

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

“Estudos de localização e interações proteína-proteína de uma putativa proteína quinase, NtCDKG;2,
de *Nicotiana tabacum*”

Pedro Boscariol Ferreira

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

“Estudos de localização e interações proteína-proteína de uma putativa proteína quinase, NtCDKG;2,
de *Nicotiana tabacum*”

Pedro Boscariol Ferreira

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Helena de Souza Goldman

RIBEIRÃO PRETO – SP

2013

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ferreira, Pedro Boscariol

Estudos de localização e interações proteína-proteína de uma putativa proteína quinase, NtCDKG;2, de *Nicotiana tabacum* / Pedro Boscariol Ferreira; orientadora Maria Helena de Souza Goldman – Ribeirão Preto – 2013. 80 p.

Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas)--Universidade de São Paulo, 2013

1.Quinases dependentes de ciclina. 2. Desenvolvimento do pistilo. 3. NtCDKG;2 4. Localização subcelular. 5. Interações proteína-proteína. 6. Expressão heteróloga

AGRADECIMENTOS

São tantas pessoas, e por tantas razões... De uma forma ou de outra, todos a quem aqui agradeço tiveram parte na construção desse trabalho. Seja ajudando com os seus aspectos mais científicos ou apenas tornando a vida e o trabalho mais leves.

À Prof.^a. Dr.^a Maria Helena de Souza Goldman, que me aceitou em seu laboratório num momento em que eu já havia perdido o rumo dentro do curso, e que com toda a sua paixão e dedicação à ciência fez com que eu me apaixonasse de novo, e encontrasse também a minha paixão dentro da Biologia. Muito obrigado pela dedicação incansável em ensinar e orientar os próximos passos, e por inspirar a busca por novos conhecimentos diariamente. Obrigado também pela preocupação de mãe, sempre prezando pelo bem estar de todos os alunos.

À CAPES, ao CNPq e à FAPESP, pelo auxílio financeiro que permitiu a realização desse trabalho.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela disponibilização do microscópio confocal.

À Prof.^a Dr.^a Zilá Luz Paulino Simões e ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman, que disponibilizaram o acesso à estrutura de seus laboratórios.

À Greice, minha mãe de laboratório! Outra enorme influência na redescoberta da minha paixão pela Genética e Biologia Molecular! Mais que isso, minha paixão pela vida! Raríssimos foram os dias que você me recebeu sem estar com um sorriso enorme no rosto, sempre esbanjando positividade nas mais diversas e adversas situações. Muito, mas muito obrigado mesmo por me ensinar praticamente tudo o que eu sei do laboratório até hoje. Sua paciência em ensinar e estimular o estudo foram extremamente importantes, eu sei que ensinar é muito mais difícil que mostrar como fazer. Tenho tanto que te agradecer, por tantas e tantas coisas!

À Hebréia! Minha tia? Ou vó? Ainda não sei como estamos nessa discussão! Você também é outra pessoa que está sempre sorrindo, sempre trazendo o melhor em todas as situações! Acho que uma das coisas que você mais me ensinou foi como ter dois braços, mas fazê-los trabalhar como se fossem seis... Ou seja, sempre é possível fazer mais! Você me ensinou bem! Muitíssimo obrigado por me ensinar os mistérios do Western passo-a-passo! Nada melhor do que aprender com a melhor!

À Ligia, veterana que conheci no laboratório e que também me ensinou muitas coisas. Tenho muito prazer em te ajudar com as linhas de comando!

Ao Amau, veterano que conheci melhor no convívio no lab. Obrigado pelos conselhos na licenciatura e principalmente pelas risadas de todo dia!

À Dea, por ser a pessoa mais engraçada do lab sem ter que dizer uma palavra! Obrigado por ajudar em todos os experimentos, fazer todos os sequenciamentos e facilitar demais o nosso trabalho!

Ao Edi, por ajudar a entender como os experimentos funcionam, você explicando até parece fácil!

À Lucia, que também alegra todos os dias de trabalho!

Aos meus colegas de iniciação científica e calouros, Francine, Danilo e Vitória.

À Dona Nina, de quem café melhor não há! Obrigado pelos bom dias alegres e por fazer esse café maravilhoso que faz com que eu consiga trabalhar mais acordado!

À Camila, minha sempre companheira da graduação! Eu sempre te disse que sem você eu não teria continuado no curso, você sempre deu aqueles empurrõesinhos pra eu continuar nos momentos em que eu mais precisei. Nem tenho como te agradecer por isso... Obrigado pela companhia, pela parceria nos trabalhos, por me ensinar organização e planejamento, por ser minha agenda! Obrigado por me ensinar também a ser objetivo e prático, você não sabe a importância que isso teve!

Ao Guga, pelas festas e caronas e por ser um dos caras mais gentis que eu conheço.

Ao Johnny, de quem fiquei amigo só no fim da graduação, mas serviu de ouvido pra muitas coisas. Desculpa não estar tão presente quanto eu poderia.

À Rapha, muito obrigado por estar presente na minha vida durante a graduação. Você também foi uma das grandes razões para eu continuar o curso, sempre me fazendo ir em frente.

À Piti, obrigado por me ensinar a ser mais observador com os animais! Obrigado também pelas caronas valiosas!

À Soph, parceira de licenciatura, obrigado por facilitar os estágios com as caronas e principalmente pelas conversas nos momentos mais tensos desses últimos semestres.

À toda a minha turma de graduação, a Bio 46 - peagÁ, Duda, Ciça, Ju, Cris, Rafa, Lu, Murilo, Manga, Piri, Dalila, Maminha, Bunny, Juma, Ity, Barbie, Nat, Xariga, Lino, Bisnaga, Helô, Punky, Finazzi... Obrigado por fazerem parte desse caminho, do qual não desistimos!

À professora Hérika, quem me mostrou o mundo fantástico da Biologia durante o colegial e fez com que eu optasse por seguir essa carreira que se prova mais fantástica a cada dia. Obrigado por ter me influenciado sem querer a seguir esse estilo de vida que é ser biólogo!

Aos meus amigos de Piracicaba, que eu amo como se fossem irmãos, e que por maior que seja o tempo em que não nos vejamos pessoalmente, sempre me recebem com abraços e muitos risos. A vida é muito mais feliz quando eu estou com vocês... Ao Marcus, muito obrigado por ser sempre divertido, por gostar das mesmas coisas que eu, por fazer parte de mais da metade

da minha vida. Camila, você é quase uma irmã pra mim... Não tenho muito o que te dizer além disso. Paula, obrigado por ser tão carefree, você me lembra que às vezes eu me preocupo muito com as coisas... Evelyn, minha futura médica pessoal! Obrigado pelas conversas de biológicas no meio desse povo de humanas! Obrigado por ser sempre amiga, mesmo quando estamos há tempos sem nos falar... Letícia, obrigado pelas conversas longas e pelos conselhos, você me ajudou muito em várias situações... Mire, obrigado por ser uma ótima amiga, mesmo! Nunca vou esquecer da visita que você e o Marcus fizeram! São tantas pessoas... Clara, Júlio, Guilhermes, Fabi, Carla, Paola, Pate, vocês fazem a vida mais doce, mais gostosa de se viver! À minha família toda! Minha madrinha Malu, tia Ieda, tia Ângela, tia Bete, tio Beto, tio Zé, tio Gordo, tio Nelson. Minhas primas, Maria, Gabi, Júlia, Marina, Beatriz, Ana, Natália, Tatas, meus primos André e Felipe... À vó Amália... Obrigado por serem família, por estarem presentes em muitos momentos da vida! Em especial, agradeço ao meu tio Beto, que veio comigo e com meus pais para Ribeirão Preto no dia da matrícula e nos ajudou a encontrar uma casa. Obrigado pelas conversas do mundo dos aparelhos de laboratório e pelas piadas de todo domingo!

À vó Naide, que sempre escuta atenciosamente quando falo de Biologia, e sempre contempla a beleza da vida. Foi com você que aprendi como plantar e admirar a beleza das flores, desde pequeno naquele jardim da nossa antiga casa! É um prazer explicar as coisas pra alguém tão interessado em aprender como você! Além de tudo, obrigado pelos almoços aos domingos, quando dá pra ver a família toda! Obrigado por me ensinar a cozinhar bem, isso me salvou morando sozinho!

Ao meu pai, um dos homens mais honestos e cabeça-dura que conheço. Acho que “brigamos” tanto por sermos muito parecidos... Obrigado por sempre me dar o melhor, e por trabalhar tanto para conseguir as melhores coisas para a nossa família. Obrigado por me levar desde pequeno no laboratório, acho que é por isso que eu gosto tanto! Obrigado por me ensinar a consertar as coisas de casa, por ser tão criativo na cozinha, por ser pai...

Por último, porém a mais importante de todos, minha mãe. Pra você eu precisaria escrever um livro! Não sei se você sabe o quanto eu te admiro, nem eu sei, é imensurável a minha admiração e o meu amor por você. Meu maior exemplo de força e dedicação. Muito obrigado por me ensinar tudo o que você me ensinou desde pequeno, principalmente a ser educado e gentil com as pessoas. Quero também, além de te agradecer, me desculpar pelos momentos em que te preocupei e te preocupo, pelas decepções que eu possa ter sido algumas vezes, por não ser como eu poderia ter sido. Você é a pessoa que mais amo nesse mundo!

OBRIGADO!

P.B.F

RESUMO

Estudos de localização e interações proteína-proteína de uma putativa proteína quinase, NtCDKG;2, de Nicotiana tabacum.

As flores são as estruturas reprodutivas que permitiram o grupo das Angiospermas atingir a diversidade que possuem hoje. A reprodução desse grupo depende do desenvolvimento correto dos órgãos reprodutivos que compõem as flores - o pistilo e os estames. O pistilo, em particular, é responsável pela produção dos gametófitos femininos e proteção do embrião após a fecundação, que só ocorre após interações compatíveis entre esse órgão e os grãos-de-pólen. Para compreender o desenvolvimento do pistilo, é essencial estudar genes preferencialmente ou exclusivamente expressos em seus tecidos. Utilizando a espécie *Nicotiana tabacum* como modelo, nosso grupo de pesquisa caracterizou um desses genes, denominado SCI1 (*Stigma/style Cell-cycle Inhibitor 1*). SCI1 controla a proliferação celular em tecidos do pistilo, regulando a proliferação celular nesse órgão, porém seu mecanismo de ação ainda é desconhecido. Para elucidar esse mecanismo, foram feitos em nosso laboratório experimentos que identificaram prováveis parceiros de interação proteína-proteína de SCI1. Dentre os parceiros confirmados, foi identificada NtCDKG;2, uma quinase dependente de ciclina (CDK), que faz parte de uma família de proteínas conhecidas por controlar o ciclo celular, das quais alguns membros estão envolvidos na regulação da transcrição gênica. Entretanto, pouco se sabe sobre a função de CDKG;2 e sua caracterização é necessária. Assim, a sequência de DNA codificadora dessa proteína em *N. tabacum* foi clonada em nosso laboratório, e foi dado início a um *screening* de duplo-híbrido em leveduras para buscar prováveis parceiros de interação da mesma. Esse experimento revelou a interação de NtCDKG;2 com NtCDKF;1, uma CDK que está envolvida tanto na regulação do ciclo celular, através da ativação de outras CDKs, quanto na regulação da transcrição, através de mecanismos desconhecidos que envolvem a fosforilação do domínio C-terminal da RNA Polimerase II (CTD da RNAPII). O presente trabalho teve como objetivos: confirmar a localização subcelular dessa proteína, através da expressão transiente da proteína recombinante GFP-NtCDKG;2; clonar o CTD da RNAPII para realizar ensaios de interação com NtCDKG;2 por duplo-híbrido; realizar a expressão heteróloga da proteína recombinante GST-RNAPII CTD em *E. coli*, para uso em experimentos futuros; e dar continuidade ao *screening* de NtCDKG;2. Os resultados obtidos mostram que, independentemente da fusão N- ou C-terminal de GFP em NtCDKG;2, esta proteína se localiza no núcleo (nucleoplasma) das células. Ensaios de interação por BiFC, entre essa proteína e SCI1, indicam que a interação entre elas ocorre no nucléolo. Esse fato permite especular que SCI1, que tem localização nos nucléolos, aja sequestrando NtCDKG;2 do nucleoplasma, inibindo sua atividade. Os ensaios de interação entre NtCDKG;2 e o CTD da RNAPII apresentaram resultado negativo, sugerindo que não há interação direta entre essas proteínas, ainda sendo possível que elas interajam em um complexo proteico, de forma indireta. A expressão de GST-RNAPII CTD em *E. coli* foi inconclusiva, tornando necessária a otimização das condições de expressão. Foram analisados 26 clones do *screening* de duplo-híbrido, dos quais 2 apresentaram funções interessantes e potencial para contribuir nas vias de sinalização e controle do ciclo celular e/ou regulação da transcrição gênica.

Palavras-chave: CDKG;2, CTD da RNA polimerase II, Desenvolvimento do pistilo, Interações proteína-proteína, Localização subcelular, Quinases dependentes de ciclinas.

ABSTRACT

Studies on the subcellular localization and protein-protein interactions of NtCDKG;2, a putative protein quinase from Nicotiana tabacum.

Flowers are the reproductive structures of the plant group Angiosperms that allowed them to reach the diversity seen nowadays. Reproduction of these plants depends on the correct development of the flower reproductive organs, which are the stamens and the pistil. The pistil, in particular, is responsible for the production of the female gametophytes and protection of the embryo after fecundation, an event that happens only after compatible interactions between this organ and the pollen grains. To understand pistil development, it is essential to study genes that are preferentially or exclusively expressed in its tissues. Using *Nicotiana tabacum* as a model species, our research group characterized one of these genes, named SCI1 (*Stigma/style Cell-cycle Inhibitor 1*). SCI1 controls cell proliferation of pistil tissues, regulating its development through a mechanism still unknown. To elucidate this mechanism, experiments were performed in our laboratory and identified putative protein-protein interaction partners of SCI1. Among the confirmed partners, it was identified NtCDKG;2, a cyclin-dependent kinase (CDK) which belongs to the family of proteins known to control the cell cycle, from which a few members are involved in transcriptional regulation. However, little is known about CDKG;2 protein function and its characterization is necessary. Therefore, the *N. tabacum* DNA coding sequence of this protein was cloned in our laboratory and a yeast two-hybrid screening to search for putative NtCDKG;2 interaction partners was initiated. This experiment revealed the interaction of NtCDKG;2 with another CDK, NtCDKF;1, which is involved in cell cycle regulation through its activation of other CDKs, and also in transcription regulation, through an yet unknown mechanism involving phosphorylation of the C-terminal domain of RNA Polymerase II (RNAPII CTD). This work aimed: to confirm the subcellular localization of NtCDKG;2, through transient expression of the recombinant protein GFP-NtCDKG;2; to clone RNAPII CTD of *N. tabacum* in order to test its interaction with NtCDKG;2 through two-hybrid assays; to express the recombinant protein GST-RNAPII CTD in *E. coli* for future experiments; and to resume the two-hybrid screening for NtCDKG;2 partners. The results show that, regardless of N- or C-terminal fusion of GFP to NtCDKG;2, this protein is located in the cell nucleus (nucleoplasm). BiFC assays between SCI1 and NtCDKG;2 indicate that this interaction occurs in the nucleolus. This allows to speculate that SCI1, which is located in the nucleolus, acts by sequestering NtCDKG;2 away from the nucleoplasm, inhibiting its activity. The two-hybrid assays between NtCDKG;2 and RNAPII CTD were negative, suggesting that there is no direct interaction, though it is still possible that they interact through a protein complex, in an indirect fashion. The expression of GST-RNAPII CTD in *E. coli* was inconclusive and optimization of the expression conditions is still necessary. During this work 26 clones from the NtCDKG;2 two-hybrid screening were analyzed, from which 2 have interesting functions and potential to contribute in signaling pathways and cell cycle control and/or transcription regulation.

Key-words: Cyclin-dependent kinases, CDKG;2, Pistil development, Protein-protein interactions, RNA polymerase II CTD, Subcellular localization.

ABREVIATURAS E SIGLAS

atm – atmosferas, unidade de medida de pressão

cDNA – *complementary DNA* – fita dupla de DNA sintetizada a partir de uma fita simples de RNA

CDS – *Coding DNA Sequence*, sequência de DNA codificadora

FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

min – minutos

OD₆₀₀ – *optical density*, absorbância (densidade óptica) a 600 nm

ORF – *Open Reading Frame*, fase de leitura aberta – sequência contínua entre um códon de início e um de terminação

p35S – Promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor

pb – pares de bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction*, reação em cadeia da polimerase

q.s.p. – quantidades suficientes para

rpm – rotações por minuto

s – segundos

T.A. – temperatura ambiente

TBE – Tris-Borato-EDTA

TE – Tris-EDTA

TES – Tris-EDTA-Sacarose

T_m – *melting temperature*, temperatura de anelamento

Tris - tris(hidroximetil)aminometano

USP – Universidade de São Paulo

w/v – *weight/volume*, relação peso/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	As flores como estruturas exclusivas da reprodução das Angiospermas...	12
1.1.1	<i>Nicotiana tabacum</i> como modelo de estudo da reprodução vegetal.....	13
1.2	SCI1: um regulador do desenvolvimento do pistilo de <i>N. tabacum</i>.....	14
1.3	Ciclo celular e CDKs.....	16
1.3.1	As fases do ciclo celular.....	16
1.3.2	Regulação do ciclo celular.....	17
1.3.3	Diferentes CDKs de plantas e suas funções.....	19
1.3.3.1	Estudos envolvendo CDKG;2.....	21
2	OBJETIVOS.....	24
2.1	OBJETIVO GERAL.....	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3	MATERIAIS & MÉTODOS.....	25
3.1	Material Vegetal.....	25
3.2	Meios de Cultura.....	25
3.3	Preparo de células competentes.....	25
3.3.1	Preparo de <i>Escherischia coli</i> eletrocompetentes.....	25
3.3.2	Preparo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> eletrocompetentes.....	26
3.3.3	Preparo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> competentes.....	26
3.4	Transformação de células por eletroporação.....	27
3.4.1	Transformação de <i>E. coli</i> eletrocompetentes.....	27
3.4.2	Transformação de <i>A. tumefaciens</i> eletrocompetentes.....	27
3.5	Transformação de <i>S. cerevisiae</i> por choque térmico.....	27
3.6	Extração de DNA plasmidial em pequena escala (minipreparação, miniprep).....	28
3.6.1	Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>.....	28
3.6.2	Extração de DNA plasmidial de <i>A. tumefaciens</i>.....	29
3.6.3	Extração de DNA plasmidial de <i>S. cerevisiae</i>.....	29

3.7	Limpeza de DNA plasmidial pelo método do fenol-clorofórmio.....	30
3.8	Digestão com enzimas de restrição.....	31
3.9	Análise de fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose.....	31
3.10	Sequenciamentos.....	32
3.11	Clonagem e Subclonagens.....	32
3.11.1	Inserção de sítios <i>attB</i> através da PCR.....	33
3.11.2	Desenho de <i>primers</i>.....	33
3.11.3	Reações de PCR para clonagem e inserção de sítios <i>attB</i>.....	34
3.11.3.1	PCR1.....	34
3.11.3.2	PCR2.....	34
3.11.4	Reações de recombinação.....	35
3.11.4.1	Reações BP.....	35
3.11.4.2	Reações LR.....	35
3.11.5	Plasmídeos utilizados.....	35
3.11.5.1	pDONRTM221.....	35
3.11.5.2	pDESTTM15.....	36
3.11.5.3	pDESTTM22 e pDESTTM32.....	36
3.11.5.4	pK7WGF2.....	37
3.12	Expressão heteróloga em <i>E. coli</i>.....	39
3.13	Extração de proteínas bacterianas através de lise celular.....	40
3.14	Análise de proteínas por SDS-PAGE.....	40
3.15	Expressão heteróloga transiente em <i>Nicotiana benthamiana</i>.....	41
3.16	Ensaio de duplo-híbrido em leveduras.....	43
3.17	Análises de <i>screening</i> de duplo-híbrido em leveduras.....	46
4	RESULTADOS & DISCUSSÃO.....	47
4.1	Localização subcelular de NtCDKG;2.....	47
4.2	Clonagem do domínio C-terminal da RNA Polimerase II (CTD da RNAPII).....	50
4.3	Expressão da proteína recombinante GST-RNAPII CTD.....	55
4.4	Ensaios de duplo-híbrido.....	57
4.5	Screening de duplo-híbrido utilizando NtCDKG;2 como presa.....	60

5	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
	APÊNDICE A.....	70
	APÊNDICE B.....	72
	APÊNDICE C.....	73
	APÊNDICE D.....	74
	APÊNDICE E.....	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. As flores como estruturas exclusivas da reprodução das Angiospermas

As Angiospermas são o grupo de plantas que apresenta a maior diversidade de espécies, com mais de 235.000 espécies descritas até hoje (Raven, 2007). A diversidade desse grupo se deve à presença de estruturas exclusivas de reprodução, que são as flores e os frutos. As flores permitiram, de certo modo, a “mobilidade” das Angiospermas na procura de parceiros sexuais, aumentando a frequência de polinizações cruzadas, enquanto os frutos permitiram a dispersão das sementes de maneiras variadas, aumentando a distância entre uma planta e seus descendentes (Raven, 2007). Esse fato se deve ao desenvolvimento de mecanismos de polinização diversos, principalmente aqueles envolvendo insetos e outros animais, quando comparado com a polinização das Gimnospermas, grupo onde a polinização passiva é o mecanismo mais comum (Raven, 2007). As interações flor-inseto, muitas vezes espécie-específicas, permitiram a polinização mais exata das flores, com menor gasto de quantidade de pólen, e o desenvolvimento de características atrativas aos insetos nas flores sempre conferiu maior vantagem seletiva a elas (Raven, 2007).

As flores são compostas por estruturas originadas de folhas modificadas, formando os verticilos florais internos e externos. Os verticilos externos são formados por conjuntos de sépalas e pétalas, cálice e corola, respectivamente, os quais são estéreis. Os verticilos internos constituem as porções férteis da flor, sendo eles o androceu (conjunto de estames) e o gineceu (um ou mais pistilos simples ou um pistilo composto), órgãos reprodutivos masculinos e femininos, respectivamente. Os estames são compostos de filetes e anteras, as últimas responsáveis por produzir os grãos de-pólen, gametófito masculino. O pistilo pode ser composto de um ou mais carpelos, unidade fundamental desse órgão e que é formado por um ovário (onde são produzidos e abrigados os gametófitos femininos), pelo estilete e pelo estigma. O pistilo com somente um carpelo é chamado de pistilo simples; quando existem dois ou mais carpelos não fusionados, é dito que a flor possui pistilos simples. Um pistilo com carpelos fusionados é chamado de composto (Esau, 1997). A Figura 1.1 apresenta o desenho esquemático da flor de *Nicotiana tabacum* e suas estruturas, aqui usado como exemplo da flor das Angiospermas.

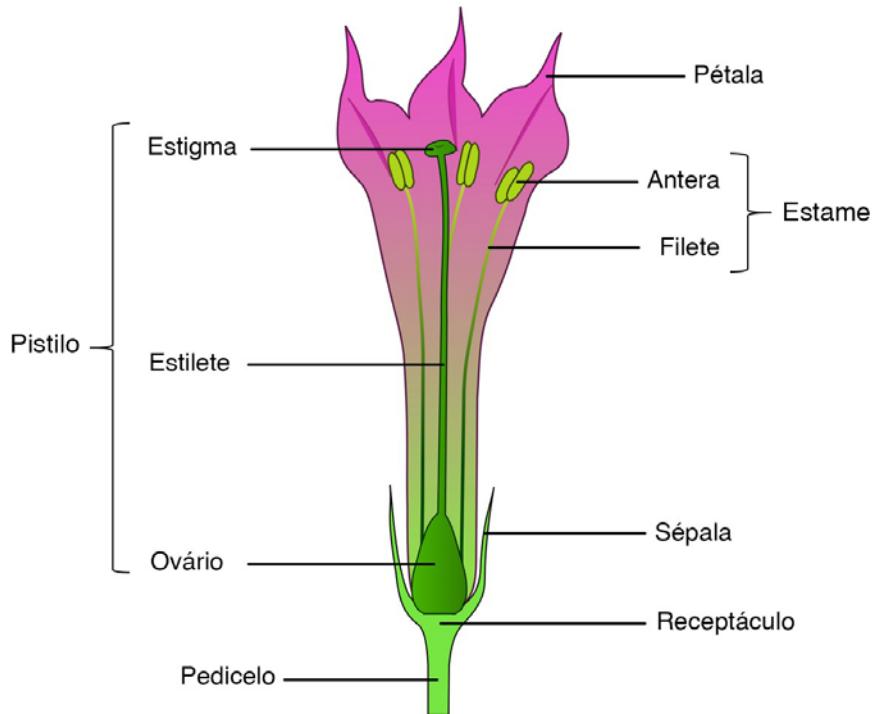


Figura 1.1 – Desenho esquemático de uma flor de Angiosperma (*Nicotiana tabacum*).

