<i>Gossypium hirsutum</i>	Ghfe1	AAM47602	EGEQRT4200A01.g	0.0	19
	<i>Pisum sativum</i>	LKB	AAK15493	EGEQRT4200A01.g	0.0	19
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	DIM	AAA67055	EGEQRT4200A01.g	0.0	19
EMBL -Transportador Mitochondrial half ABC	<i>Arabidopsis thaliana</i>	STA1	CAB97048	EGJMLV2220C06.g	e -89	1
	<i>Oriza sativa</i>	ATM1	BAA83352	EGJMLV2220C06.g	e -80	1
Esterol 22 alfa hidroxilase (CYP90) (P450)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CYP90	CAA60793	EGMCFB1086B12.g	0.0	1
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CYP90	CAA60793	EGACST6260F07.g	0.0	3
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	DWF4	NP_190635	EGMCFB1086B12.g	e -92	1
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	DWF4	NP_190635	EGACST6260F07.g	2e -82	3
	<i>Vigna radiata</i>	CYP90A2	AAF89209	EGMCFB1086B12.g	7e-102	1
	<i>Vigna radiata</i>	CYP90A2	AAF89209	EGACST6260F07.g	2e-100	3
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BON2	NP_568180	EGEQSL1051D09.g	e -117	4
COPINE ou Bonzai	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BON2	NP_568180	EGEZSL5201E08.g	e -103	2
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	COPINE	NP_172362	EGEQSL1051D09.g	2e -83	4
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	COPINE	NP_172362	EGEZSL5201E08.g	e -80	2
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	COPINE	NP_172362	EGEZSL5201E08.g	e -80	2

Foram encontrados alguns acessos de proteínas envolvidas no alongamento celular já sequenciadas (Figura 1), identificadas como esterol delta redutase modificada, responsável por nanismo, a exemplo da ação do gene DWARF5 em *Arabidopsis thaliana* 1 (Choe et al., 2000) e a sequência estudada por Lecain et al. (1996) do gene ST7R (*A. thaliana* 2). O agrupamento EGEZLV2207D07.g originado de mRNA de folha apresentou-se muito similar a estas seqüências da enzima relatada no NCBI, com alta probabilidade do agrupamento ser o loco do gene em *Eucalyptus*, de modo que variantes alélicas deste loco podem ser explorados para o caráter alongamento celular. Em *Castanea sativa* (Schafleitner e Wilhelm, 2002), para o mesmo gene foi atribuído a sinalização para estresse provocado por ataque de patógeno, modificação da parede celular, metabolismo do esterol e transporte intracelular.

Diminuto (DIM) é um gene descrito em *A. thaliana* 3 (Figura 1) por Takahashi et al. (1995), também afetando o alongamento celular mas ligado ao metabolismo dos brassinosteroides e estreitamente ligado aos genes Dwarf (proteína Ghfe1) de *Gossypium hirsutum*, registrado como acesso AF513859\_1 no NCBI e ainda não publicado, também afetando o alongamento celular. Em *Pisum sativum*, a proteína LKB é descrita como controlando o metabolismo de brassinosteroides como uma deficiência na regulação da C-6 oxidase que catalisa 24-metileno colesterol para campesterol (Schultz et al., 2001; Jager et al., 2007). O agrupamento EGEQRT4200A01.g originado de mRNA de raiz assemelhou-se muito com o gene Dwarf (proteína Ghfe1) do algodão, seguido da proteína LKB da ervilha e o gene DIM de *A. thaliana* 3, com grande probabilidade de ser outro locus genético para explorar alelos de alongamento celular.

