UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

A análise do interactoma de SCI1 (*Stigma/*style C*ell cycle *Inhibitor I) revela
possíveis mecanismos de controle da proliferação celular**

EDWARD JOSÉ STRINI

RIBEIRÃO PRETO, SP

2014

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Genética

**A análise do interactoma de SCI1 (*Stigma/style Cell cycle Inhibitor 1*) revela
possíveis mecanismos de controle da proliferação celular**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de DOUTOR em CIÊNCIAS – Área de
concentração: GENÉTICA

Aluno: Edward José Strini
Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman

Ribeirão Preto

-2014-

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

Strini, Edward José

A análise do interactoma de SCI1 (*Stigma/style Cell cycle Inhibitor 1*) revela possíveis mecanismos de controle da proliferação celular. / Edward José Strini; orientadora Maria Helena de Souza Goldman – Ribeirão Preto – 2014.

176 p.: 48 il.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Genética.

1. *Nicotiana tabacum*. 2. SCI1. 3. Interação proteína-proteína. 4. Pistilo. 5. Ciclo celular. 6. Processamento de RNA. 7. Nucléolo. 8. Duplo-híbrido. 9. BiFC.

PARECER DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 2014.

“Viva como se fosse morrer amanhã, aprenda
como se fosse viver para sempre.”

Mahatma Gandhi

A minha mãe, **Maria Clarice Boaratti Strini**, por honrar o título de mãe com toda
garra e coragem. Muito obrigado pelo apoio e devoção!

Dedico...

Agradecimentos

À Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman, por ter me contagiado com sua paixão e dedicação à ciência. Obrigado pela oportunidade oferecida e pela confiança depositada ao longo destes anos. Agradeço pela orientação, pelo apoio, por me proporcionar momentos contínuos de reflexão e aprendizagem que me fizeram enxergar a ciência de outra forma. Vou sentir falta de nossas longas conversas discutindo e planejando experimentos! Obrigado pela amizade, pelos conselhos e pelo carinho de mãe. A você toda minha gratidão!

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela oportunidade e suporte oferecidos durante a realização deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À FAPESP e CNPq pelo suporte financeiro.

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, pela utilização de sua estrutura e recursos.

A FAEPA, pelo suporte financeiro oferecido para participação em eventos científicos.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, FFCFRP/USP, pela confiança, utilização de suas estruturas e recursos, e ajuda prestada.

À Dra. Marcela Savoldi, técnica do Laboratório de Biologia Molecular da FCFRP-USP, pela ajuda na operação dos equipamentos e empréstimo de material.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC) – FMRP pela utilização dos aparelhos de microscopia confocal.

À Msc. Elizabete Rosa Milani (Bete), amiga de longa data e técnica do LMMC, pela ajuda no uso dos aparelhos de microscopia confocal, pela paciência e dedicação. Um exemplo de profissional.

À Dra. Roberta Ribeiro Costa Rosales, do Laboratório Multiusuário de Imagem In vivo, pela ajuda na utilização do microscópio confocal e do software ImageJ

À Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões, do Laboratório de Genética do Desenvolvimento de Insetos, Departamento de Genética, FMRP/USP pela utilização do aparelho *nanodrop*.

Ao Prof. Dr. Roy Edward Lason, do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo empréstimo de recursos importantes para a realização dos experimentos de *Pull-down*.

À Profa. Dra. Maria Célia Jamur e à Profa. Dra. Constance Oliver, do Departamento de Biologia Celular e Molecular da FMRP/USP, pela utilização do aparelho sonicador.

À Profa. Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius, da Universidade Federal do Tocantins, pela amizade e ajuda prestada no experimento de *Pull-down*.

Ao Prof. Dr. Luis Lamberti Pinto da Silva, do Departamento de Biologia Celular e Molecular da FMRP/USP, pelas informações, conselhos nos experimentos de duplo-híbrido e empréstimo de material e equipamentos.

À doutoranda Estela Ap. Pereira, do Laboratório de Tráfego Intracelular de Proteínas da FMRP pela ajuda no preparo dos meios de cultura para leveduras.

Ao Prof. Dr. João Atílio Jorge, do Departamento de Biologia da FFCLRP/USP, pelas informações sobre manipulação de leveduras e empréstimo de recursos.

À Dra. Taísa Magnani Dinamarco, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, FCFRP/USP, pelo auxílio na preparação das amostras analisadas por espectrometria de massa.

À Dra. Andréa Carla Quiapim da Silva, uma irmã que encontrei no laboratório e a quem posso certamente chamar de AMIGA. Obrigado pelo sequenciamento dos clones e pela incansável ajuda prestada como técnica do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, FFCLRP/USP, sem a qual este trabalho não teria sido o mesmo. Obrigado pela amizade sincera, pela agradável e engraçada companhia durante os almoços, pelos conselhos nos momentos difíceis, pelas aventuras no *campus* e na cidade, pelas receitas terapêuticas, enfim, por fazer questão de “Deiar” e nos fazer rir sempre.

À Bréia, ou melhor, Dra. Hebréia Oliveira Almeida Souza, minha grande parceira nos ensaios de *pull-down* e co-imunoprecipitação. Obrigado por me fazer companhia nas longas e repetidas semanas de COIP, quase sempre inconclusivas. Fala sério, no final já dava pra seguir todo o protocolo de olhos fechados. Obrigado pelos almoços especiais e pelos bolos que ainda vamos comprar pra comemorar os resultados. A Déa escolhe o sabor!

À Msc. Greice Lubini, ou melhor, Greçola, por nos alegrar e motivar todos os dias com um “Bom dia!” sempre acompanhado de um sorriso estampado no rosto. Pelo seu alto astral contaminante e engraçada convivência que nos dá força para encarar mais um dia.

À Lígia, amiga de laboratório e parceira nos experimentos de duplo-híbrido, BiFC e co-localização. Obrigado pela ajuda nos experimentos e na operação do SP5! Prometo que um dia ainda vou conseguir usar aquele software sozinho.

Ao amigo Vitor Pinotti, por ajudar nas coletas de material vegetal e por cuidar das plantas na casa de vegetação. Obrigado também pelas longas conversas e discussões sobre metabolismo de RNA. Acabei chegando à conclusão que RNA tem mil e uma utilidades. Uma delas, com certeza, deve precisar de NtSCII! Passo a você a tarefa de descobrir qual.

Ao Amau, ou melhor, Luís, Fernando ou Roberto, a quem conheci enquanto aluno e depois como companheiro de pós-graduação. Obrigado pela convivência agradável no laboratório.

Ao Pedro, aquele que tem a solução para todos os nossos problemas tecnológicos. Precisou de um livro digital, o Pedro tem! Não sabe como processar uma imagem, chama o Pedro. Um verdadeiro sinônimo de eficiência! Obrigado por toda a ajuda.

Ao meu amigo e aluno Danilo, pela disposição em aprender e por não desanimar com os obstáculos encontrados em seu caminho. A tarefa que passei ao Vitor também cabe a você.

Ao Dr. Michael dos Santos Brito, pela amizade, ajuda nos experimentos de *Western Blot* e cuidados dispensados às plantas na Casa de Vegetação.

Ao Paulo Rosa Júnior, técnico do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, FFCLRP. Paulão, obrigado pela amizade, colaboração e pelos ensinamentos passados. Não vou me esquecer de como fazer “tampões” para os tubos, que o dia escurece às 2 horas da tarde, exceto aos sábados, domingos e feriados; que férias e licença prêmio existem; que placas de Petri são seres aquáticos e como tal adoram ficar dentro da água e que é possível ganhar MUITO BEM por quilômetro rodado. Paulão, hoje nada tenho para autoclavar, somente para agradecer.

A Msc. Viviani Cossalter, pela ajuda nos experimentos enquanto técnica do laboratório.

À Leomina de Jesus da Silva Souza, funcionária do Departamento de Biologia, FFCLRP, pela companhia nos almoços, pela amizade, preocupação e cuidados de mãe. Promete cuidar da Déa e me contar todas as suas “deiadas”?

Aos colegas de laboratório, Henrique, Nilton, Marcela, Samantha, Luís, Ian, Tamiris, Francine e Vitória, pelo agradável convívio, ajuda e companheirismo.

À minha família que sempre me apoiou. Especialmente ao mais novo membro, meu sobrinho e afilhado, Lucas. Um presente da vida, exemplo de amor inimaginável.

Aos meus grandes amigos: Lúcia, Tatú, Pila, Isi e Márcia, pela motivação, ajuda nos momentos difíceis e pelas tardes de distração no “nosso” clube de campo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas	xi
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xvi
Resumo	xvii
Abstract	xix
I. INTRODUÇÃO	2
1.1 Caracterização da espécie <i>Nicotiana tabacum</i> L.	2
1.2 Visão geral da flor	3
1.2.1 Estrutura e função do pistilo	4
1.3 A identificação de genes preferencialmente expressos no estigma/estilete de <i>N. tabacum</i> e a caracterização do gene SCII	6
1.4 Mecanismos moleculares envolvidos no controle do ciclo celular	8
1.5 Mecanismos envolvidos no processamento de RNAs em plantas.....	13
1.5.1 O processo de <i>splicing</i> do pré-mRNA	16
1.6 Novas funcionalidades do Nucléolo	17
1.6.1 O aprisionamento de proteínas do ciclo celular.....	18
1.6.2 Síntese, maturação, processamento e exportação de diversas classes de RNAs	19
1.7 Técnicas para investigação de interação entre proteínas	20
1.7.1 O sistema de duplo-híbrido em levedura	21
1.7.2 <i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i> – BiFC.....	23
1.7.3 <i>Pull-down</i>	24
1.7.4 Co-imunoprecipitação	25
II. OBJETIVOS	28
III. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Material Vegetal	31
3.2 Preparação de células de <i>Escherichia coli</i> competentes para transformação (Sambrook <i>et al.</i> , 1989).....	31
3.2.1 Células eletrocompetentes	31
3.2.2 Células competentes para transformação por choque térmico (Método de CaCl ₂)	32
3.3 Transformação de células de <i>E.coli</i> competentes (Sambrook <i>et al.</i> , 1989).....	32
3.3.1 Eletroporação de <i>E. coli</i>	32

3.3.2 Transformação de células competentes de <i>E. coli</i> por choque térmico.....	33
3.4 Mini-preparação de DNA plasmidial	33
3.4.1 Método da lisozima	33
3.4.2 Extração com Kit GeneJET™ Plasmid Miniprep (<i>Thermo Scientific</i>)	34
3.5 Digestão do DNA utilizando enzimas de restrição.....	35
3.6 Eletroforese em gel de agarose	35
3.7 Purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose, utilizando fenol/clorofórmio.....	35
3.8 Preparações de RNA.....	36
3.8.1 Isolamento de RNA total	36
3.9 Sequenciamento de DNA	37
3.9.1 Reação de sequenciamento de DNA (PCR)	37
3.9.2 Purificação e precipitação da reação de sequenciamento	38
3.10 Consulta a banco de dados e comparação entre sequências nucleotídicas	38
3.10.1 Montagem e análise <i>in silico</i> da CDS do gene selecionado	39
3.11 Quantificação da concentração de ácidos nucleicos.....	40
3.12 Síntese de cDNAss (<i>single strand cDNA</i>)	40
3.13 Clonagem do produto de PCR no vetor PCR®-Blunt II-TOPO (Invitrogen)	41
3.14 Sistema Gateway (Invitrogen)	42
3.14.1 Desenho de <i>primers</i> específicos para clonagem da sequência amplificada	42
3.14.2 Amplificação da sequência codificadora do gene para entrada no Sistema <i>Gateway</i>	42
3.14.3 Recombinação da região codificadora do gene, no vetor de entrada pDONR221 (Invitrogen).....	45
3.14.4 Transferência da região codificadora do gene, para os vetores de expressão do sistema de duplo-híbrido	49
3.14.5 Transferência da região codificadora do gene, para o vetor de BiFC	50
3.15 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	52
3.15.1 Preparo de agrobactérias eletrocompetentes.....	52
3.15.2 Eletroporação de <i>Agrobacterium</i>	52
3.15.3 Extração de DNA plasmidial de <i>Agrobacterium</i>	52
3.15.4 Seleção das colônias positivas: checagem por PCR.....	53
3.16 Transformação de plantas	53
3.16.1 Obtenção de <i>N. tabacum</i> em condições estéreis.....	53

3.16.2 Obtenção dos transgênicos estáveis de superexpressão de NtSCI1 (prom35S::NtSCI1-GFP e prom35S::NtSCI1-HIS)	54
3.17 Extração de DNA genômico de folhas	56
3.18 Checagem dos transgênicos por reações de PCR	56
3.19 Ensaios de co-localização por meio de expressão transiente em folhas.....	57
3.19.1 Infiltração de folhas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	57
3.19.2 Análises no microscópio confocal	58
3.20 Ensaios de co-localização de NtSCI1-GFP com Hoechst durante o ciclo celular.....	58
3.20.1 Transformação de células BY-2 (cultivar <i>Bright Yellow-2</i>) de tabaco.....	58
3.20.2 Marcação de células BY-2 com o corante Hoechst.....	59
3.20.3 Marcação de plântulas de <i>N. tabacum</i> prom35S::NtSCI1-GFP com o corante Hoechst	60
3.21 Construção de uma biblioteca de duplo-híbrido a partir de cDNA de estigma/estilete de <i>N. tabacum</i>	60
3.21.1 Extração do RNA total e Isolamento de RNA mensageiro	60
3.21.2 ETAPA 1 - Construção da primeira e segunda fitas de cDNA e Reação de recombinação BP com vetor pDONR222.	61
3.21.3 ETAPA 2 - Obtenção da biblioteca de cDNA no vetor de expressão pDEST22	62
3.22 <i>Screening</i> da Biblioteca do Sistema do Duplo-Híbrido, utilizando BD-NtSCI1 como isca.	63
3.22.1 Preparação de células de levedura competentes	63
3.22.2 Leveduras competentes contendo a construção pDEST32-NtSCI1	64
3.22.3 Transformação de leveduras	64
3.22.4 Teste de auto-ativação	65
3.22.5 <i>Screening</i> da biblioteca.....	65
3.22.6 Análise do fenótipo dos transformantes para os genes repórteres.....	66
3.22.7 Extração de DNA plasmidial de leveduras.....	68
3.22.8 Identificação das presas	68
3.22.9 Re-transformação das leveduras com pDEST22-presas	69
3.23 Confirmação da interação de NtSCI1 com as proteínas obtidas no <i>screening</i> da biblioteca	69
3.23.1 Amplificação e Clonagem da CDS (<i>Coding Domain Sequence</i>) das proteínas parceiras de NtSCI1 obtidas no <i>screening</i> da biblioteca.	70

3.23.2 Transferência da região codificadora do gene, para o vetor pK7m34GW para os ensaios de BiFC.....	70
3.24 Ensaio de <i>pull-down</i> utilizando extrato protéico nuclear de estigmas e estiletes de <i>N. tabacum</i>	70
3.25 Confirmação da interação de NtSCI1 com as proteínas obtidas em ensaios de <i>pull-down</i>	71
3.25.1 Confirmação por meio da técnica de Duplo-Híbrido	72
3.25.2 Confirmação por meio da técnica de BiFC	72
3.25.3 Confirmação por meio da técnica de Co-Imunoprecipitação	73
3.26 Meios de cultura	75
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.1 Desenvolvimento de Ferramentas para o trabalho.	79
4.1.1 Obtenção de plantas transgênicas de <i>N. tabacum</i> 35S _{prom} ::NtSCI1-GFP e 35S _{prom} ::NtSCI1-HIS para produção de proteínas para os ensaios de Co-imunoprecipitação e Localização Subcelular.	79
4.1.2 Construção de uma biblioteca de cDNAs de estigmas/estiletes de <i>N. tabacum</i> em vetor do sistema de duplo-híbrido em leveduras	84
4.2 Busca por potenciais parceiros de interação com SCI1	90
4.2.1 Ensaio de <i>pull-down</i> utilizando extrato protéico nuclear de estigmas/estiletes de <i>N. tabacum</i>	90
4.2.2 Busca por possíveis parceiros de interação de SCI1 através do <i>screening</i> de uma biblioteca de cDNAs em vetor do sistema de duplo-híbrido em levedura	95
4.3 Confirmação da interação de NtSCI1 com as proteínas obtidas no ensaio de <i>pull-down</i> e no <i>screening</i> da biblioteca de duplo híbrido.....	109
4.3.1 Confirmação da interação de NtSCI1 com as proteínas identificadas no ensaio de <i>pull-down</i>	109
4.3.2 Confirmação da interação de NtSCI1 com as proteínas obtidas no <i>screening</i> da biblioteca de duplo-híbrido por meio da técnica de BiFC.....	115
4.3.3 Confirmação da interação de NtSCI1 com as proteínas obtidas no <i>screening</i> da biblioteca de duplo-híbrido por meio da técnica de Co-Imunoprecipitação.	120
4.4 Identificação de parceiros de interação com NtSCI1 a partir de análises <i>in silico</i> da sua sequência e dados da literatura.	124
4.5 Estudo da localização subcelular de NtSCI1	132
4.5.1 Co-localização de NtSCI1 com marcadores de corpúsculos nucleares	133

4.6 Localização Subcelular de NtSCI1-GFP durante as fases do ciclo celular.	138
4.6.1 Localização subcelular da proteína NtSCI1-GFP durante as fases do ciclo celular em meristemas de plântulas transgênicas de <i>N. tabacum</i> 35S _{prom} ::NtSCI1-GFP	139
4.6.2 Localização subcelular da proteína NtSCI1-GFP durante as fases do ciclo celular em culturas de células BY-2 expressando 35S _{prom} ::NtSCI1-GFP de forma estável.....	142
4.7 Construção do Interactoma de SCI1	147
4.8 Hipótese de atuação de NtSCI1 na inibição do ciclo celular por meio do controle transcricional e <i>splicing</i>	149
V. CONCLUSÕES	159
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163