A eficiência da reprodução das Angiospermas depende do desenvolvimento correto dos órgãos reprodutivos e da interação entre pólen e pistilo compatíveis (DePaoli *et al.*, 2011). O gametófito masculino, ao atingir a superfície de um estigma compatível, se adere, se reidrata e germina, dando início à formação do tubo polínico, que atravessa o estilete em direção ao ovário, onde ocorre a fecundação (Taiz; Zeiger, 2010). A importância do gineceu, para o sucesso reprodutivo das Angiospermas, reside no fato de que ele age na seleção de grãos-de-pólen (na compatibilidade de espécies) (Lersten, 2004), no processo de penetração do grão-de-pólen, no direcionamento do crescimento do tubo polínico (Goldman, MHS. *et al.*, 1994), na formação e proteção dos gametófitos femininos, e na proteção do embrião a partir do momento da fecundação (Taiz; Zeiger, 2010).

1.1.1. *Nicotiana tabacum* como modelo de estudo da reprodução vegetal

A espécie *N. tabacum* é uma das Angiospermas mais estudadas, sendo utilizada como modelo para investigações de respostas a patógenos, do funcionamento do ciclo celular, de biossíntese de alcaloides, de estresse oxidativo, da reprodução vegetal e de desenvolvimento do tubo polínico (Bombarely *et al.*, 2011). Sua utilização é justificada por essa espécie possuir um

ciclo de vida relativamente curto (em torno de seis meses), seu fácil cultivo *in vitro* e, também, por ser transformada geneticamente de maneira relativamente fácil, tendo sido a primeira planta a ser transformada com sucesso (Herrera-Estrella *et al.*, 1983). Uma dificuldade de se utilizar *N. tabacum* como modelo reside no fato dessa ser uma espécie allotetraplóide ($2n = 4x = 48$), resultante do cruzamento $\text{♀} Nicotiana sylvestris \times \text{♂} Nicotiana tomentosiformis$ (Murad *et al.*, 2002; Yukawa *et al.*, 2006). Adicionalmente, esta espécie possui um genoma grande, de aproximadamente 4,5 bilhões de pares de bases (Opperman *et al.*, 2006), e que, até o presente momento, ainda não foi totalmente sequenciado.

Em estudos de reprodução de plantas, o uso de *N. tabacum* apresenta algumas outras vantagens, como a produção elevada de sementes (possui aproximadamente 1000 óvulos em cada um dos dois lóculos de cada ovário - Huang; Russel, 1992), e a presença de flores grandes e de fácil manuseio. Adicionalmente, esta espécie cresce bem em climas quentes, como o da região de Ribeirão Preto, SP. Assim, nosso grupo de pesquisa utiliza esta espécie como modelo para estudar o desenvolvimento e funcionamento do pistilo, identificando e caracterizando os genes expressos neste órgão reprodutivo.

O pistilo de *N. tabacum* (Figura 1.2) é do tipo composto, sendo formado pela fusão de dois carpelos (Bell; Hicks, 1976) e podendo ser dividido em três partes: o estigma, o estilete e o ovário. O estigma é bilobado e sua superfície é formada por uma epiderme com células papilares distribuídas de maneira espaçada (Bell; Hicks, 1976; Kandasamy; Kristen, 1987). Abaixo destas células se encontra uma zona secretória e um tecido parenquimatoso de suporte (Kandasamy; Kristen, 1987). A zona secretória do estigma converge no estilete, de tipo sólido, como uma região central de tecido transmissor, envolto pelo córtex parenquimatoso e pela epiderme (Kandasamy; Kristen, 1987; Kandasamy *et al.*, 1990). As interações entre grãos-de-pólen e pistilo compatíveis ocorre principalmente na zona secretória e no tecido transmissor (DePaoli *et al.*, 2011). Em *N. tabacum*, cada carpelo possui um único feixe vascular, que se localiza paralelamente ao tecido transmissor (Bell; Hicks, 1976).

1.2. SCI1: um regulador do desenvolvimento do pistilo de *N. tabacum*

Com o intuito de estudar genes importantes para o desenvolvimento do pistilo, são identificados genes preferencialmente ou exclusivamente expressos nesse órgão. Um desses genes, recentemente descrito por nosso grupo de pesquisa, foi denominado SCI1 – Stigma/style Cell-cycle Inhibitor 1. Esse nome foi dado devido aos fenótipos das plantas transgênicas nas

quais este gene foi silenciado e superexpresso, com o aumento e diminuição, respectivamente, do número de células da zona secretória do estigma e do tecido transmissor estigmático (DePaoli *et al.*, 2011). Foi proposto que esse gene faça parte de uma nova família de inibidores do ciclo celular, com expressão tecido-específica, controlando a proliferação celular dos seus tecidos-alvo (DePaoli *et al.*, 2012). A hipótese é que SCI1 seja um inibidor do complexo ciclina-CDK. Entretanto, o mecanismo de ação e a fase do ciclo celular nos quais SCI1 atua ainda não estão definidos.

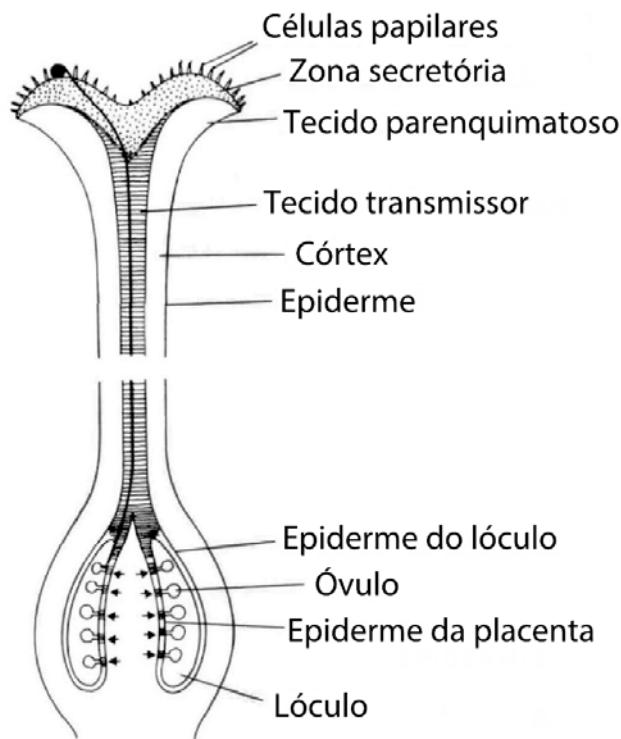


Figura 1.2 – Esquema de corte longitudinal do pistilo de *Nicotiana tabacum*. Modificado de Kandasamy *et al.*, 1990.

Para desvendar como a proteína SCI1 regula a proliferação celular, é necessário identificar e estudar as proteínas com as quais ela interage. Para esta finalidade, foi realizado, em nosso laboratório, um ensaio de *pull down* utilizando um extrato de proteínas de estigma e estilete de *N. tabacum*. Dentre os candidatos a interação, identificados através de espectrometria de massa (*MALDI TOF/TOF*) e análise com o software *MASCOT*, foi encontrada uma proteína similar à proteína CDK10/11 de *Ricinus communis* (no. acesso no NCBI: XM_002511178.1) (Strini, dados não publicados). A sequência de aminoácidos da CDK10/11 de *R. communis* foi,

então, utilizada para buscar similaridades no banco de dados de *A. thaliana*, o TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*). Esta busca resultou na identificação da proteína AtCDKG;2, com 62% de similaridade e 50% de identidade de aminoácidos a CDK10/11 (Lubini, 2012). As CDKs (*Cyclin-Dependent Kinases*) são uma classe de proteínas quinases envolvidas na regulação do ciclo celular (Morgan, 2007), e o estudo delas pode revelar mecanismos de controle do ciclo celular que podem influenciar o desenvolvimento dos órgãos das plantas.

1.3. Ciclo celular e CDKs

Diferente dos animais, as plantas se desenvolvem em grande parte no período pós-embriônário, o que destaca a importância das divisões celulares para a formação do indivíduo adulto (Inzé; De Veylder, 2006). O ciclo celular é o processo subjacente à divisão celular, e é um dos processos biológicos mais bem estudados em diversos organismos - de unicelulares a pluricelulares, de protozoários e leveduras a plantas e animais. Trata-se de um processo fundamental para o crescimento e desenvolvimento dos seres vivos (Inzé, 2007).

Desse modo, o estudo desse processo nas plantas é importante para entender os mecanismos através dos quais ocorre a regulação do desenvolvimento das mesmas, com possíveis implicações práticas no aumento da produção de biomassa e produção em plantações comerciais (Inzé, 2003). Inzé (2003) acredita que entender como a coordenação das divisões ocorre e como elas se integram ao desenvolvimento das plantas pode ajudar também a responder questões similares em outros organismos, visto que alguns genes de controle do ciclo podem ser funcionalmente expressos em organismos distintos.

1.3.1. As fases do ciclo celular

De modo geral, o ciclo celular em células eucarióticas compreende quatro fases: G₁, S, G₂ e M, porém diferentes tipos celulares possuem organizações diferentes dessas fases em relação ao seu tempo de duração (Morgan, 2007). As fases G₁ e G₂ são chamadas de fases *gap*, ou fases de parada, onde a célula duplica seus componentes e, principalmente, quando o mecanismo molecular de controle do ciclo celular mais atua (Alberts *et al.*, 2008). A fase G₁ é particularmente importante porque ela pode se estender em resposta a sinais externos e, até mesmo, fazer com que a célula entre em uma fase de estagnação, chamada G₀, onde pode

permanecer por períodos indeterminados (Morgan, 2007). Ao final de G₁, a célula atinge o primeiro ponto de checagem (*checkpoint*), onde um mecanismo molecular verifica a integridade da célula atua e, caso não haja problemas, a célula fica comprometida à replicação do DNA, que ocorre na fase S (Alberts *et al.*, 2008).

A fase S corresponde à fase de duplicação das moléculas de DNA e das proteínas associadas que determinam algumas funções dos cromossomos (Alberts *et al.*, 2008). Em alguns organismos, como *Drosophila* e em algumas plantas, pode ocorrer um tipo especializado de ciclo celular chamado endorreduplicação, que consiste em repetições da fase S antes de progredir para as fases seguintes, produzindo um número maior de cópias cromossômicas (Inzé, 2007; Morgan, 2007). Acredita-se que esse processo possa aumentar a quantidade de alguns produtos gênicos nessas células (Morgan, 2007).

Na fase G₂, posterior à S, ocorre síntese de proteínas e crescimento celular que preparam a célula para a entrada na mitose e, no final de G₂, há outro *checkpoint* para checagem de danos ao material genético (Alberts *et al.*, 2008). Caso sejam encontrados defeitos nas moléculas de DNA, por erros ocorridos na replicação ou pela ação de agentes danosos, as proteínas de reparo ao DNA são ativadas, e o ciclo só progride após o reparo. G₁, S e G₂ são coletivamente chamadas de Interfase, precedendo a fase M, que compreende a mitose e citocinese.

A mitose pode ser dividida em cinco outras fases: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase. Na transição entre metáfase e anáfase existe outro *checkpoint*, onde o complexo APC (*Anaphase Promoting Complex*) pode, ou não, ser ativado para promover a separação das cromátides-irmãs durante a anáfase (Morgan, 2007). Ao final da telófase ocorre a citocinese, onde o citoplasma da célula é dividido em dois, formando duas novas células, cada uma com suas próprias organelas e proteínas e seu próprio núcleo, com seus cromossomos contendo a mesma informação genética (Alberts *et al.*, 2008).

1.3.2. Regulação do ciclo celular

O ciclo celular é finamente regulado através de mecanismos moleculares de resposta a sinais intracelulares, resultantes do monitoramento das fases do ciclo, e extracelulares, como disponibilidade nutricional, hormônios, estágio de desenvolvimento e sinais ambientais. As respostas a esses sinais ocorrem através de interação e a degradação específica de algumas proteínas (Inzé, 2007). O mecanismo de controle é independente dos eventos do ciclo, agindo como um relógio bioquímico que regula esses eventos de modo que ocorram no tempo correto

e em intervalos específicos (Morgan, 2007). Esse controle age mesmo quando os eventos falham (Morgan, 2007).

A regulação do ciclo celular ocorre através de mecanismos moleculares que envolvem a fosforilação reversível de proteínas (Inzé, 2007), uma vez que os componentes principais desses mecanismos de controle são as CDKs (Morgan, 2007). As proteínas quinases, em geral, são responsáveis pela adição de grupos fosfato à cadeia lateral de resíduos de aminoácidos de outras proteínas e, desse modo, podem alterar a atividade das mesmas, marcá-las para degradação, mudar sua localização subcelular e modificar a dinâmica do complexo onde se encontram (Inzé, 2007).

As CDKs (*Cyclin-Dependent Kinases*) têm esse nome, pois somente possuem atividade de quinase quando associadas às ciclinas (Morgan, 2007). As ciclinas são proteínas que têm um ciclo de síntese e degradação durante as fases do ciclo celular (Morgan, 2007). Os complexos ciclina-CDK podem fosforilar uma grande quantidade de substratos nas diferentes fases do ciclo celular, inclusive durante *checkpoints* G₁/S e G₂/M, desencadeando a replicação do DNA e a mitose, respectivamente (Alberts *et al.*, 2008). A subunidade catalítica das CDKs atua sobre um motivo-alvo de serina (Ser) ou treonina (Thr), seguido de prolina (Pro), nas proteínas-substrato, enquanto que as ciclinas reconhecem os diferentes substratos sobre os quais as CDKs deverão agir, direcionando as mesmas para eles (Inzé; De Veylder, 2006; Morgan, 2007). A Figura 1.3 contém um esquema da ciclagem das ciclinas durante as diferentes fases do ciclo celular.

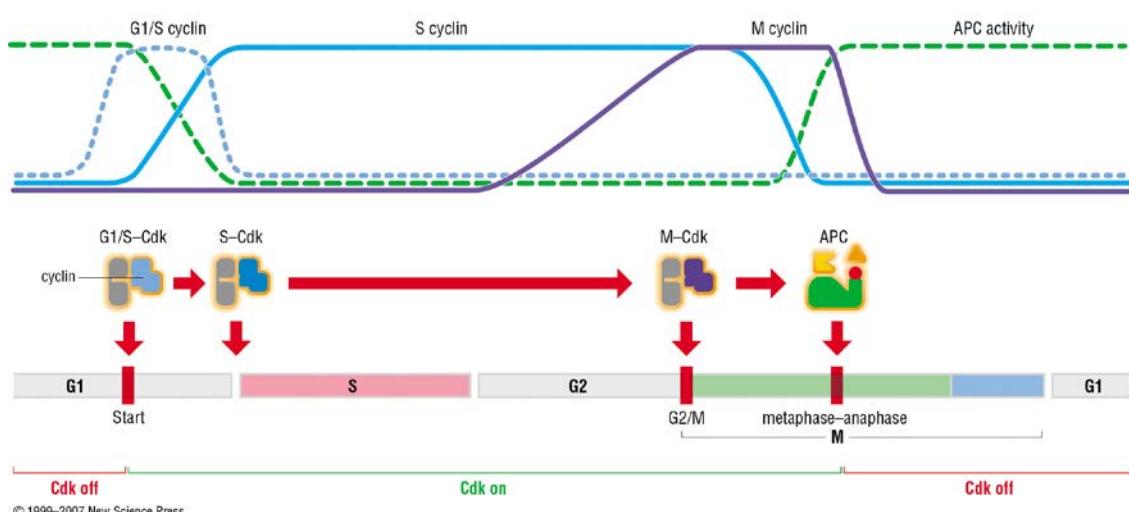


Figura 1.3 – Esquema simplificado do mecanismo de controle do ciclo celular. Em cima, o gráfico retrata os ciclos de síntese e degradação das principais ciclinas que agem no ciclo celular. Abaixo estão os eventos do ciclo regulados pelos complexos ciclina-CDK, que têm seu pico de atividade coincidente com os picos de produção de ciclinas. Retirado de Morgan, 2007.

1.3.3. Diferentes CDKs de plantas e suas funções

As plantas possuem um número de proteínas quinases significativamente maior que outros eucariotos, contendo de 600 a 2500 membros no seu repertório contra, por exemplo, 239, 285, 353 e 518 encontrados em *Drosophila*, *Dictyostellium discoideum*, ouriço-do-mar e *Homo sapiens*, respectivamente (Bradham *et al.* 2006; Goldberg *et al.* 2006; Lehti-Shiu; Shiu, 2012). Em *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*, aproximadamente 4% e 5% das sequências codificadoras, respectivamente, correspondem a proteínas quinases (Champion *et al.*, 2004; Dardick *et al.*, 2007). Atualmente, está disponível uma lista de 152 CDKs em 41 espécies de plantas, sendo que 14 diferentes CDKs são encontradas em *Arabidopsis thaliana*, espécie-modelo que possui o genoma sequenciado (Inzé, 2007). As sequências-motivo de ligação a ciclinas são utilizadas como um dos critérios para a divisão das CDKs em oito classes, de CDKA a CDKG, e em proteínas similares às CDKs, as CKLs (*CDK-like kinases*) (Inzé, 2007).

A classe CDKA é ortóloga à cdc28 de leveduras e é a classe com o maior número de representantes conhecidos em plantas (Inzé; De Veylder, 2006), possuindo papel em ambos os *checkpoints* do ciclo celular (Mews *et al.*, 2000). As CDKBs são específicas de plantas e compõem a segunda maior classe, dividida em CDKB1 e CDKB2 (Inzé, 2007). As CDKBs possuem funções celulares diversas, como um exemplo, a CDKB1;1 de *A. thaliana* é essencial para o desenvolvimento dos estômatos (Boudolf *et al.*, 2004) e para a manutenção da identidade do meristema apical caulinar (Andersen *et al.*, 2008), além de ser crucial para a entrada do ciclo celular na mitose (Porceddu *et al.*, 2001).

A classe CDKC contém as homólogas mais próximas das CDK9 de metazoários (Inzé, 2007). Em complexo com a ciclina T, a CDKC fosforila o domínio C-terminal (CTD) da RNA Polimerase II (RNAPII), atuando na extensão da transcrição (Fülöp *et al.*, 2005). Kitsios *et al.* (2008) observaram que AtCDKC;2 parece ter envolvimento no processamento de pré-mRNAs em *A. thaliana*, pois ela se co-localiza com os componentes do *spliceossomo*, modula sua distribuição, e é co-expressa com outros genes envolvidos nesse processamento. Uma hipótese que surge a partir desses dados é que as CDKCs possam fazer uma ligação entre a transcrição e o processamento de mRNAs em plantas (Kitsios *et al.*, 2008). As CDKEs também são específicas de plantas (Inzé, 2007) e, quando em complexo com ciclinas C, as CDKEs fosforilam o CTD da RNAPII, tendo efeito negativo na transcrição (Tank; Thaker, 2011).

As CDKDs de plantas pertencem a uma classe chamada de CAKs (*Cyclin-dependent kinase Activating Kinases*). Essas CDKs são homólogas às CDK7 de animais e leveduras (Inzé, 2007), que são CAKs ditas heteroméricas, pois formam um complexo constituído, em

vertebrados, por uma subunidade quinase catalítica CDK7/p40^{MO15}, uma subunidade regulatória ciclina H, e um fator de montagem MAT1 (Shimotohno *et al.*, 2003). Esses complexos heteroméricos fosforilam preferencialmente complexos CDK-ciclina maximizando sua atividade (Jia *et al.*, 2011). Esse tipo de CAKs também tem papel na regulação da transcrição através da fosforilação de resíduos de aminoácidos do CTD da RNAPII (Shimotohno *et al.*, 2003). Em *A. thaliana* foram identificadas três CDKDs: AtCDKD;1, AtCDKD;2 e AtCDKD;3 (Shimotohno *et al.*, 2004).

Com exceção da AtCDKD;2, as CDKDs possuem uma região C-terminal estendida, apresentando sinal de localização nuclear (Fabian-Marwedel *et al.*, 2002; Shimotohno *et al.*, 2004). A maioria das CDKDs possui a ciclina H (CycH) como subunidade regulatória (Inzé, 2007) e todas apresentam atividade de quinase nas três posições de serina das sequências consenso do CTD – S₂, S₅ e S₇ – da RNAPII. AtCDKD;2, no entanto, demonstrou maior atividade no CTD da RNAPII em comparação com AtCDKD;3, que possui maior atividade sobre CDKs, em específico CDKAs (Shimotohno *et al.*, 2004; Hajheidari *et al.*, 2012). A marcação de fosfoserina em S₅P em leveduras e mamíferos foi descrita como necessária para o recrutamento e ativação de enzimas de capeamento, que colocam uma *cap* de metilguanosina nas extremidades 5' dos transcritos emergentes, enquanto a marcação S₇ facilita a ligação da RNAPII ao complexo *Integrator*, mediando o processamento 3'-específico dos snRNAs U1/2, que fazem parte do *spliceossomo* (Matera *et al.*, 2007; Goldman, S. *et al.*, 2009; Hajheidari *et al.*, 2012).

A CAK CDKF é monomérica, cuja similaridade com CAKs de vertebrados é restrita somente à sequência de aminoácidos dos domínios quinase conservados. Uma característica única da CDKF;1 de *A. thaliana* (AtCDKF;1) é a inserção de 111 aminoácidos (posição 178-288) entre o sítio ativo da quinase e o sítio de fosforregulação correspondente ao *T-loop* das CDKs. A deleção dessa sequência de inserção provou que a mesma não é essencial para a atividade da CDKF (Inzé, 2007). Ela, no entanto, é encontrada em quinases relacionadas à CDKF de diferentes espécies, com alta similaridade de aminoácidos, indicando que essa sequência pode estar envolvida na interação com proteínas regulatórias específicas ou substratos em vias de sinalização planta-específicas (Inzé, 2007).

Algumas atividades conhecidas da AtCDKF;1 estão descritas a seguir. Ela atua como CAK, juntamente das CDKDs, sobre CDKAs (Shimotohno *et al.*, 2006), porém essa ativação direta não é essencial, podendo ser suprida pela atividade das CDKDs (Takatsuka *et al.*, 2009). A CDKF também age como CAKAK (*CDK-activating kinase-activating kinase*), fosforilando os resíduos Ser/Thr das três CDKDs de *A. thaliana* (Shimotohno *et al.*, 2006). Foi observado

também que AtCDKF;1 e a CDKF;1 de *Euphorbia esula* (EeCDKF;1) são capazes de realizar auto-fosforilação, confirmando um mecanismo de auto-ativação independente da interação com ciclinas (Hajheidari *et al.*, 2012; Jia *et al.*, 2011). Ela também realiza fosforilação sítio-específica de resíduos S₇ das repetições consenso do CTD da RNAPII (Hajheidari *et al.*, 2012). Além disso, Hajheidari *et al.* (2012) sugerem que há sinergia entre a fosforilação dos resíduos Ser das repetições do CTD, uma vez que as fosforilações das posições S₂P e S₅P pelas CDKDs facilitaram a fosforilação da posição S₇, e vice-versa.

1.3.3.1. Estudos envolvendo CDKG;2

Devido ao envolvimento das CDKs com o ciclo celular e ao fato de uma proteína com similaridade à CDKG;2 ter sido encontrada no experimento de *pull down* com SCI1, a sequência de DNA correspondente à CDKG;2 de *N. tabacum*, NtCDKG;2, foi amplificada a partir de cDNAs do pistilo, clonada e caracterizada por nosso grupo de pesquisa (Lubini, 2012). As quinases da classe CDKG foram identificadas em *A. thaliana*, sendo os genes AtCDKG;1 e AtCDKG;2 relacionados com os genes CDK10 e CDK11 em humanos, os quais estão relacionados com o processamento de mRNA, realizado em parte pela RNAPII (Trembley *et al.*, 2004). Além disso, a CDK11 está envolvida na regulação da maquinaria do *splicing* e sua interação com a ciclina L parece ser essencial para essa função (Trembley *et al.*, 2004; Loyer *et al.*, 2008).

A AtCDKG;1 apresenta um papel importante na regulação do *splicing* do pré-mRNA do gene *CalS5*, envolvido na produção de calose, que é importante para a formação da parede dos grãos-de-pólen em *A. thaliana* (Huang *et al.*, 2013). Ela também interage com o fator de *splicing* RSZ33, entrando para o grupo de CDKs que participam no processamento de pré-mRNAs, como a AtCKDC;2 e as CDKs 11, 12 e 13 de humanos (Huang *et al.*, 2013). Duas características em comum entre essas proteínas são (1) a interação ou co-localização com fatores de *splicing*, como proteínas *Serine-Rich* (SR)e (2) a presença de um ou mais motivos RS (*Arginine/Serine*) na região amino-terminal (N-terminal) (Huang *et al.*, 2013). AtCDKG;1 possui 4 desses motivos, enquanto que AtCDKG;2 possui 6 (Huang *et al.*, 2013). Análises *in silico* da sequência de NtCDKG;2, feitas em nosso laboratório, mostraram a presença de 5 motivos RS, o que pode indicar sua possível participação no processamento de mRNAs.