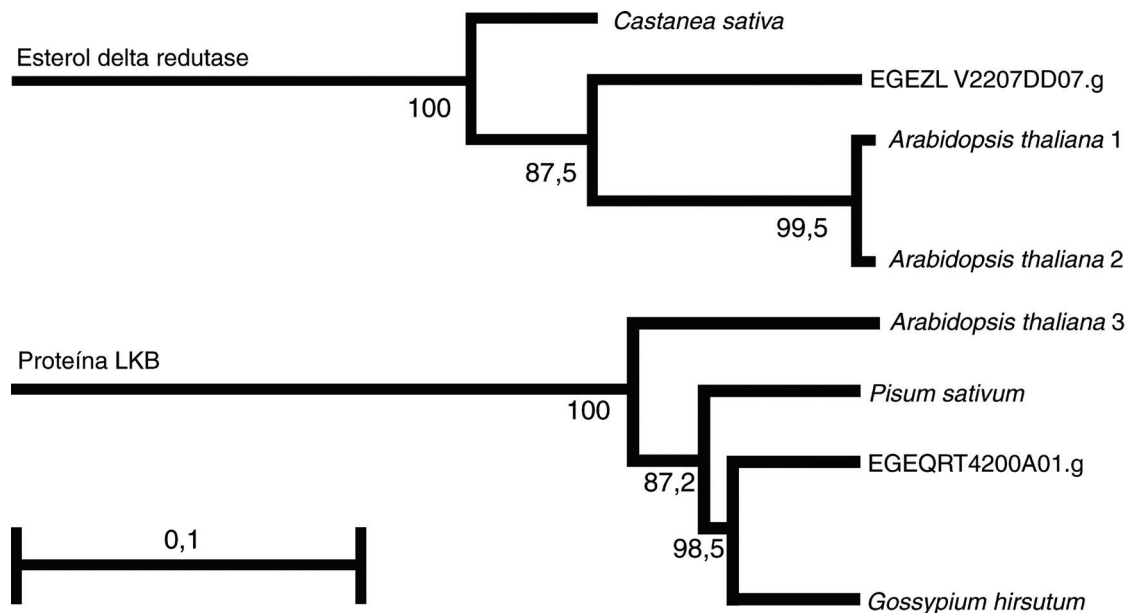


Figura 1. Análise de seqüência de aminoácidos de esterol delta redutase e proteína LKB envolvidas no alongamento celular. As seguintes seqüências foram obtidas do EMBL GeneBank: *Castanea sativa* (gi|16118817), *Pisum sativum* (gi|13194621), *Gossypium hirsutum* (gi|21326148), e *Arabidopsis thaliana* (1 gi|1245182, 2 gi|7542561, 3 gi|602302), as quais foram comparadas com os agrupamentos de ESTs em *Eucalyptus* (EG\*). A escala é corrigida por múltiplas substituições. O número indica a consistência probabilística do nó, sendo que a barra indica produto de 0,1 substituições do total.

Figure 1. Analysis of amino acid sequences of sterol delta reductase and LKB protein involved in the control of the cellular elongation. The following sequences were taken from the EMBL GeneBank *Castanea sativa* (gi|16118817), *Pisum sativum* (gi|13194621), *Gossypium hirsutum* (gi|21326148), *Arabidopsis thaliana* (1 gi|1245182, 2 gi|7542561, 3 gi|602302), compared to the *Eucalyptus* clusters in figure (EG\*). The scale is corrected for multiply substitutions. The numbers indicate the percentage supported for each branch, computed from 1,000 bootstrap resamplings and corresponds to 0.1 substitution per site

Na Figura 2, o agrupamento EGJMLV2220C06.g originado de mRNA de folha apresentou similaridade como transportador mitocondrial half-ABC EMBL de *A. thaliana* 4 publicado por Kushnir et al. (2001), que reportou fenótipo de nanismo e clorose por alteração da proteína, registrado como gene Stal.

É similar à sequência do gene ATM1 de *Oriza sativa* relatado como transportador tipo ABC mitocondrial envolvendo regulação do transporte de FeS na mitocôndria (Cheng et al., 2007). Uma vez confirmado em ensaio de validação, esse gene tem possibilidades de ser explorado na genômica do *Eucalyptus* com suas formas alélicas.