Lista de Abreviaturas e Siglas

AD - *Activation Domain* – domínio de ativação

Ade – adenina

BD ou DBD - *DNA Binding Domain* – domínio de ligação ao DNA

BiFC – *Bimolecular Fluorescence Complementation*

BY-2 – *cultivar Bright Yellow - 2*

cDNA – DNA complementar

CDS - *Coding sequence* – sequência codificadora

Co-IP - Co-imunoprecipitação

DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*

DEPC - Dietil Pirocarbonato

DMSO - Dimetilsulfóxido

dNTP – *Deoxyribonucleotide 5'-triphosphate*

D.O. - Densidade Óptica

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

E/E – Estigmas e estiletos

ESTs - *expressed sequence tag* - etiquetas de sequências expressas

GFP – *Green Fluorescent Protein*

GST - *Glutathione S-transferase*

HEPES - *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

His – histidine

IPTG - *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*

LB - *Luria-Bertani medium*

Leu – leucina

MALDI - *Matrix-assisted laser desorption/ionization*

MAS - *Minimum A Sucrose médium*

MES - *2-N-morpholino ethanesulfonic acid*

MS - *Murashige e Skoog médium*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

RNAi – RNA de interferência

SC - *Synthetic Complete medium*

SDS - *Sodium dodecyl sulfate*

SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*

SSH - *Suppression Subtractive Hybridization*

SSZ - zona secretória do estigma

STK – *STOREKEEPER*

STT - tecido transmissor do estilete

TOBEST - *TOBacco ESTs*

TOF - *time-of-flight mass spectrometer*

Trp - triptofano

YNB - *Yeast Nitrogen Base without aminoacids*

Y2H – *Yeast Two-Hybrid*

2,4D - ácido 2,4 diclorofenoxiacético

3AT - *3-Amino-1,2,4-triazole*

Lista de Figuras

Figura 1: Visão detalhada da estrutura e órgãos que compõem um botão floral.....	04
Figura 2: Representação de um pistilo maduro de <i>N. tabacum</i> , composto por estigma, estilete e ovário.....	05
Figura 3: Esquema simplificado do mecanismo de controle molecular da progressão do ciclo celular.....	11
Figura 04: Modelo esquemático dos complexos CDK-Ciclina encontrados no interactoma de proteínas do ciclo celular de Arabidopsis.....	13
Figura 5: Modelo esquemático da expressão gênica de eucariotos.....	15
Figura 6: Esquema ilustrativo do sistema de duplo-híbrido.....	22
Figura 7: Estrutura do plasmídeo PCR®-Blunt II-TOPO do Kit Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Invitrogen), evidenciando a região do sítio múltiplo de clonagem.....	41
Figura 8: Esquema representando as principais estratégias e detalhes na elaboração de <i>primers</i> específicos para a amplificação da CDS de todas as proteínas utilizadas neste trabalho, de forma a permitir sua inserção no sistema gateway.....	43
Figura 9: Mapa do vetor pDONR221 (Invitrogen), destinado a inserção de produtos de PCR por recombinação, na região entre os nucleotídeos 801 e 2754.....	45
Figura 10: Esquema ilustrativo do vetor de expressão em leveduras pDEST22 (Invitrogen), destinado a inserção de fragmentos presentes no vetor de entrada, via recombinação, na região entre os nucleotídeos 2245 e 3841.....	49
Figura 11: Mapa do vetor de expressão em leveduras pDEST32 (Invitrogen). A recombinação ocorre na região compreendida entre os nucleotídeos 2161 e 3757.....	50
Figura 12: Mapa do vetor de BiFC para plantas pK7m34GW.....	51
Figura 13: Principais etapas na obtenção das plantas transgênicas.....	55
Figura 14: Esquema gráfico representando a estimativa da quantidade de proteína NtSCI1-GFP produzida em células foliares dos transgênicos 35S _{prom} ::NtSCI1-GFP de <i>N. tabacum</i> , com base na observação da proteína fluorescente.....	81
Figura 15: Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR obtido após a amplificação de parte da construção 35S _{prom} ::NtSCI1-HIS, utilizando como molde o DNA genômico extraído das plantas transgênicas 35S _{prom} ::NtSCI1-HIS.....	82
Figura 16: Confirmação por <i>Western Blotting</i> da produção da proteína NtSCI1-HIS no tecido foliar das plantas transgênicas 35S _{prom} ::NtSCI1-HIS.....	83
Figura 17: Imagem da eletroforese em gel de agarose 1,2% com isotiocianato de guanidina, de 1 µg de RNA total extraído de estigmas/estiletes de <i>N. tabacum</i> , correspondente aos 11 estádios de desenvolvimento floral indicados.....	85

Figura 18: Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando o perfil de digestão, com as enzimas NheI e EcoRV, do DNA plasmidial extraído de 24 colônias oriundas da primeira fase de construção da biblioteca de cDNAs.....	87
Figura 19: Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando o perfil de digestão, com as enzimas XhoI e SacI, do DNA plasmidial extraído de 24 colônias oriundas da segunda fase de construção da biblioteca de cDNAs.....	89
Figura 20: Análise da expressão da proteína heteróloga GST-NtSCI1 em <i>E. coli</i> , por SDS-PAGE (gel a 12,5%).....	91
Figura 21: Análise por eletroforese (gel gradiente 4-12% Bis-Tris, Nu PAGE - Invitrogen) da amostra eluída do ensaio de <i>pull-down</i> , realizado com a proteína heteróloga GST-SCI1, expressa em células de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-Rosetta, e extrato enriquecido para proteínas nucleares de estigmas/estiletes (E/E) de plantas SR1 de <i>N. tabacum</i>	92
Figura 22: Imagem obtida no teste de indução do gene repórter HIS3 com os 88 clones iniciais do <i>screening</i>	96
Figura 23: Imagem da eletroforese em gel de agarose 1% do DNA extraído de 5 colônias de <i>E. coli</i> , que foram transformadas com o DNA extraído dos clones positivos de levedura (nesta figura, os clones B8, C7, C9 e E7), quando submetidos a digestão enzimática com as enzimas XhoI e SacI.....	98
Figura 24: Resumo dos dados referente ao <i>screening</i> da biblioteca de cDNAs de estigmas/estiletes de <i>N. tabacum</i> , no sistema de duplo-híbrido, utilizando BD-NtSCI1 como isca.....	100
Figura 25: Análise <i>in silico</i> da sequência de aminoácidos da proteína NtSCI1, descrita por DePaoli <i>et al</i> (2011).....	107
Figura 26: Ensaios de duplo híbrido realizados para confirmação da interação de NtSCI1 com as seguintes proteínas: CDPK, CICLINAB1;1, CICLINAB1;1DDB, CICLINA-L1, CICLINA-RELATED e CICLINA-RELATED-DDB.....	111
Figura 27: Ensaio de BiFC da interação de NtSCI1-hGFP com NtCDKG;2-tGFP em folhas de <i>N. benthamiana</i>	113
Figura 28: Ensaios de duplo-híbrido realizados para confirmação da interação de NtSCI1 com as a proteína NtCDKG;2.....	114
Figura 29: Ensaio de BiFC da interação de NtSCI1 com a proteína NtDEAD-BOX.....	116
Figura 30: Ensaio de BiFC da interação de NtSCI1 com a proteína Nt14-3-3D2.....	117
Figura 31: Ensaio de BiFC da interação de NtSCI1 com a proteína NtSTK.....	119.
Figura 32: Expressão da proteína heteróloga HIS-Nt14-3-3D2 em células de <i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta.....	121
Figura 33: Ensaio de co-imunoprecipitação, usando extrato proteico de estigmas/estiletes (E/E) de plantas transgênicas de <i>N. tabacum</i> , expressando a construção 35Sprom::NtSCI1-	

GFP, o qual foi incubado com a proteína recombinante HIS-Nt14-3-3D2, produzida em <i>E. coli</i>	123
Figura 34: Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. (A) Imagem da amostra de PCR para amplificação da CDS de NtCICLINA-L1. (B) Amostras de DNAs extraídos de 20 clones oriundos da construção TOPO-PCR-BluntII + NtCICLINA-L1, digeridos com a enzima EcoRI.....	125
Figura 35: Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, PCRs 1 e 2 NtCICLINA-L1.....	126
Figura 36: Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, de amostras do DNA extraído de 11 clones oriundos da construção pk7m34GW + P35S + NtCICLINA-L1 + tGFP, digeridas com a enzima BsrGI.....	127
Figura 37: Ensaio de BiFC da interação de NtSCI1-hGFP com a proteína NtCICLINA-L1.....	128
Figura 38: Ensaio de BiFC da interação de NtSCI1-hGFP com a proteína NtCYCLIN-RELATED-tGFP.....	130
Figura 39: Imagem ilustrando os dados referentes ao ensaio de duplo-híbrido, utilizando BD-NtSCI1 como isca e AD-NtCICLINA-L1-DDB e AD-NtCYCLIN-RELATED-DDB como presas.....	131
Figura 40: Localização subcelular da proteína NtSCI1-GFP em células foliares de <i>N. benthamiana</i>	133
Figura 41: Imagens de microscopia confocal que mostram os ensaios de co-localização de NtSCI1-GFP e os marcadores AtCOILIN-mRFP (A) e AtFIBRILLARIN-mRFP (B).....	134
Figura 42: Imagens mostrando o ensaio de co-localização de NtSCI1-GFP com marcadores de <i>speckles</i> , a proteína SRP34-mRFP e CICLOPHILIN-mRFP de <i>Arabidopsis</i> , realizado em células foliares de <i>N. benthamiana</i>	136
Figura 43: Imagens de microscopia confocal do meristema apical de plântulas transgênicas de <i>N. tabacum</i> expressando NtSCI1-GFP.....	141
Figura 44: Microscopia confocal de células BY-2 de tabaco, transformadas de forma estável com a construção 35S _{prom} ::NtSCI1-GFP, marcadas com Hoerchst 33342.....	143
Figura 45: Microscopia confocal, em maior aumento, de células BY-2 de tabaco, transformadas de forma estável com a construção 35S _{prom} ::NtSCI1-GFP, marcadas com Hoerchst 33342.....	146
Figura 46: Interactoma de SCI1 construído com base nos seus parceiros de interação encontrados neste trabalho.....	150
Figura 47: Modelo da hipótese de atuação de NtSCI1 na inibição do ciclo celular, mediante a inativação de NtCDKG;2 e NtCICLINA-L1.....	152
Figura 48: Ensaio de duplo-híbrido mostrando a interação positiva entre as proteínas Nt14-3-3D2 e NtWEE1.....	153

Lista de Tabelas

Tabela 1. <i>Primers (forward + reverse)</i> utilizados nas ampliações dos clones utilizados neste trabalho e para sequenciamento.....	46
Tabela 2: Resumo do procedimento utilizado para os testes dos genes repórteres HIS3 e lacZ com os clones positivos do <i>screening</i> da biblioteca.....	66
Tabela 3: Resultado do fracionamento dos cDNAs. Nesta tabela encontram-se as concentrações dos cDNAs em cada fração coletada e a massa de cDNA total em cada fração.....	86
Tabela 4: Resumo dos dados referentes ao teste de qualidade da biblioteca na primeira fase de construção.....	88
Tabela 5: Resumo dos dados referentes ao teste de qualidade da biblioteca na segunda fase de construção.....	90
Tabela 6: Proteínas identificadas por MALDI-TOF/MS após ensaio de <i>pull-down</i> , utilizando a proteína recombinante GST-NtSCII como isca e extrato protéico de estigma/estilete de <i>N. tabacum</i> , enriquecido com proteínas nucleares, como presas.....	94
Tabela 7: Uma amostra de dados referentes aos clones obtidos através da transformação de células de <i>E. coli</i> utilizando o DNA extraído dos clones de levedura.....	99

Resumo

STRINI, E.J. **A análise do interactoma de SCII (*Stigma/style Cell cycle Inhibitor 1*) revela possíveis mecanismos de controle da proliferação celular.** 2014. 176 p. Tese de Doutorado – Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A biologia da reprodução de plantas é um campo de grande interesse, já que a maioria dos alimentos consumidos pelo homem é composta de partes reprodutivas das plantas (frutos e sementes). O pistilo é o órgão reprodutivo feminino, composto de estigma, estilete e ovário. Devido à importância central do pistilo no sucesso da reprodução de plantas, faz-se necessário um melhor conhecimento dos genes e processos que regulam seu desenvolvimento e funcionamento. Estudos comparativos da expressão gênica nos órgãos vegetativos e reprodutivos de *Nicotiana tabacum* revelaram genes de expressão preferencial nos órgãos reprodutivos, entre eles alguns codificando proteínas de função ainda desconhecida. Um destes genes foi caracterizado e denominado SCII (*Stigma/style Cell-cycle Inhibitor 1*), por apresentar um papel importante no desenvolvimento do estigma/estilete, atuando como um inibidor de ciclo celular tecido-específico (DePaoli *et al.*, 2011). O presente trabalho teve como objetivo estudar os mecanismos moleculares pelos quais NtSCII regula o ciclo celular, investigando seus parceiros de interação. Em um ensaio de *pull-down*, utilizando-se extrato proteico nuclear de estigmas/estiletos de *N. tabacum*, vários putativos reguladores de ciclo celular foram identificados, sendo a interação entre NtSCII e NtCDKG;2 confirmada por BiFC e localizada no nucléolo. Uma biblioteca de cDNAs de estigmas/estiletos de *N. tabacum*, no sistema de duplo-híbrido de levedura, foi construída com sucesso. O *screening* desta biblioteca, utilizando BD-NtSCII como "isca", permitiu a identificação de vários parceiros de interação com NtSCII, entre eles: uma helicase de RNA DEAD-BOX, a proteína 14-3-3D2, dois fatores de transcrição (HOMEBOX-22 e STOREKEEPER), um fator de *splicing* portador do domínio SWAP, uma quinase de adenosina e uma transposase. As interações entre NtSCII e os três primeiros parceiros citados já foram confirmadas por BiFC (observadas no núcleo e nucléolo) e a interação entre NtSCII e Nt14-3-3D2 foi confirmada também por co-imunoprecipitação. O envolvimento de NtSCII com a regulação do ciclo celular foi corroborado pela interação entre NtSCII e a proteína NtCICLINA-L1 (subunidade regulatória

de CDKG;2), confirmada por duplo-híbrido e por BiFC, no nucléolo. A interação entre NtSCI1 e NtCICLINA-RELATED também foi confirmada por BiFC. Para entender a dinâmica de NtSCI1 no nucléolo, foi estudada a localização subcelular da proteína de fusão NtSCI1-GFP durante as fases do ciclo celular. NtSCI1-GFP foi observada no nucléolo de células BY-2 em interfase e prófase, desaparecendo na metáfase e anáfase e reaparecendo no nucléolo no final da telófase, mostrando que a presença de NtSCI1 na célula é controlada pelo ciclo celular. A construção de uma primeira versão do interactoma de NtSCI1 mostrou seu envolvimento direto e indireto com proteínas relacionadas ao metabolismo de RNAs, controle da transcrição e regulação do ciclo celular. Estes resultados sugerem que NtSCI1 possa atuar no controle do ciclo celular de forma não canônica, por meio de múltiplos processos paralelos que interconectam aspectos da regulação da transcrição e o processamento de RNAs com o controle do ciclo celular.

Palavras chaves: *Nicotiana tabacum*. SCI1. Interação proteína-proteína. Pistilo. Ciclo celular. Processamento de RNA. Nucléolo. Duplo-híbrido. BiFC.

Abstract

STRINI, E.J. **The analysis of the interactome of SCII (Stigma / style Cell Cycle Inhibitor 1) reveals possible mechanisms controlling cell proliferation.** 2014. 176 pp. PhD. Thesis – Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The biology of plant reproduction is a field of great interest, since most of the food consumed by humans is composed of reproductive parts of plants (fruits and seeds). The pistil is the female reproductive organ, composed of stigma, style and ovary. Due to the central importance of the pistil in the success of plant reproduction, a better knowledge of the genes and processes that regulate pistil development and function is necessary. Comparative studies of gene expression in vegetative and reproductive organs of *Nicotiana tabacum* have revealed genes preferentially expressed in the reproductive organs, among them some encoding proteins of unknown function. One of these genes was characterized and denominated SCII (*Stigma/style Cell-cycle Inhibitor 1*), since it has an important role in stigma/style development, acting as a tissue-specific cell-cycle inhibitor (DePaoli *et al.*, 2011). The objective of the present work was to study the molecular mechanisms through which NtSCII regulates the cell cycle investigating its interaction partners. In a pull-down assay, using nuclear protein extracts from *N. tabacum* stigmas/styles, several putative cell cycle regulators were identified. Among them, the interaction between NtSCII and NtCDKG;2 was confirmed by BiFC and localized in the nucleolus. A *N. tabacum* stigma/style cDNA library in the yeast two-hybrid system was successfully constructed. The screening of this library, using BD-NtSCII as bait, allowed the identification of several NtSCII interaction partners, among them: a DEAD-BOX RNA helicase; the 14-3-3D2 protein; two transcription factors (HOMEBOX-22 and STOREKEEPER); a splicing factor containing a SWAP domain; an adenosine kinase; and a transposase. The interactions between NtSCII and the first three mentioned partners have already been confirmed by BiFC (observed in the nucleus and nucleolus) and the interaction between NtSCII and Nt14-3-3D2 was also confirmed by co-immunoprecipitation. The NtSCII involvement in cell cycle regulation was corroborated by the interaction between NtSCII and the NtCYCLIN-L1 (a regulatory subunit of CDKG;2), which was confirmed by two-hybrid and BiFC in the nucleolus. The interaction between

NtSCI1 and NtCYCLIN-RELATED was also confirmed by BiFC. To understand the dynamics of NtSCI1 in the nucleolus, the subcellular localization of the fusion protein NtSCI1-GFP was studied during the different cell cycle phases. NtSCI1-GFP was observed in the nucleolus of BY-2 cells at interphase and prophase, disappearing at metaphase and anaphase and reappearing in the nucleolus at the end of telophase, showing that NtSCI1 presence in the cell is controlled by the cell cycle. The construction of the first version of NtSCI1 interactome showed its direct and indirect involvement with proteins related to RNA metabolism, transcription control and cell cycle regulation. These results suggest that NtSCI1 may act in cell cycle control in a non-canonical way, through multiple parallel processes interconnecting aspects of transcription regulation, RNA processing and cell cycle control.

Key-words: *Nicotiana tabacum*. SCI1. Protein-protein interaction. Pistil. Cell cycle. RNA processing. Nucleolus. Yeast two-hybrid. BiFC.