Estudos de *knockout* do gene AtCDKG;2 em *A. thaliana* mostraram atraso na organogênese nos mutantes, a não formação de raízes em meio indutor, a malformação do caule das plantas sem raiz, e o desenvolvimento de inflorescências, porém sem sementes, devido a

malformação dos órgãos reprodutivos (Żabicki *et al.*, 2013). Os autores sugeriram que a função da AtCDKG;2 não está limitada ao controle do ciclo celular, podendo estar envolvida em outras funções durante o desenvolvimento inicial da planta - provavelmente na formação do meristema da raiz -, e no desencadeamento da organogênese (Żabicki *et al.*, 2013).

Através de ensaios de *BiFC* (*Bimolecular Fluorescent Complementation*) em células BY2 de *N. tabacum* e TAP (*Tandem Affinity Purification*) em *A. thaliana*, foram identificadas interações de AtCDKG;2 com 6 ciclinas (CycA3;4/CycD4;1/CycD4;2/CycF1/CycH1/CycL1), duas CDKs (CDKB;1 e CDKF;1), e um inibidor de CDK (KRP4) (Van Leene *et al.*, 2007; Boruc *et al.*, 2010a; Van Leene *et al.*, 2010). Em nosso laboratório, experimentos de *BiFC* confirmaram a interação entre SCI1 e NtCDKG;2 identificada por *pull down* (Strini, dados não publicados), a qual ocorre no núcleo das células vegetais, mais precisamente no nucléolo.

Em um *screening* de uma biblioteca de cDNAs de estigma e estilete de *N. tabacum*, no sistema de duplo-híbrido de levedura (Y2H), usando NtCDKG;2 como isca, nosso grupo de pesquisa identificou NtCDKF;1 (Lubini, dados não publicados). Este resultado corrobora a interação entre CDKG;2 e CDKF;1 já observada em *A. thaliana*. O fato de que várias CDKs, inclusive a CDKF;1, atuam sobre a CTD da RNAPII, levanta a hipótese de que NtCDKG;2 também possa ter esse papel. Adicionalmente, o fato de que a AtCDKG;1, da mesma classe que AtCDKG;2, atua na regulação do *splicing* de pré-mRNAs, e que NtCDKG;2 possui 5 motivos RS, sugerem que CDKG;2 possa participar no controle do processamento de mRNAs. Portanto, estabelecer a localização subcelular de NtCDKG;2 e sua possível co-localização com fatores de *splicing* são importantes tarefas no sentido de elucidar a função molecular e biológica desta proteína.

Com os dados observados tanto na literatura quanto em experimentos do nosso grupo de pesquisa, surgiram algumas hipóteses, das quais algumas (representadas na Figura 1.4) foram abordadas por esse trabalho.

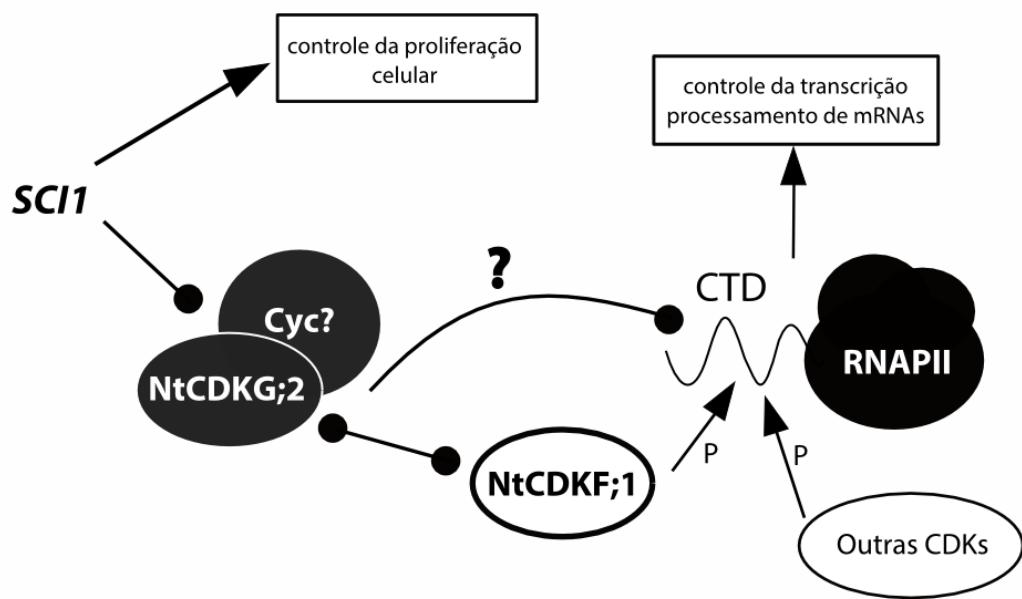


Figura 1.4 – Hipóteses sobre o funcionamento de NtCDKG;2 endereçadas pelo presente trabalho. Setas indicam indução ou promoção; barras com círculos indicam indução ou repressão. Em cinza claro – prováveis parceiras de interação de NtCDKG;2; P – fosforilação.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho pretende contribuir para responder às seguintes perguntas:

- 1) Como SCI1 regula a proliferação celular?
- 2) A regulação da proliferação celular por SCI1 ocorre por meio de sua interação com NtCDKG;2?
- 3) Qual(is) é(são) a(s) função(ões) biológica(s) de NtCDKG;2?

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O presente trabalho tem como objetivos específicos:

- Estudar a localização subcelular de NtCDKG;2.
- Identificar e estudar as interações proteína-proteína que NtCDKG;2 estabelece. Para isto, será necessário:
 - Clonar a sequência codificadora do CTD da RNAPII de *Nicotiana tabacum*.
 - Obter a proteína recombinante GST-CTD da RNAPII.
 - Realizar ensaios de duplo-híbrido em levedura, testando a interação entre o CTD da RNAPII com NtCDKG;2 e NtCDKF;1.
 - Dar continuidade ao *screening* de duplo-híbrido, utilizando NtCDKG;2 como isca.

3. MATERIAIS & MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Nesse trabalho foram utilizadas plantas da espécie *Nicotiana benthamiana* para os ensaios de expressão heteróloga transiente. Foram utilizados indivíduos com 70-90 dias após a germinação, crescidos em câmara de crescimento de ambiente controlado, a temperatura de 22°C, umidade média de 55 % e fotoperíodo 12h:12h (luz:escuro).

3.2. Meios de Cultura

Os meios de cultura estão descritos no APÊNDICE A.

3.3. Preparo de células competentes

Todos os procedimentos para a preparação de células competentes foram realizados em condições estéreis, em um fluxo laminar.

3.3.1. Preparo de *Escherischia coli* eletrocompetentes

As células de *E. coli* cepas DH10B foram estriadas em meio LB e incubadas a 37°C por 16-20 h. Uma colônia isolada foi inoculada em meio LB líquido e incubada a 37°C e 220 rpm por 16-20 h. No final desse período, 1 mL do inoculo foi passado para um Erlenmeyer contendo 200 mL de meio LB líquido, que ficou a 37°C e 220 rpm de agitação até a cultura atingir absorbância a 600 nm (OD₆₀₀) entre 0,5 e 0,8. A cultura foi mantida no gelo por 30 min e depois foi transferida para tubos Falcon, que foram centrifugados a 1100 x g a 4°C numa centrifuga Eppendorf (modelo 5810R) por 10 min. O sobrenadante dos tubos foi descartado e os precipitados de células foram ressuspensos em 25 mL de água deionizada (Millipore) esterilizada. O volume total (100 mL) foi dividido em dois tubos Falcon, que foram novamente centrifugados a 1100 x g e 4°C por 10 min. Após descartar o sobrenadante, o precipitado de cada tubo foi ressuspensos em 5 mL de glicerol 10 %, e os tubos foram novamente centrifugados nas mesmas condições da centrifugação anterior. O sobrenadante foi descartado

e o precipitado foi ressuspensionado em 500 μ L de glicerol 10 % em cada tubo. O volume final (1 mL) foi dividido em alíquotas de uso de 40 μ L, posteriormente mantidas sob -80°C até o momento do uso.

3.3.2. Preparo de *Agrobacterium tumefaciens* eletrocompetentes

Células em estoque da cepa C58C1RifR (pGV2260) foram estriadas em uma placa contendo meio MAS sólido, que foi incubada a 28°C por 48 h. Uma colônia isolada foi inoculada em meio LB 2X líquido e incubada a 28°C e 150 rpm por 16-20 h. A cultura foi então centrifugada a 9900 x g e 4°C por 1 min (centrífuga Eppendorf 5810R), e o sobrenadante descartado. O precipitado celular foi ressuspensionado em 500 μ L de ácido 4-(2-hidroxietil)-ácido-1-piperazina-etanossulfônico (HEPES) 1 mM e centrifugado novamente nas mesmas condições da anterior. Esse processo foi repetido duas vezes. Após descartar o sobrenadante, as células foram ressuspensionadas em 200 μ L de glicerol 10 %, e o volume final foi dividido em alíquotas de uso de 40 μ L, sendo mantidas a -80°C até o momento de uso.

3.3.3. Preparo de *Saccharomyces cerevisiae* competentes

Células em estoque da cepa de leveduras PJ69-4a ([*MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ*] – James *et al.*, 1996) foram estriadas, com uma alça de platina, em uma placa de Petri contendo meio YPAD sólido, que foi então incubada a 30°C por 48 h. Dessa placa, foi selecionada uma colônia isolada que foi inoculada em meio YPAD líquido e incubada *overnight* a 30°C e 200 rpm. Na manhã seguinte, a cultura foi deixada em incubação até atingir $OD_{600} \geq 0,1$. Após atingir esse valor, a cultura foi diluída em dois Erlenmeyers contendo 150 mL de meio YPAD líquido cada, previamente esterilizados, e a mistura foi incubada a 30°C e 200 rpm até atingir $OD_{600} \geq 0,5$. Ao atingir essa absorbância, a cultura foi dividida em 6 tubos Falcon e as células foram centrifugadas a 1250 x g (centrífuga Eppendorf 5810R) por 5 min a T.A. (temperatura ambiente). O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o precipitado celular de cada tubo foi ressuspensionado em 5 mL de água deionizada esterilizada. Ao final desse processo, as soluções ficaram divididas em dois tubos Falcon, que foram novamente centrifugados durante 5 min nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em cada tubo com 750 μ L da solução [TE 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 1 mM); LiAc 1X (acetato de lítio 100 mM; TE 0,5X)].

Foram adicionados a essa mistura 500 μ L de glicerol 80 %, e as células foram armazenadas em alíquotas de uso de 50 μ L a -80°C.

3.4. Transformação de células por eletroporação

3.4.1. Transformação de *E. coli* eletrocompetentes

Para a transformação de células de *E. coli* DH10B foi utilizada uma alíquota de células (40 μ L) por transformação. Essas células foram descongeladas em gelo, e foi adicionado 1-2 μ L do DNA de interesse às células. Essa mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 10 mm (BioRad) previamente gelada. O conjunto foi então colocado no eletroporador *GenePulse II* (BioRad), e submetido a um pulso elétrico de 1.8 kV, capacitância de 25 μ F e resistência de 200 Ω durante 5 s. Logo após o pulso, 1 mL de meio LB líquido foi adicionado para recuperar as células da cubeta, e todo o volume foi transferido para um tubo de ensaio. As células transformadas foram incubadas logo em seguida a 37°C e 200 rpm durante 1 h. No final desse período, 200-500 μ L da cultura foram plaqueados em meio LB sólido complementado com antibióticos de seleção adequados. A placa foi incubada a 37°C por 16-20 h.

3.4.2. Transformação de *A. tumefaciens* eletrocompetentes

A transformação de *A. tumefaciens* é similar à de *E. coli*, porém existem algumas diferenças quanto às incubações. Após o pulso elétrico, as células são incubadas a 28°C e 150 rpm durante 4 h. Depois de plaquear 200-500 μ L da cultura, as placas ficam incubadas a 28°C por 48 h.

3.5. Transformação de *S. cerevisiae* por choque térmico

Uma alíquota de 50 μ L de células de levedura PJ69-4a foram descongeladas em gelo até o momento do uso, quando foram adicionados 500 ng de cada um dos DNAs de interesse e 5 μ L de DNA de esperma de salmão 10 mg/mL previamente desnaturado a 100°C por 5 min. À mistura foram adicionados 300 μ L de solução de PEG/LiAc [TE 1X; LiAc 1X; Polietilenoglicol-3350 (PEG-3350) 40 %]. O tubo foi incubado em banho-maria a 30°C por 30 min, e, após esse período transferido para um banho-maria a 42°C, onde ficou por 15 min. O tubo foi

então centrifugado a 7000 x g por 30 s a T.A. (microcentrífuga Eppendorf 5415 D). O sobrenadante foi cuidadosamente removido e o precipitado celular foi ressuspensido em 200 µL de solução de NaCl 0,9 %. A solução contendo as células transformadas foi plaqueada em meio SC – Leu –Trp sólido, e a placa foi incubada a 30°C por 48-72 h.

3.6. Extração de DNA plasmidial em pequena escala (minipreparação, miniprep)

3.6.1. Extração de DNA plasmidial de *E. coli*

A extração de DNA plasmidial de *E. coli* foi realizada através de dois métodos diferentes. O primeiro, a extração com lisozima, foi utilizada principalmente para a checagem de tamanhos de inserts em diferentes vetores com enzimas de restrição. O segundo foi a utilização de um *kit* comercial, o *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas Lifesciences), utilizado principalmente para obter um DNA de qualidade para utilizar em transformações e sequenciamentos. A extração com o *kit* foi realizada segundo as instruções presentes no mesmo.

Em ambos os métodos, a etapa inicial consistiu no crescimento da colônia de interesse em meio LB líquido suplementado com antibióticos de seleção adequados, incubada a 37°C por 16-20 h e 220 rpm, precedendo a extração. Essa colônia foi obtida de uma placa resultante de transformação por eletroporação ou de estoques em glicerol. No primeiro caso, um estoque semipermanente em glicerol 25 % foi feito para as colônias ainda não estocadas precedendo a extração (Sambrook; Russell, 2001). Os estoques foram armazenados a -80°C.

Para a extração com lisozima, um volume de 1,5 mL de cultura foi centrifugado a 18000 x g por 2 min a T.A (microcentrífuga Eppendorf 5415 C). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o processo foi repetido uma vez. Depois de descartar o sobrenadante, a colônia precipitada foi ressuspensida em 175 µL de tampão TES [Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0; sacarose 15%]. Em seguida, foram adicionados 20 µL de lisozima (25 mg/µL), e a mistura ficou incubada por 10 min a T.A. e a seguir em banho-maria a 73°C por 15 min. O tubo foi centrifugado a 18000 x g por 15 min para a separação dos *debris* celulares. Após a centrifugação, o sobrenadante contendo os plasmídeos foi transferido a um novo tubo, onde houve a adição de 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol gelado. A mistura ficou incubada a -80°C por 15 min, e em seguida o tubo foi centrifugado a 18000 x g durante 15 min. O sobrenadante foi descartado e foi feita uma lavagem com 400 µL de etanol 70 %, o tubo foi novamente centrifugado a 18000 x g por 3 min e o sobrenadante descartado. Os tubos abertos foram mantidos em T.A. até a evaporação total do etanol, e o DNA precipitado

foi ressuspensionado com 50 μ L de água deionizada estéril. As soluções contendo os plasmídeos foram armazenadas a -20°C.

3.6.2. Extração de DNA plasmidial de *A. tumefaciens*

O método utilizado para extrair os plasmídeos de *A. tumefaciens* foi o da lise alcalina, baseado no descrito por Brasileiro e Carneiro (1998). Assim como nos métodos anteriores, anterior à extração a colônia de interesse foi inoculada em meio LB suplementado com antibióticos de seleção e incubada por 24 h a 28°C e 150 rpm. Caso o inoculo tenha sido feito de uma placa de colônias recém transformadas, foi feito também o estoque semipermanente em glicerol como descrito no item anterior.

Inicialmente, um volume de 1,5 mL de cultura foi submetido à centrifugação por 2 min a 13300 x g e T.A. (microcentrífuga Eppendorf 5415 C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspensionado em 1 mL de Tampão I [NaCl 0,2 M em Tris-EDTA]. Foi realizada nova centrifugação por 2 min nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e o processo repetido uma vez. Depois de descartar o sobrenadante novamente, o precipitado foi ressuspensionado em 200 μ L de Tampão I, e foram acrescentados 200 μ L de Solução I [NaOH 0,2 N; dodecil sulfato de sódio (SDS) 1 %]. A mistura foi homogeneizada e, em seguida, mantida em gelo por 15 min. Ainda no gelo, foram adicionados 150 μ L de acetato de potássio 3 M (pH 5,2) gelado. A mistura foi homogeneizada manualmente e novamente mantida em gelo por 30 min. No final desse período, o tubo foi centrifugado por 5 min a 13300 x g e T.A. para separar os *debris* celulares do DNA plasmidial. O sobrenadante foi transferido a um novo tubo, onde foi acrescido de 2 volumes de etanol, e depois mantido a -20°C por no mínimo 1 h para ocorrer a precipitação. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 13300 x g e T.A. por 30 min e o sobrenadante foi descartado a seguir. O precipitado foi lavado com 400 μ L de etanol 70 % e centrifugado novamente por 2 min nas mesmas condições anteriores. Depois de descartado o etanol, o tubo foi deixado aberto a T.A. até a evaporação total do etanol residual, e o precipitado foi ressuspensionado em 20 μ L de água deionizada esterilizada.

3.6.3. Extração de DNA plasmidial de *S. cerevisiae*

Previamente a extração, a colônia isolada foi inoculada em meio SC –Leu –Trp líquido e incubada a 30°C e 285 rpm por aproximadamente 24 h. Depois desse período a colônia foi centrifugada a 14000 x g por 30 s a T.A (centrífuga Eppendorf 5810 R). Após o descarte do

sobrenadante, foi feita uma de duas opções: realizar a extração imediata ou manter os precipitados celulares a -20°C até o momento da extração. A segunda opção foi utilizada quando foi feito inoculo de colônias em placas de 96 poços, permitindo a extração gradual das colônias.

Para a extração, o precipitado celular foi ressuspensionado em 100 µL da solução [SDS 3 %, NaOH 0,2 N] recém-preparada, e a mistura foi incubada por 15 min a T.A. com ocasionais inversões rápidas do tubo durante esse período. A seguir foram adicionados 500 µL de tampão TE e 60 µL de acetato de sódio 3M. A mistura foi homogeneizada por inversões rápidas. Foram então adicionados 600 µL de fenol [saturado com Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM]:clorofórmio:álcool isoamílico, 25:24:1, e o tubo foi agitado em vórtex por 2 min na velocidade máxima. Em seguida o tubo foi centrifugado a 14000 x g por 2 min, e a fase superior foi removida cuidadosamente e transferida para um novo tubo. Novamente foram adicionados 600 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, e o tubo foi agitado e centrifugado nas mesmas condições anteriores. A fase superior foi transferida para um novo tubo onde foram adicionados 650 µL de isopropanol gelado, ficando essa mistura a -20°C por no mínimo 20 min. O tubo foi então centrifugado a 14000 x g por 5 min e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente para evitar a perda do precipitado. Foi feita nova centrifugação por 10 s para remover o sobrenadante residual. 100 µL de etanol 70 % foram adicionados e o tubo centrifugado por 5 min nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado, o precipitado seco a T.A. e ressuspensionado em 10 µL de água deionizada estéril.

3.7. Limpeza de DNA plasmidial pelo método do fenol-clorofórmio

O volume inicial da solução foi completado com água deionizada esterilizada q.s.p. 200 µL. A essa solução foram adicionados 4 µL de solução de RNase (10 µg/µL), e a mistura foi mantida em banho-maria a 37°C por 30 min. Depois, foram adicionados 200 µL de fenol tamponado em pH 8,0 (Invitrogen), e a mistura foi homogeneizada em vórtex e centrifugada a seguir por 3 min a 18000 x g, T.A. (microcentrífuga Eppendorf 5415 C). A fase superior da mistura foi removida e transferida para um novo tubo, no qual foi adicionado 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1. O tubo foi vortexado e centrifugado nas mesmas condições anteriores. A fase superior da mistura foi novamente removida e transferida para um novo tubo, onde foi adicionado 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol gelado. A mistura foi mantida por 15 min a -80°C para ocorrer a precipitação do DNA plasmidial. Em

seguida, o tubo foi centrifugado por 15 min a 18000 x g, T.A. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 400 µL de etanol 70 %, sofrendo nova centrifugação por 3 min nas mesmas condições da anterior. O sobrenadante foi novamente descartado e o tubo aberto ficou a T.A. até a evaporação do etanol residual. O precipitado foi ressuspensionado em 50 µL de água deionizada estéril.

3.8. Digestão com enzimas de restrição

Todas as construções foram checadas através de digestão com endonucleases de restrição seguida de eletroforese em gel de agarose, após a transformação de *E. coli* cepa DH10B e replicação em meio seletivo. As digestões foram planejadas utilizando a ferramenta *online* NEBCutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>, New England BioLabs), o qual indica sítios de restrição de diversas enzimas para a sequência de interesse. Para cada digestão, o ideal foi escolher enzimas que possuam sítios dentro da sequência de interesse e também na sequência do vetor, para confirmar a inserção. Caso a sequência de interesse não estivesse sequenciada, foram escolhidas enzimas que excisavam o fragmento inserido, para extrapolar a inserção através da comparação do tamanho do fragmento resultante com o tamanho esperado do inserto. As digestões foram feitas utilizando o tampão adequado para cada enzima, RNase, *Bovine Serum Albumine* (BSA) quando necessário e água deionizada estéril, além do DNA a ser digerido. As reações foram feitas em temperatura e tempo adequados para as enzimas utilizadas. O produto foi utilizado logo em seguida ou armazenado a -20°C.

3.9. Análise de fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose

Os géis de agarose foram feitos em duas situações para analisar moléculas de DNA. A primeira delas foi para a checagem de DNA que passou por digestão enzimática com nucleases de restrição. A outra foi para checar o tamanho de produtos de reações de PCR para a clonagem do gene de interesse, e posterior excisão e purificação da banda contendo esse gene. As análises foram feitas através de eletroforese em gel de agarose 1 % (w/v) em tampão TBE 0,5X [Tris-base 50 mM; ácido bórico 50 mM; EDTA 2 mM, pH 8,0].

A mistura [TBE 0,5X; agarose 1%] foi aquecida em forno micro-ondas para a dissolução da agarose. Após dissolvida, ela foi ligeiramente resfriada e acrescida de brometo de etídeo em concentração final de 1 ng/mL. Após a adição do intercalante de DNA, a mistura foi colocada

em um molde para gel de agarose para a formação dos poços para a aplicação de amostras. Depois de solidificado, o gel foi colocado em uma cuba de eletroforese contendo tampão TBE 0,5X em q.s.p. recobrir todo o gel. As amostras foram preparadas com a adição de tampão de carregamento [azul de bromofenol 0,25 %; xileno cianol 0,25 %; Ficoll] 6X o suficiente para sua concentração final na amostra ficar 1X. O marcador utilizado foi o *1kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen). Depois de aplicadas as amostras, o gel foi submetido a uma corrente elétrica de 100 V durante 90-120 min.

Após a eletroforese, o gel foi retirado da cuba e transferido ao sistema *Kodak Gel Logic 100 Imaging System* (Kodak), que possui um sistema de emissão de luz UV acoplado a uma câmera, ligado a um computador. As imagens foram capturadas através do *software* que acompanha o sistema, e as condições de exposição e iluminação dependeram da quantidade de DNA aplicada no gel, sendo otimizadas para melhor visualização.

3.10. Sequenciamentos

Os sequenciamentos foram feitos pela Dr^a. Andréa Carla Quiapim, utilizando o sequenciador *ABI 3100* (Applied Biosystems). Os *primers* utilizados nas reações de sequenciamentos estão descritos no APÊNDICE B.

3.11. Clonagem e Subclonagens

A clonagem e as subclonagens presentes nesse trabalho foram feitas através do Sistema Gateway® (*Gateway® Technology*, Invitrogen). Esse sistema se baseia na recombinação entre sítios específicos presentes na sequência de interesse e nos vetores artificiais de entrada e de expressão, os sítios *att*. Existem quatro tipos de sítios de recombinação: os *attB*, que são adicionados através de PCR às extremidades de uma sequência de interesse e também estão presentes em vetores depois de uma reação LR; os sítios *attP*, presentes nos vetores de entrada vazios; os sítios *attL*, que flanqueiam a sequência de interesse dentro do vetor após uma reação BP; e os sítios *attR*, presentes nos vetores de expressão vazios. As reações BP ocorrem entre sítios de recombinação *attB* e *attP*, gerando sítios *attL* no vetor e *attR* como subproduto. As reações LR ocorrem entre sítios *attL* e *attR*, gerando sítios *attB* no vetor e *attP* como subproduto. A Figura 3.1 resume o sistema Gateway de clonagem.