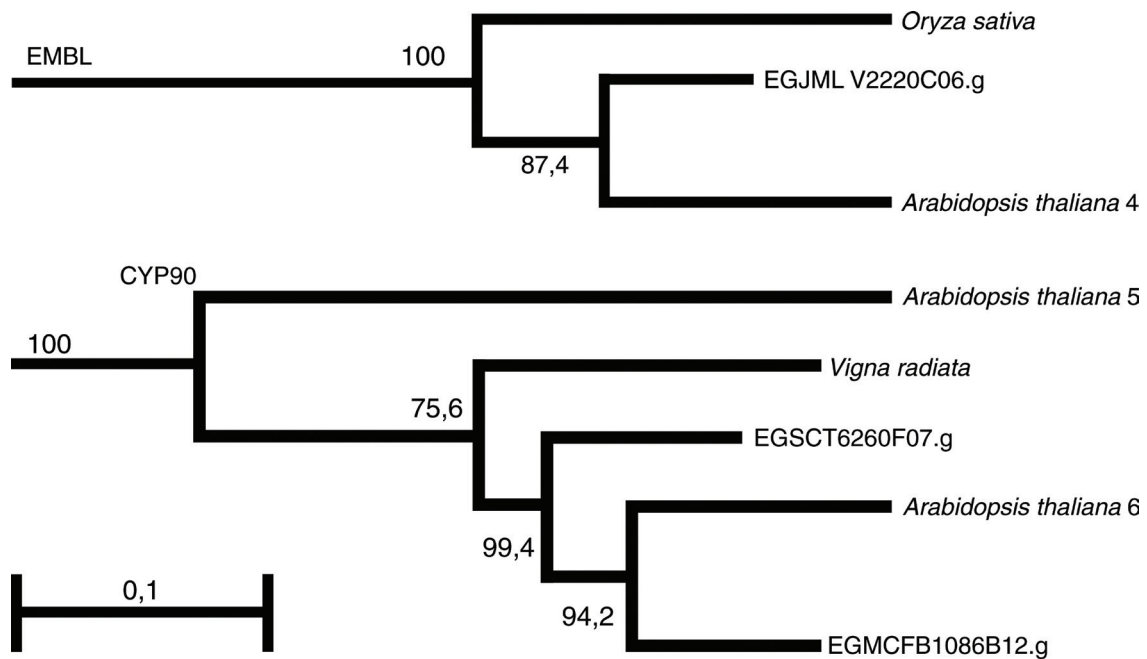


Figura 2. Análise de sequência de aminoácidos de proteínas EMBL e CYP90 envolvidas no alongamento celular. As seguintes seqüências foram obtidas do EMBL GeneBank: *Arabidopsis thaliana* (4 gi|9187883, 5 gi|15229822, 6 gi|15239203), *Vigna radiata* (gi|9587211), e *Oryza sativa* (gi|5734621), as quais foram comparadas com os agrupamentos de ESTs em *Eucalyptus* (EG\*). A escala é corrigida por múltiplas substituições. O número indica a consistência probabilística do nó, sendo que a barra indica produto de 0,1 substituições do total.

Figure 2. Figure 2. Analysis of amino acid sequences of EMBL and CYP90 proteins involved in the control of the cellular elongation. The following sequences were taken from the EMBL GeneBank: *Arabidopsis thaliana* (4 gi|9187883, 5 gi|15229822, 6 gi|15239203), *Vigna radiata* (gi|9587211), and *Oryza sativa* (gi|5734621), compared to the *Eucalyptus* clusters in figure (EG\*). The scale is corrected for multiply substitutions. The numbers indicate the percentage supported for each branch, computed from 1,000 bootstrap resamplings and corresponds to 0.1 substitution per site.

Surgiu também como resultado de busca o provável mRNA correspondente à proteína esterol 22 alfa hidroxilase (citocromo CYP90B1 de cloroplasto) com a mutação do gene DWF4 (Fujita et al., 2006) causando nanismo em *A. thaliana* 5 (Figura 2), mais distante que os “clusters” EGACST6260F07.g e EGMCFB1086B12.g. Entretanto, estss “clusters” são mais semelhantes às sequências de *Vigna radiata* (citocromo CYP90A2) de Nomura e Bishop (2006) e *A. thaliana* 6 (citocromo CYP90), mostrando serem distintos ou outras formas alélicas. No citocromo CYP90 Szekeres et al. (1996) localizaram a mutação CPD localizada no cromossomo 5-14.3 de *Arabidopsis* com marcação utilizando T-DNA, mutação esta que inibe o alongamento celular controlado pelo hormônio brassinosteróide brassinolideo semelhante à ecdisona. O mutante CPD apresenta pouca estiolação e não ocorre a repressão de genes induzidos pela luz no escuro, assim como exibe o nanismo, macho-esterilidade e ativação de genes que regulam estresse em ambiente de luz. O gene CPD codifica o citocromo P450 (CYP90) que compartilha o mesmo domínio com as enzimas esterol hidroxilases. Para restaurar o fenótipo normal no mutante CPD, foi adicionado o precursor C23-brassinolideo hidroxilado no meio de cultura ou por superexpressão ectópica do cDNA do gene CPD. Brassinosteróides mutantes também podem ser compensados por diferentes genes de alongamento celular