Introdução

I. INTRODUÇÃO

Estudos sobre a biologia reprodutiva de espécies vegetais são importantes para o entendimento das interações planta-polinizadores, e principalmente porque a maioria dos alimentos consumidos pelos animais, inclusive pelo homem, é composta de partes reprodutivas das plantas (frutos e sementes). O órgão reprodutor feminino das angiospermas é o pistilo, geralmente formado por estigma, estilete e ovário. Constitui um órgão essencial para a reprodução, uma vez que apresenta as funções de formação dos gametófitos femininos dentro do ovário e discriminação dos diferentes tipos de grãos de pólen que o estigma recebe, selecionando aqueles congruentes e compatíveis com a planta (Cornish *et al.*, 1988).

1.1 Caracterização da espécie *Nicotiana tabacum* L.

O nome do gênero *Nicotiana* foi uma homenagem de Lineu a Jean Nicot, diplomata francês (1530-1600), que enviou sementes de tabaco para a França em 1560, introduzindo assim o fumo na Europa. A espécie *Nicotiana tabacum* Linné é amplamente conhecida por sua importância econômica, por fornecer matéria-prima para a indústria do fumo e por ser muito utilizada em investigações científicas nas áreas de farmácia, fisiologia e biologia molecular.

Nicotiana tabacum L. pertence à família Solanaceae, uma das famílias pertencentes ao grupo das Angiospermas. Esta família é de grande importância para a alimentação humana, uma vez que é constituída por plantas como a batata (*Solanum tuberosum*) e o tomate (*Solanum lycopersicum*). *Nicotiana tabacum* é popularmente conhecida como planta-do-fumo, uma dicotiledônea herbácea, originária da América do Sul Ocidental e amplamente utilizada como planta modelo em estudos de biologia molecular, devido à facilidade de seu cultivo, inclusive *in vitro*, e à facilidade de transformação e regeneração de plantas transgênicas.

Na natureza, se apresenta na forma de uma erva robusta, pouco ramificada, de até 2,5 metros de altura, com folhas grandes e uma longa inflorescência com flores rosadas. Todas as partes da planta são cobertas por tricomas glandulares curtos, que exsudam uma secreção amarela contendo nicotina e grandes quantidades de metabólitos secundários, alguns dos quais desempenham um papel importante na defesa das plantas (Cutsem *et al.*, 2011).

Dados presentes na literatura sugerem que a espécie *N. tabacum* seja alotetraplóide ($2n = 48$), originada da hibridação interespecífica de duas espécies diplóides, *Nicotiana sylvestris* e *Nicotiana tomentosiformis* ($2n = 2x = 24$) (Goodspeed, 1954; Gray *et al.*, 1974). Resultados obtidos em investigações sobre os genomas mitocondriais e cloroplastidiais apoiam a idéia de que o genoma maternal de *N. tabacum* originou-se da espécie ancestral de *N. sylvestris* (Bland *et al.*, 1985; Kenton *et al.*, 1993). Por meio de estudos comparativos realizados nas sequências intergênicas do rDNA de *N. tabacum*, Volkov *et al.* (1999) observaram similaridades entre as sequências desta espécie e *N. tomentosiformis*, fortalecendo a hipótese dessa espécie ser o ancestral paterno de *N. tabacum*.

1.2 Visão geral da flor

A flor representa a maior inovação evolutiva das angiospermas. Tal como o ramo vegetativo, a flor é constituída de um eixo (receptáculo) e apêndices laterais (Esau, 1997). Estes apêndices se apresentam na forma de quatro verticilos, dois estéreis, responsáveis pela proteção dos verticilos férteis e atração de polinizadores (cálice – formado pelas sépalas e corola – formado pelas pétalas), e dois verticilos férteis internamente localizados, representados pelo androceu e gineceu (Figura 1).

O androceu é formado pelo conjunto de estames, enquanto os carpelos, livres ou unidos, compõem o gineceu. Particularmente, quando o gineceu é constituído por dois carpelos sincárpicos, é denominado pistilo. Estas estruturas florais estão associadas com o processo de esporogênese, por meio do qual são produzidas as células reprodutivas (gametófitos). Os termos masculino e feminino, referentes ao androceu e gineceu, respectivamente, estão relacionados com o desenvolvimento dos gametófitos masculinos (grão de pólen), a partir de micrósporos originados em microsporângios (sacos polínicos) nos estames, e gametófitos femininos (sacos embrionários), a partir de megásporos originados em megasporângios (nucelos dos óvulos), nos carpelos (Esau, 1997).

Figura 1: Visão detalhada da estrutura e órgãos que compõem um botão floral. Fonte: Mauseth (2003).

1.2.1 Estrutura e função do pistilo

A palavra pistilo tem origem no latim *pistillum* que significa pilão, e faz referência à semelhança entre os formatos destas estruturas. O pistilo (Figura 2) é composto, na maioria das vezes, por uma porção inferior fértil (ovário) e uma porção superior estéril (estilete) que eleva uma porção periférica, mais ou menos extensa, diferenciada em estigma (Esau, 1997). A disposição destas estruturas faz com que o pistilo apresente, na maioria das vezes, o formato de um pino de boliche, ou de um pilão, como sugere a raiz de seu nome. Duas funções principais são exercidas por este órgão floral: no ovário ocorre a produção do gametófito feminino (ou saco embrionário), enquanto o estigma e o estilete realizam a discriminação entre diferentes tipos de grãos de pólen recebidos, selecionando os compatíveis com a planta. A transferência do gametófito masculino (grão de pólen), do estame para o estigma, dá início a um processo que pode resultar na fertilização (Otsu *et al*, 2004). Ao ser depositado no estigma, o grão de pólen inicia um processo de interação com este tecido que revelará se há compatibilidade deste grão de pólen com a planta, e então será permitida sua adesão ao estigma, hidratação, germinação e penetração no estilete (Lord, 2003).

Figura 2: Representação de um pistilo maduro de *N. tabacum*, composto por estigma, estilete e ovário. Na imagem está representado o tubo polínico em crescimento, produzido por um grão de pólen aderido na superfície estigmática (modificado de Kandasamy *et al.*, 1990).

A germinação do grão de pólen dá origem ao tubo polínico, que penetra entre as células estigmáticas (Cheung, 1995). O tubo polínico cresce nos espaços intercelulares do tecido transmissor do estilete, avançando neste tecido em direção ao ovário, transportando dois núcleos espermáticos até o saco embrionário (Preuss, 2002). Durante o crescimento do tubo polínico por este tecido ocorre o reconhecimento espécie-específico (congruidade), assim como a competição entre os gametófitos masculinos e seleção daqueles que chegarão ao saco embrionário (gametófito feminino) (Hiscock & Allen, 2008; Sage *et al.*, 2009). Portanto, o tecido transmissor do estilete apresenta um papel decisivo na determinação do genótipo dos futuros embriões e plantas (Linskens, 1986 apud Goldman *et al.*, 1994).

Ao atingir o final do estilete, o tubo polínico continua crescendo em direção ao ovário até que encontre o óvulo e, então, libere os dois núcleos espermáticos. Um destes núcleos fecunda a oosfera, originando o zigoto $2n$, e o outro se une aos núcleos polares, resultando em uma célula triploide que dará origem ao endosperma.

Estudos moleculares indicam que substâncias presentes no exsudato do estigma de flores da planta-do-fumo, são responsáveis pelo comportamento pós-polinização do grão de pólen nos tecidos do pistilo (Goldman *et al.*, 1994). Mesmo reconhecendo-se a importância de proteínas específicas de estigma/estilete no sucesso dos processos de polinização e

fertilização, poucas proteínas foram identificadas e pouco é conhecido sobre o papel destas em tais processos (Lord, 2003).

1.3 A identificação de genes preferencialmente expressos no estigma/estilete de *N. tabacum* e a caracterização do gene SCI1

A biologia molecular tem se revelado como uma ferramenta importante para o entendimento dos processos moleculares envolvidos no processo reprodutivo das plantas, especialmente aqueles responsáveis pela interação pólen-pistilo. A primeira tentativa de nosso laboratório de identificar genes, cujos produtos proteicos atuam em diversos contextos do desenvolvimento e funcionamento do estigma e estilete, foi a construção de uma biblioteca de cDNAs sintetizados a partir de RNAs extraídos destes órgãos. Esta biblioteca, construída e sequenciada por Quiapim *et al* (2009), resultou em um banco de dados denominado TOBEST. Neste trabalho também foi realizado um estudo comparativo de expressão gênica nos órgãos vegetativos e reprodutivos de *N. tabacum*, que revelou genes com expressão preferencial nos estigmas/estiletos. Muitos dos genes identificados codificavam proteínas de função ainda desconhecida.

A fim de encontrar novos genes com expressão específica ou preferencial no estigma/estilete de *N. tabacum*, DePaoli (2006) realizou a construção de duas bibliotecas subtrativas por SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*). Dentre os vários genes identificados, o gene correspondente ao clone HS1-002E06 foi escolhido para análise e caracterização (DePaoli *et al.*, 2011). Seu produto proteico apresentava uma grande similaridade com uma proteína de função desconhecida presente em diferentes espécies de plantas. A análise *in silico* da sequência de 154 aminoácidos, codificada por este gene, revelou que a mesma apresenta um domínio N-terminal rico em lisina, um putativo sinal de localização nuclear, dois domínios putativos de interação com ciclinas e 15 sítios putativos de fosforilação.

A análise da expressão deste gene, ao longo dos estádios de desenvolvimento floral de *N. tabacum*, descritos por Koltunow *et al.* (1990), mostrou que os maiores níveis de expressão ocorrem nos estádios iniciais do desenvolvimento, quando está ocorrendo a proliferação celular e diferenciação dos tecidos especializados do estigma/estilete. Plantas transgênicas de silenciamento (RNAi) e superexpressão do gene referente ao clone HS1-002E06 apresentaram fenótipos bastante peculiares. Plantas de silenciamento apresentaram flores com um aumento nítido no comprimento do estilete e tamanho do estigma, se comparadas com pistilos de

plantas selvagens (SR1). Apesar de menos evidentes, fenótipos opostos foram observados nas plantas de superexpressão, que possuíam um estigma menor que o de plantas selvagens. Análises histológicas demonstraram que estes fenótipos estavam associados a um aumento no número de células constituintes do tecido transmissor do estilete (STT) e da zona secretória do estigma (SSZ) nas plantas de silenciamento e a uma diminuição no número destas células nas plantas de superexpressão.

Diante destes dados, DePaoli *et al* (2011) sugeriram que a proteína em questão estaria associada a uma via de controle do desenvolvimento do pistilo e de inibição da proliferação celular tecido-específica e o gene foi denominado de SCII (*Stigma/style Cell-cycle Inhibitor I*). Em conjunto, estes resultados levaram os autores a sugerir que SCII possa ser um inibidor do complexo ciclina/CDK e que os sítios de fosforilação encontrados em sua sequência possam ser alvos de proteínas quinases, que regulariam a sua atividade, em uma via de transdução de sinal. Como SCII apresenta características diferentes dos outros inibidores de CDKs descritos em plantas: CKI (CDK *Inhibitor*)/KRP (*Kip-Related Proteins*) (Wang *et al.*, 1997; Vanderpoole *et al.*, 2002) e as proteínas da família SIAMESE (Churchman *et al.*, 2006), foi proposta a existência de uma nova classe de inibidores de ciclo celular: TICs - *Tissue-specific inhibitors of CDK* (DePaoli *et al.*, 2012).

A comparação do fenótipo observado nos pistilos de plantas transgênicas SCII^{RI} (silenciamento) com dados da literatura mostrou que o fenótipo era bastante similar ao encontrado em pistilos de *Arabidopsis thaliana* tratados com NPA (*N-1-naphtylphthalamic acid*) (Nemhauser *et al.*, 2000), um inibidor do transporte polar de auxina. Para confirmar a conexão de SCII com a via de sinalização de auxina, os níveis de expressão de três genes regulados por auxina (ARF8, Aux/IAA13 e Aux/IAA19) foram investigados em plantas SCII^{RI} e SCII^{OE} (superexpressão). De fato, os resultados mostraram que todos os genes encontravam-se induzidos nas plantas SCII^{OE}, enquanto Aux/IAA13 e Aux/IAA19 estavam aparentemente reprimidos nas plantas SCII^{RI} (DePaoli *et al.*, 2012). Em conjunto, estes dados sugerem que SCII influencie a regulação transcricional de alguns genes de resposta à auxina e, de alguma forma, esteja relacionado com a sinalização por auxina no desenvolvimento apical do pistilo.

Em suma, a caracterização de SCII revela uma nova classe de proteína capaz de inibir o ciclo celular de maneira tecido-específica, atuando na sinalização molecular que leva ao desenvolvimento apical do pistilo por inibição da proliferação/diferenciação celular, provavelmente participando da via de sinalização por auxina.

1.4 Mecanismos moleculares envolvidos no controle do ciclo celular

Em continuidade à embriogênese, as plantas exibem uma estratégia de crescimento-aberto (De Veylder *et al.*, 2007), que tem como característica a contínua formação de novos órgãos durante seu ciclo de vida. Esta estratégia se baseia na existência e manutenção de grupos de células indiferenciadas nos ramos em crescimento, denominados meristemas. A intensa proliferação celular que ocorre nestes tecidos resulta na produção de grandes quantidades de células, que respondem a um sistema de diferenciação temporal e espacial, capaz de induzi-las à diferenciação e, conseqüentemente, originar os diferentes tecidos dos órgãos vegetais.

O ciclo celular compreende quatro fases sequenciais: G1, S, G2 e M. Entretanto, a mitose (fase M) compreende apenas um curto período do ciclo celular. Ele é alternado com a fase mais longa do ciclo celular, a Interfase, que compreende as fases G1, S e G2, onde a célula se prepara para a divisão celular, produzindo proteínas e organelas citoplasmáticas. As fases G (*gap*) se interpõem à fase de síntese de DNA (fase S) e de segregação dos cromossomos (fase M, mitose), permitindo a operação de controles que assegurem que a fase prévia foi concluída com precisão (Dewitte & Murray, 2003). Assim, os principais pontos de regulação do ciclo celular (*checkpoints*) operam nas transições entre as fases G1→S e G2→M. Durante G1, a célula deve integrar uma série de sinais endógenos antes de decidir prosseguir com a síntese do DNA (fase S). Uma vez tendo duplicado seu DNA, a célula entra na fase G2, onde deve ativar genes responsáveis pela reorganização do citoesqueleto e que permitam a separação dos cromossomos (Komaki & Sugimoto, 2012).

Nos eucariotos, a primeira fase do ciclo mitótico (fase M) é a Prófase. Entretanto, como células vegetais possuem grandes vacúolos, o núcleo deve migrar para o centro da célula antes que a mitose possa começar. Assim, em plantas, a Prófase, é precedida por um breve estágio denominado Pre-prófase. Em seguida, a célula entra na fase de Prófase, onde ocorre a condensação da cromatina originando os cromossomos e o início da formação do fuso mitótico fora do núcleo. Na Pro-Metáfase ocorre a desmontagem do nucléolo (Zharskaya & Zatsepina, 2007) e a fragmentação do envoltório nuclear (Alberts *et al.*, 2002), permitindo que os microtúbulos do fuso mitótico sejam capazes de capturar e alinhar os cromossomos no plano equatorial da célula durante a Metáfase, formando a placa metafásica.

Durante a Anáfase, as cromátides irmãs são separadas, sendo puxadas para os pólos opostos do fuso. Uma vez que os cromossomos foram liberados do fuso mitótico na Telólase,

o envelope nuclear é reorganizado ao redor deles e tem início a remontagem do nucléolo (Alberts *et al.*, 2002).

A progressão pelas quatro fases do ciclo celular de plantas, como nos demais eucariotos, é orquestrada por complexos proteicos heterodiméricos conservados (Inzé & De Veylder, 2006). Estes complexos são compostos por uma unidade catalítica denominada CDKs (*cyclin-dependent kinase*) e uma ciclina, subunidade regulatória cuja associação determina a atividade do complexo e, também, sua estabilidade, localização e especificidade de substrato (Gonzalez *et al.*, 2007). Este complexo é precisamente regulado, de forma que sua atividade kinase é dependente da disponibilidade e interação com suas subunidades reguladoras (ciclina), inibidores de CDK e/ou fatores regulatórios. Em ciclos celulares de organismos mais complexos, entretanto, o controle transcricional proporciona um nível adicional de regulação. Os níveis de ciclina na maioria das células, por exemplo, são controlados não apenas por mudanças na degradação destas moléculas, mas também por alterações na transcrição e síntese de ciclina (Alberts *et al.*, 2002; Komaki & Sugimoto, 2012).

O *status* (ativo/inativo) da subunidade kinase depende de fosforilações e desfosforilações em sítios específicos desta molécula por kinases e fosfatases do ciclo celular. Dois membros importantes desta classe de proteínas regulatórias são: 1) WEE1, uma kinase que fosforila CDKs de maneira inibitória (Russel & Nurse, 1987; Sorrell *et al.*, 2002; Cook *et al.*, 2013), constituindo um importante inibidor da proliferação celular; e 2) CDC25, uma fosfatase encontrada nos eucariotos, que atua removendo as fosforilações que inibem a atividade das CDKs, se caracterizando como uma molécula ativadora do ciclo celular (Russel & Nurse, 1986; Hagan & Grallert, 2013). Apesar de ser encontrada em todos os eucariotos, ainda não há um consenso sobre a proteína homóloga da CDC25 em plantas.

Em plantas, as principais moléculas regulatórias do ciclo celular são as CDKs das famílias A e B (De Veylder *et al.*, 2007). CDKAs apresentam-se constitutivamente presentes durante todo o ciclo celular e controlam os pontos de transição $G1 \rightarrow S$ e $G2 \rightarrow M$, enquanto que as CDKBs são acumuladas de acordo com a fase do ciclo celular, alcançando o máximo na transição $G2 \rightarrow M$. Entretanto, como já mencionado acima, a ativação das CDKs requer a associação destas com moléculas especiais denominadas ciclina. Ciclina tipo D (CYCD) formam complexos com CDKAs e regulam a transição $G1 \rightarrow S$, enquanto ciclina tipo A (CYCA) estão principalmente presentes da fase S a M (Komaki & Sugimoto, 2012). A progressão do ciclo celular é regulada pela periódica expressão e proteólise de ciclina,

mediada pelo complexo ubiquitina-proteassomo, em momentos específicos do ciclo celular (Genschik *et al.*, 1998; Komaki & Sugimoto, 2012).