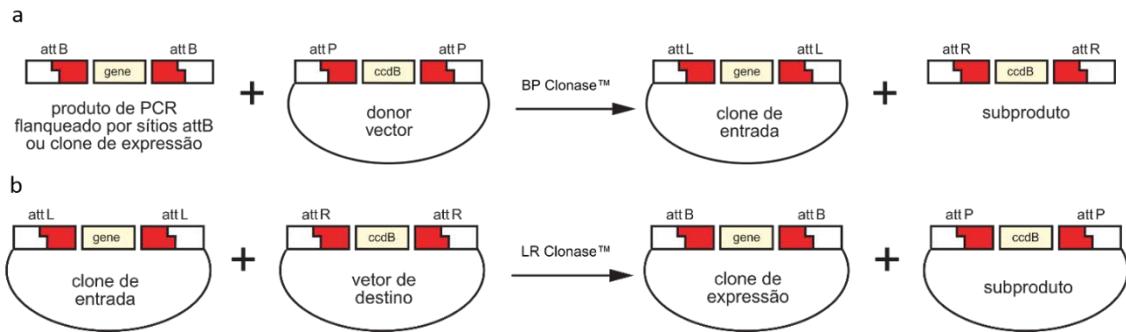


Figura 3.1. Reações de recombinação do *Gateway® Technology*, Invitrogen. a. Reação BP. b. Reação LR. Modificado de Invitrogen, 2010.

Os vetores de entrada, quando vazios, geralmente são chamados de “pDONR”, e após a recombinação passam a ser chamados de “pENTRY”. Os vetores de destino vazios são chamados “pDEST”, e após transformados recebem o nome de “pEXP”, seguidos de sua denominação e sequência inserida, p.e. pEXP15-RNAPII CTD c/s, se refere ao vetor pDEST15 recombinado com a sequência codificadora do domínio C-terminal da RNA Polimerase II com códon de terminação.

3.11.1. Inserção de sítios *attB* através da PCR

Para trabalhar com a sequência de interesse, foi necessário realizar uma clonagem da mesma, seguida da inserção dos sítios de recombinação *attB*1 e *attB*2 para a inserção no vetor de entrada do sistema de clonagem.

Isso foi feito em dois passos, chamados PCR1 e PCR2. Na PCR1, a sequência de interesse foi amplificada a partir de uma mistura de cDNAs de estigma e estilete de diferentes estágios de desenvolvimento de *N. tabacum* gentilmente cedidos pela estudante de mestrado Lígia Tereza Bertolino, utilizando-se *primers* específicos da sequência que contém também uma porção dos sítios *attB* em suas extremidades. Com o produto da PCR1 foi realizada uma nova reação, a PCR2, utilizando *primers* que contém os sítios *attB*1 e *attB*2 completos.

3.11.2. Desenho de *primers*

Os *primers* para a amplificação da sequência codificadora da região C-terminal da RNA Polimerase II foram desenhados a partir de análises *in silico* (descritas na seção 4.2), com o objetivo de amplificar a sequência desde o códon de iniciação até o de terminação e inserir as porções dos sítios *attB*1 e *attB*2 para a segunda reação.

3.11.3. Reações de PCR para clonagem e inserção de sítios *attB*

Ambas as reações foram feitas com o kit *KAPA3G Plant PCR Kit* (Kapa Biosystems), em condições diferentes, com os *primers* descritos no APÊNDICE B.

3.11.3.1. PCR1

Foram utilizados 25 µL de KAPA *Plant PCR Buffer 2X*, 0,5 µL de KAPA *Plant PCR Enhancer*, 0,4 µL de KAPA3G *Plant DNA Polymerase*, 1,5 µL do *primer forward* (attB1-CTD RNA pol II-Fw), 3 µL do *primer reverse* (attB2-CTD RNA pol II-Rv c/s), 2 µL de cDNA e água deionizada esterilizada q.s.p. 50 µL. A desnaturação inicial foi feita a 95°C por 300 s, seguida de 40 ciclos de 95°C por 20 s, 50°C por 15 s e 72°C por 60 s. Depois, foi feito um passo de extensão final a 72°C por 10 min, após o qual as reações ficaram a 10°C até serem retiradas do termociclador.

O *primer* attB2-CTD RNA pol II-Rv c/s foi utilizado em maior concentração pelo fato de ser degenerado, podendo ser possível sua presença em duas sequências diferentes. Assim, foram fornecidas quantidades teoricamente iguais de cada sequência para a reação.

3.11.3.2. PCR2

Foram utilizados 25 µL de KAPA *Plant PCR Buffer 2X*, 0,5 µL de KAPA *Plant PCR Enhancer*, 0,4 µL de KAPA3G *Plant DNA Polymerase*, 1,5 µL do *primer forward* (BP1), 1,5 µL do *primer reverse* (BP2), 2 µL do produto da PCR1 e água deionizada estéril q.s.p. 50 µL. A desnaturação inicial foi feita a 95°C por 300 s, seguida de 35 ciclos de 95°C por 20 s, 50°C por 15 s e 72°C por 60 s. Depois, foi feito um passo de extensão final a 72°C por 10 min, após o qual as reações ficaram a 10 °C até serem retiradas do termociclador.

Ambas as reações foram submetidas à análise por eletroforese em gel de agarose para confirmar o tamanho esperado do produto. O DNA foi então extraído dos géis com o *GeneJET™ Gel Extraction Kit* (Fermentas Lifesciences) e armazenado a -20°C até o momento do uso.

3.11.4. Reações de recombinação

3.11.4.1. Reações BP

Foram utilizados 150 ng de DNA do vetor de entrada, 100 ng de DNA da sequência de interesse flanqueada por sítios *attB*, 1 μ L de *mix* de enzimas *BP ClonaseTM 5X* (Invitrogen) e água deionizada estéril q.s.p. 5 μ L. A reação foi incubada em T.A. *overnight*. Após a incubação, foi adicionado 1 μ L de proteinase K (2 μ g/ μ L) (Invitrogen), e a mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por 10 min para parar a reação. O produto foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

3.11.4.2. Reações LR

Foram utilizados 150 ng de DNA do vetor de destino, 100 ng do clone de entrada, 1 μ L de *mix* de enzimas *LR ClonaseTM 5X* (Invitrogen) e água deionizada estéril q.s.p. 5 μ L. A reação foi incubada a T.A. *overnight*. Após a incubação, foi adicionado 1 μ L de proteinase K (2 μ g/ μ L) (Invitrogen) e a mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por 10 min. O produto foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

3.11.5. Plasmídeos utilizados

3.11.5.1. pDONR221

O plasmídeo pDONR221 (Invitrogen) foi utilizado como vetor de entrada no sistema *Gateway[®]* de clonagem, sendo todas as reações LR para a produção de vetores de expressão feitas a partir do clone obtido nesse vetor. Após a reação de recombinação e consequente inserção do gene de interesse nesse vetor, ele passou a ser chamado de pENTRY (Figura 3.2).

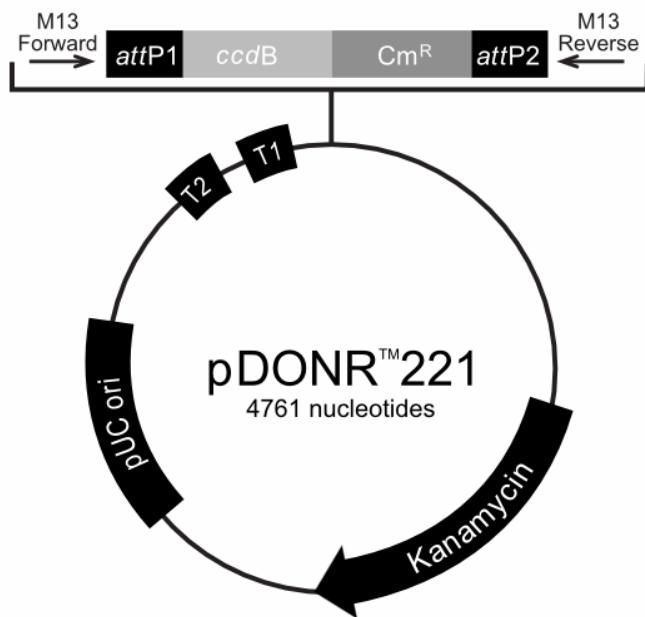


Figura 3.2. Mapa representativo do vetor de entrada pDONR™221 (Invitrogen). Esse vetor apresenta os sítios de recombinação *attP* flanqueando os genes de seleção negativa *ccdB*, que produz a proteína *ccdB*, inibidora da enzima DNA girasse, e *Cm^R*, que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol. O gene de seleção positiva é responsável pela resistência à canamicina em *E. coli* transformadas com esse vetor. Ele possui também dois sítios de anelamento a *primers* de sequenciamento, M13 Forward e M13 Reverse. Possui também a sequência pUC ori, essencial para sua replicação e manutenção em *E. coli*, além de T1 e T2, terminadores *rrnB* para a proteção do gene clonado contra a expressão por promotores codificados pelo próprio vetor. Modificado de Life Technologies, 2012a.

3.11.5.2. pDEST15

O plasmídeo pDEST15 (Invitrogen – Figura 3.3) é um vetor de expressão que contém a sequência codificadora da proteína Glutationa S-Transferase (GST) na região precedente ao sítio de recombinação do vetor. Desse modo, a expressão do mesmo acarreta na produção da proteína de interesse em fusão N-terminal com GST, que funciona então como uma *tag*.

3.11.5.3. pDEST32 e pDEST22

Os vetores pDEST32 e pDEST22 (Figura 3.4) são plasmídeos do sistema *ProQuest™ Two-Hybrid* (Invitrogen), utilizados em ensaios de duplo-híbrido em leveduras. O pDEST32 possui a região de ligação ao DNA do fator de transcrição GAL4 (GAL4-DBD), em fase de leitura com a sequência de interesse. O pDEST22 possui o domínio de ativação do GAL4 (GAL4-AD), também em fase de leitura com a sequência de interesse.

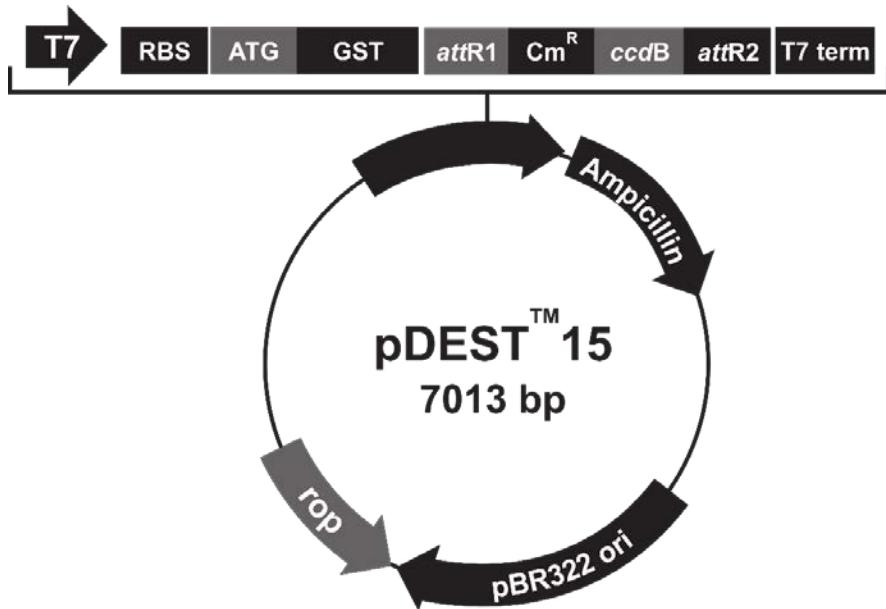


Figura 3.3. Mapa representativo do vetor de destino pDEST™15 (Invitrogen). Esse vetor apresenta os sítios de recombinação *attR*, característicos de vetores de destino, flanqueando as sequências codificadoras dos genes de seleção negativa *ccdB*, que produz a proteína *ccdB*, inibidora da enzima DNA girase de *E. coli*, e *Cm^R*, que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol. O gene de seleção positiva é o de resistência à ampicilina. O cassete de expressão é constituído pelo promotor do bacteriófago T7, seguido da RBS (*Ribosome Binding Site*), um códon de iniciação (ATG), e a CDS da *Glutathione S-Transferase*, seguidos dos sítios de recombinação e do terminador T7. O gene *rop* codifica a proteína *Repressor of primer*, reguladora do número de cópias de genes de um plasmídeo em *E. coli*. A sequência pBR322 ori é a origem de replicação do plasmídeo em *E. coli*. Retirado de Life Technologies, 2012b.

3.11.5.4. pK7WGF2

O vetor pK7WGF2 (gentilmente cedido por Prof. Dr. Lieven De Veylder, University of Ghent – Bélgica), possui a sequência codificadora da proteína fluorescente *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) anterior ao sítio de recombinação *attR1*, o que permite a fusão da sequência de interesse com essa proteína em sua região carboxi-terminal. As demais características desse vetor se encontram na Figura 3.5.

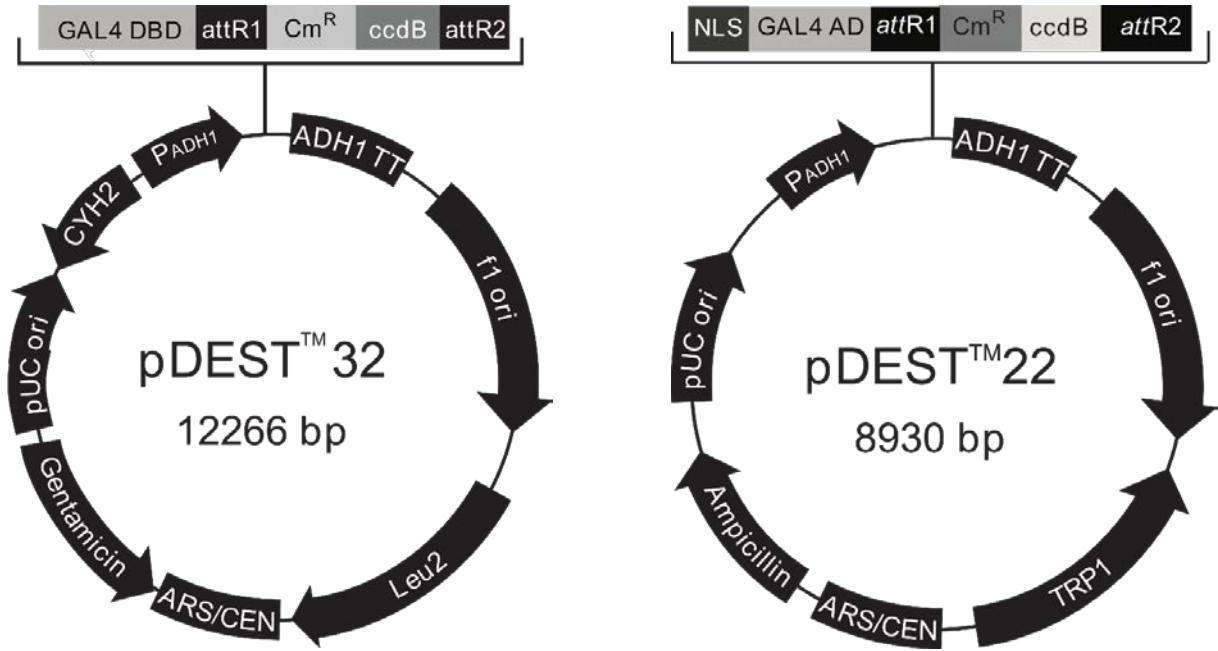


Figura 3.4. Mapas representativos dos vetores de destino pDEST™32 e pDEST™22 (Invitrogen). Ambos possuem os sítios de recombinação *attR* flanqueando os genes de seleção negativa *Cm^R* e *ccdB*; *P_{ADH1}* é o promotor que permite a expressão constitutiva a nível médio do cassette de expressão. A sequência *ADH1 TT* permite a terminação da transcrição e poliadenilação do mRNA. As sequências *ARS* (*Autonomously replicating sequences*) funcionam como as origens de replicação dos cromossomos e as sequências *CEN* (*Centromere*) codificam os centrômeros desses cromossomos em *S. cerevisiae*. A *pUC ori* é a origem de replicação em *E. coli*. A *f1 ori* permite o resgate de ssDNA (para realização de *Phage display*). Características exclusivas do pDEST™32 - Anterior ao cassete de recombinação se encontra a CDS do domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição *GAL4*. O gene de seleção positiva em *E. coli* é de resistência à gentamicina. A seleção em *S. cerevisiae* ocorre com a transcrição do gene *LEU2*, que codifica a enzima β -isopropilmalato desidrogenase, envolvida na síntese de leucina nesse organismo (*Saccharomyces Genome Database*, no. acesso: S000000523). *CYH2* é o gene de sensibilidade à cicloheximida (permite a realização de *plasmid shuffling*). Características exclusivas do pDEST™22 - Anterior ao cassete de recombinação se encontra a CDS do domínio ativação do fator de transcrição *GAL4*, precedida de um sinal de localização nuclear (NLS – *Nuclear Localization Signal*). O gene de seleção positiva em *E. coli* é de resistência à ampicilina. O gene de seleção positiva em *S. cerevisiae*, *TRP1*, codifica a enzima Fosforibosilantranilato isomerase, que cataliza a biossíntese do triptofano (*Saccharomyces Genome Database*, no. acesso: S000002414). Retirado de Invitrogen, 2005.

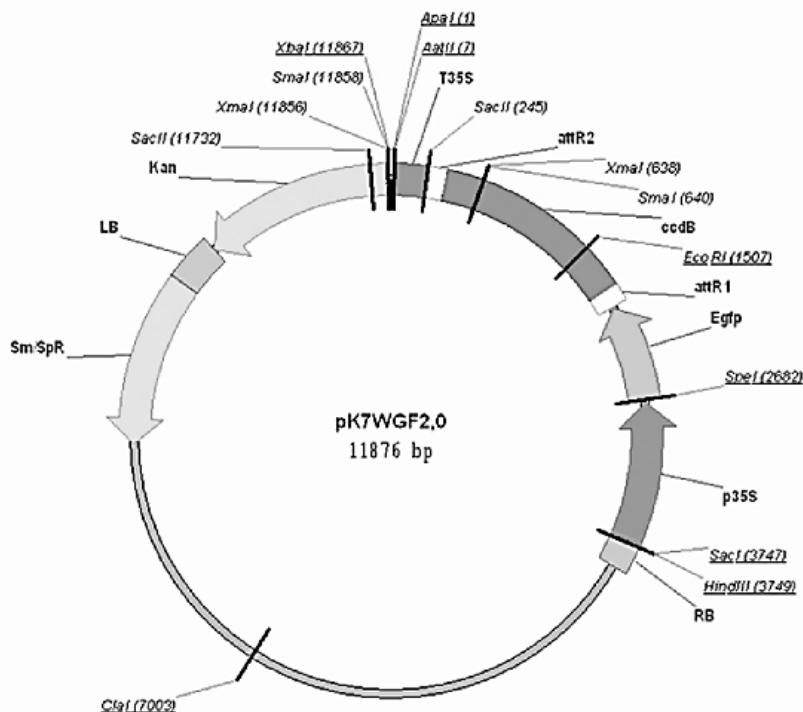


Figura 3.5. Mapa representativo do vetor pK7WGF2 (Karimi; Inzé; Depicker, 2002). Esse vetor possui as sequências LB e RB (Left Border e Right Border, respectivamente), que delimitam a porção do vetor que é transmitida para o genoma da planta durante a infecção com *A. tumefaciens* transformadas com o mesmo. Fora da delimitação das bordas encontra-se o gene de seleção positiva em *E. coli*, contra espectromicina e espectinomicina. Dentro das bordas, encontram-se o promotor p35S e o terminador T35S, ambos provenientes do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV). O promotor p35S permite a expressão constitutiva do cassete em plantas transformadas. Seguida do promotor está a CDS da eGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), que permite a fusão C-terminal dessa proteína com aquela codificada pela sequência inserida entre os sítios de recombinação *attR*. Essa construção apresenta o gene de seleção negativa *ccdB* e o gene de seleção positiva em *A. tumefaciens* que fornece resistência à canamicina. Retirado de <<http://gateway.psb.ugent.be/vector/show/pK7WGF2/search/index/>>, acesso em 26/10/2013.

3.12. Expressão heteróloga em *E. coli*

Foi realizada a expressão da proteína recombinante GST-RNAPII CTD em *E. coli* para sua futura utilização em experimentos de interação proteína-proteína. A expressão foi feita com a cepa de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta. Após a confirmação da construção *GST-RNAPII CTD c/s* no vetor pDEST15 através de digestão e sequenciamento, células da cepa BL21(DE3) Rosetta foram transformadas por eletroporação, plaqueadas em meio LB sólido suplementado com os antibióticos cloranfenicol (34 µg/mL) e ampicilina (50 µg/mL), e incubadas a 37 °C por 20 h.

Em seguida, uma colônia isolada foi inoculada em meio LB líquido suplementado com os mesmos antibióticos nas mesmas concentrações, e a cultura foi incubada novamente a 37 °C e 220 rpm durante 20 h. No final desse período, 1 mL da cultura foi adicionado em cada um de dois Erlenmeyers contendo 100 mL de meio LB líquido suplementado com cloranfenicol e ampicilina. As culturas foram incubadas a 37°C e 220 rpm até atingiram uma OD₆₀₀ entre 0,4 e 0,6. No momento em que as culturas atingiram absorbância nesse intervalo, foi adicionado o indutor de expressão *Isopropil β-D-1-β-galactopiranosídio* (IPTG) para concentração final de 0,1 mM em cada um dos Erlenmeyers. A partir de então, a expressão foi feita em duas condições distintas – um Erlenmeyer ficou a 37°C sob agitação de 220 rpm, e outro a 28°C, sob agitação de 150 rpm. Antes dessa incubação, foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada uma das culturas, chamadas de tempo zero (t₀). Alíquotas de 30 mL foram retiradas após 1 h, 2 h e 4 h após a indução e mantidas em gelo. Posteriormente, as 6 alíquotas foram centrifugadas a 12000 x g a 4°C por 10 min para a precipitação das células. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente, e as células foram armazenadas a -20°C para posterior lise celular e análise por SDS-PAGE.

3.13. Extração de proteínas bacterianas através de lise celular

Para a extração das proteínas expressas, os precipitados celulares foram ressuspensos em 5 mL de tampão de lise [Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 100 mM; lisozima 0,5 %; glicerol 1 %; imidazol 20 mM; inibidor de proteases 0,5 %] e incubados em gelo durante 30 min. As células foram mantidas em gelo e submetidas à sonicação com 6 pulsos de 30 s a 30 % de potência (100 % = 400 W) e intervalos de 1 min entre cada pulso (*Branson Sonifier™ S-450 Digital Ultrasonic Cell Disruptor/Homogenizer*, Fisher Scientific). Ao final desse processo, o lisado foi centrifugado a 12000 x g e 4°C durante 30 min. O sobrenadante foi transferido a um novo tubo e o precipitado foi ressuspensos em 5 mL de tampão de lise. O material foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

3.14. Análise de proteínas por SDS-PAGE

As proteínas obtidas na expressão heteróloga em *E. coli* foram submetidas à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Os géis de poliacrilamida são preparados com duas fases de diferentes relações peso/volume (w/v) de bis-acrilamida. A fase

superior é chamada de gel de empacotamento, onde as amostras são concentradas, e a fase inferior é chamada de gel de separação, onde ocorre a separação das amostras. Os géis foram montados no suporte adequado para espessura final de 1 mm.

O gel de empacotamento possui relação *w/v* de 3 %, com reagentes nas concentrações finais: Bis-acrilamida 3 %; de Tris 100 mM, pH 6,8; SDS 0,09 %; persulfato de amônio 0,09 %; e Tetrametiletilenodiamina (TEMED) 0,09 %, diluídos em água deionizada estéril. O gel de separação foi feito com 12,5 % *w/v*, e preparado com concentrações: Bis-acrilamida 12,5 %; Tris 400 mM, pH 8,8; SDS 0,1 %; persulfato de amônio 0,05 %; e TEMED 0,05%.

O gel de separação foi feito primeiro e aplicado no suporte. Logo em seguida, foi adicionado isopropanol acima do gel, para nivelar o mesmo durante a polimerização. Após a polimerização do gel de separação, o isopropanol foi removido e o gel de empacotamento foi aplicado. O pente para a formação dos poços de amostra foi colocado logo em seguida, evitando a formação de bolhas. Após a polimerização do gel de empacotamento, o cassete foi montado e colocado na cuba de eletroforese contendo o tampão de corrida [Tris-base 25 mM; SDS 0,05 %; glicina 0,2 M], e só então o pente foi removido.

As amostras foram preparadas misturando 20 μ L do extrato de proteínas obtido com a lise celular e 6 μ L de tampão de amostra 4X [Tris-HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 4 %; glicerol 10 %; azul de bromofenol 0,2 %; β -mercaptoetanol 4 %]. A mistura foi incubada a 100 °C por 5 min precedendo a aplicação no gel. As amostras foram então aplicadas com o auxílio de uma micropipeta, e os poços sem amostras foram preenchidos com tampão de amostra 1X. O marcador utilizado foi o *LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare).