em *Arabidopsis*, tais como os mutantes det, cop, fus, e axr2 (Szekeres et al., 1996), indicando que estes esteróides têm uma série de papéis muito importantes na regulação do desenvolvimento da planta, sendo que os “clusters” de *Eucalyptus* obtidos neste teste de similaridade têm alta probabilidade de serem úteis na seleção genômica do caráter.

Os genes Bonzai 2 de *A. thaliana* 7 e COPINE de *A. thaliana* 8, registrados no NCBI, também causam nanismo e são a mesma proteína copina também registrada como gene Bonzai 1 (Tomsig et al., 2003), mostrando alta similaridade com os “clusters” EGEQSL1051D09.g e EGEZSL5201E08.g na Figura 3. Essa proteína copina liga fosfolipídeos e é dependente da presença do íon  $Ca^{2+}$  responsável pela divisão e crescimento celular (Tomsig et al., 2003), que regula o crescimento, exocitose, mitose, apoptose, transcrição e organização da parece celular, porque é uma proteína estrutural da membrana celular que sinaliza muitos passos metabólicos. Neste estudo, não foram observados ESTs de calo, casca e fruto, mas somente de raiz, caule, plântula, folha e gema floral, justamente onde ocorrem maiores taxas de alongamento celular. Estes dois últimos “clusters” foram obtidos de mRNA de plântulas que cresceram em condições de ausência de luz, demonstrando alta probabilidade de terem sido identificados como a proteína em questão, cujas formas alélicas podem ser estudadas para selecionar o caráter alongamento celular após ensaio de validação.

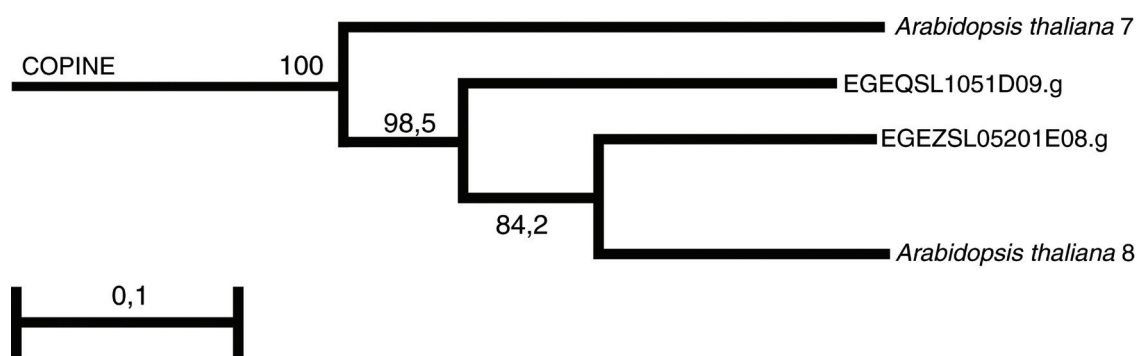


Figura 3. Análise de sequência de aminoácidos de proteína COPINE envolvida no alongamento celular. As seguintes sequencias foram obtidas do EMBL GeneBank: *Arabidopsis thaliana* (7 gi| 18415456 e 8 gi| 15223946), as quais foram comparadas com os agrupamentos de ESTs em *Eucalyptus* (EG\*). A escala é corrigida por múltiplas substituições. O número indica a consistência probabilística do nó, sendo que a barra indica produto de 0,1 substituições do total.