Como mencionado anteriormente, a especificidade da subunidade kinase é dependente da ciclina ativadora do complexo. Desta forma, ao longo do ciclo celular, vários complexos heterodiméricos são produzidos, alterando os substratos alvos das respectivas subunidades kinases. Esta estratégia permite que proteínas específicas sejam fosforiladas, sendo ativadas ou inibidas por estas kinases (via fosforilação), em momentos precisos do ciclo celular. Em plantas, por exemplo, o *checkpoint* G1→S é marcado pela síntese de CYCD, permitindo a montagem do complexo CDKA;1-CYCD, capaz de fosforilar a proteína RBR (*retinoblastoma-related*), que promove a liberação do fator de transcrição E2F dos dímeros DPa-E2Fa e DPb-E2Fb (Figura 3). Esta liberação permite que o fator de transcrição E2F se ligue na região promotora de genes alvos (envolvidos na síntese de DNA), promovendo sua transcrição (De Veylder *et al.*, 2007; Suryadinata *et al.*, 2010; Komaki & Sugimoto, 2012).

Vários membros das classes CDKA, CDKB, CYCA e CYCB também são sintetizados no *checkpoint* G2→M (Figura 3). Não há relatos de qual(is) complexo(s) ativa(m) os fatores de transcrição MYB3R1 e MYB3R4, entretanto sabe-se que eles são capazes de reconhecer o sítio MSA (*M-specific genes*) na sequência promotora de genes específicos da fase M (Komaki & Sugimoto, 2012). Finalmente, a saída do ciclo mitótico é promovida pela degradação das ciclinas (subunidades regulatórias das CDKs), pela maquinaria de proteólise APC (*Anaphase Promoting Complex*) dependente de ubiquitina, que resulta na segregação das cromátides irmãs (Sudakin *et al.*, 1995; Visintin *et al.*, 2000)

A atividade dos complexos CDKA-CYCD pode ser inibida pela associação destes com proteínas inibidoras de CDKs, como CKI/KRP e pela proteína SIAMESE. Apesar dos reguladores do ciclo celular serem os principais efetores do controle da proliferação celular, como estas moléculas são ativadas/inibidas pelos mecanismos de controle de proliferação celular/diferenciação, acarretando o desenvolvimento da planta, constituem processos pouco entendidos até o momento. A identificação de vias moleculares que interconectem o controle da proliferação celular/diferenciação e desenvolvimento, através da regulação do ciclo celular é, portanto, de importância primordial.

Figura 3: Esquema simplificado do mecanismo de controle molecular da progressão do ciclo celular. Na imagem é possível observar que membros de várias classes de CDKs e Ciclinas estão presentes em fases específicas do ciclo celular. Complexos CDK-CYC fosforilam proteínas específicas, em momentos precisos, que desencadeiam uma via de ativação da expressão de genes relacionados à síntese de DNA (G1→S) e segregação dos cromossomos (G2→M). Retirado de Komaki & Sugimoto (2012).

Recentemente, foi descoberto um número intrigantemente maior de genes reguladores do ciclo celular no genoma de *Arabidopsis* do que em outros organismos (Figura 4). Em cinco classes de genes regulatórios, 71 genes são encontrados em *Arabidopsis*, enquanto 15 são encontrados em leveduras e 23 em humanos (Van Leene *et al.*, 2010). Atualmente, são conhecidas 152 CDKs em 41 espécies de plantas, sendo que 14 delas são encontradas em *Arabidopsis thaliana*. Apesar de CDKAs e CDKBs serem as principais moléculas regulatórias do ciclo celular, análises baseadas na sequência-motivo de ligação a ciclinas permitiu a distinção de oito classes de CDKs, de CDKA a CDKG, além de CKLs (*CDKs-like kinases*) (Inzé, 2007).

A classe CDKA é ortóloga à *cdc28* de leveduras e corresponde à classe com maior número de representantes conhecidos em plantas (Inzé & De Veylder, 2006). Já as CDKBs são específicas de plantas e compõem a segunda maior classe de CDKs, com funções diversas. A classe CDKC forma complexo com ciclinas-T, de forma que CDKC fosforila o domínio C-terminal (CTD) da RNA Polimerase II (RNAPII), atuando na extensão da transcrição (Fülöp *et al.*, 2005), sugerindo um envolvimento no processamento de pré-mRNAs. CDKDs de plantas correspondem a CAKs (*Cyclin-dependent kinase Activating Kinases*) que ativam outras CDKs e possuem a ciclina H como subunidade regulatória (Inzé, 2007). As CDKEs também são específicas de plantas e em complexo com ciclinas C,

fosforilam o CTD da RNAPII, tendo efeito negativo na transcrição (Tank & Thaker, 2011). Dentro da classe CDKF, CDKF;1 fosforila resíduos Ser/Thr das três CDKDs e foi recentemente associada com a fosforilação do CTD da RNAPII, afetando o processamento e estabilidade de um conjunto de pequenos RNAs e transcritos envolvidos na sua biogênese (Hajheidari *et al.*, 2012).

Finalmente, a classe CDKG de plantas é composta por dois membros: CDKG;1 e CDKG;2, homólogos de CDK10 e CDK11 de humanos, respectivamente. CDK11 está envolvida na regulação da maquinaria de *splicing* e sua interação com a ciclina-L parece ser essencial para essa função (Loyer *et al.*, 2008; Drogat *et al.*, 2012). Recentemente, o complexo CDK11-ciclina-L foi associado ao controle da transcrição, uma vez que CDK11 controla a montagem do complexo Mediator da RNAPII (Drogat *et al.*, 2012). Em plantas, até 2013 nada se sabia sobre a função das CDKGs. Huang *et al.* (2013) mostraram que AtCDKG;1 apresenta um papel importante na regulação do *splicing* do pré-mRNA do gene CalS5, envolvido na produção de calose nos grãos de pólen, AtCDKG;1 e AtCDKG;2 apresentam 4 e 6 motivos RS (*Arginine-Serine*) em suas sequências, respectivamente (Huang, *et al.*, 2013). Estes motivos são frequentemente encontrados em proteínas de ligação e processamento de RNAs. Segundo Van Leene *et al.* (2010), o complexo CDKG;2–ciclina-L está presumivelmente ativo no início do ciclo celular.

Em arroz, ao menos 50 ciclinas foram encontradas e subdivididas em 11 classes (tipos A, B, C, D, F, H, L, SDS, Q, T e P). Entretanto, em *Arabidopsis* e todas as outras espécies de plantas não foram encontradas ciclinas do tipo F, e suas funções permanecem indeterminadas. Um fato curioso é o número de membros da família das ciclinas em plantas, que parece ser muito maior do que o encontrado em outros eucariotos. No genoma de *Caenorhabditis elegans* foram encontradas 34 ciclinas e em humanos, ao menos 22 (Inzé, 2007). O papel dos membros das famílias A, B, C e D no controle do ciclo celular já é bem conhecido, entretanto a função dos membros das classes F, H, L, SDS, Q, T e P ainda é incerta. Por exemplo, a ciclina-L é relacionada à ciclina-C e tem sido também identificada em insetos, vermes e mamíferos, onde interage com CDK11 (quinase com domínio PITSLRE) e fosforila o CTD da RNA Polimerase II (RNAPII) e o fator de *splicing* SC35 (Inzé, 2007).

Figura 4: Modelo esquemático dos complexos CDK-Ciclina encontrados no interactoma de proteínas do ciclo celular de Arabidopsis. Os módulos foram organizados ao longo das fases do ciclo celular de acordo com o pico de expressão das ciclinas. A cor da ciclina corresponde à fase do ciclo celular na qual foi observado seu pico de expressão. Os complexos situados no centro do círculo apresentam um perfil de expressão constante da respectiva ciclina ao longo do ciclo. (Retirado de Van Leene *et al.*, 2010).

Com base na diversidade de moléculas regulatórias do ciclo celular encontradas no genoma de plantas, acredita-se que estes organismos tenham desenvolvido um conjunto combinatório de, ao menos, 92 complexos CDK-ciclina distintos, o que ressalta fortemente a diversificação funcional entre as famílias de ciclinas e reflete o papel central da regulação do ciclo celular na plasticidade do desenvolvimento das plantas (Van Leene *et al.*, 2010).

1.5 Mecanismos envolvidos no processamento de RNAs em plantas

A transferência da informação genética contida no DNA, para moléculas de RNA durante a transcrição e para proteínas durante a tradução, é considerada o dogma central da biologia. Esta transferência da informação genética do DNA para proteína envolve duas

etapas: (1) transcrição – transferência da informação genética do DNA para RNA e (2) tradução – transferência da informação do RNA para proteína. Durante a transcrição, uma das cadeias da molécula de DNA, onde está localizado um gene, é usada como molde para a síntese de uma fita complementar de RNA denominada transcrito gênico. Em procariotos, o produto da transcrição (transcrito primário) é equivalente ao mRNA (RNA mensageiro) e já pode ser imediatamente traduzido em proteínas. Entretanto, em eucariotos os transcritos primários devem necessariamente ser processados pela excisão de sequências específicas e por modificações em ambas as extremidades antes de serem traduzidos. Neste caso, os transcritos primários são precursores do mRNA e são denominados pré-mRNAs. Este processamento do pré-mRNA, que antecede a tradução, é necessário, pois a maioria dos genes de eucariotos contém sequências não-codificantes, chamadas *introns*, que intercalam sequências codificantes deste gene – os *exons*. A retirada dos *introns* presentes na sequência que constitui o pré-mRNA e junção dos *exons* remanescentes é realizada por reações de *splicing* promovidas por estruturas macromoleculares chamadas spliceossomos. À extremidade 5' do pré-mRNA é adicionado um nucleosídeo alterado (7-metil-guanosina; *cap*) e à extremidade 3', uma cauda poli[(A)_n]. A Figura 5 apresenta um modelo esquemático que resume os processos descritos acima.

Cinco diferentes classes de moléculas de RNAs participam da expressão gênica, incluindo o mRNA (Snustad & Simmons, 2012). RNA transportadores (tRNAs) constituem pequenas moléculas que funcionam como adaptadores entre os aminoácidos e os códons no mRNA durante a tradução. RNAs ribossomais (rRNAs) constituem os componentes estruturais e catalíticos dos ribossomos, que convertem a informação presente no mRNA em uma cadeia de aminoácidos. Small Nuclear RNAs (snRNAs) são pequenos RNAs, de aproximadamente 150 nucleotídeos, que atuam principalmente no processamento do pré-mRNA. Estes RNAs interagem com proteínas nucleares, formando complexos denominados snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*), que são componentes dos spliceossomos.

Finalmente, a quinta classe de RNAs é representada pelos ncRNAs (*noncoding RNAs*) que desempenham papel essencial em complexos sistemas biológicos, mesmo sem codificar proteínas. Até recentemente, apenas um número limitado de ncRNAs, como rRNAs (*ribosomal RNAs*) e tRNAs (*transfer RNAs*) haviam sido caracterizados em detalhes. Entretanto, novos membros desta emergente classe de ncRNAs, como snoRNAs (*small nucleolar RNAs*), miRNAs (*microRNAs*), siRNAs (*short interfering RNAs*) e dsRNAs (*double-stranded RNAs*) vêm sendo associados à regulação, em vários níveis, da expressão gênica, incluindo a arquitetura da cromatina, edição e estabilidade de outros RNAs, tradução

e, possivelmente, transcrição e *splicing* (Mattick & Makunin, 2005; Kawaji & Hayashizaki, 2008). Particularmente, os micro-RNAs (miRNAs), sequências curtas, de 19 a 24 nucleotídeos de RNA de fita simples, são capazes de se ligar e bloquear a expressão de um mRNA que apresente complementariedade total (plantas) ou parcial (demais eucariotos) com a sua sequência, por meio da degradação ou repressão de sua tradução (Chen, 2005; Voinnet, 2009; Xie *et al.*, 2010; Rogers & Chen, 2013).

Figura 5: Modelo esquemático da expressão gênica de eucariotos. Na imagem observa-se a transcrição do DNA originando um transcrito primário (pré-mRNA ou precursor) que sofre um processo de *splicing* para retirada de *introns*, além de modificações nas extremidades 5' e 3', que dão origem ao mRNA que será exportado para o citoplasma para ser traduzido em proteína. (Retirado de Snustad & Simmons, 2012).

Três RNA Polimerases (I, II e III) são encontradas em todos os eucariotos. A RNA Polimerase I (RNAPI) é encontrada no nucléolo e catalisa a síntese de todos os RNAs ribossomais, exceto o 5S rRNA, que é produzido no núcleo pela RNA Polimerase III (RNAPIII). Já a RNA Polimerase II (RNAPII) transcreve genes nucleares que codificam

proteínas, ou seja, pré-mRNAs. A RNAPIII catalisa a síntese de tRNAs e snRNAs. Duas outras RNA Polimerases (IV e V) são encontradas apenas em plantas e desempenham um papel importante na inibição da transcrição gênica por meio da remodelagem da cromatina, que ocorre por modificações químicas nas histonas que compõem os nucleossomos. A RNAPIV sintetiza transcritos que são processados em siRNAs (RNAs de interferência) que regulam a expressão gênica. A RNAPV sintetiza um conjunto de siRNAs e transcritos *noncoding* que são regulados por siRNAs (Haag & Pikaard, 2011).

1.5.1 O processo de *splicing* do pré-mRNA

Os spliceossomos de eucariotos constituem um complexo macromolecular, ribonucleoproteico, composto por quatro diferentes snRNPs e centenas de proteínas, e responsável pelo processo de *splicing* (Ru *et al.*, 2008; Will & Lührmann, 2011). Cinco snRNAs estão envolvidos no *splicing* de pré-mRNA nuclear: U1, U2, U4, U5, e U6. Cada um dos snRNAs U1, U2 e U5 estão presentes em uma snRNP específica e U4/U6 estão juntos em uma quarta snRNP. A primeira etapa no *splicing* de pré-mRNA envolve a ligação de snRNP U1 à sequência GU do *intron* no sítio de corte 5' do pré-mRNA e snRNP U2 no sítio de ramificação presente no *intron*. O spliceossomo completo é montado e cliva o transcrito no sítio de corte 5'. A extremidade 5' do *intron* é unida ao nucleotídeo A presente no sítio de ramificação para formar uma estrutura *lariat* (em formato de laço) e as snRNPs U1 e U4/U6 são, então, liberadas. A snRNP U5, que já se encontra ligada ao sítio de corte 3', posiciona o complexo neste local, o qual realiza a clivagem no sítio de corte 3' e a extremidade 5' do *exon* 2 é unida à extremidade 3' do *exon* 1, por ligação 5'-3' fosfodiéster normal, dando origem ao mRNA que pode ser exportado para o citoplasma (Snustad & Simmons, 2012).

Os spliceossomos de plantas ainda não foram isolados e detalhes sobre a sua montagem e composição ainda não são conhecidos (Reddy *et al.*, 2013). Análises do genoma de *Arabidopsis*, em busca de proteínas homólogas às relacionadas ao processo de *splicing*, permitiram a identificação de quase o dobro de fatores reguladores de *splicing* do que o encontrado em humanos, incluindo 74 genes de snRNAs e 395 genes codificantes de putativas proteínas de *splicing* (Wang & Brendel, 2004). Os consensos das sequências para o sítio de corte 5', sítio de corte 3' e região de ramificação são comparáveis entre animais e plantas, indicando que o conjunto de fatores que reconhecem estas sequências atuam de maneira semelhante (Iwata & Gotoh, 2011). Estes dados não só revelam que os princípios de

processamento de pré-mRNAs conhecidos em humanos são aplicáveis em plantas, como sugerem que exista alguma especificidade na maquinaria de *splicing*, e nas sequências de *introns*, em plantas para o sucesso deste processo.

Eventuais erros de seleção ou diferenças no uso dos sítios de corte 5' e 3' podem levar a eventos de retenção de *introns* ou excisão de *exons*. Além disso, sítios alternativos de *splicing* podem ser empregados e todos estes eventos podem gerar múltiplas isoformas de mRNA para um mesmo gene, processo denominado *Splicing Alternativo*. Apesar das funções das variantes de *splicing* ainda não serem conhecidas, acredita-se que estas isoformas aumentem a diversidade funcional das proteínas.

1.6 Novas funcionalidades do Nucléolo

Na vasta maioria das células somáticas de eucariotos, o nucléolo é o maior e mais dinâmico domínio nuclear (Zharskaya & Zatsepina, 2007). O nucléolo é uma estrutura altamente organizada e, ao contrário das organelas citoplasmáticas, não é delimitado por membranas. Ao invés disso, sua estrutura é mantida pelas inúmeras interações entre os componentes proteicos e ácidos nucleicos que o constitui, formando extensos complexos multimoleculares (Shaw & Brown, 2012).

A função canônica do nucléolo é biogênese ribossomal, que inclui a transcrição de DNA ribossomal (rDNA), processamento de pré-rRNA e montagem da subunidade ribossômica (Cockell & Gasser, 1999; Pendle et al., 2005; Zharskaya & Zatsepina, 2007). Entretanto, na década de 90 o nucléolo foi considerado um compartimento multifuncional, uma vez que foi associado à biossíntese e ao processamento dos componentes de RNAs de complexos riboproteicos (Pederson, 1998; Pederson, 2011) e já havia sido relacionado com o processamento ou exportação nuclear de certos mRNAs (Harris, 1974 apud Pederson, 1998). Dados recentes remetem cada vez mais funcionalidades ao nucléolo, como o metabolismo e montagem de RNAs diversos e partículas de ribonucleoproteínas, controle da divisão celular, silenciamento transcricional em plantas (Kim *et al.*, 2009), apoptose e controle do envelhecimento. Estas funções são principalmente realizadas pelo nucléolo durante a Interfase e se tornam reprimidas durante a mitose, quando o nucléolo é desmontado (Zharskaya & Zatsepina, 2007).