A eletroforese ocorreu em duas fases. A fase inicial, de empacotamento, foi de 30 min a 60V, seguida da fase de separação por 2-2,5 h a 100V. Em seguida, os géis foram retirados cuidadosamente dos suportes de eletroforese e corados em solução corante [metanol 25 %; ácido acético 5 %; Coomassie Blue R-250 0,2 %] *overnight*. Após corados, os géis foram incubados em solução descorante [etanol 30 %; ácido acético 50 %] para remoção do excesso de corantes.

3.15. Expressão heteróloga transiente em *Nicotiana benthamiana*

A expressão heteróloga transiente em *N. benthamiana* se baseia no processo natural de infecção de plantas pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, causadora do tumor coroa-dagalha. Na natureza, essa bactéria é capaz de inserir parte de seu DNA no genoma das células

vegetais que ela infecta, levando à produção dos genes de infecção pela própria planta (Crouzet; Hohn, 2001). A utilização de cepas modificadas de *A. tumefaciens* permitiu sua utilização para inserir construções artificiais em plantas. Esse processo pode ser utilizado para a produção de plantas transgênicas, através da infecção de discos foliares e posterior produção de calos já modificados. Em plantas adultas, a infecção com *A. tumefaciens* transformadas com construções de interesse permitem que essa construção seja expressa pelas células que integraram o DNA exógeno em seu genoma durante determinado período de tempo.

A expressão heteróloga transiente foi feita utilizando colônias de *A. tumefaciens* transformadas que foram inoculadas, do estoque em glicerol, em meio LB complementado com antibióticos de seleção por 24 h a 28°C e 150 rpm de agitação. No final desse período, 1,5 mL de cultura foram transferidos a um microtubo e centrifugados a 5900 x g, T.A., por 2 min (microcentrífuga Eppendorf 5415 C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspensionado em 500 µL de tampão [ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfônico (MES) 10 mM; MgCl₂ 10 mM]. A suspensão foi centrifugada novamente nas mesmas condições anteriores, e o sobrenadante descartado. O processo foi repetido e após o descarte do sobrenadante, o precipitado celular foi novamente ressuspensionado em 500 µL de tampão [MES 10 mM; MgCl₂ 10 mM]. Nesse ponto, a OD₆₀₀ das células foi medida e foi feita diluição para que a absorbância ficasse em um intervalo entre 0,2-0,3, e à mistura foi adicionada acetoseringona para concentração final de 10 mM.

Na porção abaxial das folhas de *N. benthamiana* foram feitas pequenas incisões com a ponta de uma ponteira P-10, através das quais a solução de células foi infiltrada, com o auxílio de uma seringa de 1 mL estéril. Após infiltradas, as folhas foram identificadas com etiquetas, para diferenciá-las das folhas que não haviam sido transformadas. As plantas foram deixadas a T.A. e expostas à luz natural por 24 h.

Após esse período, foram retirados pedaços das folhas transformadas, que foram colocadas em lâminas de microscopia junto de gotas de água e cobertas por uma lamínula. Essas folhas foram observadas em microscópio de fluorescência para identificar células com expressão de GFP. As folhas que apresentaram fluorescência foram então marcadas com 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para observação em microscópio confocal (Leica SP5, FMRP-USP). Para tal, as folhas foram seccionadas em quadrados de aproximadamente 0,5 X 0,5 cm, colocadas em placas de Petri, e embebidas em 2 mL de DAPI (2,5 µg/mL), sendo cobertas com papel alumínio para evitar a degradação do marcador. Em seguida, elas foram submetidas à 5 min de vácuo (a 15 mmHg). Esse passo permite a penetração do DAPI nas células e a formação do complexo com a molécula de DNA. Após a aplicação do vácuo, as placas, ainda cobertas

foram mantidas sobre a bancada por 30 min e posteriormente lavadas com PBS 1X. Após a lavagem, os cortes foram mantidos em PBS 1X até o momento da visualização. As lâminas foram montadas com 2-3 cortes das folhas cobertos com PBS 1X e recobertos por lamínula.

A análise das lâminas no microscópio confocal foi feita com o auxílio da aluna de mestrado Lígia Tereza Bertolino, do nosso grupo de pesquisa. Para o DAPI, a excitação foi feita com laser ultravioleta, no comprimento de onda de 405 nm, e a captura das imagens (detecção da fluorescência) foi feita no intervalo de 410-475 nm. Para a GFP, a excitação foi feito com laser de argônio, no comprimento de onda de 488 nm, e a captura foi feita no intervalo entre 495-550 nm. As análises e capturas, montagem de imagens e suas escalas foram feitas com o software *Leica LAS AF v.2.x*, que acompanha o microscópio.

3.16. Ensaio de duplo-híbrido em leveduras

O ensaio de duplo-híbrido (*Yeast Two-Hybrid* – Y2H) foi utilizado para verificar interações entre as proteínas analisadas nesse trabalho. Para isso, foram feitas construções das sequências codificadoras dessas proteínas em ambos os vetores pDEST32 e pDEST22. Desse modo, foi possível utilizar as proteínas tanto como “iscas” quanto “presas” nos experimentos. Para cada experimento, foram montadas placas contendo três controles de interação (kit *ProQuest™ Two-Hybrid System*, Invitrogen), controles de auto-ativação dos vetores vazios e das construções utilizadas, e três ensaios de interação a serem analisados.

Os controles de interação do kit consistem na proteína de rato Krev1 associada ao domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição GAL4 e três versões do domínio de associação à ras da proteína RalGDS ligados ao domínio de ativação do fator de transcrição GAL4. As três versões são denominadas “Wt” para a sequência selvagem da proteína, que apresenta interação forte com Krev1, “M1” para uma mutação na posição I77 para T77 que altera parcialmente a interação, servindo de controle para interações médias, e “M2” para uma mutação na posição L65 para P65, que inativa a interação, e serve, portanto, como controle negativo.

Para cada placa, foram feitos 5 controles de auto-ativação. O primeiro consiste em leveduras transformadas com os vetores pDEST32 e pDEST22 vazios, para testar se estava havendo ativação do sistema sem as proteínas híbridas. Os quatro outros controles consistem nas construções híbridas acompanhadas de vetores vazios, ou seja, um dos vetores contendo a

sequência codificadora da proteína híbrida e o outro vazio foram inseridos em uma mesma levedura.

Foram feitos no máximo 3 ensaios de interação proteína-proteína, sendo as leveduras transformadas com os dois vetores contendo as sequências codificadoras das proteínas a serem analisadas. A Tabela 3.1 resume as construções utilizadas para transformar leveduras em um ensaio de duplo-híbrido.

Tabela 3.1 – Combinações de vetores utilizados para montar uma placa de duplo-híbrido.

	Construções utilizadas	Descrição das construções
Controles do kit	pEXP™32-Krev1 x pEXP™22-RalGDS-wt	Interação forte
	pEXP™32-Krev1 x pEXP™22-RalGDS-m1	Interação fraca
	pEXP™32-Krev1 x pEXP™22-RalGDS-m2	Sem interação
Controle de auto-ativação do sistema	pDEST™32 x pDEST™22	Controle de ativação do sistema
Controles de auto-ativação das construções	pEXP™32-isca x pDEST™22	Controle de auto-ativação da isca
	pDEST™32 x pEXP™22-presa1	Controle de auto-ativação da presa1
	pDEST™32 x pEXP™22-presa2	Controle de auto-ativação da presa2
	pDEST™32 x pEXP™22-presa3	Controle de auto-ativação da presa3
Ensaios a serem analisados	pEXP™32-isca x pEXP™22-presa1	Ensaio de interação entre isca e presa1
	pEXP™32-isca x pEXP™22-presa2	Ensaio de interação entre isca e presa2
	pEXP™32-isca x pEXP™22-presa3	Ensaio de interação entre isca e presa3

As transformações foram feitas como descrito na seção 3.5. Após transformadas, uma colônia oriunda de cada transformação foi inoculada em meio SC –Leu –Trp líquido, e os

inoculos foram incubados *overnight* a 30 °C e 200 rpm. Após a incubação, foi medida a OD₆₀₀ de cada cultura, e as mesmas foram diluídas para uma OD₆₀₀ de 0,2 em meio SC –Leu –Trp para um volume final de 250 µL. Essas diluições foram feitas em microplacas de 96 poços, na linha A. Nos primeiros 6 poços (A1-A6) foram colocados o controle negativo do kit e os controles de auto-ativação. O poço A7 foi deixado vazio. Nos poços A8 e A9 foram colocados os controles de interação forte e média, respectivamente. Os ensaios de interação foram colocados nos poços A10, A11 e A12. Nas linhas C, E, G e H foram feitas diluições consecutivas de 1:5, resultando em OD₆₀₀ de 0,04; 0,008; 0,0016 e 0,00032, respectivamente. O conteúdo das microplacas foi replicado em placas contendo diferentes meios de cultura para avaliar as interações com um replicador de 96 pinos. Os diferentes meios de cultura utilizados estão descrito na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Diferentes meios de cultura utilizados nos ensaios de duplo-híbrido.

Meio de Cultura	Descrição/Função	Crescimento esperado
SC –Leu –Trp	Meio SC sem os aminoácidos Leu e Trp, para controle do crescimento de leveduras	Todas as transformações
SC –Leu –Trp –His	Meio SC sem os aminoácidos Leu, Trp e His. Objetiva analisar a transcrição do gene repórter <i>HIS3</i> .	Apenas interações positivas entre as proteínas híbridas.
SC –Leu –Trp –Ade	Meio SC sem os aminoácidos Leu e Trp e sem Adenina. Objetiva analisar a transcrição do gene repórter <i>ADE2</i> .	Apenas interações positivas fortes entre as proteínas híbridas.

O meio SC –Leu –Trp foi feito utilizando 50 mL de meio SC –Leu –Trp –His –Ura sólido, complementado com 400 µL de solução de Histidina 100 mM e 400 µL de solução de Uracila 20 mM. O meio SC – Leu –Trp –His foi feito com 50 mL de meio SC –Leu –Trp –His –Ura complementado com 400 µL de solução de Uracila 20 mM. O meio SC –Leu –Trp –Ade foi feito utilizando 50 mL de meio SC –Leu –Trp –His –Ade complementado com 400 µL de Solução de Histidina 100 mM. Foram utilizadas placas de Petri descartáveis de 15 cm de diâmetro. Depois de receber as culturas, as placas foram incubadas a 30°C durante 48 h. Após esse período, elas foram fotografadas e deixadas sobre a bancada para verificar o crescimento ou não de novas colônias. Isso foi feito porque algumas interações fracas demoram mais a ativar a transcrição dos genes repórter.

3.17. Análises de *screening* de duplo-híbrido em leveduras

O experimento de *screening* e a metodologia das análises estão descritos na seção 4. RESULTADOS & DISCUSSÃO.

4. RESULTADOS & DISCUSSÃO

4.1. Localização subcelular de NtCDKG;2

Para a localização subcelular da proteína NtCDKG;2 foi produzida a construção p35S::GFP-NtCDKG;2, através da reação de recombinação LR entre os vetores pENTRY-NtCDKG;2_cs (cedido pela aluna de doutorado Greice Lubini) e pK7WGF2. O plasmídeo resultante, pK7WGF2-NtCDKG;2_cs, foi utilizado para transformar células de *E. coli* cepa DH10B. Para confirmar a clonagem, foi extraído o DNA plasmidial de 7 colônias independentes resultantes da transformação, e foi feita digestão com a endonuclease de restrição BsrGI. O plasmídeo inteiro possui 12249 pb, e a digestão com BsrGI produz 4 fragmentos, de 10170 pb, 1745 pb, 313 pb e 21 pb, uma vez que existem 3 sítios de restrição dentro da sequência codificadora (CDS) de NtCDKG;2 e 1 sítio no vetor. A digestão foi analisada através de eletroforese em gel de agarose, ilustrada na Figura 4.1.

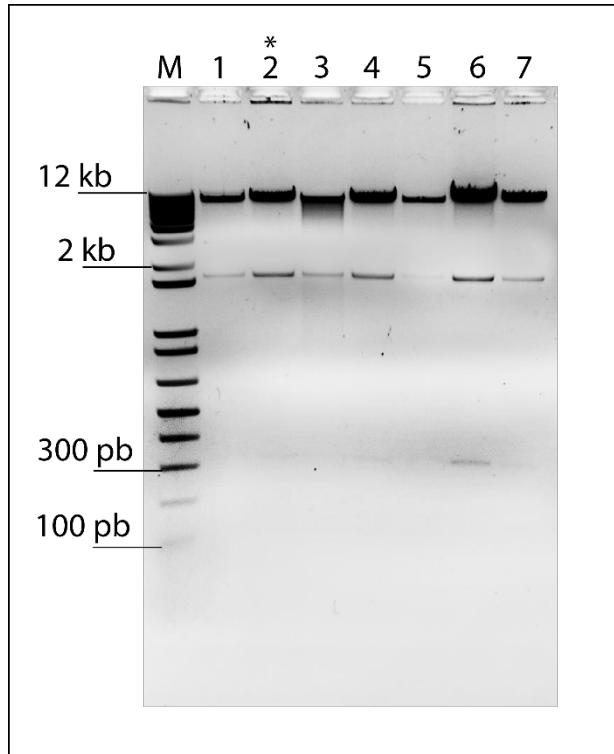


Figura 4.1 – Fotografia do gel de agarose resultante da eletroforese das digestões com o DNA plasmidial de 7 colônias de *E. coli* transformadas com o vetor pK7WGF2-NtCDKG;2_cs. A banda de 21 pb não está visível devido à pouca quantidade de DNA. M – marcador *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); * - colônia escolhida para dar continuidade aos experimentos.

O DNA da colônia 2 foi purificado através do método de fenol-clorofórmio e utilizado para transformar células competentes de *A. tumefaciens*. Após o crescimento das colônias, foi feita a extração do DNA plasmidial de 6 delas, e a checagem da presença do plasmídeo foi feita através de reação de PCR com os *primers forward* Prom35S e *reverse* SGN-U423624-RV-qPCR. O *primer forward* é capaz de parear com a sequência do vetor, enquanto o *primer reverse* é capaz de parear com a CDS de NtCDKG;2. O *amplicon* esperado para essa reação é de 1445 pb. Inicialmente, nenhuma das 6 colônias apresentou o plasmídeo. Assim, foi feita a extração de DNA plasmidial de 6 novas colônias, seguida de reação de PCR com o DNA. Foi confirmada a presença do plasmídeo em apenas uma colônia, como ilustrado na Figura 4.2.

Células de *Agrobacterium* da colônia positiva (10) foram infiltradas em folhas de *N. benthamiana* (descrita na seção 3.15), para viabilizar a expressão transiente da proteína recombinante GFP-NtCDKG;2. Após 24 horas, as folhas infiltradas foram analisadas em microscópio confocal quando foi possível observar que NtCDKG;2 se localiza exclusivamente no núcleo das células (Figura 4.3). Esse resultado corrobora o resultado obtido anteriormente por Lubini (2012), em células epiteliais de *N. tabacum* expressando NtCDKG;2-GFP de forma transitória, através de microscopia de fluorescência. O resultado aqui descrito é importante por demonstrar que, independentemente do tipo de fusão da GFP em CDKG;2 (N- ou C-terminal), a localização subcelular de NtCDKG;2 é sempre a mesma. Adicionalmente, o presente resultado está de acordo com o resultado descrito por Boruc *et al.* (2010b), no qual a proteína AtCDKG;2, provável homóloga de NtCDKG;2 em Arabidopsis, também foi localizada no núcleo em células BY2 de *N. tabacum* transformadas para expressar AtCDKG;2-GFP.

A localização nuclear dessa proteína já era esperada, uma vez que a maioria das CDKs e outras proteínas envolvidas no ciclo celular possuem essa localização em pelo menos uma das fases do ciclo ou durante a interação com outras proteínas envolvidas nesse processo, como descrito em *A. thaliana* (Boruc *et al.*, 2010b). Além disso, a possibilidade de NtCDKG;2 estar envolvida em algum mecanismo relacionado com a transcrição também sugere uma localização nuclear para a mesma. Outra observação importante é a de que SCI1 também possui localização nuclear e co-localiza com marcadores de nucléolo e de *speckles* (Strini, dados não publicados). *Speckles* são estruturas subnucleares dinâmicas, localizadas nas regiões de intercromatina, e contêm fatores de *splicing* de pré-mRNA, que podem se mover entre essas estruturas e outras localizações nucleares, inclusive em sítios de transcrição ativos (Lamond; Spector, 2003). A interação entre SCI1 e NtCDKG;2, identificada por *pull down*, foi posteriormente confirmada em nosso laboratório através de *BiFC*, mostrando que essa interação ocorre no nucléolo. Tomando a hipótese de que SCI1 seja um inibidor da ação de complexos ciclina-CDK,

poderíamos especular que SCI1 pode inibir a ação de NtCDKG;2 ao retirar essa proteína do nucleoplasma, onde provavelmente ela é ativa.

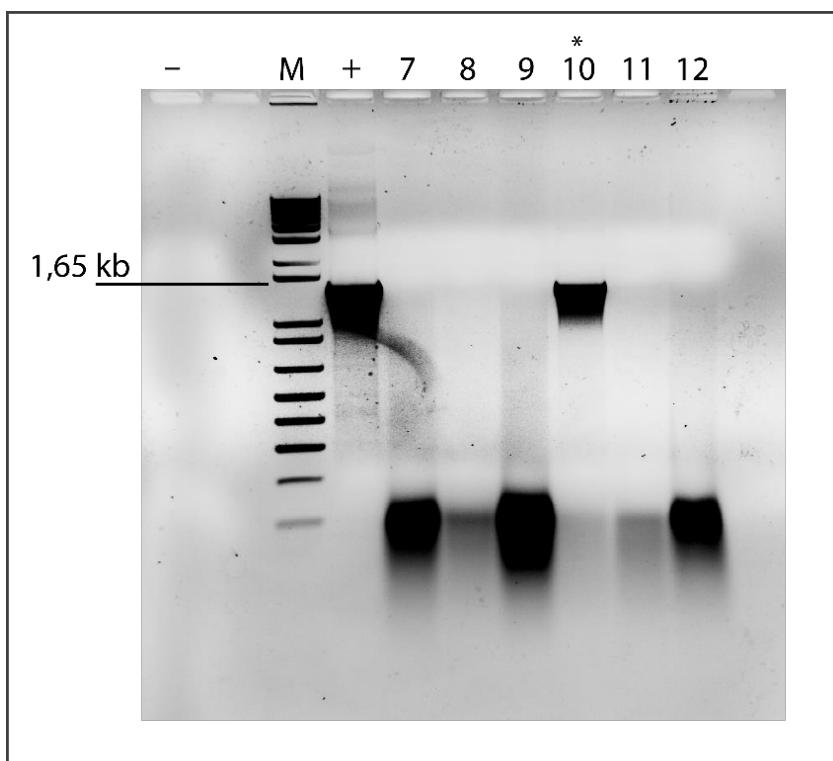


Figura 4.2 – Fotografia do gel de agarose resultante da eletroforese dos produtos de PCR utilizando o DNA plasmidial de 6 diferentes colônias de *A. tumefaciens* transformadas com pK7WGF2-NtCDKG;2_{cs}. Apenas a colônia 10 apresentou padrão correspondente ao desejado. M – marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); – controle negativo: mix de PCR sem adição de DNA submetido à mesma reação que as amostras; + controle positivo: mesma reação de PCR, mas com o DNA plasmidial utilizado na transformação de *A. tumefaciens*; 7-12 – produtos da PCR; * - colônia escolhida para dar continuidade aos experimentos.

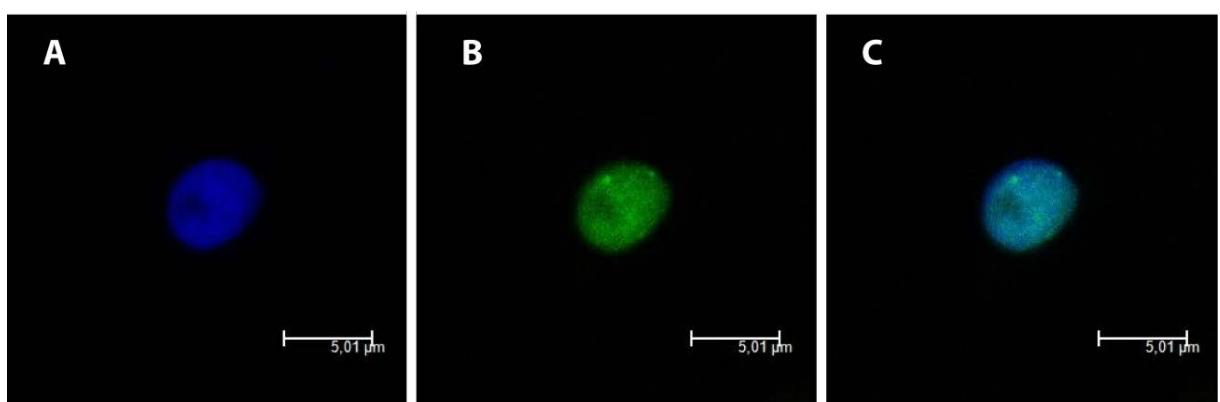


Figura 4.3 – Micrografia obtida com microscópio confocal (Leica SP5 – FMRP-USP) de células de *N. benthamiana* expressando GFP-NtCDKG;2. A – núcleo marcado com DAPI; B – fluorescência emitida por GFP-NtCDKG;2; C – sobreposição de A e B, mostrando que há co-localização da proteína NtCDKG;2 com o núcleo celular. Barra = 5 μ m.

Outra especulação plausível é de que NtCDKG;2 esteja envolvida em mecanismos transpcionais. Sua provável homóloga em *A. thaliana*, AtCDKG;2 possui 69,4 % de identidade de aminoácidos (aa) com AtCDKG;1, e ambas compartilham motivos em comum com CDKs de regulação transpcionais em animais (Huang *et al.*, 2013). Além disso, análises filogenéticas entre CDKs de *A. thaliana* mostram que ambas as CDKGs estão próximas da classe CDKC, de função conhecida na regulação da transcrição através de interações com o CTD da RNAPII (Fülöp *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2013). Por esses motivos, foi realizada no presente trabalho a clonagem desse domínio em *N. tabacum*, com o objetivo de testar se ocorre interação entre ele e NtCDKG;2.

4.2. Clonagem do domínio C-terminal da RNA Polimerase II (CTD da RNAPII)

A RNA Polimerase II (RNAPII) é um complexo proteico que compreende 12 subunidades, sendo uma das responsáveis pela transcrição do DNA em eucariotos, junto das RNA Polimerases I e III (Snustad; Simmons, 2012). Ela é quem transcreve os genes codificadores de proteínas e os *small noncoding RNAs*, enquanto as outras são responsáveis pela transcrição de RNAs transportadores e ribossômicos (Egloff; Murphy, 2008). A maior subunidade da RNAPII, a Rpb1, possui uma região carboxi-terminal que consiste de várias repetições de um heptapeptídeo altamente conservado em eucariotos com a sequência consenso Y₁S₂P₃T₄Y₅S₆P₇S₇, chamado domínio carboxi-terminal (CTD) (Hajheidari *et al.*, 2012). A fosforilação de sítios específicos nessa região cria um código dinâmico que integra e dirige eventos da transcrição, processamento de RNAs e modificações na cromatina realizados pela RNAPII (Hajheidari *et al.* 2012).

Para clonar a região codificadora do CTD da RNAPII de *N. tabacum*, foi necessário desenhar *primers* específicos para realizar a amplificação da mesma. Como o genoma de *N. tabacum* ainda não foi totalmente sequenciado, o desenho de *primers* foi baseado em análises *in silico* das sequências codificadoras dessa região em *Solanum lycopersicum* (tomate) e *Solanum tuberosum* (batata), que assim como *N. tabacum* pertencem à família Solanaceae. Isso foi feito pois os domínios homólogos da Rpb1 são conservados em plantas (Nawrath *et al.*, 1990).

Como esse domínio faz parte de uma subunidade grande (1839, 1846 e 1839 aa em *A. thaliana*, *S. lycopersicum* e *S. tuberosum*, respectivamente), a escolha da região do gene que possui uma ORF (*Open Reading Frame*) abrangendo somente a extensão do domínio C-

terminal foi feita com base na clonagem do CTD da RNAPII de *A. thaliana*, descrita por Umeda *et al.* (1998), que produz uma proteína de 318 aa. Utilizando a sequência de aminoácidos da Rpb1 de *A. thaliana* (no. acesso no TAIR: AT4G35800.1), foram feitas buscas de similaridade, utilizando o algoritmo *tblastn*, em dois bancos de dados de Solanaceae – DFCI (*Dana-Farber Cancer Institute* - <http://compbio.dfci.harvard.edu/>) e *Solanaceae Genomics Resource* (<http://solanaceae.plantbiology.msu.edu>). Como resultado, foram encontradas as sequências Solyc02g083350.2.1 (tomate) e PGSC0003DMT400009249 (batata), ambas com 87% de identidade de aminoácidos com a sequência de *A. thaliana* e 99% de identidade entre elas.