Figure 3. Analysis of amino acid sequences of COPINE protein involved in the control of the cellular elongation. The following sequences were taken from the EMBL GeneBank: *Arabidopsis thaliana* (7 gi| 18415456, and 8 gi| 15223946), compared to the *Eucalyptus* clusters in figure (EG\*). The scale is corrected for multiply substitutions. The numbers indicate the percentage supported for each branch, computed from 1,000 bootstrap resamplings and corresponds to 0.1 substitution per site.

#### 4 CONCLUSÕES

A busca *in silico* possibilitou encontrar sete evidências de relação entre ESTs de *Eucalyptus* e proteínas responsáveis pelo alongamento celular, ocorrendo uma com a enzima esterol delta redutase, uma com a proteína LKB biosintética de brassinosteróide, uma com EMBL-transportador mitochondrial half ABC, duas com esterol 22 alfa hidroxilase (CYP90) (P450) e duas para a proteína copine.

#### 5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às empresas Fibria, Suzano Bahia Sul, Duratex S/A e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo suporte financeiro e acesso ao banco de dados do Projeto FORESTS.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUD, S.F. et al. Grapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas (noções básicas)**. Jaboticabal: FUNEP, 1988. 41 p.
- CHENG, L.J. et al. Mutation in nicotianamine aminotransferase stimulated the Fe(II) acquisition system and led to iron accumulation in rice. **Plant Physiology**, v. 145, p. 1647-1657, 2007.
- CHOE, S. et al. Lesions in the sterol delta reductase gene of *Arabidopsis* cause dwarfism due to a block in brassinosteroid biosynthesis. **Plant Journal**, v. 21, n. 5, p. 431-443, 2000.
- FORESTS: Projeto Genoma do Eucalipto. Disponível em: <<https://forests.esalq.usp.br>>. Acesso em: 1 set. 2001.
- FUJITA, S. et al. *Arabidopsis* CYP90B1 catalyses the early C-22 hydroxylation of C27, C28 and C29 sterols. **The Plant Journal**, v. 45, p. 765-774, 2006.
- HUA, J. et al. Plant growth homeostasis is controlled by the *Arabidopsis* BON1 and BAP1 genes. **Genes Dev.**, v. 15, n. 17, p. 2263-2272, 2001.
- KUSHNIR, S. et al. A mutation of the mitochondrial ABC transporter *Stal* leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis* mutant *stark*. **Plant Cell**, v. 13, n. 1, p. 89-100, 2001.
- JAGER, C.E. et al. Characterization of two brassinosteroid C-6 oxidase genes in pea. **Plant Physiology**, v. 143, p. 1894-1904, 2007.
- LECAIN, E. et al. Cloning by metabolic interference in yeast and enzymatic characterization of *Arabidopsis thaliana* sterol delta 7-reductase. **J. Biol. Chem.**, v. 3, n. 271, p. 10866-73, 1996.
- NATIONAL CENTER BIOTECHNOLOGIES INFORMATION – NCBI. Gene Bank. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 1 fev. 2002.
- NOMURA, T.; BISHOP, G.J. Cytochrome P450s in plant steroid hormone synthesis and metabolism. **Phytochem. Rev.**, v. 5, p. 421-432, 2006.
- SCHAFLEITNER, R.; WILHELM, E. Isolation of wound-responsive genes from chestnut (*Castanea sativa*) microstems by mRNA display and their differential expression upon wounding and infection with the chestnut blight fungus (*Chryphonectria parasitica*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 61, n. 6, p. 339-348, 2002.
- SCHULTZ, L. et al. Molecular characterization of the brassinosteroid-deficient *lkb* mutant in pea. **Plant Mol. Biol.**, v. 47, n. 4, p. 491-498, 2001.
- SZEKERES, M. et al. Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. **Cell**, v. 85, n. 2, p. 171-182, 1996.
- TAO, L. et al. Molecular cloning of OSDIM cDNA and its linkage analysis in rice. **Rice Genet. Newsl.**, v. 14, p. 130-132, 1997.
- TAKAHASHI, T. et al. The DIMINUTO gene of *Arabidopsis* is involved in regulating cell elongation. **Genes Dev.**, v. 9, n. 1, p. 97-107, 1995.
- TOMSIG, J.L.; SNYDER, S.L.; CREUTZ, C.E. Identification of targets for calcium signaling through the copine family of proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 12, p. 10048-10054, 2003.