A comparação da análise proteômica do nucléolo, de células humanas e de plantas, revelou que aproximadamente 30% das proteínas nucleolares de humanos possuem função

relacionada à biogênese ribossomal (Boisvert *et al.*, 2007), sendo as demais relacionadas a processos adicionais que ainda permanecem desconhecidos. Já, no nucléolo de *Arabidopsis thaliana*, foram identificadas 217 proteínas nucleolares, sendo várias destas também identificadas em humanos. Adicionalmente, foram encontradas proteínas específicas de plantas, proteínas com funções desconhecidas, proteínas nucleolares em plantas que são consideradas não-nucleolares em humanos, fatores de transcrição e fatores de *splicing*, inclusive componentes do Complexo de Junção de Exons (EJC) (Pendle *et al.*, 2005). Estes dados sugerem a possibilidade de que, em plantas, o nucléolo possa apresentar funções adicionais, possivelmente associadas à exportação e monitoramento de mRNAs (Pendle *et al.*, 2005). Segundo Brown & Shaw (2008), além de sítio de biogênese ribossomal, o nucléolo de plantas apresenta outras funcionalidades que incluem o silenciamento gênico transcricional; a biogênese, o controle de qualidade e a exportação de mRNAs; a montagem de ribonucleoproteínas (RNPs); o sensoramento de estresse; e controle do ciclo celular e senescência.

1.6.1 O aprisionamento de proteínas do ciclo celular

No ano de 2000, o nucléolo foi referido por Visintin *et al* (2000) como “*the magician’s hat for cell cycle tricks* - o chapéu do mágico para as artimanhas do ciclo celular”. O motivo desta denominação foram os crescentes relatos da observação de proteínas regulatórias do ciclo celular no interior do nucléolo. Naquele ano, três reguladores do ciclo celular haviam sido identificados no nucléolo, que regularia a atividade destas proteínas mantendo-as num estado sequestrado (Visintin *et al.*, 2000). CDC14, uma proteína fosfatase essencial para a saída do ciclo mitótico, seria mantida sequestrada no nucléolo até o início da anáfase a fim de prevenir a saída prematura do ciclo mitótico (Visintin *et al.*, 1998). MDM2, inibidor da proteína supressora de tumor p53, seria mantida pela proteína ARF num estado inativo no nucléolo, permitindo a ativação de p53 (Weber *et al.*, 1999). E PCH2 (*Pachytene checkpoint 2 protein*), proteína presente no *checkpoint* meiótico, também localizada no nucléolo, seria capaz de reprimir a recombinação meiótica inter-homóloga no DNA ribossomal (San-Segundo & Roeder, 1999).

Além disso, o envolvimento do nucléolo no controle do ciclo celular inclui mecanismos regulatórios sutis, como o sequestro oportuno de elementos *trans-acting* específicos e a biogênese da maioria dos componentes de ribonucleoproteínas (RNPs) celulares (Thiry & Lafontaine, 2005).

O nucléolo é uma estrutura bastante dinâmica e, sob condições naturais, apresenta uma reorganização particular durante o ciclo mitótico. Células em proliferação são caracterizadas por grandes nucléolos (González-Camacho & Medina, 2005), devido à intensa atividade de biogênese ribossomal previamente necessária para a produção de novas células (Zharskaya & Zatsepina, 2007). As primeiras alterações morfológicas do nucléolo coincidem com a condensação dos cromossomos durante a Prófase. Neste estágio é detectada uma diminuição da densidade óptica conhecida como “fusão do nucléolo”, resultado da gradual inibição da síntese e processamento de rRNAs. Com a fragmentação do envoltório nuclear durante a Prometáfase, várias proteínas nucleolares migram para o nucleoplasma posicionando-se na periferia dos cromossomos, constituindo o PCM (*Peripheral Chromosome Material*). A proteína RNA Polimerase I (RNAPI) é mantida intimamente associada com as regiões cromossômicas NORs. A reativação da transcrição de rDNA, no final da Anáfase e início da Telófase, requer a recuperação funcional do nucléolo, disparando a translocação do material presente nos PNBs (*Prenucleolar Bodies*) para as NORs ativas (Zharskaya & Zatsepina, 2007).

1.6.2 Síntese, maturação, processamento e exportação de diversas classes de RNAs

A maioria das classes de RNAs celulares, incluindo snRNAs (*small nuclear RNAs*), tRNAs, o sinal de reconhecimento de partículas SRP RNA (envolvido na secreção proteica), a RNA telomerase (necessária para a manutenção das extremidades dos cromossomos) e vários mRNAs transitam de fato pelo nucléolo durante seu ciclo de vida (Thiry & Lafontaine, 2005).

O nucléolo é o sítio da transcrição do rDNA pela RNAPI. O DNA ribossomal consiste em cópias repetidas de genes para rRNAs, presentes em alguns cromossomos que se organizam ao redor do nucléolo e são denominados NOR (*Nucleolar Organizer Regions*). Os rDNAs são transcritos em um RNA precursor 45S único, o qual é processado em três rRNAs (18S, 5.8S e 28S), por meio da excisão de sequências espaçadoras ITS (*Internal Transcribed Spacer*). No nucléolo também ocorre a maioria das etapas envolvidas na montagem e maturação dos ribossomos. Isto significa que cerca de 90 proteínas ribossomais e fatores de processamento devem ser importados do citoplasma para o nucléolo a fim de finalizar a montagem das duas subunidades ribossomais, que são, então, exportadas separadamente para o citoplasma (Shaw & Brown, 2012). Como uma célula em crescimento pode requerer que milhões de ribossomos sejam sintetizados, o nucléolo é de longe o principal destino e origem do transporte núcleo-citoplasmático nas células mais ativas (Shaw & Brown, 2012).

A via de processamento de pré-rRNAs foi descrita em leveduras e várias proteínas e componentes de snoRNP foram identificados como mediadores das reações de clivagem e remontagem responsáveis pela produção de rRNAs maduros (Shaw & Brown, 2008). Por exemplo, a clivagem inicial do pré-rRNA envolve os snoRNAs U3, U14, MRP, snR10 e sn30 (Venema & Tollervey, 1999). Estes snoRNAs se associam a proteínas específicas formando pequenas ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNPs), como a FIBRILARINA, principal snoRNP encontrada no nucléolo de eucariotos e requerida no início do processamento e metilação do pré-rRNA.

Este pequeno complexo formado por proteínas e snoRNAs – snoRNP - se liga ao pré-rRNA, realizando modificações e cortes enzimáticos em regiões específicas deste precursor. A molécula de snoRNA contém um elemento antisense que é complementar à região ao redor do nucleotídeo que será marcado no pré-rRNA. Esta marcação permite a snoRNP reconhecer e se ligar na região correta do precursor de rRNA, posicionando proteínas associadas, como exonucleases, que realizarão a clivagem do pré-rRNA. Pouco é conhecido sobre a via de processamento de pré-rRNAs em plantas, porém acredita-se que muitas etapas do processamento sejam conservadas entre os eucariotos. De fato, a localização de uma variedade de proteínas, rRNA e snoRNAs em subcompartimentos do nucléolo de plantas reforçam esta hipótese (Pendle *et al.*, 2005).

Adicionalmente, snoRNAs também têm sido descritos interagindo com tRNAs e na biogênese de mRNAs por *splicing* alternativo. Em humanos, o snoRNA HBII-52 pode se ligar ao exon Vb do pré-mRNA do receptor de serotonina 2C, encobrindo um possível sítio de *splicing* alternativo (Kishore & Stamm, 2006). Finalmente, diversas classes de mRNAs foram recentemente encontradas no nucléolo de plantas. A presença de RNAs completamente processados, mRNAs com *splicing* aberrante e transcritos de exon único neste compartimento, sugere que o nucléolo de plantas esteja envolvido em certos aspectos do metabolismo de RNAs, como a detecção de mRNAs aberrantes (Kim *et al.*, 2009).

1.7 Técnicas para investigação de interação entre proteínas

Processos como síntese de DNA, ativação transcricional, tradução de proteínas, localização proteica e transdução de sinal envolvem complexos protéicos (Gietz *et al.*, 1997). Interações proteína-proteína estão envolvidas em todos os processos celulares, e o mapeamento destas redes de interações, a fim de elucidar a organização do proteoma em

unidades funcionais, é de extrema importância para sistemas biológicos (Bruckner *et al*, 2009).

A busca pelos parceiros de interação da proteína em estudo constitui um bom ponto de partida, uma vez que o *screening* de interações proteína-proteína irá revelar informações inéditas, abrindo novas perspectivas e permitindo um melhor entendimento da fisiologia celular. Nestes casos, diversos autores (Phizicky & Fields, 1995; Walhout & Vidal, 2001; Parrish *et al*, 2006; Bruckner *et al*, 2009; Golemis *et al*, 2009) sugerem a construção de bibliotecas de cDNA e *screening* das mesmas utilizando-se o sistema de duplo-híbrido. Entretanto, a construção deste tipo de biblioteca não consiste em um procedimento trivial. Muitas vezes, a seleção de alguns possíveis parceiros para a realização de testes de duplo-híbrido “par a par”, baseados nas informações levantadas sobre a proteína, pode ser uma alternativa a ser considerada.

Além disso, a combinação de técnicas como *pull-down* e co-imunoprecipitação com a espectrometria de massa pode constituir uma alternativa interessante para descoberta de parceiros de interação.

1.7.1 O sistema de duplo-híbrido em levedura

O sistema de duplo-híbrido (*Two-hybrid System*) foi criado e inicialmente descrito por Fields & Song em 1989. Consiste em um método genético *in vivo* para detecção de interações entre proteínas em células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. O sistema foi desenvolvido com base no princípio de que várias proteínas, incluindo fatores de transcrição, são constituídos de múltiplos domínios com funções independentes. Quando expressos isoladamente e aproximados por meio de interações não covalentes, domínios individuais podem funcionar conjuntamente para reconstituir a atividade da proteína intacta. Detalhes do sistema podem ser observados na Figura 6.

Figura 6: Esquema ilustrativo do sistema de duplo-híbrido. No caso de células de levedura expressando duas proteínas híbridas (DBD-X e AD-Y) que não interagem, AD-Y não estará fisicamente localizada no promotor e não ativará a transcrição dos genes repórteres do sistema. Caso as proteínas híbridas sejam parceiras de interação, DBD-X e AD-Y estarão localizadas na região promotora de genes repórteres e a transcrição destes é ativada. Fonte: Manual do Kit ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway® Technology, CAT. PQ10001-01, Invitrogen.

Fatores de transcrição são compostos por dois domínios, um domínio de ligação ao DNA (*DNA Binding Domain* - DBD) e um domínio de ativação da transcrição (*Activation Domain* - AD), que devem necessariamente estar ligados (ou próximos) para ativar a transcrição de um determinado gene. A idéia central do sistema é criar duas proteínas híbridas para testar se há a ocorrência de interação entre as mesmas. Para isso, Fields & Song (1989) propuseram o uso dos domínios DBD e AD do fator de transcrição GAL4 de *S. cerevisiae*, que necessita destes dois domínios para ativar a expressão de genes codificantes de enzimas de utilização da galactose.

Uma proteína híbrida é gerada pela fusão, em fase, de um cDNA-teste à sequência codificante de um dos domínios do fator de transcrição GAL4. O domínio de ligação ao DNA GAL4 é ligado à proteína X e o domínio de ativação GAL4 à proteína Y (Fiels & Song, 1989). Caso as proteínas X e Y interajam formando complexos proteína-proteína, a proximidade entre os domínios do GAL4 será reconstituída e a transcrição dos genes regulados por este fator ocorrerá.

Chevray & Nathans (1992) e Vidal *et al* (1996) incorporaram modificações ao sistema descrito por Fields & Song (1989), adaptando-o à tecnologia Gateway, que possibilita a inserção direcional de sequências de cDNA em plasmídeos especiais, através da recombinação entre sequências exclusivamente projetadas e presentes nos vetores. Tal tecnologia tornou o sistema do duplo-híbrido mais fácil e eficiente, possibilitando a ampliação do seu campo de utilização.

Desde seu advento, o sistema tem sido utilizado com sucesso em vários trabalhos, como por exemplo: na descrição de CKIs - Inibidores de Quinases Dependentes de Ciclina (Wang *et al.*, 1997); no estudo de proteínas reguladoras da atividade repressora do fator ERF3 de *N. tabacum* (Koyama *et al.*, 2003); em estudos de proteínas de ativação de RhoGTPases, importantes para manutenção da polaridade dos tubos polínicos em *N. tabacum* (Klahre & Kost, 2006); na descoberta e caracterização de novos parceiros de interação com proteínas MBD7 em *Arabidopsis* (Scebba *et al*, 2007); no estudo da maquinaria de poliadenilação do mRNA em *Arabidopsis* (Hunt *et al*, 2008); entre outros.

A construção de bibliotecas de cDNA, para uso no sistema de duplo-híbrido, já foi realizada com sucesso em diversos trabalhos (Walhout *et al*, 2000; Walhout & Vidal, 2001; Schoonheim *et al*, 2007; Mohameda *et al*, 2009) e, atualmente, existem no mercado kits comerciais para sua construção, como o *Clone Miner cDNA Library Construction Kit* (Invitrogen), que apresenta algumas inovações para melhoria dos resultados.

1.7.2 Bimolecular Fluorescence Complementation – BiFC

A complementação de fluorescência bimolecular, conhecida por BiFC, consiste em uma técnica tipicamente utilizada para validar interações entre proteínas. É baseada no processo de complementação bioquímica de fragmentos de proteínas, que foi reportado pela primeira vez em ribonuclease pancreática bovina clivada com subtilisina (Richards, 1958). Alguns anos depois, Ghosh *et al* (2000) desenvolveram um sistema para o estudo de

interações proteína-proteína baseado na reconstituição da proteína GFP, a partir da heterodimerização de dois domínios *leucine zipper*, sendo que um estava fusionado ao fragmento C-terminal da proteína GFP e o outro ao fragmento N-terminal. Entretanto, o primeiro relato da técnica de BiFC, *in vivo*, foi a utilização de fragmentos da proteína YFP (*Yellow Flourescent Protein*) para a investigação da interação entre os fatores de transcrição bZIP (*Basic Leucine Zipper Domain*) e REL, realizados por Hu *et al* (2002).

Na técnica de BiFC, duas proteínas com interação predita são fundidas com fragmentos complementares de uma proteína fluorescente repórter e expresso em células vivas. A interação destas proteínas irá aproximar os fragmentos da proteína repórter, permitindo que esta reestabeleça sua estrutura tridimensional nativa e emita o seu sinal de fluorescência. Este sinal pode ser, então, detectado e localizado no interior da célula com o uso de microscopia de fluorescência ou confocal. Por meio da visualização e distribuição da fluorescência na célula, a técnica de BiFC pode também revelar a localização e a força da interação entre as proteínas estudadas.

Enquanto o método de BiFC originalmente relatado permitiu o estudo de muitas interações proteína-proteína, crescentes exigências para visualizar interações proteína-proteína em várias condições fisiológicas não só levaram a uma série de melhorias tecnológicas para a técnica de BiFC, como também estimularam o interesse em desenvolver abordagens completamente novas (Kodama & Hu, 2012). Estas inovações incluem desde a adaptação do sistema para utilização de novas proteínas fluorescentes repórteres, até a construção de bibliotecas de cDNA para detecção de interações entre proteínas diretamente da planta (Lee *et al.*, 2012).

1.7.3 Pull-down

Métodos de purificação de proteínas por afinidade são bem apropriados para estudo de complexos proteicos sob condições próximas ao estado fisiológico. Eles permitem que macromoléculas fisicamente associadas com uma proteína específica, fusionada a uma *tag* (etiqueta), sejam recuperadas e identificadas por espectrometria de massa (Gavin *et al.*, 2006). A beleza do estudo de complexos moleculares é que ele permite localizar proteínas com função ainda desconhecida dentro de um contexto funcional que é providenciado pelos seus parceiros de interação, muitos dos quais possuem uma função conhecida (Bauer & Kuster, 2003).

Ensaio de *pull-down* investiga interações entre uma proteína de interesse, expressa como uma proteína de fusão em *Escherichia coli*, por exemplo, e seus possíveis parceiros de interação. Inicialmente, a proteína portadora da *tag* é imobilizada em uma resina de afinidade específica para a *tag* de fusão. Complexos protéicos podem ser precipitados (ou “puxados para baixo” – *pulled-down*) pela aplicação de um lisado de células específico à coluna, o qual contém proteínas que supostamente interagirão com a proteína estudada, formando complexos. A fonte destas proteínas depende se o experimento é designado para confirmar uma interação já detectada por outro método, como o duplo-híbrido, ou identificar novas interações. Neste último caso, o ensaio de *pull-down* assemelha-se muito à técnica clássica de imunoprecipitação, diferindo apenas no fato de que uma proteína com uma *tag* de afinidade específica é utilizada no lugar de um anticorpo.

Uma vantagem óbvia deste método é que consiste em uma técnica robusta, fácil de ser utilizada e capaz de recuperar proteínas de interações fracas e pouco abundantes, devido ao fato de grande quantidade de proteína recombinante estar presente na coluna. Entretanto, devido ao fato dos complexos de proteínas serem formados no interior de células, a proteína de fusão recombinante compete com o componente endógeno correspondente e, portanto, o complexo pode não ser recuperado totalmente, pois todos os componentes do complexo estão ocupados nas interações proteína-proteína endógenas (Bauer & Kuster, 2003).

Uma vez obtidos os complexos de proteínas, seus componentes podem ser identificados por espectrometria de massa, devido à rapidez, sensibilidade e versatilidade que esta técnica apresenta. O avanço na sensibilidade e competência, associado à extensa disponibilidade de informações sobre as sequências de proteínas e nucleotídeos têm tornado a espectrometria de massa mais compatível com estudos em biologia (Bauer & Kuster, 2003).

1.7.4 Co-imunoprecipitação

Uma das mais comuns e rigorosas técnicas para o estudo da interação proteína-proteína é a co-imunoprecipitação (Co-IP) de complexos proteicos de interesse a partir de extratos celulares (Phizicky & Fields, 1995). Estes ensaios são geralmente conduzidos para providenciar a verificação independente dos resultados de *screening* de duplo-híbrido. A confirmação da interação por co-imunoprecipitação utiliza um extrato celular completo, onde proteínas estão presentes em sua conformação nativa, em uma complexa mistura de componentes celulares que podem ser requeridos para a efetivação da interação.