Através do alinhamento entre sequências de aminoácidos dos três organismos, foi feita a busca pela região delimitada no trabalho de Umeda *et al.* (1998) na sequência de *A. thaliana*, e a identificação de suas correspondentes em batata e tomate (APÊNDICE C). A partir dessa análise, foi identificada a sequência de nucleotídeos codificadora dessa região, onde foram determinados os códons de iniciação (ATG) e terminação de transcrição (TAA, TAG ou TGA) (APÊNDICE D). A partir disso, foram desenhados os *primers forward* e *reverse* para tentar amplificar a sequência correspondente em *N. tabacum*. O tamanho das sequências codificadoras dessa região de interesse em batata e tomate é de 968 e 989 pb, respectivamente (APÊNDICE D), e um tamanho próximo a esse foi o esperado para a amplificação em *N. tabacum*.

No *primer forward*, foram adicionados, antecedendo a sequência específica do CTD da RNAPII, uma porção do sítio de recombinação *attB1* de 9 bases, seguido da sequência Shine-Dalgarno (para ligação do ribossomo ao mRNA em procariotos), duas bases para correção da fase de leitura, a sequência Kozak (para ligação do ribossomo em eucariotos) e, finalmente, uma sequência de 21 bases específicas da sequência-alvo. No *primer reverse*, anterior à sequência específica, foram adicionadas 9 bases do sítio de recombinação *attB2*, seguida de uma base para correção da fase de leitura e, depois, 19 bases específicas da sequência-alvo. Foi necessário desenhar um *primer reverse* degenerado, pois as sequências de batata e tomate possuem 1 base anterior ao códon de terminação que difere entre as duas (códons GGT e GGG, respectivamente, ambos codificando Gly). Os *primers* desenhados estão representados na Figura 4.4.

Após a primeira reação de amplificação (PCR1), foi feita eletroforese em gel de agarose para avaliar o tamanho da sequência obtida. Como observado na Figura 4.5, a amplificação resultou em uma banda de aproximadamente 1000 pb, correspondente ao tamanho esperado segundo comparações com as sequências de batata e tomate. A banda correspondente à CDS do CTD da RNAPII foi excisada e purificada, e o DNA resultante foi utilizado para a reação

PCR2. Após a segunda amplificação, que adicionou os sítios de recombinação completos, o tamanho da sequência aumentou ligeiramente, como observado na Figura 4.6.

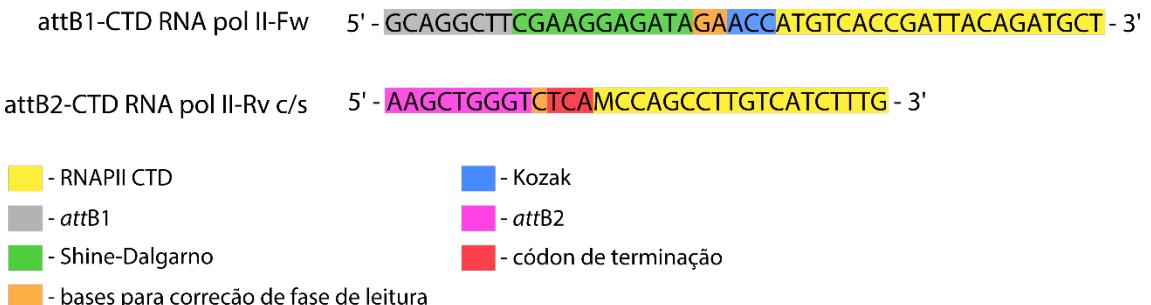


Figura 4.4 – Representação dos *primers* desenhados para a amplificação da sequência codificadora do CTD da RNAPII. attB1-CTD RNA pol II-Fw – *primer forward*; attB2-CTD RNA pol II-Rv c/s – *primer reverse*; RNAPII CTD – bases específicas da CDS do CTD da RNAPII; M – amino, corresponde às bases nitrogenadas que contém grupos amina - citosina e adenina; c/s – com códon de terminação (*stop codon*).

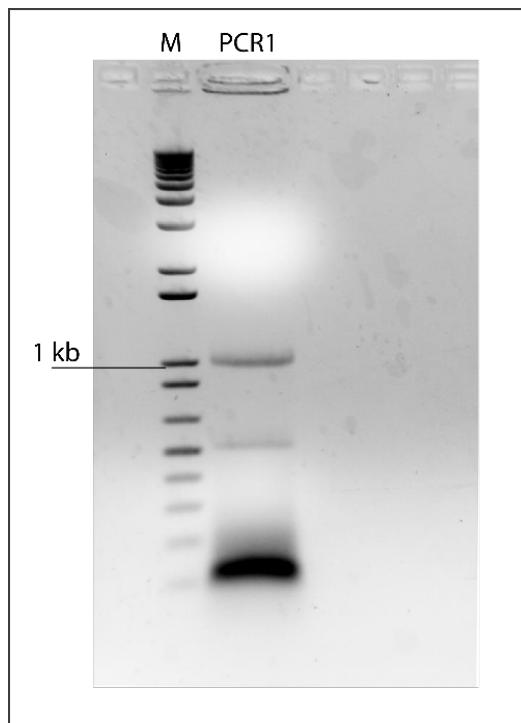


Figura 4.5 – Fotografia do gel de agarose resultante da eletroforese do produto da PCR1. A banda superior na canaleta PCR1 corresponde à sequência codificadora do CTD da RNAPII amplificada na reação. A banda inferior representa o excesso de *primers* que não foram utilizados durante a reação. M – marcador *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); PCR1 – produto total da PCR1 aplicado no gel.

O DNA extraído e purificado da banda do gel foi utilizado em uma reação BP com o vetor de entrada pDONRTM221, resultando no vetor pENTRY-RNAPII CTD c/s. Esse

plasmídeo foi utilizado para transformar células de *E. coli* DH10B que, após cultivo em meio seletivo, resultaram em colônias das quais o DNA plasmidial foi extraído pelo método da lisozima e digerido com a endonuclease de restrição BsrGI. Essa enzima foi escolhida, pois existem 2 sítios de restrição no vetor, um dentro de cada um dos sítios de recombinação *att*, e um sítio no gene de seleção negativa, *ccdB*. Desse modo, caso não tivesse havido clonagem, a digestão do vetor vazio (4761 pb) resultaria em fragmentos de 2514 pb, 1457 pb e 790 pb. Caso a recombinação tenha sido feita com sucesso, o gene seria eliminado e o plasmídeo pENTRY-RNAPII CTD c/s possuiria aproximadamente 3549 pb. Neste caso, a digestão com BsrGI produziria apenas 2 fragmentos, com 2514 pb, correspondente ao vetor, e aproximadamente 1000 pb, correspondente ao inserto.

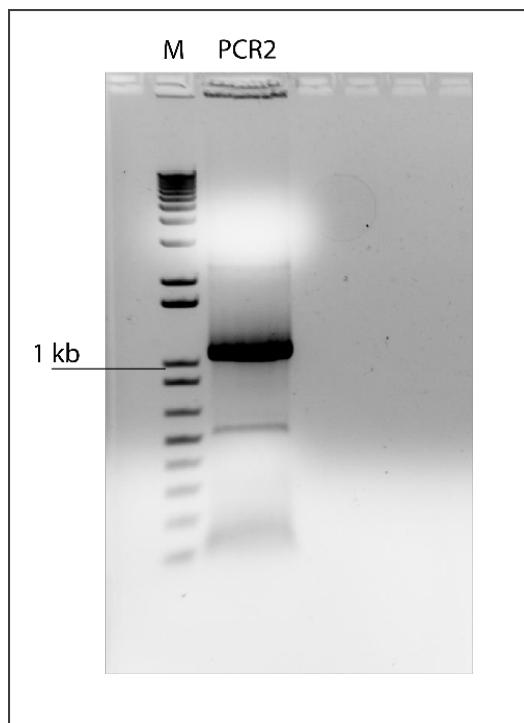


Figura 4.6 – Fotografia do gel de agarose da eletroforese do produto da PCR2. A banda superior na canaleta PCR2 corresponde à CDS do CTD da RNAPII flanqueada pelos sítios de recombinação *attB*. M – marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); PCR2 – produto total da PCR2 aplicado no gel.

Como é possível observar na Figura 4.7, a inserção da sequência no vetor foi feita com sucesso e o plasmídeo produzido pôde ser utilizado para realizar outras reações de recombinação. O DNA proveniente da colônia 1 foi escolhido para dar seguimento aos experimentos com o CTD da RNAPII. O fragmento de DNA clonado foi sequenciado, e a sequência analisada pelo programa *blast*, confirmando sua identidade e a clonagem bem sucedida do CTD da RNAPII de *N. tabacum*. Como a sequência do CTD da RNAPII desta

espécie ainda não havia sido descrita e/ou depositada nos bancos de dados, foram feitos sequenciamentos adicionais da mesma. O sequenciamento já foi realizado 3 vezes com o *primer* M13 *forward* e 2 vezes com o *primer* M13 *reverse*, e os dados resultantes foram analisados com os softwares Phred/Phrap/Consed (versões 1.020425, 1.090518 e 26.0, respectivamente – obtidos sob licença acadêmica dos Profs. Drs. Brent Ewing, Phil Green e David Gordon – University of Washington). Para aumentar a qualidade das bases na porção intermediária da sequência, ainda será necessário realizar o sequenciamento utilizando *primers* internos. Quando o sequenciamento estiver finalizado (ou seja, cada base tenha sido sequenciada pelo menos 3 vezes, em 2 direções diferentes e tiverem qualidade Phred/Phrap >20), a sequência obtida será depositada no Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

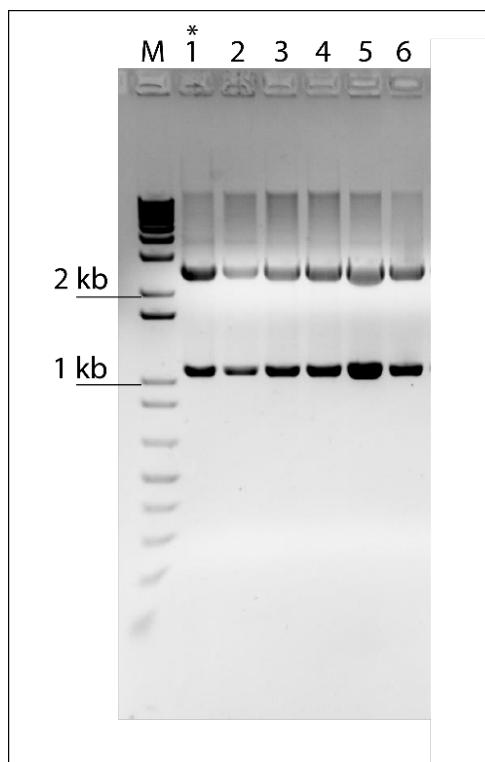


Figura 4.7 – Fotografia do gel de agarose da eletroforese dos produtos da digestão, com a enzima BsrGI, do DNA plasmidial proveniente de 6 diferentes colônias de *E. coli* referentes à construção pENTRY-RNAPII CTD c/s. O padrão de bandas observado foi igual ao esperado, sendo a banda superior correspondente ao plasmídeo, e a banda inferior correspondente à sequência clonada. M – marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); 1-6 – produtos da digestão do DNA plasmidial das colônias 1 a 6 de *E. coli*; * - colônia escolhida para dar continuidade aos experimentos.

4.3. Expressão da proteína recombinante GST-RNAPII CTD

Para viabilizar a expressão da proteína recombinante GST-RNAPII CTD e seu uso futuro em ensaios de interação proteína-proteína, a CDS do CTD da RNAPII foi clonada no vetor de expressão em *E. coli*, de modo a codificar uma proteína recombinante contendo GST na porção N-terminal do CTD da RNAPII. A construção foi feita através de recombinação LR entre o plasmídeo de entrada pENTRY-RNAPII CTD c/s e o vetor pDESTTM15, resultando no vetor de expressão pEXP15-RNAPII CTD c/s. A clonagem foi verificada através da transformação de *E. coli*, seguida de digestão enzimática com BsrGI. Foram confirmadas 5 colônias (Figura 4.8), das quais a colônia 1 foi escolhida para dar continuidade aos experimentos. Além da checagem por enzimas de restrição, foi realizado um sequenciamento na região de ligação entre o vetor, contendo a GST, e a CDS do CTD da RNAPII para verificar se ambas se encontravam na mesma fase de leitura.

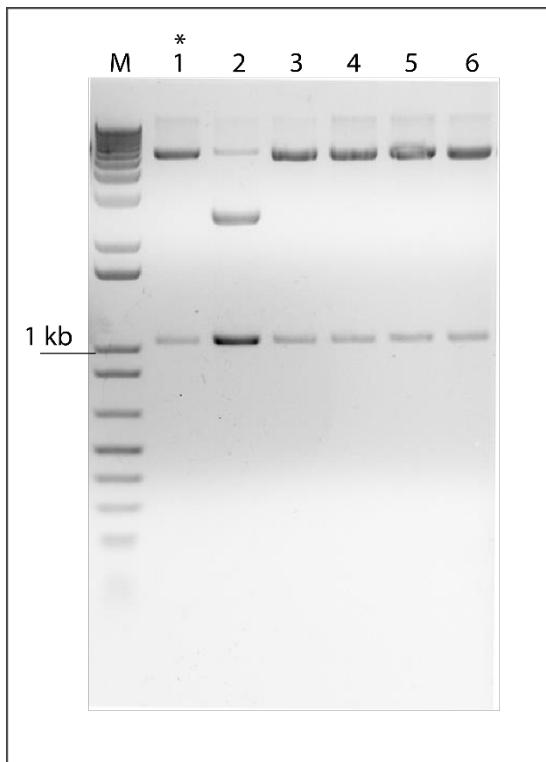


Figura 4.8 – Fotografia do gel de agarose da eletroforese dos produtos da digestão, com a enzima BsrGI, do DNA plasmidial proveniente de 6 diferentes colônias de *E. coli* referentes à construção pEXP15-RNAPII CTD c/s. O padrão de bandas observado foi igual ao esperado, exceto para a colônia 2. M – marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); 1-6 – produtos da digestão do DNA plasmidial das colônias 1 a 6 de *E. coli*; * - colônia escolhida para dar continuidade aos experimentos.

O DNA plasmidial da colônia 1 foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli*, cepa BL21(DE3) *Rosetta*, que é uma cepa adequada para a expressão de proteínas heterólogas, capaz de fornecer tRNAs para 6 códons raros em *E. coli* – AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, e GGA (Novagen, 2004). Após a transformação bacteriana, foi feita a expressão em duas condições distintas, a 37 °C e 220 rpm de agitação e a 28 °C e 150 rpm de agitação, pois fatores como temperatura e oxigenação do meio de cultura podem influenciar na expressão de proteínas. O material extraído da expressão heteróloga a 37 °C e 28 °C foi analisado através de SDS-PAGE (Figuras 4.9 e 4.10). O tamanho esperado para a proteína recombinante GST-RNAPII CTD c/s foi calculado com a ferramenta *Compute pI/Mw* (http://web.expasy.org/compute_pi/), utilizando as CDSs de GST e RNAPII CTD c/s, e foi igual a \approx 49 kDa. Não foi observada uma banda bem definida na região esperada, o que pode indicar que as condições nas quais as expressões foram realizadas não foram as ideais, sendo necessária a otimização dessas condições futuramente. A presença de GST permitiu realizar o experimento de *Western Blotting*, usando um anticorpo contra a GST (Sigma-Aldrich). Entretanto, este anticorpo comercial reconheceu um número grande bandas (dados não mostrados), tornando o experimento inconclusivo.

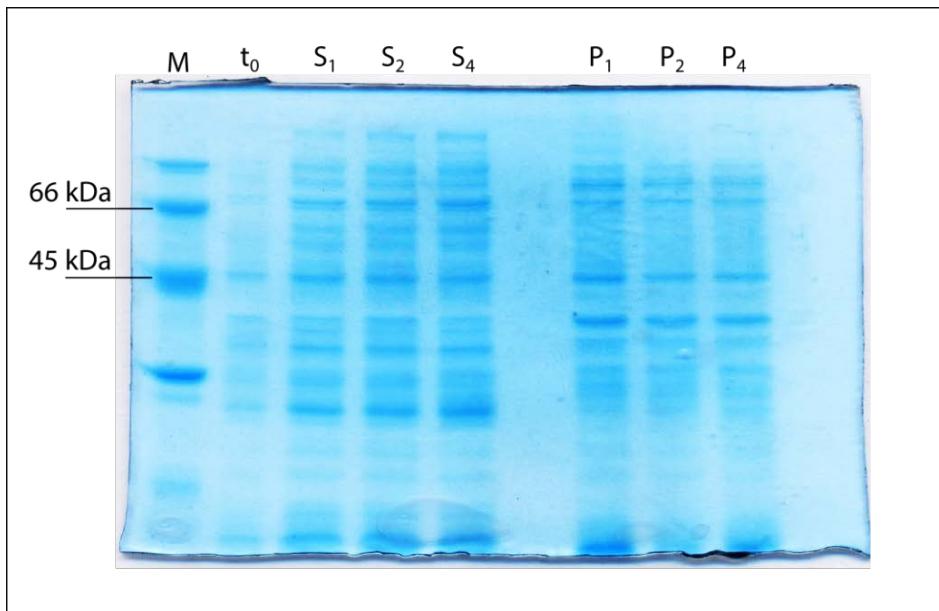


Figura 4.9 – Fotografia do gel de poliacrilamida dos extratos proteicos da expressão heteróloga em *E. coli* a 37 °C submetidos à SDS-PAGE. M – marcador de peso molecular *LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare); t₀ – suspensão celular no tempo zero de indução; S₁₋₄ – amostras correspondentes à porção solúvel dos lisados celulares de *E. coli* 1, 2 e 4 horas após a indução de expressão; P₁₋₄ – amostras correspondentes à porção precipitada (insolúvel) dos lisados celulares de *E. coli* 1, 2 e 4 horas após a indução de expressão.

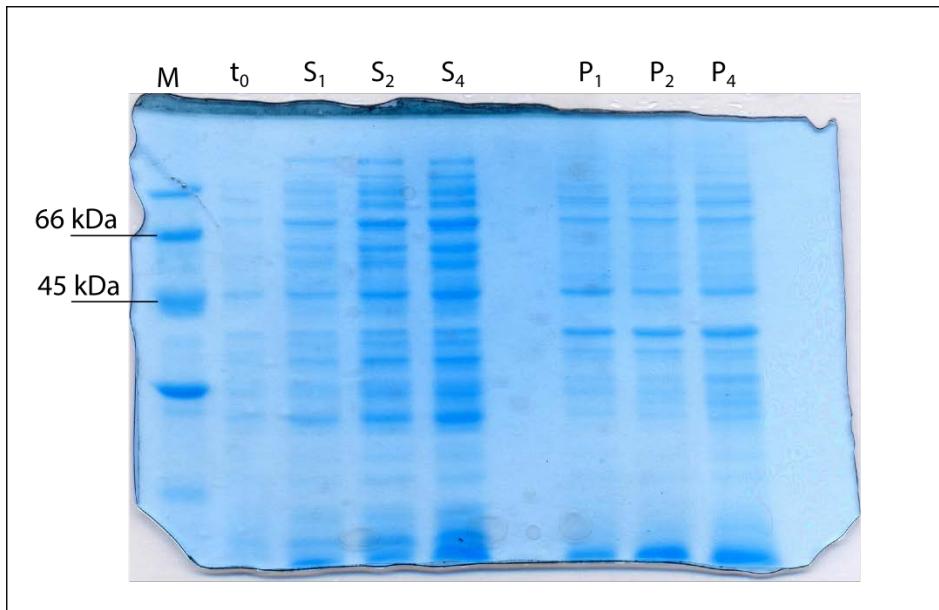


Figura 4.10 – Fotografia do gel de poliacrilamida dos extratos proteicos da expressão heteróloga em *E. coli* a 28 °C submetidos à SDS-PAGE. M – marcador de peso molecular *LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare); t₀ – suspensão celular no tempo zero de indução; S₁₋₄ – amostras correspondentes à porção solúvel dos lisados celulares de *E. coli* 1, 2 e 4 horas após a indução de expressão; P₁₋₄ – amostras correspondentes à porção precipitada (insolúvel) dos lisados celulares de *E. coli* 1, 2 e 4 horas após a indução de expressão.

4.4. Ensaios de duplo-híbrido

Os ensaios de duplo-híbrido em levedura (Y2H) foram feitos para testar a interação entre o CTD da RNAPII com as proteínas NtCDKG;2 e NtCDKF;1. Além dos controles de interação presentes no kit *ProQuest™ Two-Hybrid*, foi utilizada como controle a interação positiva entre NtCDKG;2 e NtCDKF;1, já confirmada anteriormente em nosso laboratório (Lubini, dados não publicados). Inicialmente, o CTD da RNAPII foi utilizado como isca, ou seja, foi colocado no vetor contendo o domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição GAL4 (GAL4 DBD), enquanto NtCDKG;2 e NtCDKF;1 foram utilizados como presas – ligados ao domínio de ativação do fator de transcrição GAL4 (GAL4 AD). Estas construções estão sujeitas à auto-ativação da transcrição do gene repórter da interação, *HIS3*. Por esse motivo, foi utilizado 3-aminotriazol (3-AT), um inibidor desse gene, nas placas com meio seletivo sem o aminoácido His, de modo a dificultar a auto-ativação. A concentração de 3-AT utilizada no primeiro ensaio foi de 1,75 mM.

Após 48 horas de crescimento em meio seletivo sem His e na presença de 3-AT, foi observado que as interações entre o CTD da RNAPII e NtCDKG;2 e CTD da RNAPII e

NtCDKF;1 são negativas (Figura 4.11). O resultado observado contradiz a literatura em relação à interação do CTD da RNAPII com a quinase CDKF;1, uma vez que a interação entre as sequências homólogas de *A. thaliana* já foi comprovada por Hajheidari *et al.* (2012).

Por esse motivo, as interações foram testadas novamente, porém diferente do experimento descrito anteriormente, as proteínas NtCDKG;2 e NtCDKF;1 foram utilizadas como presas, enquanto o CTD da RNAPII foi utilizado como isca. Foi observada auto-ativação da construção DBD-NtCDKF;1, mesmo em meio de cultura contendo 1,75 mM de 3-AT. Isso indica que a concentração deste inibidor deveria ser aumentada, porém como o experimento anterior havia indicado interação negativa entre o CTD da RNAPII e NtCDKF;1, não foram utilizadas concentrações maiores. Novamente, a interação entre o CTD da RNAPII e NtCDKG;2 mostrou resultado negativo (Figura 4.12).

Esses resultados não são, no entanto, definitivos. Sendo a NtCDKG;2 uma quinase, a interação com seu alvo de fosforilação pode ser muito rápida para ser detectada por esse tipo de experimento, uma vez que ele se baseia em interações físicas entre as proteínas. Outra hipótese para esta ausência de interação poderia ser a necessidade de algumas proteínas sofrerem modificações pós-traducionais para que ocorra a interação. Uma das soluções para esse problema seria a co-expressão de uma proteína que realize esta modificação juntamente das proteínas híbridas durante o ensaio (Young, 1998).

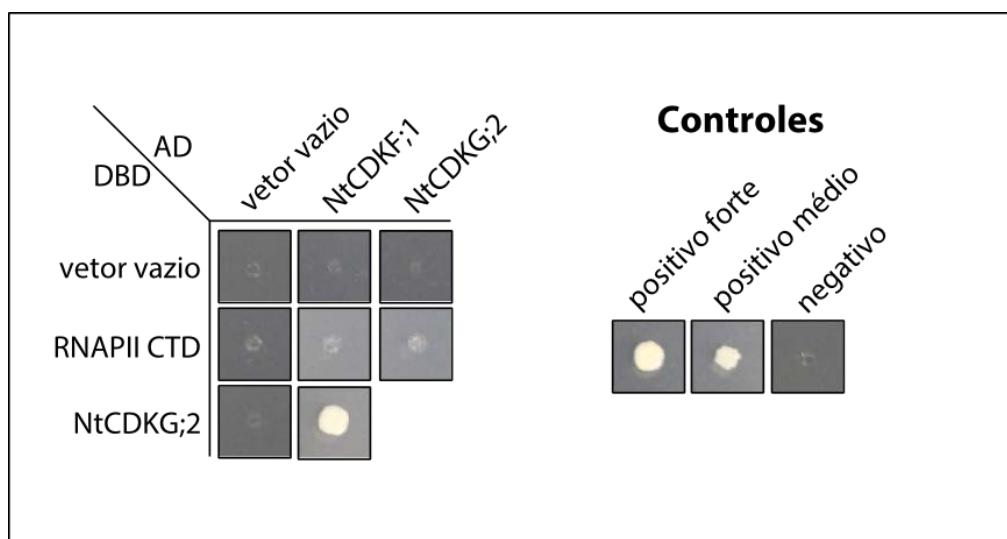


Figura 4.11 – Ensaio de Y2H para avaliar a interação entre o CTD da RNAPII e a proteína NtCDKG;2, em meio sem o aminoácido His e contendo 1,75 mM de 3-AT. Não houve auto-ativação de nenhuma construção. Não houve interação entre o CTD da RNAPII e a proteína NtCDKG;2. Entretanto, a interação entre NtCDKF;1 e o CTD da RNAPII, que deveria ter sido positiva, também foi negativa. A interação positiva NtCDKF;1 X NtCDKG;2 já havia sido observada anteriormente e foi utilizada como controle positivo adicional.