Como um sistema de expressão de procarioto, *E. coli* não realiza modificações pós-traducionais, como glicosilações, fosforilações e pontes dissulfeto, que são requeridas para a ocorrência apropriada das estruturas secundárias, terciárias e quaternárias e para as características funcionais da proteína de interesse (Yin *et al.*, 2007). Recentemente, o uso de organismos eucariotos, como plantas (Streatfield, 2007; Sheludko, 2008), para a produção de proteínas recombinantes têm revelado uma alternativa viável para a produção de proteínas que necessitam de modificações pós-traducionais para correta funcionalidade.

Em um experimento padrão, um extrato celular completo é preparado em condições não-desnaturantes, para preservar as características funcionais das proteínas e manter as interações que ocorrem no ambiente celular. É adicionado ao extrato, um anticorpo específico para a proteína estudada, que se ligará ao complexo por meio da interação com a proteína alvo. Este complexo proteico é, então, imobilizado em *beads* de *sepharose* contendo proteína A ou proteína G. Estas proteínas se ligam fortemente à região Fc (*fragment crystallizable region*) dos anticorpos, prendendo-os às *beads*. As proteínas que não fazem parte deste complexo imobilizado nas *beads* podem ser então removidas por meio de uma série de lavagens. Em seguida, as proteínas ou complexos proteicos, efetivamente ligados à proteína em estudo, podem ser co-precipitados com as *beads* e seus membros dissociados em tampão com SDS. As amostras de proteínas podem ser, então, submetidas à SDS-PAGE e em seguida *Western Blotting*, utilizando anticorpos específicos para a proteína em questão ou para os parceiros de interação da proteína alvo, para avaliação dos resultados.

Entretanto, a identificação por *Western Blotting* das proteínas imunoprecipitadas pode ser particularmente difícil, devido ao reconhecimento das cadeias leves e pesadas dos anticorpos utilizados para a imunoprecipitação, pelos anticorpos utilizados na marcação. Este *background* resultante, muitas vezes se sobrepõe ao sinal de marcação da proteína de interesse, tornando os resultados inconclusivos. A literatura propõe alguns métodos para evitar ou suavizar estes problemas, como descrito em Lal *et al.* (2005).

Em suma, o uso das técnicas descritas acima poderia ser útil na identificação de proteínas que interagem com NtSCI1, o que proporcionaria um maior entendimento de sua funcionalidade e o modo como atua no controle do ciclo celular e diferenciação do pistilo.

Objetivos

II. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi estudar a proteína NtSCI1, expressa preferencialmente nos estigmas e estiletes de *N. tabacum*, buscando compreender sua funcionalidade nestes tecidos através da descoberta e investigação de seus parceiros de interação. Especificamente, o projeto teve como objetivos:

- 1) descobrir novos parceiros de interação com NtSCI1, por meio de ensaios de *pull-down*, utilizando-se extrato protéico enriquecido com proteínas nucleares de estigmas/estiletes de *N. tabacum*;
- 2) amplificar e clonar as seqüências codificadoras de alguns candidatos a parceiros de interação de NtSCI1, identificados nos ensaios de *pull-down*, e confirmar as interações por meio de ensaios de duplo-híbrido, BiFC e/ou Imunoprecipitação;
- 3) construir uma biblioteca de cDNAs a partir de RNA extraído do estigma/estilete de *N. tabacum*, em vetor de expressão adequado ao sistema de duplo-híbrido;
- 4) realizar o *screening* da biblioteca de duplo-híbrido, utilizando BD-NtSCI1 como "isca";
- 5) sequenciar e caracterizar o(s) cDNA(s) presente(s) no(s) vetor(es) da(s) célula(s) que mostrar(em)-se positiva(s) para o teste de interação no sistema de duplo-híbrido;
- 6) confirmar a interação de NtSCI1 com as proteínas identificadas no *screening* da biblioteca de duplo-híbrido, por meio de ensaios de BiFC, *Pull-down* e/ou Co-imunoprecipitação;
- 7) produzir plantas transgênicas de *N. tabacum* expressando constitutivamente as proteínas NtSCI1-GFP e NtSCI1-HIS de modo que estas proteínas possam ser extraídas do estigma/estilete em condições semelhantes a sua forma nativa, permitindo a realização de ensaios de co-imunoprecipitação;
- 8) estudar a localização subcelular da proteína NtSCI1-GFP por meio de ensaios de co-localização utilizando marcadores de corpúsculos nucleares;

- 9) estudar a localização subcelular de NtSCI1-GFP durante as fases do ciclo celular;
- 10) elaborar um interactoma para NtSCI1 baseado nos parceiros de interação encontrados neste trabalho;
- 11) propor um modelo de atuação de NtSCI1 no controle do ciclo celular.

Material e Métodos

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Sementes de *N. tabacum* Petit Havana SR1, cedidas pelo Jardim Botânico da *University of Nijmegen* (Holanda), foram semeadas em composto vegetal de fabricação comercial e bem irrigadas, com água, no dia da semeadura. O processo de crescimento ocorreu em casa de vegetação, onde a umidade relativa do ar é mantida em 70%, e a irrigação automática é ativada por mecanismo de “timer”. Os estigmas/estiletes de flores não polinizadas nos 12 estágios de desenvolvimento floral descritos por Koltunow *et al.* (1990) foram coletados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer - 70°C.

3.2 Preparação de células de *Escherichia coli* competentes para transformação (Sambrook *et al.*, 1989)

3.2.1 Células eletrocompetentes

Estriou-se, com uma alça de platina, uma pequena alíquota de suspensão bacteriana de *E. coli*, cepa DH10B, em uma placa contendo meio LB sólido (10g/L de triptona, 5g/L de extrato de levedura, 10g/L de NaCl e 1% de ágar). A placa foi incubada durante 16 horas, a 37°C. Uma colônia foi transferida para 5ml de meio LB líquido (10g/L de triptona, 5g/L de extrato de levedura, 10g/L de NaCl) e incubou-se durante 16 horas, a 37°C, sob agitação de 220 rpm. Transferiu-se para 200 ml de meio LB, 2 ml da suspensão bacteriana e deixou-se a 37°C, sob agitação de 220 rpm por aproximadamente 3 horas (até a leitura da absorbância atingir o ponto ideal -A₆₀₀ entre 0,4-0,6. A cultura foi então mantida no gelo durante 30 minutos e em seguida centrifugou-se a 4000 rpm durante 10 minutos, a 4°C.

Removeu-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas delicadamente em 200ml de água estéril a 4°C. A suspensão de células foi novamente centrifugada a 4.000 rpm durante 10 minutos, a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas delicadamente em 100ml de água estéril a 4°C. Outra etapa de centrifugação a 4.000 rpm durante 10 minutos, a 4°C foi realizada. Descartou-se o sobrenadante e, desta vez, as células foram ressuspensas delicadamente em 10ml de glicerol 10% a 4°C. Centrifugou-se a 4.000 rpm durante 10 minutos, a 4°C. Nesta última etapa, as células foram ressuspensas

delicadamente em um volume final de 500µl de glicerol 10% a 4°C. As alíquotas foram feitas num volume de 40µl, as quais foram estocadas a -80°C.

Para construção da biblioteca de cDNA, foram produzidas células DH10B eletrocompetentes especiais, a partir do protocolo sugerido por Wu *et al.* (2010). Neste procedimento, foram produzidas células com eficiência de $1,5 \times 10^9$ transformantes por µg de DNA, muito próxima da oferecida por células eletrocompetentes comerciais. Estas células foram armazenadas em alíquotas de 100 µl.

3.2.2 Células competentes para transformação por choque térmico (Método de CaCl₂)

Colônias isoladas de *E. coli*, cepa DH5α, foram obtidas em placa de Petri contendo meio LB sólido. Uma colônia isolada foi inoculada em 5 ml de meio LB líquido. O crescimento das bactérias foi realizado por 16 horas, com agitação vigorosa 220 rpm a 37°C. Transferiu-se para 20 ml de meio LB, 500ul da suspensão bacteriana e deixou-se a 37°C, sob agitação de 220rpm até a leitura da absorbância atingir o ponto ideal -A₆₀₀ entre 0,4-0,6. Em seguida, a cultura de bactérias foi transferida para tubo Falcon de 50ml e a precipitação das células foi realizada através da centrifugação por 6 minutos a 3.500 rpm. A seguir, o precipitado de células foi ressuscitado, delicadamente, em 20ml de uma solução de MgCl₂, 0,1M a 4°C. A suspensão de células foi centrifugada novamente e o precipitado ressuscitado, com leve agitação, em 10ml de solução de CaCl₂ 0,1M, 4°C e incubado no gelo por 15 minutos. As células foram centrifugadas por 6 minutos a 3.500 rpm e novamente ressuscitadas em 2ml de solução gelada de CaCl₂ 0,1M. Uma nova incubação foi feita no gelo por pelo menos 30 minutos, e a ressuspensão foi misturada com 0,5ml de glicerol 80%. As células em suspensão foram aliqüotadas em tubos Eppendorf, cada um contendo 100µl. Os tubos de células competentes foram, então, guardados imediatamente no freezer a -80°C, para uso posterior.

3.3 Transformação de células de *E.coli* competentes (Sambrook *et al.*, 1989)

3.3.1 Eletroporação de *E. coli*

Uma alíquota de 1µl da reação de recombinação foi adicionada em 40µl de células DH10B eletrocompetentes, previamente preparadas e aliqüotadas em frascos de 1,5ml (item 3.2.1). Colocou-se a mistura de células + produto da recombinação em uma cubeta de

eletroporação previamente resfriada no gelo. Submeteu-se o conjunto a um pulso de 1,8 kV/25 μ F (eletroporador Gene Pulse, BioRad). Imediatamente após a eletroporação, foram adicionados 1ml de meio LB líquido e as células foram ressuspensas delicadamente. A suspensão de células transformadas foi transferida para um tubo de ensaio, incubando-se durante 1 hora a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Em seguida, a cultura foi distribuída uniformemente, com o auxílio de uma alça de Drigalski, em placas contendo meio LB sólido com antibiótico apropriado. As placas foram, então, incubadas a 37°C durante 16-20 horas.

3.3.2 Transformação de células competentes de *E. coli* por choque térmico

Inicialmente 7 μ l da reação de ligação foram delicadamente misturados com 100 μ l de células competentes (CaCl₂), previamente preparados (item 3.2.2). Após incubação no gelo durante 30 minutos, o tubo foi transferido para um banho estabilizado a 37°C, por 5 minutos. Após este tempo, o tubo foi transferido imediatamente para o gelo e mantido por 2 minutos, caracterizando-se o choque térmico. Em seguida, foram acrescentados 500 μ l de meio LB líquido, e o mesmo foi novamente colocado em um banho com temperatura estável a 37°C, durante 30 minutos. A mistura do tubo (250 μ l) foi distribuída uniformemente sobre uma placa com meio LB sólido, suplementado com antibiótico adequado, para seleção das colônias transformadas. A placa foi incubada a 37°C por 16-20 horas.

3.4 Mini-preparação de DNA plasmidial

Após a transformação, um número determinado de transformantes foi analisado. Para isso, colônias isoladas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 5ml de meio de cultura LB líquido, suplementado com antibiótico adequado e em seguida, incubadas a 37°C, sob agitação. Após 16-20 horas de crescimento, as culturas foram transferidas para tubos de 1,5ml e centrifugadas a 13.200 rpm (Centrífuga Eppendorf 5415C) por 2 minutos.

3.4.1 Método da lisozima

Para extração do DNA plasmidial pelo método da lisozima, o precipitado de células foi ressuspendido em 175 μ l de tampão TES (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0; 15% Sacarose). Adicionou-se 20 μ l de lisozima (10mg/ml), agitando-se a mistura gentilmente

com a mesma ponteira. A amostra foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, colocada em banho-maria a 73°C por 15 minutos. O tubo foi centrifugado a 13200 rpm por 15 minutos, para precipitação dos restos celulares. O sobrenadante foi recuperado e transferido para novo tubo Eppendorf. Adicionou-se 1/10 do volume total da amostra de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol absoluto, para precipitação do DNA plasmidial. O tubo foi colocado em freezer -20°C por no mínimo 1 hora ou em freezer -80°C por 20 minutos. Centrifugou-se a 13200 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado uma vez com 500 µl de etanol 70% gelado. O tubo foi novamente centrifugado a 13200 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi mantido aberto e invertido para completa evaporação do etanol. O DNA foi ressuspensionado em 50 µl de água ultrapura estéril e armazenado a -20°C.

3.4.2 Extração com Kit GeneJET™ Plasmid Miniprep (Thermo Scientific)

Para obter DNA plasmidial com alto grau de pureza necessário para as reações de sequenciamento, optou-se pela utilização de um kit. Para isso, o precipitado de células proveniente de 3 ml do inóculo foi ressuspensionado em 250 µl da Solução de Ressuspensão. Posteriormente, 250 µl da Solução de Lise foram adicionados, e o tubo foi invertido de 4-6 vezes para misturar as soluções. Foram adicionados 350 µl da Solução de Neutralização, agitando-se a amostra por inversão de 4-6 vezes, e centrifugando-a em seguida a 13200 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para uma coluna disponibilizada pelo kit, que se encaixa em um tubo de coleta de 1,5 ml, também do kit. O conjunto coluna + tubo foi centrifugado a 13200 rpm por 1 minuto. O *flow-through* depositado no tubo de coleta foi descartado, e a coluna foi encaixada no mesmo tubo. Foram adicionados 500 µl da Solução de Lavagem, centrifugando-se a amostra por 1 minuto a 13200 rpm. O *flow-through* foi descartado e a lavagem foi repetida. Após a segunda lavagem, uma centrifugação adicional de 1 minuto foi realizada para retirar o etanol remanescente e evitar que o mesmo contamine o DNA plasmidial. A coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 ml e 50 µl do Tampão de Eluição foram adicionados no centro da mesma. Após incubação por 2 minutos a temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada por 2 minutos a 13200 rpm. A coluna foi descartada e o tubo, contendo o DNA plasmidial, foi armazenado em freezer -20°C.

3.5 Digestão do DNA utilizando enzimas de restrição

As digestões foram realizadas utilizando-se aproximadamente 10µg de DNA, 2µl de tampão adequado para a enzima (solução 10x concentrada) e 1 unidade de enzima de restrição, sendo o volume completado para 20µl com água ultrapura autoclavada. Após o preparo, as digestões foram mantidas em banho-maria a 37°C por 2 horas e, posteriormente, submetidas a uma corrida eletroforética.

3.6 Eletroforese em gel de agarose

Os DNAs digeridos, produtos de PCR e amostras de RNA foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, preparado com tampão TBE 0,5X (Solução estoque 5X: 54 g Tris base; 27,5 g ácido bórico; 20 ml de EDTA 0,5 M, pH 8.0), adicionando-se 0,5µg/ml de brometo de etídeo (Sambrook *et al.*, 1989), um agente intercalante de DNA que permite a visualização das bandas de DNA quando o gel é exposto a luz ultravioleta. Durante as corridas eletroforéticas, os géis foram imersos em TBE 0,5X. As amostras foram preparadas adicionando 1µl de tampão de carregamento (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol e 15% ficol tipo 400-DL) para cada 5µl de amostra. Para os géis de checagem da integridade do RNA extraído, a água utilizada para o tampão TBE e para o tampão de carregamento foi água destilada tratada *overnight* com DEPC (*Dietil Pirocarbonato*) a 0,1% e, posteriormente, autoclavada. Para os géis de RNA, foram adicionados, ainda antes de solidificar, 20 µl de isotiocianato de guanidina 1 M, para cada 1 ml de tampão TBE. Foi aplicado 1 µg de RNA de cada amostra nas canaletas do gel.

A voltagem utilizada (geralmente ao redor de 100 volts) e o tempo das corridas variaram de acordo com o tamanho do gel preparado (em comprimento), tamanho da cuba e tamanho do fragmento esperado. Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram inferidos por comparação com a migração dos fragmentos do Marcador de Peso Molecular 1 kb Plus DNA Ladder (*Invitrogen*). As bandas foram visualizadas em fotodocumentador, quando os géis eram expostos a luz ultravioleta.

3.7 Purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose, utilizando fenol/clorofórmio

A porção do gel onde se encontrava o fragmento de DNA de interesse foi excisada com o auxílio de um bisturi. Um pequeno círculo feito de membrana Millipore, tipo GV, poro de 22µm, foi umedecida em tampão TE e dobrada na forma de cone. Esta foi inserida em um tubo de 1,5ml, cortado na sua extremidade superior e com um furo na extremidade inferior, feito com uma agulha quente. A porção de gel de agarose, contendo o fragmento de DNA, foi colocada dentro do cone feito com a membrana. O conjunto foi então colocado sobre outro tubo de 1,5ml e todo o aparato foi centrifugado a 10.000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5415C) por 5 minutos. A fração líquida recuperada foi transferida para um novo tubo.

A fim de realizar a limpeza do DNA, 1 volume de fenol foi adicionado à solução. A mistura foi homogeneizada no vortex e em seguida centrifugada a 14.000 rpm por 2 minutos. A parte superior aquosa, contendo o DNA, foi coletada delicadamente e transferida para outro tubo. Procedeu-se adicionando 1 volume de clorofórmio (1 volume de álcool isoamílico para 24 de clorofórmio) e homogeneizando a mistura no vortex. As fases foram separadas através da centrifugação da mistura a 14.000 rpm por 2 minutos. Recolheu-se a parte superior aquosa, a qual foram adicionados 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol absoluto. A solução permaneceu em processo de precipitação do DNA por pelo menos 1 hora a -20°C. Em seguida, foi centrifugada a 14.000 rpm durante 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, deixou-se secar e o DNA foi ressuspensionado em volume adequado de água ultrapura autoclavada.

3.8 Preparações de RNA

3.8.1 Isolamento de RNA total

Todas as soluções para uso com RNA foram preparadas com água ultrapura tratada com DEPC (Dietil Pirocarbonato) e as vidrarias tratadas a 180°C em estufa de esterilização por no mínimo 4 horas. O RNA total foi extraído das diferentes amostras, de acordo com o protocolo a seguir. Cada amostra (100-500 mg) foi macerada em nitrogênio líquido, utilizando-se almofarizes e pistilos previamente tratados a 180°C, por 4 horas. O material macerado foi transferido para um tubo Eppendorf de 1,5 ml (experimentos com 100 mg de tecido) ou para um tubo Falcon de 15 ml (experimentos com 500 mg de tecido). A extração do RNA total de cada amostra foi feita pelo método do TRIzol (*Invitrogen*). Para isso, 1 ml de

TRIzol foi adicionado, para cada 100 mg de tecido, ao tubo contendo o material macerado. A amostra foi homogeneizada em vortex e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio por 100 mg de tecido, e o tubo foi agitado por inversão por 15 segundos. A amostra foi incubada por 3 minutos a temperatura ambiente e posteriormente centrifugada a 12000 x g por 15 minutos, a 4°C (centrifuga *Eppendorf* 5810R). A fase aquosa (fase superior, que contém o RNA) foi removida e transferida para novo tubo. Foram adicionados 0,5 ml de isopropanol 100% por 100 mg de tecido, e o tubo foi agitado por inversão.

A amostra foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e posteriormente centrifugada a 12000 x g por 10 minutos, a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 75%, preparado com água DEPC 0,1%. A amostra foi colocada rapidamente em vortex e centrifugada a 7500 x g por 5 minutos, a 4°C. O tubo foi mantido aberto por 10 minutos para evaporação do etanol e secagem do precipitado. Ao final da extração, o RNA de cada amostra foi ressuspensionado em 50 µl de água DEPC 0,1%. As amostras foram quantificadas em NanoDrop e armazenadas a -80°C. Foi feito um gel de agarose para checagem da integridade do RNA, como descrito no item 3.6 e o material foi armazenado em freezer -70°C.

3.9 Sequenciamento de DNA

3.9.1 Reação de sequenciamento de DNA (PCR)

As amostras foram preparadas com o kit de reação *ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready* (Applied Biosystems). Para cada amostra a ser sequenciada em microplaca de 96 poços, foram usados aproximadamente 500 ng de DNA (1 a 2 µl), 2 µl de *primer* 5 pmoles/µl, 2 µl de “Big Dye” (deoxinucleotídeos, dideoxinucleotídeos fluorescentes e enzima Taq DNA-Polimerase), 2 µl de tampão de diluição do “Big Dye” (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM de Cloreto de Magnésio) e água ultrapura estéril, para completar o volume final de 10 µl. A microplaca foi então selada, levada ao vortex por 1 minuto e centrifugada rapidamente a 1.000 rpm. O programa de PCR utilizado foi:

Desnaturação - 96°C por 2 minutos (passo inicial)

Desnaturação - 96°C por 45 segundos;

Pareamento - 50°C por 30 segundos;

Extensão - 60°C por 4 minutos.

Número total de ciclos: 35

Manutenção: 4°C por tempo indeterminado.

3.9.2 Purificação e precipitação da reação de sequenciamento

Nesta etapa, as amostras, obtidas na reação em cadeia da polimerase (PCR), são precipitadas e limpas dos dideoxinucleotídeos fluorescentes não incorporados durante a síntese de moléculas de DNA. Estes dideoxinucleotídeos livres interferem com a leitura das bases durante o sequenciamento.

O produto das reações de PCR foi precipitado com 80µl de isopropanol 75% e, após leve agitação no vortex, foi incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação a 4.000 rpm por 45 minutos a 20°C (Centrífuga Eppendorf 5810R), o isopropanol foi removido completamente por centrifugação (*spin* até 1.000 rpm), com a placa invertida e apoiada em papel absorvente. Em seguida, o precipitado foi lavado com 200µL de etanol 70% e, a seguir, centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos a 20°C. O etanol foi removido completamente por centrifugação (*spin* até 1.000 rpm), com a placa invertida e apoiada em papel absorvente. O precipitado foi incubado a temperatura ambiente por 1 hora para secar.

Após a precipitação das reações de PCR, cada amostra foi ressuspensa em 10µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems), a placa foi levada ao vortex por 1 minuto, centrifugada e colocada a 95°C por 5 minutos, para desnaturação das amostras. As placas foram colocadas no sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems), que contém 16 capilares preenchidos por poliacrilamida (POP6.- Applied Biosystems) A corrida eletroforética nos capilares foi realizada em 15h para cada 96 amostras. O sequenciador reconhece as bases por meio de diferentes fluorescências, e as informações são transferidas automaticamente para um computador. A leitura das bases foi analisada pelo programa de computador, o ABI 3100 Data Collection. As sequências e detalhes dos *primers* utilizados para sequenciamento dos clones obtidos neste trabalho estão descritos na Tabela 1.

3.10 Consulta a banco de dados e comparação entre sequências nucleotídicas

Para identificar a similaridade das sequências clonadas neste trabalho com as sequências registradas nos bancos de genes, foi utilizado o programa *BlastX* (Altschul *et al.*,

1997), que pode ser encontrado no site <http://www.ncbi.nih.gov/Blast>. Este programa realiza a tradução da sequência de nucleotídeos que lhe é fornecida, nas 6 possíveis fases de leitura, em sequências de aminoácidos correspondentes, comparando com o banco de dados de proteína. Para se comparar a similaridade entre as bases nucleotídicas de duas sequências foi utilizado o programa *Blast* de duas sequências, que pode ser encontrado no site <http://www.ncbi.nih.gov/Blast>. Este programa faz o alinhamento de duas sequências nucleotídicas e encontra similaridades entre elas. Para comparar a similaridade e fazer o alinhamento entre bases nucleotídicas de três ou mais sequências foi utilizado o programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), que pode ser encontrado no site <http://align.genome.jp/sit-bin/clustalw>.

3.10.1 Montagem e análise *in silico* da CDS do gene selecionado

Análises *in silico* permitiram a montagem da CDS (sequência codificadora) do gene, referente ao clone selecionado para estudo. Para isso, foram utilizados os programas *blast* (Altschul *et al.*, 1997) dos bancos de dados SOL (*SOLanaceae Genomics Network* - <http://solgenomics.net/tools/blast/index.pl>) e DFCI (The Gene Index - *Dana-Farber Cancer Institute* - <http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/Blast/index.cgi>), onde a sequência nucleotídica do clone de estudo foi usada como *query sequence* na busca de sequências similares que pudessem complementar e aumentar o tamanho da CDS do seu gene correspondente. As sequências encontradas foram alinhadas a sequência do clone de estudo, utilizando-se a ferramenta *bl2seq* do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), para alinhamento de duas sequências, e o programa *ClustalW2* – *Multiple Sequence Alignment* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), para o alinhamento de duas ou mais sequências. A sequência teórica completa gerada foi traduzida com a ferramenta *ExPASyTranslate* (<http://web.expasy.org/translate/>) para observar se não havia códons de terminação no interior da sequência criada. Para auxiliar as análises e tornar a sequência teórica criada mais confiável, foram feitas análises por *blastp* (busca por similaridade entre sequências de aminoácidos) no banco de dados TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*), para determinação da similaridade da proteína gerada com a proteína codificada pelo ortólogo do gene de estudo em *Arabidopsis*.

A sequência de aminoácidos do gene de estudo foi analisada no programa *Motif Scan* (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>). Este programa mostra os domínios presentes na proteína de estudo, assim como a posição de cada um ao longo da sequência de aminoácidos.

Adicionalmente, buscas foram realizadas no banco de dados SOL para identificação da sequência genômica da CDS de estudo. Este banco possui sequências genômicas parciais de *N. tabacum* depositadas. Para a busca, a CDS do gene de estudo foi utilizada como molde. Para tanto, o programa *blastN* deste banco foi utilizado, que busca sequências de nucleotídeos similares a sequência utilizada como molde.

3.11 Quantificação da concentração de ácidos nucleicos

A quantificação das amostras de DNA e de RNA foi realizada em NanoDrop™ 1000 (*Thermo Scientific*), cedido gentilmente pela Prof. Dra. Zilá Luz Paulino Simões (FFCLRP-SP). Para as dosagens, foram utilizados 2 µl de cada amostra. O grau de pureza das amostras foi considerado e analisado pelas razões A260nm/A280nm e A260nm/A230nm, sendo que os ácidos nucleicos absorvem a luz no comprimento de onda de 260 nm. Para a razão 260/280, as amostras foram consideradas “puras” quando o valor era próximo a 1,8 e 2,0, para amostras de DNA e RNA, respectivamente. Razões menores do que estes valores podem indicar presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem a luz em 280 nm. Para a razão A260nm/A230nm, valores entre 2,0 – 2,2, tanto para DNA quanto para RNA, indicam amostras livres de outros contaminantes que absorvem a luz próximo ao comprimento de 230 nm, como EDTA e fenol. Dessa forma, valores menores aos geralmente aceitáveis indicam amostras impuras para serem utilizadas (<http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>).

3.12 Síntese de cDNAs (*single strand cDNA*)

A síntese de cDNA a partir do RNA extraído de estigma e estilete (item 3.8.1) foi realizada utilizando-se a enzima transcriptase reversa III (*Superscript® III Reverse Transcriptase*, Invitrogen). Em um tubo de 1,5 ml livre de RNase foram adicionados 1 µL de oligo(dT)20 (50 µM), 5 µg de RNA total, 1 µL de dNTP Mix (10 mM de cada: dATP, dGTP, dCTP e dTTP) e água tratada com DEPC para completar o volume de 13 µL. A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e imediatamente transferida para o gelo por 2 minutos. Após uma breve centrifugação, foram adicionados à mistura: 4 µL de *First-Strand Buffer* 5X, 1 µL de DTT 0.1M, 1 µL de *RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor* e 1 µL of *SuperScript™ III RT* (200 unidades/µL). O conteúdo foi homogenizado, pipetando-se gentilmente, e

incubado a 50°C por 40 minutos e a 55°C por 20 minutos. Em seguida, a reação foi inativada, aquecendo-se o tubo a 70°C por 15 minutos. As amostras foram armazenadas a -20°C.

3.13 Clonagem do produto de PCR no vetor PCR[®]-Blunt II-TOPO (Invitrogen)

A partir da purificação dos produtos de PCR foi feita a ligação, adicionando-se 4,0µl da reação de PCR, 1µl do vetor PCR[®]-Blunt II-TOPO (Figura 7) e 1 µl de sal diluído (1:4). A reação foi mantida à temperatura ambiente por 30 minutos e, em seguida, usada para transformar células de *E. coli* eletrocompetentes (DH10B). Após a eletroporação, o material resultante foi cuidadosamente espalhado em placas de LB contendo 50 µg/ml canamicina para seleção dos transformantes e incubadas a 37°C por 16-20h.

Figura 7: Estrutura do plasmídeo PCR[®]-Blunt II-TOPO do Kit Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit (Invitrogen), evidenciando a região do sítio múltiplo de clonagem.

3.14 Sistema Gateway (Invitrogen)

3.14.1 Desenho de *primers* específicos para clonagem da sequência amplificada

A estratégia para inserção da CDS de todas as proteínas estudadas neste trabalho no vetor de entrada no sistema gateway (pDONR221) foi a mesma. *Primers forward* específicos foram desenhados, utilizando de 19 a 23 bases específicas da região 5' do transcrito, iniciando pela metionina inicial. Como representa a Figura 8A, antes desta sequência, foram incluídos 24 nucleotídeos que representam: parte do sítio attB1, sequência de Shine-Dalgarno (Shine & Dalgarno, 1975), importante para expressão em procariotos, e sequência de Kozak (Kozak, 1987), importante para expressão em eucariotos. É imprescindível que 35-50% das bases componentes deste tipo de *primer* apresentem complementariedade com a sequência alvo para que a amplificação possa ocorrer com sucesso.

Os *primers reverse* foram construídos em dois subtipos, para permitir a amplificação da sequência com códon de terminação (importante para fusões N-terminais) e sem *stop codon* (para permitir fusões C-terminais). Em ambos os casos, foi incluída uma sequência de 10 bases que representam parte do sítio attB2 (Figura 8B e C), um nucleotídeo C (citossina) para manter o frame de leitura nas fusões C-terminais e os últimos 19-23 nucleotídeos que codificam a CDS do transcrito em questão, incluindo o códon de terminação (Figura 8B). No caso do oligo utilizado para amplificação da CDS sem o códon de terminação, este era deletado na sequência do *primer reverse* (Figura 8C).

3.14.2 Amplificação da sequência codificadora do gene para entrada no Sistema Gateway

Para introduzir o cDNA codificante de todas as proteínas estudadas neste trabalho no sistema Gateway, foi seguido o mesmo protocolo, descrito a seguir. Foram feitas duas reações de PCR. Na primeira amplificação, os *primers* específicos foram utilizados para amplificar a CDS do gene em questão. Estes *primers* (Tabela 1) foram desenhados de forma a conter uma parte das sequências correspondentes aos sítios attB1 e attB2.

Figura 8: Esquema representando as principais estratégias e detalhes na elaboração de *primers* específicos para a amplificação da CDS de todas as proteínas utilizadas neste trabalho, de forma a permitir sua inserção no sistema gateway. Na imagem, são mostrados, como exemplo, os *primers* utilizados para amplificação da CDS de NtCICLINA-L1. **(A)** Oligo *forward* utilizado para a amplificação da CDS com e sem códon de terminação. Na imagem, observa-se parte da sequência correspondente ao sítio attB1, a sequência de Shine-Dalgarno (importante para a expressão em procariotos), a sequência de Kozak (importante para a expressão em eucariotos) e os 21 primeiros nucleotídeos que codificam NtCICLINA-L1, começando pela metionina inicial. **(B)** *Primer* reverse utilizado para amplificação da CDS com códon de terminação. Na imagem, observa-se que os primeiros 9 nucleotídeos representam parte do sítio attB2. Em seguida, observa-se um nucleotídeo citosina que deve estar presente para permitir a PCR2 utilizando o primer BP2, e os últimos 22 nucleotídeos da CDS de NtCICLINA-L1, incluindo o códon de terminação. **(C)** Oligonucleotídeo reverso utilizado para amplificar a versão sem *stop codon* da CDS de NtCICLINA-L1. Neste oligo, também observa-se a presença dos 9 nucleotídeos que constituem parte do sítio attB2, o nucleosídeo citosina (C) importante para manter o frame de leitura em fusões C-terminais, e últimos 22 nucleotídeos da CDS, não incluindo o códon de terminação.

Logo em seguida, foi feita a segunda amplificação utilizando os *primers* específicos dos sítios de recombinação, BP1 e BP2, que complementam a sequência destes sítios. Desse modo a construção pode ser inserida no sistema *Gateway*. As duas reações de PCR foram realizadas como descrito abaixo:

Primeira reação (PCR1): nesta reação, é inserida uma parte dos sítios de recombinação attB1 e attB2 no fragmento amplificado, a partir de *primers* específicos.

Montagem da primeira reação:

- 2µl de DNA molde (10ng/µl)
- 1µl de *primer forward* (10pmoles/µl)
- 1µl de *primer reverse* (10pmoles/µl)
- 1µl dNTP (10mM)
- 0,5µl enzima Phusion Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (2U/µl - *New England Biolabs*)
- 10µl Buffer HF (5X)
- 34,5µl de água destilada autoclavada (para completar 50µl)

Segunda reação (PCR2): nesta reação os sítios de recombinação attB1 e attB2 que flanqueiam o fragmento gerado na PCR1 são complementados, utilizando o produto da PCR1 como molde.

Montagem da segunda reação:

- 2µl do cDNA obtido na PCR1 purificado do gel de agarose
- 1µl de primer BP1 (10pmoles/µl)
- 1µl de primer BP2 (10pmoles/µl)
- 1µl dNTP (10mM)
- 0,5µl enzima *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (2U/µl - *New England Biolabs*)
- 10µl Buffer HF (5X)
- 34,5µl de água destilada autoclavada (para completar 50µl)

Condições da reação 2:

- Desnaturação (98°C) 30 segundos
- Desnaturação (98°C) 8 segundos
- Pareamento (57°C) 30 segundos
- Extensão (72°C) 2 minutos
- Número de ciclos - 29 ciclos
- Extensão após os ciclos (72°C) 10 minutos

3.14.3 Recombinação da região codificadora do gene, no vetor de entrada pDONR221 (Invitrogen)

Neste sistema, o gene de interesse é clonado em um vetor de entrada via recombinação (*Kit BP Clonase*, Invitrogen) e, posteriormente, pode ser transferido para diferentes vetores de expressão. Assim, o gene foi inicialmente clonado no vetor de entrada pDONR221 (Figura 9) através da reação BP. Nesta reação utilizamos 2µl (~200ng) do produto de PCR2, 1µl do vetor pDONR221 (150 ng), 2µl do tampão BP (5X), 1µl da mistura da enzima BP clonase, num volume final de 10µl, completados com água ultrapura autoclavada. A reação foi incubada a 25°C durante a noite. Após esse tempo, foi adicionado 1µl de proteinase K (2µg/µl) e foi feita a incubação a 37°C, durante 10 minutos, para que ocorresse a degradação de proteínas presentes na reação.

Figura 9: Mapa do vetor pDONR221 (Invitrogen), destinado a inserção de produtos de PCR por recombinação, na região entre os nucleotídeos 801 e 2754. Este vetor de 4,762kb apresenta os genes que conferem resistência a canamicina (KM^r) e a cloramfenicol (Cm^r). Além disso, apresenta os sítios M13-Fw e M13-Rv para sequenciamento. O gene *ccdB* inibe o crescimento quando presente na maioria das linhagens de *E. coli*, o que facilita a seleção dos clones desejados. Os sítios attP1 e attP2 são reconhecidos por recombinases.