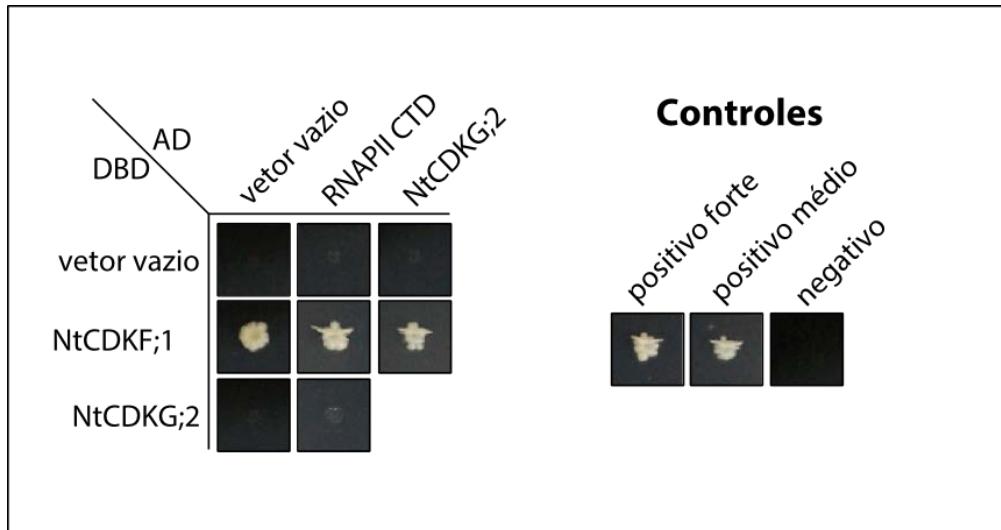


Figura 4.12 – Ensaio de Y2H para avaliar as interações entre o CTD da RNAPII e a proteína NtCDKG;2 em meio sem o aminoácido His e contendo 1,75 mM de 3-AT. Houve auto-ativação da construção DBD-NtCDKF;1, o que invalida as interações positivas observadas entre o CTD da RNAPII e NtCDKF;1 e também entre NtCDKG;2 e NtCDKF;1. Não houve interação entre o CTD da RNAPII e NtCDKG;2, assim como no experimento anterior.

Segundo Hajheidari *et al.* (2012), a proteína AtCDKF;1 fosforila resíduos específicos das repetições consenso do CTD da RNAPII, na posição S₇, e isso ocorre com maior intensidade quando os resíduos S₂ e S₅ estão fosforilados. A fosforilação desses outros resíduos é feita por CDKs *in vitro*, e talvez a ausência dessas proteínas durante o ensaio tenha diminuído a taxa de fosforilação do CTD pela CDKF;1, aparentando resultado negativo. O mesmo pode ocorrer com a NtCDKG;2, uma vez que a mesma ainda não foi caracterizada e seu mecanismo de ação é desconhecido. Caso ela realmente interaja com o CTD da RNAPII *in vivo*, essa interação pode depender de modificações na própria proteína ou no CTD. Estes problemas podem ser solucionados com a utilização de outros ensaios de interação proteína-proteína, como é o caso, por exemplo, do ensaio de *BiFC*, que permite a avaliação de interações *in planta* através da complementação de duas porções da proteína repórter GFP, fusionadas individualmente às proteínas cuja interação é avaliada. Esse ensaio pode permitir identificar interações rápidas e conta com proteínas de plantas sendo co-expresas naturalmente, de modo que as modificações pós-traducionais, necessárias para que ocorram as interações, aconteçam sem a necessidade de se adicionar proteínas artificialmente. Além disso, caso haja interação entre as proteínas, o *BiFC* permite a localização da estrutura subcelular onde a interação ocorre, o que é importante para determinar a regulação espaço-temporal da sinalização celular.

4.5. Screening de duplo-híbrido utilizando NtCDKG;2 como isca

Parte desse trabalho foi dar continuidade a um *screening* de duplo-híbrido para encontrar proteínas putativas parceiras de interação de NtCDKG;2, iniciado pela aluna de doutorado Greice Lubini. Esse experimento foi feito com o sistema de duplo-híbrido em leveduras, utilizando a construção DBD-NtCDKG;2 como isca e uma biblioteca de cDNAs de estigma/estilete de *N. tabacum* inseridos no vetor pDESTTM22, permitindo a fusão dos cDNAs com o domínio de ativação do fator de transcrição GAL4 e consequente formação de presas. A biblioteca de presas foi utilizada para transformar leveduras já transformadas com o plasmídeo pEXP22-NtCDKG;2, e as células transformadas foram plaqueadas em diferentes meios seletivos para avaliar a transcrição dos genes repórteres *HIS3* e *ADE1*. Foram selecionadas 230 colônias isoladas que cresceram nas diferentes placas de seleção, e as mesmas foram incubadas novamente em meio seletivo para realizar a extração de seus DNAs plasmidiais e posterior análise dos clones de cDNA que possuíam.

A identificação dos parceiros foi feita através da extração plasmidial das leveduras positivas, seguida de transformação de células de *E. coli* com esse DNA, permitindo a separação de plasmídeos diferentes, eventualmente contidos em um único clone de levedura positiva. As bactérias foram incubadas em meio contendo o antibiótico seletivo canamicina, para recuperar apenas células contendo o plasmídeo pDESTTM22, que é o plasmídeo que contém a presa. Foram selecionadas 6 colônias de *E. coli* provenientes de cada transformação, e seus plasmídeos foram então analisados através de digestão com a enzima de restrição BsrGI. A digestão do vetor vazio com essa enzima produz 4 fragmentos, de 6015 pb, 1423 pb, 1090 pb e 402 pb. A reação de recombinação exclui um dos sítios de restrição dessa enzima, presente no gene de seleção negativa *ccdB*, de modo que, caso o cDNA inserido não apresente sítios de restrição para essa enzima, são esperados 3 fragmentos, um de 6015 pb, um de 1090 pb correspondentes ao vetor, e um terceiro fragmento, de tamanho desconhecido, correspondente ao inserto.

Os padrões de digestão observados no gel de agarose, resultante da análise por eletroforese, foram utilizados para selecionar os diferentes cDNAs provenientes de um único clone positivo de levedura, sendo que padrões diferentes foram considerados como clones independentes. Cada clone foi sequenciado uma vez na direção *forward*, a partir de uma região anterior ao sítio de recombinação permitindo realizar sua identificação. As sequências desses cDNAs foram analisadas através de alinhamentos com o algoritmo *tblastx* nos banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e TAIR. Esse algoritmo realiza a tradução das sequências de nucleotídeos em aminoácidos em todas as

fases de leitura possíveis e as compara com um banco de sequências de nucleotídeos também traduzida em todas as fases de leitura possíveis. Os resultados obtidos foram anotados utilizando apenas o resultado com maior cobertura da sequência, maior identidade de aminoácidos entre as sequências e menor *e-value* (denominados de *top hits*). Os clones que não apresentaram similaridades ou aqueles com similaridades extremamente baixas foram classificados como “*no match*”, indicando que não foi encontrada sequência correspondente no banco de dados referente.

Após a identificação das sequências codificadoras de putativos parceiros de interação de NtCDKG;2, pode ser feita a escolha de candidatas para a realização de um “re-teste” par-a-par, em condições isoladas para confirmar se as interações realmente ocorrem. Somente genes com potencial função no ciclo celular ou processos relacionados foram escolhidos para re-testes.

Nesse trabalho foram analisados 26 clones, provenientes de 16 colônias positivas de levedura, levantando alguns putativos parceiros de interação para serem re-testados. A Figura 4.13 traz um dos géis de agarose utilizados para determinar os clones a serem identificados. A Tabela 4.1 traz a identificação dos 6 clones referentes ao gel da Figura 4.13 e 2 clones com potencial para re-teste. A tabela com a identificação de todos os 26 clones encontra-se no APÊNDICE E.

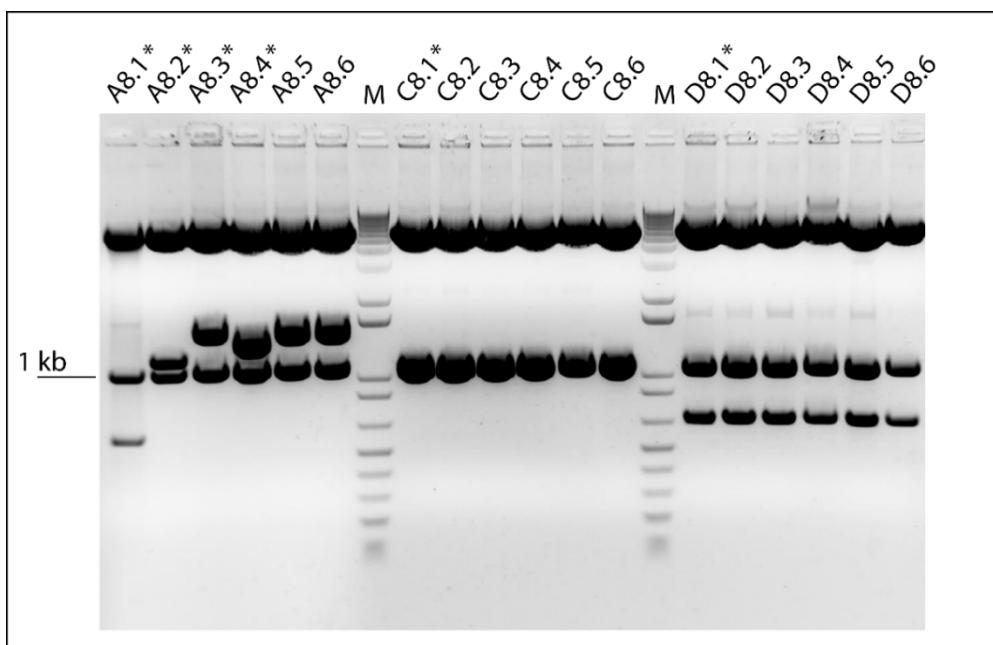


Figura 4.13 – Fotografia do gel de agarose resultante da eletroforese das digestões com a enzima BsrGI dos DNAs plasmidiais das colônias de *E. coli* transformadas com o DNA extraído de colônias de levedura positivas do screening de Y2H de NtCDKG;2. A8.1-6, C8.1-6, D8.1-6 – padrões de digestão dos plasmídeos de colônias de *E. coli* transformadas com o DNA extraído das colônias de levedura A8, C8 e D8, respectivamente; M – marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); * – colônias escolhidas para identificação por sequenciamento, com base nas diferenças dos padrões de digestão observados.

O clone G1F8.1 foi identificado como sendo uma subunidade catalítica da proteína fosfatase 2A. Essa proteína, em *A. thaliana*, possui atividade de fosfatase de resíduos Ser/Thr (País *et al.*, 2009), que é a atividade contrária a das CDKs, que são quinases de resíduos Ser/Thr (Morgan, 2007).

O clone G1H9.2 foi identificado como provável ortólogo da proteína 14-3-3H-1, membro da família de proteínas 14-3-3, que possui muitos genes que codificam diversas isoformas dessas proteínas (DeLille *et al.*, 2001). As 14-3-3 formam homo- e/ou heterodímeros e modulam a atividade, localização subcelular e interação proteína-proteína de proteínas fosforiladas (Aitken, 2011). As proteínas “clientes” das 14-3-3 estão envolvidas em uma série de funções diferentes, incluindo divisão celular, sinalização e apoptose (Hemert *et al.*, 2001). Em nosso laboratório foi identificada a interação de SCI1 com duas proteínas dessa família, diferentes da identificada nesse trabalho. A interação de SCI1 com uma putativa ortóloga de 14-3-3A foi identificada através de *pull down*, e a interação com uma putativa ortóloga de 14-3-3D foi comprovada por Y2H, *BiFC* e co-imunoprecipitação (Bertolino, dados não publicados; Strini, dados não publicados). A análise da interação entre o clone aqui identificado com a NtCDKG;2 e também com SCI1 pode revelar se essa proteína está envolvida no mecanismo de interação dessas proteínas.

Tabela 4.1 – Identificação de 8 clones sequenciados a partir do *screening* de duplo-híbrido de NtCDKG;2.

Clone	<i>Top hit</i> no TAIR	<i>Top hit</i> no NCBI
G1A8.1	<i>No match</i>	<i>No match</i>
G1A8.2	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	PREDICTED: <i>Solanum lycopersicum</i> uncharacterized LOC101251625, mRNA
G1A8.3	METHIONINE SYNTHASE 2	<i>Nicotiana attenuata</i> isolate MS 90 methionine synthase mRNA, complete cds
G1A8.4	THI1, THI4, THIAMINE4, THIAZOLE REQUIRING	<i>Nicotiana tabacum</i> putative chloroplast thiazole biosynthetic protein (ThiI) mRNA, complete cds; nuclear gene for chloroplast product
G1C8.1	20S PROTEASOME ALPHA SUBUNIT E1	PREDICTED: <i>Solanum lycopersicum</i> proteasome subunit alpha type-5-like, mRNA
G1D8.1	LIPID TRANSFER PROTEIN 1	<i>Nicotiana tabacum</i> NtLTP1 gene for lipid transfer protein, complete cds
G1F8.1	PROTEIN PHOSPHATASE 2A-4	<i>Nicotiana tabacum</i> mRNA for protein phosphatase 2A catalytic subunit
G1H9.2	14-3-3OMEGA	<i>Nicotiana tabacum</i> mRNA for 14-3-3 h-1 protein, complete cds

5. CONCLUSÃO

Futuramente, a utilização de diferentes métodos para testar as interações das proteínas encontradas no *screening*, bem como do CTD da RNAPII, com NtCDKG;2 pode confirmar ou descartar as hipóteses levantadas durante a realização do presente trabalho (Figura 5.1), e auxiliar na compreensão da(s) função(ões) biológica(s) dessa proteína quinase. Os experimentos realizados durante esse projeto, junto dos resultados obtidos, poderão subsidiar novos experimentos com esse mesmo objetivo.

Em suma, foi possível concluir que:

- 1) NtCDKG;2 se localiza no núcleo;
- 2) O CDT da RNAPII de *N. tabacum* foi clonado com sucesso;
- 3) É necessário otimizar as condições de expressão da proteína recombinante GST-RNAPII CTD;
- 4) NtCDKG;2 não interage com o CTD da RNAPII por Y2H, porém são necessários testes através de outros métodos para verificar se realmente não há interação entre essas proteínas;
- 5) NtCDKG;2 pode interagir com a subunidade de uma fosfatase e/ou com uma proteína 14-3-3.

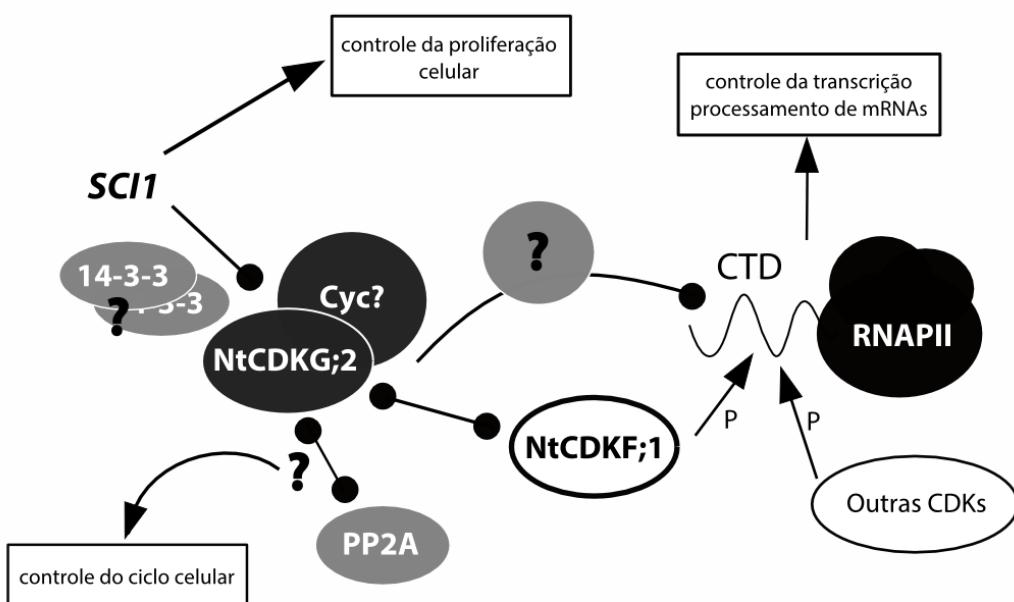


Figura 5.1 – Hipóteses sobre o funcionamento de NtCDKG;2 levantadas com as conclusões observadas (marcadas com interrogações). Setas indicam indução ou promoção; barras com círculos indicam indução ou repressão. Em cinza claro – prováveis parceiras de interação de NtCDKG;2; P – fosforilação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- AITKEN, A. Post-translational modification of 14-3-3 isoforms and regulation of cellular function. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2011, v. 22, p. 673-680.
- ALBERTS, B. *et al.* *Molecular Biology of The Cell*. 5th ed. New York, NY: Garland Science, 2008.
- ANDERSEN, SU. *et al.* Requirement of B2-type cyclin-dependent kinases for meristem integrity in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 2008, v. 20, p. 88–100.
- BELL, J., HICKS, G. Transmitting tissue in the pistil of tobacco: light and electron microscopic observations. *Planta*, 1976, v. 131, p. 187-200.
- BOMBARELY, A. *et al.* The Sol Genomics Network (solgenomics.net): growing tomatoes using Perl. *Nucleic Acids Research*, 2011, v. 38, Database issue, p. D1149-D1155.
- BORUC, J. *et al.* Functional Modules in the Arabidopsis Core Cell Cycle Binary Protein–Protein Interaction Network. *The Plant Cell*, 2010a, v. 22, p. 1264–1280.
- BORUC, J. *et al.* Systematic localization of the Arabidopsis core cell cycle proteins reveals novel cell division complexes. *Plant Physiology*, 2010b, v. 152, p. 553-565.
- BOUDOLF, V. *et al.* B1-type cyclin-dependent kinases are essential for the formation of stomatal complexes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 2004, v. 16, p. 945–955.
- BRADHAM, CA. *et al.* The sea urchin kinome: a first look. *Developmental Biology*, 2006, v. 300, n. 1, p 180-193.
- BRASILEIRO, ACM., CARNEIRO, VTC. *Manual de Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Editora Embrapa Produção de Informação, 1998.
- CHAMPION, A. *et al.* Arabidopsis kinome: after the casting. *Functional & Integrative genomics*, 2004, v. 4, p. 163-187.

¹ De acordo com a International Organization for Standardization (ISO)

CROUZET, P., HOHN, B. Transgenic Plants. In: *eLS*. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd, 2001.

DARDICK, C. *et al.* The rice kinase database. A phylogenomic database for the rice kinome. *Plant Physiology*, 2007 v. 143, p. 579-586.

DELILLE, JM, SEHNKE, PC., FERL, RJ. The Arabidopsis 14-3-3 Family of Signaling Regulators. *Plant Physiology*, 2001, v. 126, p. 35-38.

DEPAOLI, HC. *et al.* Stigma/style cell cycle inhibitor 1 (SCI1), a tissue-specific cell cycle regulator that controls upper pistil development. *The New Phytologist*, 2011, v. 190, n. 4, p. 82-95.

DEPAOLI, HC., GOLDMAN, G., GOLDMAN, MH. SCI1, the first member of the tissue-specific inhibitors of CDK (TIC) class, is probably connected to the auxin signaling pathway. *Plant Signaling & Behavior*, 2012, v. 7, n. 1, p. 1-6.

EDGAR, RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nuclei Acids Research*, 2004, v. 32, n. 5, p. 1792-1797.

EGLOFF, S., MURPHY, S. Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends in Genetics*, 2008, v. 24, n. 6, p. 280-288.

ESAU, K. *Anatomy of Seed Plants*. New York, NY: Edgar Blucher LTD, 1997.

FABIAN-MARWEDEL, T., UMEDA, M., SAUTER, M. The rice cyclin-dependent kinase-activating kinase R2 regulates S-phase progression. *The Plant Cell*, 2002, v. 14, p. 197-210.

FÜLÖP, K. *et al.* The *Medicago* CDKC1-CYCLINT1 kinase complex phosphorylates the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and promotes transcription. *The Plant Journal*, 2005, v. 42, p. 810-820.

GOLDBERG, JM. *et al.* The *Dictyostelium* Kinome – Analysis of the Protein Kinases form a Simple Model Organism. *PLoS Genetics*, 2006, v. 2, n. 3, p. 291-303.

GOLDMAN, MHS., GOLDBERG, RB., MARIANI, C. Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. *EMBO Journal*, 1994, v. 13, p. 2976 –2984.

- GOLDMAN, S., EBRIGHT, R., NICKELS, B. Direct detection of abortive RNA transcripts *in vivo*. *Science*, 2009, v. 324, n. 5929, p. 927-928.
- HAJHEIDARI, M. *et al.* CDKF;1 and CDKD protein kinases regulate phosphorylation of serine residues in the C-terminal domain of *Arabidopsis* RNA polymerase II. *The Plant Cell*, 2012, v. 24, p. 1626-1642.
- HEMERT, MJ., STEENSMA, HY., HEUSDEN, GPH. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signaling and apoptosis. *BioEssays*, 2001, v. 23, p. 936-946.
- HERRERA-ESTRELLA, L. *et al.*. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature*, 1983, v. 303, p. 209-213.
- HUANG, BQ., RUSSEL, SD. Synergid degeneration in *Nicotiana*: a quantitative, fluorochromatic and chlorotetracycline study. *Sexual Plant Reproduction*, 1992, v. 5, p. 151-155.
- HUANG, X. *et al.* CYCLIN-DEPENDENT KINASE G1 Is Associated with the Spliceosome to Regulate *CALLOSE SYNTHASE5* Splicing and Pollen Wall Formation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2013, v. 25, p. 637-648.
- INVITROGEN. *ProQuest™ Two-Hybrid System*: A sensitive method for detecting protein-protein interactions - User Manual. 2005, 106 p.
- INVITROGEN. *Gateway® Technology*: A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems – User Manual. 2010, 60 p.
- INZÉ, D. Why should we study the plant cell cycle? *Journal of Experimental Botany*, 2003, v. 54, n. 385, p. 1125-1126.
- INZÉ, D., DE VEYLDER, L. Cell Cycle Regulation in Plant Development. *Annual Reviews in Genetics*, 2006, v. 40, p. 77-105.
- INZÉ, D. (Ed.). Cell Cycle Control and Plant Development. *Annual Plant Reviews*, 2007, v. 32.
- JAMES, P., HALLADAY, J., CRAIG, EA. Genomic Libraries and a Host Strain Designed for Highly Efficient Two-Hybrid Selection in Yeast. *Genetics*, 1996, v. 144, p. 1425-1436.

JIA, Y., ANDERSON, JV., CHAO, WS. Autophosphorylation is crucial for CDK-activating kinase (Ee;CDKF;1) activity and complex formation in leafy spurge. *Plant Science*, 2011, v. 180, p. 259-267.

KANDASAMY, MK., KRISTEN, U. Developmental aspects of ultrastructure, histochemistry and receptivity of the stigma of *Nicotiana sylvestris*. *Annals of Botany*, 1987, v. 60, p. 427-437.

KANDASAMY, MK. *et al.* *Brassica* S-proteins accumulate in the intercellular matrix along the path of pollen tubes in transgenic tobacco. *The Plant Cell*, 1990, v. 2, p. 39-49.

KITSIOS, G. *et al.* A cyclin-dependent protein kinase, CDKC2, colocalizes with and modulates the distribution of spliceosomal components in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 2008, v. 54, p. 220-235.

LAMOND, AI., SPECTOR, DL. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2003, v. 4, n. 8, p. 605-612.

LEHTI-SHIU, MD., SHIU, SH. Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily. *Philosophic Transactions of The Royal Society B*, 2012, v. 367, p. 2619-2639.

LERSTEN, N. R. *Flowering plant embryology*. Blackwell Publishing, 2004.

LIFE TECHNOLOGIES. *Gateway® pDONR™ Vectors – User Guide*. 2012a, 28 p.

LIFE TECHNOLOGIES. *E. coli Expression System with Gateway® Technology - Gateway®-adapted destination vectors for cloning and high-level expression of native or tagged recombinant proteins in E. coli – User Guide*. 2012b, 44 p.

LOYER, P. *et al.* Characterization of cyclin L1 and L2 interactions with CDK11 and splicing factors: Influence of cyclin L isoforms on splice site selection. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, v. 283, p. 7721-7732.

LUBINI, G. *Caracterização do gene NtCDKG;2 expresso no pistilo de Nicotiana tabacum L.* Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto, São Paulo, 2012.

MATERA, G., TERNS, RM., TERNS, MP. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNA. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, v. 8, p. 209-220.

MEWS, M. *et al.* Immunodetection of four mitotic cyclins and the Cdc2a protein kinase in the maize root: their distribution in the cell development and dedifferentiation. *Protoplasma*, 2000, v. 212, p. 236-249.

MORGAN, DO. *The Cell Cycle: Principles of Control*. London: New Science Press Ltd., 2007.

MURAD, L. *et al.* The origin of tobacco's T genome is traced to a particular lineage within *Nicotiana tomentosiformis* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 2002, v. 89, n. 6, p. 921-928.

NAWRATH, C., SCHELL, J., KONCZ, C. Homologous domains of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II are conserved in plants. *Molecular Genetics & Genomics*, 1990, v. 223, n.1, p. 65-75.

NOVAGEN. *Competent Cells – User Protocol TB009 Rev. F 0104*. 2004, 23 p.

OPPERMAN, CH. *et al.* Update On The Tobacco Genome Initiative: A Gene Discovery Platform. In *Plant & Animal Genomes XIV Conference*, San Diego, CA, 2006.

PAÍS, SM., TÉLLEZ-İNÓN, MT., CAPIATI, DA. Serine/Threonine protein phosphatases type 2A and their roles in stress signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 2009, v. 4, n. 11, p. 1013-1015.

PORCEDDU, A. *et al.* A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G2/M progression in plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, v. 276, p. 36354-36360.

RAVEN, PH. *Biología Vegetal*. 7^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2007.

SAMBROOK, J., RUSSELL, DW. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York, NY: Cold Spring Harbor, 2001.

SHIMOTOHNO, A. *et al.* Differential phosphorylation activities of CDK-activating kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 2003, v. 534, p. 69-74.

SHIMOTOHNO, A. *et al.* The plant specific kinase CDKF1 is involved in activating phosphorylation in cyclin-dependent kinase activating kinases in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2004, v. 16, p. 2954-2966.

SHIMOTOHNO, A. *et al.* Diverse phosphoregulatory mechanisms controlling cyclin-dependent kinase-activating kinases in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 2006, v. 47, p. 701-710.

SNUSTAD, DP., SIMMONS, MJ. *Principles of Genetics*. 6th ed. John Wiley & Sons, 2012.

TAIZ, L., ZEIGER, E. *Plant Physiology*. 5th ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2010.

TAKATSUKA, H., OHNO, R., UMEDA, M. The *Arabidopsis* cyclin-dependent kinase-activating kinase CDKF;1 is a major regulator of cell proliferation and cell expansion but is dispensable for CDKA activation. *The Plant Journal*, 2009, v. 59, p. 475-487.

TANK, JG., THAKER, VS. Cyclin dependent kinases and their role in regulation of plant cell cycle. *Biologia Plantarum*, 2011, v. 55, p. 201-212.

TREMBLEY, JH. *et al.* Cyclin dependent kinase 11 in RNA transcription and splicing. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 2004, v. 77, p. 263-288.

UMEDA, M. *et al.* A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 1998, v. 95, p. 5021-5026.

VAN LEENE, J. *et al.* A tandem affinity purification-based technology platform to study the cell cycle interactome in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Cell Proteomics*, 2007, v. 6, p. 1226-1238.

VAN LEENE, J. *et al.* Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Systems Biology*, 2010, v. 6, p. 397.

YOUNG, KH. Yeast Two-Hybrid: So Many Interactions, (in) So Little Time... *Biology of Reproduction*, 1998, v. 58, p. 302-311.

YUKAWA, M., TSUDZUKI, T., SUGIURA, M. The chloroplast genome of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis*: complete sequencing confirms that the *Nicotiana sylvestris* progenitor is the maternal genome donor of *Nicotiana tabacum*. *Molecular Genetics and Genomics*, 2006, v. 275, n. 4, p. 367-373.

ŻABICKI, P. *et al.* *Arabidopsis* Cyclin-Dependent Kinase Gene CDKG;2 is Involved in Organogenic Responses Induced In Vitro. *Acta Biologica Cracoviensis Series Botanica*, 2013, v. 55, n. 1, p. 37-48.

APÊNDICE A

Meios de Cultura

Todos os meios de cultura, depois de preparados, foram esterilizados em autoclave por 20 minutos sob 1 atm de pressão e 120°C (autoclave vertical 415 – Fanem).

A.1. Meio LB (Luria-Bertani)

O meio foi feito com 1% de triptona, 0,5 % de extrato de levedura e 1 % de NaCl em água deionizada. Para a preparação sólida, foi adicionado ágar bacteriológico a 1 %. Depois de preparado, o meio foi dividido em garrafas de vidro, nunca ultrapassando dois terços do volume total, e foi esterilizado.

A.2. Meio MAS (Minimum A Sucrose)

Para o meio MAS, as concentrações finais foram de 4% de meio A 1X, 0,2 % de sacarose, 0,04 % de MgSO₄, 0,0005 % de tiamina dissolvidos em solução de ágar 1,5 % previamente preparada e esterilizada. Os componentes desse meio são preparados separadamente:

- Meio A 5X – K₂HPO₄ 0,4 M, 0,5 % de (NH₄)₂SO₄ e 0,25 % de citrato de sódio dissolvidos em água deionizada, esterilizado em autoclave e armazenado a 4°C.
- Solução de sacarose 20 % - esterilizada por filtração (filtro Millipore de 0,22 µm) e armazenada a 4°C.
- Solução de MgSO₄ 20 % - esterilizada em autoclave e armazenada a -20°C.
- Solução de tiamina 10 mg/mL – esterilizada em filtro Millipore 0,22 µm e armazenada a -20°C.

A.3. Meio YPAD (Yeast extract, Peptone, Adenine, Dextrose)

Para o meio YPAD, as concentrações finais foram: 1% de extrato de levedura, 2 % de peptona, 2 % de dextrose e 0,02 % de sulfato de adenina em água deionizada. O pH foi ajustado para 6,0 com HCl 4N. Para a versão sólida, foi utilizado ágar para concentração final de 2 %. O meio de cultura foi dividido em garrafas ou Erlenmeyers, posteriormente autoclavadas.

A.4. Meio SC (Synthetic Complete)

O meio foi feito com concentrações finais de 0,67 % de *Yeast Nitrogen Base* 0,135 % de *mix* de aminoácidos (*dropout mix* – item A.4.1.) em água deionizada. O pH foi ajustado para

5,9 com NaOH 4N. Para o meio sólido, foi adicionado ágar bacteriológico para concentração final de 2 %. A solução foi dividida em garrafas e esterilizada. Depois de autoclavados, os meios foram acrescidos de dextrose esterilizada para concentração final de 2 %.

Este meio de cultura foi feito com duas misturas de aminoácidos diferentes, resultando nos meios SC –Leucina –Triptofano –Histidina –Uracila e SC –Leucina –Triptofano –Histidina –Adenina. Para o crescimento seletivo de leveduras, os meios foram complementados com soluções de aminoácidos (item A.4.2.), dependendo do objetivo. Os diferentes meios SC seletivos serão descritos na seção do experimento de duplo-híbrido (seção 3.16).

A.4.1. Mix de Aminoácidos e bases nitrogenadas (*Dropout Mix*)

A mistura de aminoácidos para o preparo de meio SC sem aminoácidos específicos (*dropout*) foi feita de acordo com o manual para os ensaios de duplo-híbrido (*ProQuest™ Two-Hybrid System, Invitrogen*). Foram utilizadas duas misturas diferentes, a primeira sem os aminoácidos Leucina (Leu, L), Triptofano (Trp, W), Histidina (His, H) e a base nitrogenada Uracila (Ura), e a segunda sem os aminoácidos Leu, Trp, His e a base nitrogenada Adenina (Ade). As misturas foram realizadas fazendo a adição de 1g de cada um dos aminoácidos a seguir: Alanina (Ala, A), Arginina (Arg, R), Aspartato (Asp, D), Asparagina (Asn, N), Cisteína (Cis, C), Glutamato (Glu, E), Glutamina (Gln, Q), Glicina (Gly, G), Isoleucina (Ile, I), Lisina (Lys, K), Metionina (Met, M), Fenilalanina (Phe, F), Prolina (Pro, P), Serina (Ser, S), Treonina (Thr, T), Tirosina (Tyr, Y) e Valina (Val, V). Na primeira mistura foi adicionado 1 g de Adenina, enquanto que na segunda foi adicionado 1 g de Uracila.

A.4.2. Soluções de aminoácidos e Uracila

Foram preparadas soluções dos aminoácidos Leu, Trp, His e também da base nitrogenada Uracila para complementar o meio de cultura SC em alguns casos. As soluções foram feitas nas concentrações: Leucina – 100 mM, Triptofano – 40 mM, Histidina 100 mM, Uracila – 20 mM. Todas as soluções foram esterilizadas através de filtração em filtros Millipore de 0,22 µm.

APÊNDICE B

A Tabela B.1 traz as descrições dos *primers* utilizados durante esse trabalho.

Tabela B.1. *Primers* utilizados nesse trabalho. T_m – temperatura de anelamento; M – nucleotídeos com grupamento amina (adenina ou citosina).

Construção	Primers	Sequência (5'→3')	T_m (°C)
PCR1	attB1-CTD RNA pol II-Fw	GCAGGGCTTCGAAGGAGATAAGAACCATGTCACCGATTACAG	68,8
	ATGCT		
Clonagem	attB2-CTD RNA pol II-Rv c/s	AAGCTGGGTCTCAMCCAGCCCTGTCACTCTTGT	66,3
	BP1	GGGGACAAGTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC	61,7
PCR2	BP2	GGGGACCACACTTTGTACAAGAAAGCTGGTC	63,8
	M13 forward	GTAAAAACGACGGCCAGT	42
pENTRY-RNAPII CTD c/s	M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	50
	SeqpDEST15-Fw	AACGTATTGAAAGCTATCCCAC	52,4
Sequenciamento	DEST22-AD502-FW	TATAACGCGTTGGAAATCACT	52,1
Clones do screening	Prom35S	ATGACGGCACAAATCCCACTATCC	57,1
pK7WGF2-NtCDKG;2	SGN-U423624-RV-qPCR	ACCTCAACAGGAGGGTCAAAAGAT	60,3
Confirmação de transformação			

APÊNDICE C

Alinhamento entre as sequências de aminoácidos das subunidades Rpb1 de *A. thaliana*, *S. lycopersicum* e *S. tuberosum*. AthaRPB1 – Rpb1 de *Arabidopsis thaliana*; SolyRPB1 – Rpb1 de *Solanum lycopersicum*; SotuRPB1 – Rpb1 de *Solanum tuberosum*; * - aminoácidos idênticos em todas as sequências; . – substituições semi-conservadas (aminoácidos de forma/função parecida). O alinhamento foi realizado com o software MUSCLE (Edgar, 2004), utilizando os parâmetros padrão (*default*) para alinhamentos de proteínas.

A região clonada por Umeda *et al.* (1998) em *A. thaliana* vai da metionina inicial na posição 1523 até a prolina na posição 1840. A região escolhida para a clonagem do CTD em *N. tabacum* corresponde à região que vai da metionina na posição 1519 – tanto em batata quanto em tomate – até a glicina final, nas posições 1847 e 1840 de tomate e batata, respectivamente.

AthaRPB1	1673	TSPSYSPTSPSYSPTSPSYSPTSPAYSPTSPGYSPTSPSYSPTSPSYGPTSPSYNPQS	AK
SolyRPB1	1679	TSPSYSPTSPSYSPTSPSYSPTSPAYSPTSPGYSPTSPSYSPTSPSYSP	SAR
SotuRPB1	1672	TSPSYSPTSPSYSPTSPSYSPTSPAYSPTSPGYSPTSPSYSPTSPSYSP	SAR
consensus	1681	*****	*****

APÊNDICE D

Alinhamento entre as sequências de nucleotídeos do mRNA codificante das subunidades Rpb1 de *S. lycopersicum* e *S. tuberosum*. SolyRPB1 – Rpb1 de *Solanum lycopersicum*; SotuRPB1 – Rpb1 de *Solanum tuberosum*; * - aminoácidos idênticos em todas as sequências; . – substituições semi-conservadas (aminoácidos de forma parecida). O alinhamento foi feito com o *software* MUSCLE (Edgar, 2004), utilizando os parâmetros padrão (*default*) para alinhamento de nucleotídeos.

A região utilizada para a confecção dos *primers* para amplificação da CDS do RNAPII CTD em tabaco foi do códon ATG correspondente às posições 4762-4764 em tomate e 4755-4757 em batata. O códon de terminação corresponde às posições 5749-4751 em tomate e 5721-5723 em batata.

SolyRPB1	4739	TTTGCTCAGCCCAAATATGCGGATGTCACCGATTACAGATGCTCAATTCTCCG	TATGT
SotuRPB1	4732	TTTGCTCAGCCCAAATATGCGGATGTCACCGATTACAGATGCTCAATTCTCCG	TATGT
consensus	4741	*****	*****
SolyRPB1	4799	GGGTGGCATGGCTTCTCTCC	CACTTCATCCCCTGGTTACAGTCCATCATCCCCTGGTTA
SotuRPB1	4792	GGGTGGCATGGCTTCTCTCC	CACTTCATCCCCTGGTTACAGTCCATCATCCCCTGGTTA
consensus	4801	*****	*****
SolyRPB1	4859	CAGCCCACATCATCCCCTGGTTACAGCCCCGACCTCTCCAGGATAACAGT	CCCACCTCCCCCGG
SotuRPB1	4852	CAGCCCACATCATCCCCTGGTTACAGCCCCGACCTCTCCAGGATAACAGG	CCCACCTCCCCCGG
consensus	4861	*****	*****
SolyRPB1	4919	TTATAGCCCCACATCTCCTGGTTACAGCCCCACTTCCCCACTTATAGCCCCAGCTCCCC	
SotuRPB1	4912	TTACAGCCCCACATCTCCTGGTTACAGCCCCACTTCCCCACTTATAGCCCCAGCTCCCC	
consensus	4921	***	*****
SolyRPB1	4979	TGGCTACAGCCCCACAAGTCCAGCATATTCTCCAACCAGTCCTCATACTCACCCACATC	
SotuRPB1	4972	TGGCTACAGCCCCACAAGTCCAGCATATTCTCCAACCAGTCCTCATACTCACCCACATC	
consensus	4981	*****	*****
SolyRPB1	5039	ACCCAGTTATAGCCAACATCTCCAAGCTATAGCCAACCTCGCCTAGCTACAGCCCAAC	
SotuRPB1	5032	ACCCAGTTATAGCCAACATCTCCAAGCTATAGCCAACCTCGCCTAGCTATAGCCCAAC	
consensus	5041	*****	*****
SolyRPB1	5099	ATCACCTAGCTACAGCCCTACTTCTCCAGCGTACAGCCCCACTTCTCCGGCTACAGCCC	
SotuRPB1	5092	ATCACCTAGCTACAGCCCTACTTCTCCGGCATAACAGCCCCACTTCTCCGGCTACAGCCC	
consensus	5101	*****	*****

SolyRPB1	5159	TA	CTCTCCGGC	TACAGCCCCACTTCTCCATCTTACAGCCCCACTTCGCCATCTTACAG	
SotuRPB1	5152	CA	CTCTCCGGC	A-----TACAGCCCCACTTCGCCATCTTACAG	
consensus	5161	*****	*****	*****	
SolyRPB1	5219	CC	CCCAC	TTCAC	CTTACAGCCCCACATCGCCTCATATAGCCCCACCTCACCCCTTA
SotuRPB1	5191	CC	CCCAC	TTCAC	CTTACAGCCCCACATCACCTCATATAGCCCCACCTCACCCCTTA
consensus	5221	*****	*****	*****	*****
SolyRPB1	5279	TA	GTCCGACTTCTCC	CATCATATAGTCCGACTTCTCCTGCT	TACAGTCCTACCTCCCCTGG
SotuRPB1	5251	TA	GTCCGACTTCTCC	CATCATATAGTCCAAC	TACAGTCCTACCTCCCCTGG
consensus	5281	*****	*****	*****	*****
SolyRPB1	5339	TT	ACAGCCC	AAACATCTCCCAGC	TATAGCCCCAACATCACCACTACAGTCCAACATCACCC
SotuRPB1	5311	TT	ACAGCCC	AAACATCTCCCAGC	TATAGCCCCAACATCACCACTACAGTCCAACATCACCC
consensus	5341	*****	*****	*****	*****
SolyRPB1	5459	G	CTGTCTCCTTCTA	GTCCATACAGCCCGTCATCTCCAAAGTTACAGTCCCACATCACCA	T
SotuRPB1	5431	G	CTGTCTCCTTCTA	GTCCATACAGCCCGTCATCTCCAAAGTTACAGTCCCACATCACCA	T
consensus	5461	*****	*****	*****	*****
SolyRPB1	5519	GT	ACTCTCCAACATCTCC	CATCATATTCTCCTTCAAGCCCCAACCTATA	AGTCCCAGCAGCCC
SotuRPB1	5491	GT	ACTCTCCAACATCTCC	CATCATATTCTCCTTCAAGCCCCAACCTATA	AGTCCCAGCAGCCC
consensus	5521	*****	*****	*****	*****
SolyRPB1	5579	AT	ACAACAAC	TCAAGGTACAAGCCCAGATT	TATAGTCCCAGTTCTCCCCAGTACAGTCCAAG
SotuRPB1	5551	AT	ACAACAAC	TCAAGGTACAAGCCCAGATT	TATAGTCCCAGTTCTCCCCAGTACAGTCCAAG
consensus	5581	*****	*****	*****	*****
SolyRPB1	5639	TG	CAGGGTACTCACCA	AGTGCCTGGTATTCA	CCATCATCTACTAGCCAGTACACCCC
SotuRPB1	5611	TG	CAGGGTACTCACCA	AGTGCCTGGTATTCA	CCATCATCTACTAGCCAGTACACCCC
consensus	5641	*****	*****	*****	*****
SolyRPB1	5699	AC	GTGTAGTGAGAGAGAC	AGAAGTGTCAAAGATGACAAGGCTGG	TGATCATTAGG
SotuRPB1	5671	AC	GTGTAGTGAGAGAGAC	AGAAGTGTCAAAGATGACAAGGCTGG	TGATCATT
consensus	5701	*****	*****	*****	...
SolyRPB1	5759	G	AGGGAAACGAAGTTG	TATTTACTTGAA	ACTTTAATCTTCAGTTGCTAACTGGCTCATT
SotuRPB1	5728	-A	GGGAATAAAGTTG	TATTTACTTTGAG	-----TGGCTTATT
consensus	5761	*****	*****	*****	*****
SolyRPB1	5819	AG	TCACTGTGCTTCTG	AAGGCATAAGATTGCTGTATAA	TATTTCGAAGAACACA
SotuRPB1	5764	AG	TCACTGTGCTTCTG	AAGGCATAAGATTGCTGTATAA	TATTTCGAAGAACACA
consensus	5821	*****	*****	*****	**

APÊNDICE E

Os resultados das análises dos sequenciamentos provenientes do *screening* de duplo-híbrido entre NtCDKG;2 e a biblioteca cDNAs e/e de *N. tabacum* se encontram na Tabela E.1, nas páginas seguintes. As análises *in silico* foram feitas utilizando o algoritmo tblastx nos bancos de dados TAIR (*The Arabidopsis Information Resource* - <http://www.arabidopsis.org/>) e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os *Top hits* correspondem aos resultados que demonstraram maior cobertura da sequência, maior identidade de aminoácidos entre as sequências e menor *e-value*. Os clones que não apresentaram similaridades ou aqueles com similaridades extremamente baixas aparecem como “*no match*”, indicando que não foi encontrada sequência correspondente no banco de dados referente.

Tabela E.1 – Identificação dos clones provenientes do screening de duplo-híbrido de NtCDKG;2.

Clone	Descrição	Top hit no TAIR		Top hit no NCB	
		No. acesso	Descrição	No. acesso	Descrição
G1A8.1	No match		No match		
G1A8.2	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	AT5G27690	PREDICTED: <i>Solanum lycopersicum</i> uncharacterized LOC101251625 (LOC101251625), mRNA	XM_004230183.1	
G1A8.3	ATMS2, METHIONINE SYNTHASE 2, MS2	AT3G03780	<i>Nicotiana attenuata</i> isolate MS 90 methionine synthase mRNA, complete cds	KF321734.1	
G1A8.4	THI1, THI4, THIAMINE4, THIAZOLE REQUIRING, TZ	AT5G54770	<i>Nicotiana tabacum</i> putative chloroplast thiazole biosynthetic protein (Thi1) mRNA, complete cds; nuclear gene for chloroplast product	AY220080.1	
G1A9.1	40S RIBOSOMAL PROTEIN SA, AP40, P40, RP40, RPSAA	AT1G72370	PREDICTED: <i>Solanum lycopersicum</i> 40S ribosomal protein SA-like (LOC101250808), mRNA	XM_004241438.1	
G1B8.1	ATHIRD11, DEHYDRIN 11KDA, HIRD11	AT1G54410	<i>Solanum sugarandinum</i> dehydrin-like protein (ci18) mRNA, complete cds	AF542504.1	
G1C8.1	20S PROTEASOME ALPHA SUBUNIT E1, ARABIDOPSIS 20S PROTEASOME ALPHA SUBUNIT E1, ATPAE1, PAE1	AT1G53850	PREDICTED: <i>Solanum lycopersicum</i> proteasome subunit alpha type-5-like (LOC101266742), mRNA	XM_004244755.1	
G1C9.1	No match		No match		
G1D8.1	ARABIDOPSIS THALIANA LIPID TRANSFER PROTEIN 1, ATL TP1, LIPID TRANSFER PROTEIN 1, LP1, LTP1	AT2G38540	<i>Nicotiana tabacum</i> NtLTP1 gene for lipid transfer protein, complete cds	AB625593.1	
G1D9.1	No match		<i>N.tabacum</i> cysteine-rich extensin-like protein-2 mRNA, complete cds	L13440.1	
G1D9.2	No match		<i>Solanum lycopersicum</i> ripening regulated protein DDTFR8 (DDTFR8), mRNA	AF204783	
G1D9.3	HR-like lesion-inducing protein-related	AT1G04340	No match		continua

Tabela E.1 - *continuação*

Clone	Descrição	Top hit no TAIR		Top hit no NCBI
		Nº. acesso	Descrição	
G1E8.1	HR-like lesion-inducing protein-related	AT1G04340	<i>Capsicum annuum</i> putative lesion-inducing protein mRNA, complete cds	AY496120.1
G1F8.1	PP2A-4, PROTEIN PHOSPHATASE 2A-4	AT3G58500	<i>Nicotiana tabacum</i> mRNA for protein phosphatase 2A catalytic subunit	AJ007496.1
G1F8.4	<i>No match</i>		<i>No match</i>	
G1F8.5	Aluminium induced protein with YGL and LRDR motifs	AT4G27450	PREDICTED: <i>Solanum lycopersicum</i> stem-specific protein TSJT1-like (LOC101268056), mRNA	XM_004232802.1
G1F9.1	PP2A-4, PROTEIN PHOSPHATASE 2A-4	AT3G58500	<i>No match</i>	
G1F9.4	40S RIBOSOMAL PROTEIN SA, AP40, P40, RP40, RPSAA	AT1G72370	PREDICTED: <i>Solanum lycopersicum</i> 40S ribosomal protein SA-like (LOC101250808), mRNA	XM_004241438.1
G1G8.1	<i>No match</i>		<i>No match</i>	
G1G8.4	unknown protein	AT5G13100	<i>No match</i>	
G1G9.2	RD19, RD19A, RESPONSIVE TO DEHYDRATION 19, RESPONSIVE TO DEHYDRATION 19A	AT4G39090	<i>Nicotiana tabacum</i> mRNA for putative preprocysteine proteinase	AJ242994.1
G1G9.4	LIKE SEX4 1, LSF1	AT3G01510	PREDICTED: <i>Solanum lycopersicum</i> phosphoglucan phosphatase LSF1, chloroplast-like (LOC101243774)	XM_004252618.1
G1H8.1	ATPPA6, PPA6, PYROPHOSPHORYLASE 6	AT5G09650	PREDICTED: <i>Solanum lycopersicum</i> soluble inorganic pyrophosphatase 1, chloroplast-like (LOC101264469), mRNA	XM_004248736.1
G1H8.5	GAE3, UDP-D-GLUCURONATE 4-EPIMERASE 3	AT4G00110	PREDICTED: <i>Solanum lycopersicum</i> UDP-glucuronate 4-epimerase 3-like (LOC101249858), mRNA	XM_004229756.1

continua

Tabela E.1 - conclusão.

Clone	Top hit no TAIR		Top hit no NCBI	
	Descrição	No. acesso	Descrição	No. acesso
G1H9.2	14-3-3 PROTEIN G-BOX FACTOR 14 OMEGA, 14-3-3OMEGA, GENERAL REGULATORY FACTOR 2, GF14 OMEGA, GRF2	AT1G78300	<i>Nicotiana tabacum</i> mRNA for 14-3-3 h-1 protein, complete cds	AB119478.1
G1H9.4	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	AT1G64430	PREDICTED: <i>Solanum lycopersicum</i> uncharacterized LOC101247896 (LOC101247896), mRNA	XM_004252564.1