Tabela 1. *Primers (forward + reverse)* utilizados nas amplificações dos clones utilizados neste trabalho e para sequenciamento. O nome, sequência e T_m (temperatura de *melting* em 50mM Na⁺) de cada *primer* estão representados. **(1)** *Primer* utilizado, em conjunto com 50, para checagem das colônias de *Agrobacterium* e plantas transgênicas portadoras da construção prom35S::NtSCI1-HIS. **(2-4)** Oligos utilizados para amplificação da CDS da proteína homóloga de AtCDPK1 (AtCPK10), com e sem códon de terminação, a partir de cDNA e inserção no sistema gateway. **(5-7)** Utilizados para amplificação da CDS da proteína Nt14-3-3D2 (com e sem códon de terminação) a partir do clone pDEST22-H6.1 e inserção no sistema gateway. **(8-9)** Idem para a CDS da proteína DEAD-BOX (somente sem códon de terminação) a partir do clone pDEST22-D6.4. **(10-12)** Idem para a CDS da proteína NtSTOREKEEPER a partir do clone pDEST22-B11.1. **(13-15)** Usados para a amplificação da CDS da proteína NtCICLINA-B1.1 (com e sem *stop codon*) a partir de cDNA e inserção no sistema gateway. **(16-20)** Idem para NtCDKB1;1 e NtCDKB1;2. Neste caso, o mesmo primer forward foi utilizado para amplificação das duas CDS, pois a sequência é conservada. **(21)** Oligo utilizado para deleção do *Destruction Box* na CDS de NtCICLINA-B1;1. **(22-23)** Oligos degenerados utilizados para amplificação da CDS de NtCICLINA-L1 a partir de cDNA e inserção no vetor TOPO-PCR-BluntII (Invitrogen). **(24-26)** Oligos usados para a amplificação da CDS da proteína NtCICLINA-L1 (com e sem *stop codon*) a partir do clone TOPO-PCR-BluntII-NtCICLINA-L1 e inserção no sistema gateway. **(27)** *Primer* utilizado para deleção do *Destruction Box* na CDS de NtCICLINA-L1. **(28-29)** Oligos para amplificação da CDS de NtCICLINA-RELATED (*sem stop codon*) a partir de cDNA e inserção no sistema gateway. **(30)** *Primer* utilizado para deleção do *Destruction Box* na CDS de NtCICLINA-RELATED. **(31-33)** Oligos utilizados para amplificação da CDS de NtWEE1 a partir de cDNA e inserção no sistema gateway. **(34-35)** Oligos utilizados para amplificação de parte do gene NtACTINA, usado como controle das reações de PCRs na checagem das plantas transgênicas prom35S::NtSCI1-HIS. **(36-37)** Oligos utilizados para a realização da PCR2, onde os sítios attB1 e attB2 são completados na sequência. **(38-50)** Oligos utilizados para sequenciamento dos clones. Na sequência do *primer*, as bases em negrito representam a região do oligo que é complementar à sequência do transcrito em questão. As demais bases representam os sítios attB1, Shine-Dalgarno (Shine & Dalgarno, 1975) e Kozak (Kozak, 1987) nos *primers forward* e attB2 nos *primers reverse*.

Num	<i>Primer</i>	Sequência (5'→3')	T _m (°C)
1	SCI1-qPCR-Fw	ACC AAG AGC CAC AAA CAT AAG GA	56,6
2	TTV-attB1SDK-NtCDPK-FW	GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC ATG GGT AAC TGT AAT GCT TGC	68,8
3	TTV-NtCDPK-attB2-Rv	AAG CTG GGT CTT AAA CAG TGA TTG TTT GGC CA	62,2
4	TTV-NtCDPKSS-attB2-Rv	AAG CTG GGT CAA CAG TGA TTG TTT GGC CAT G	63,6
5	EJS-attB1SDK-1433D-FW	GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC ATG GCC GTA CCG GAA AAT TTA AC	79,2
6	EJS-ATTB2-1433D-RV	AAG CTG GGT CTC AAG CCT CGT CCA TCT GC	79,2
7	EJS-ATTB2-1433Dss-RV	AAG CTG GGT CAG CCT CGT CCA TCT GCT CC	80,7
8	EJS-DEAD-BOX-FW	GCA GGC TTC ACC ATG GCA AAA GTT GGG CAT ATC ATC G	67,0
9	EJS-DEAD-BOXss-Rv	AAG CTG GGT CAA TTT CTC CAC GAT AAC C	60,6
10	EJS-attB1SDK-B11.1-FW	GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC ATG GCT AAG AAG CAT ACC GAG	69,1

Material e Métodos 47

11	EJS-B11.1-attB2-RV	AAG CTG GGT CTT ACT TTT GAA AGA TG	65,3
12	EJS-B11.1ss-attB2-RV	AAG CTG GGT CCT TTT GAA AGA TGT TAA TC	69,1
13	EJS-attB1K-NtCYCB1-Fw	GCA GGC TTC ACC ATG GAT AAC AAT AGT GTT GGTG	64,5
14	EJS-NtCYCB1-attB2-Rv	AAG CTG GGT CTC AAG AAG AGG AGG AAG CAG CAT	65,9
15	EJS-NtCYCB1ss-attB2-Rv	AAG CTG GGT CAG AAG AGG AGG AAG CAG CAT CAG	67,1
16	attB1-SDK-NtCDKB1.1-2-Fw	GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC ATG GAG AAA TAC GAG AAA TTG	67,0
17	NtCDKB1.1-attB2-Rv	AAG CTG GGT CTC AGA ATT GCG ACT TGT CCA AG	64,8
18	NtCDKB1.1ss-attB2-Rv	AAG CTG GGT CGA ATT GCG ACT TGT CCA AG	63,9
19	NtCDKB1.2-attB2-Rv	AAG CTG GGT CTC AAA ACT GAG ACT TGT CCA AG	63,5
20	NtCDKB1.2ss-attB2-Rv	AAG CTG GGT CAA ACT GAG ACT TGT CCA AGC	63,7
21	EJS-attB1-NtCYCB1DDB-FW	GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC ATG CTT GTG CCT GCT CCT GCT GCA G	73,1
22	EJS-CYCL-Fw	ATG ATT TAC ACG GCA WTA GAC ACA TTC	71,1
23	EJS-CYCL-Rv	CTA ATG RTG TCT ACG ACG ATC CTT CT	67,4
24	EJS-attB1-NtCYCL-FW	GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC ATG ATT TAC ACG GCA ATA GAC	66,1
25	EJS-NtCYCL-attB2-Rv	AAG CTG GGT CCT AAT GGT GTC TAC GAC GAT CC	64,8
26	EJS-NtCYCLss-attB2-Rv	AAG CTG GGT CAT GGT GTC TAC GAC GAT CCT TC	65,1
27	EJS-attB1-NtCYCL1DDB-FW	GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC ATG GGT TTC ATC TGC CAT GTC GAG C	71,5
28	attB1-NtCYCREL-Fw	GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC ATG TCG TCT CGT CGA GAG	67,9
29	EJS-attB2-NtCYCRELss-RV	AAG CTG GGT CTG AAG CCA ATA GTT CTT CA	61,4
30	attB1-SDK-NtCYCRELDDB-Fw	GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC ATG GCA CAA GAT TCC AAG TCA GAA AGA AC	69,8
31	attB1-NtWEE1-Fw	GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC ATG AAG AGG AAA ACC CTA AAT C	67,8
32	attB2-NtWEE1-Rv	AAG CTG GGT CTT ACT TGT TAG CAT TTC TTT G	59,6
33	attB2-NtWEE1ss-Rv	AAG CTG GGT CCT TGT TAG CAT TTC TTT G	59,6
34	SqACTIN3-Nt-Fw	TAA GGC TGG ATT TGC CGG AGA TGA	60,3
35	SqACTIN3-Nt-Rv	TCT TCT GGA GCC ACA CGA AGT TCA	60,2
36	BP1	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT C	57,0
37	BP2	GGC GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC	59,0

Material e Métodos 48

38	Oligo-dTV	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV	42,0
39	T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	56,0
40	SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG	42,1
41	M13F	GTA AAA CGA CGG CCA GT	42,0
42	M13R	CAG GAA ACA GCT ATG AC	50,0
43	SEQ-hGFP-Rv	CAG CTT GCC GTA GGT GGC ATC	60,9
44	SEQ-tGFP-Rv	GTG TTC TGC TGG TAG TGG TCG	57,8
45	SEQ-pDEST15-Fw	AAC GTA TTG AAG CTA TCC CAC	52,4
46	DEST22-AD502-Fw	TAT AAC GCG TTT GGA ATC ACT	52,1
47	DEST32-22-Rv	AGC CGA CAA CCT TGA TTC GAG AC	59,4
48	DEST32-Fw	AAC CGA AGT GCG CCA AGT GTC TG	62,2
49	PROM35S-Fw	ATG ACG CAC AAT CCC ACT ATC C	57,1
50	TERM35S-Rv	CCC TAT AAG AAC CCT AAT TCC C	57,0

3.14.4 Transferência da região codificadora do gene, para os vetores de expressão do sistema de duplo-híbrido

Após confirmar a inserção da região codificadora do gene, no vetor de entrada, foi feita uma nova recombinação com os vetores de expressão do sistema de duplo-híbrido: pDEST22 ou pDEST32, dependendo do objetivo do experimento. Para isso, utilizou-se o *Kit LR Clonase* (Invitrogen).

Em cada reação LR foram utilizados 1µl do vetor de entrada contendo a CDS do gene estudado (200 ng), 1µl (150 ng) do vetor de expressão pDEST22 (Figura 10) ou pDEST32 (Figura 11), 2µl de tampão de reação da enzima LR clonase (5X), 1µl da enzima LR clonase, num volume final de 10µl, completados com água ultrapura autoclavada. A reação foi incubada a 25°C durante a noite. Em seguida, foi adicionado 1µl de proteinase K (2µg/µl) à reação e esta foi incubada a 37°C durante 10 minutos. Na sequência, o produto da recombinação foi utilizado para transformação de células de *E. coli* DH10B eletrocompetentes e plaqueadas em meio LB com antibiótico de seleção adequado. Para construções que fazem uso do vetor pDET22, a seleção foi realizada com o antibiótico ampicilina (100mg/ml) e de pDEST32, com gentamicina (5mg/ml).

Figura 10: Esquema ilustrativo do vetor de expressão em leveduras pDEST22 (Invitrogen), destinado a inserção de fragmentos presentes no vetor de entrada, via recombinação, na região entre os nucleotídeos 2245 e 3841. Este vetor de 8,930kb apresenta os genes que conferem resistência a ampicilina (AMP^r) e a cloramfenicol (Cm^r), além de genes importantes (TRP1) para a biossíntese de triptofano. O vetor é utilizado a fim de produzir proteínas de interesse com o domínio AD fusionado em sua extremidade N-terminal. Um sinal de localização nuclear também é inserido à extremidade N-

terminal de AD. O gene *ccdB* inibe o crescimento quando presente na maioria das linhagens de *E. coli*, o que facilita a seleção dos clones desejados. Os sítios *attP1* e *attP2* são reconhecidos por recombinases.

Figura 11: Mapa do vetor de expressão em leveduras pDEST32 (Invitrogen). A recombinação ocorre na região compreendida entre os nucleotídeos 2161 e 3757. Este vetor de 12,266 kb apresenta os genes que conferem resistência a gentamicina e a cloramfenicol (Cm^r), além de genes importantes (*Leu2*) para a biossíntese de leucina. O vetor é utilizado a fim de produzir proteínas de interesse com o domínio BD fusionado em sua extremidade N-terminal. Um sinal de localização nuclear também é inserido à extremidade N-terminal de BD.

3.14.5 Transferência da região codificadora do gene, para o vetor de BiFC

Os cassetes Pro35S:BAIT-hGFP (sequência codificadora da proteína isca (BAIT) com hGFP - aminoácidos 1 a 149 da proteína GFP - fusionada na extremidade N-terminal, sob o controle do promotor 35S) e Pro35S:PREY-tGFP (sequência codificadora da proteína presa (PREY) com tGFP - aminoácidos 150 a 238 da proteína GFP - fusionada na extremidade N-terminal, sob o controle do promotor 35S) foram obtidos através da realização de uma reação de recombinações múltiplas com o kit *LR Clonase II Plus* (Invitrogen) e inserido no vetor pK7m34GW (Figura 12). Em cada reação, foram adicionados: 60 ng da construção pDONR221-BAIT/PREY (sem códon de terminação), 60 ng da construção pENTRY-L4-PROM35S-R1 (promotor 35S flanqueado pelos sítios *attL4* e *attR1*), 60 ng da construção

pENTRY-R2-hGFP/tGFP-L3 (sequência hGFP ou tGFP flanqueada pelos sítios attR1 e attL3), 90ng do vetor pk7m34GW, 2µL de *mix* de enzima *LR clonase plus* e água destilada em quantidade suficiente para complementar o volume de 10 µl. A reação foi mantida a 25°C por 24 horas e a degradação da enzima foi realizada adicionando-se 1 µl de proteinase K e mantendo a reação a 37°C por 10 minutos. Em seguida, 1 µl da reação foi utilizada para transformar células de *E. coli* DH10B eletrocompetentes. O produto da transformação foi plaqueado em meio LB suplementado com os antibióticos Espectinomicina (50 µg/ml) e Estreptomicina (12,5 µg/ml) e mantidas a 37°C por 16-18 horas para crescimento dos transformantes.

Figura 12: Mapa do vetor de BiFC para plantas pK7m34GW. Este vetor de 10.198 pb apresenta os genes que conferem resistência a espectinomicina (Sm^r) e a estreptomicina (Sp^r), além das bordas LB e RB para inserção do cassete no genoma de plantas. O vetor é utilizado a fim de produzir proteínas de interesse, sob o controle de interesse e com uma *tag*, também de interesse, em sua extremidade C-terminal.

3.15 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

3.15.1 Preparo de agrobactérias eletrocompetentes

Uma alça de platina foi imersa em uma suspensão bacteriana de *Agrobacterium tumefaciens* da cepa C58C1RifR (pGV2260), mantida como estoque em glicerol a -80°C , e estriada em uma placa contendo meio MAS sólido (item 4.23). A placa foi incubada a 28°C por 48 horas. Uma colônia isolada foi inoculada em 50 ml de meio LB líquido e incubada a 28°C por 16 horas com agitação de 150 rpm. Nesta etapa, o protocolo para preparação de agrobactérias eletrocompetentes é idêntico ao de preparo de células de *E. coli*, descrito no item 3.2.1, exceto pela temperatura de incubação de 28°C . Ao final, as células foram estocadas em alíquotas de 40 μl , em *freezer* -80°C .

3.15.2 Eletroporação de *Agrobacterium*

A transformação de *A. tumefaciens* foi feita com 1 μg do DNA plasmidial de interesse, por eletroporação (ver item 3.3). Cada transformação foi incubada por 4 horas a 28°C , sob agitação de 200 rpm. Plaqueou-se 25-100 μl da suspensão bacteriana em meio LB sólido, contendo os antibióticos adequados. As placas foram incubadas a 28°C durante 48 horas. Após esse período, colônias isoladas foram obtidas e foram feitos inóculos para colônias selecionadas de cada construção, em 5 ml de meio LB líquido com os mesmos antibióticos utilizados nas placas. Os inóculos foram incubados a 28°C , sob agitação de 200 rpm, por 48 horas para infecção de discos foliares e por 24 horas para infiltração de folhas para experimentos de expressão transiente.

3.15.3 Extração de DNA plasmidial de *Agrobacterium*

Para confirmar a presença do vetor de interesse em *A. tumefaciens*, foram feitas preparações de DNA plasmidial (Brasileiro & Carneiro, 1998), para posterior checagem por reações de PCR. Para mini preparação de DNA plasmidial de *A. tumefaciens*, foram utilizados 1,5 ml dos inóculos, após 24 horas de incubação. O volume foi centrifugado a 13200 rpm por 2 minutos (centrifuga *Eppendorf* 5415 D) e o precipitado de células foi ressuspendido em 1 ml de Tampão 1 (NaCl 0,2 M em 10 ml de TE) para lavagem e retirada do meio LB líquido. Em seguida, o volume foi novamente centrifugado e o sobrenadante foi descartado, repetindo-

se o passo por mais uma ou duas vezes. Após a lavagem, ressuspendeu-se as células em 200 µl do Tampão 1 e, em seguida, foram adicionados 200 µl da Solução 1 (NaOH 0,2 N e SDS 1%), incubados em gelo por 15 minutos. Após, foram adicionados 150 µl de acetato de potássio 3M e o tubo foi incubado em gelo por 30 minutos. O sobrenadante, obtido após centrifugação a 13200 rpm por 5 minutos, foi transferido para um novo tubo e, em seguida, fez-se limpeza com fenol/clorofórmio, como indicado no item 3.7. Para precipitação do DNA, foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto, mantendo-se as amostras a -20°C por pelo menos 1 hora. Foi obtido um precipitado de DNA após centrifugação a 13200 rpm por 30 minutos, o qual foi ressuspendido em 20 µl de água ultrapura estéril.

3.15.4 Seleção das colônias positivas: checagem por PCR

Para checagem de cada construção, foi utilizado um *primer* interno (dentro da região do fragmento de interesse) e um *primer* externo, que parecia na sequência do respectivo vetor de expressão. As reações de PCR foram feitas com 1 µl de DNA plasmidial extraído de cada uma das colônias de cada construção, 5 µl de tampão 5X da reação (*Biotools*), 2 µl de MgCl₂ 50 mM, 1 µl de *primer forward* e 1 µl de *primer reverse* (10 µM cada), 1 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl da enzima BIOTOOLS DNA Polimerase (concentração da enzima: 1U/µl – temperatura de extensão: 72°C) e quantidades suficientes de água estéril estéril para volume final de 50 µl.

3.16 Transformação de plantas

3.16.1 Obtenção de *N. tabacum* em condições estéreis

Sementes de *Nicotiana tabacum* (cultivar *Petit Havana* SR1) foram acondicionadas em um tubo de 1,5 ml e imersas em 1 ml de etanol 70% (preparado com água ultrapura autoclavada) por 1 minuto. O etanol foi descartado com o auxílio de uma pipeta. Posteriormente, foram adicionados 700 µL de hipoclorito de sódio (4-6%, *Sigma*), e as semente permaneceram nesta solução por exatos 40 minutos sob agitação em vortex. As sementes foram então lavadas cinco vezes com água destilada estéril e, distribuídas em placas de Petri contendo meio MS sólido (item 3.26). As placas foram mantidas em condições adequadas de temperatura (28°C) e luminosidade (16 horas de luz e 8 horas de escuro), até a

germinação das sementes. Posteriormente, as plântulas foram transferidas para potes de vidro estéreis, contendo o mesmo meio de cultura, e mantidas nas mesmas condições até obtenção de folhas de tamanho adequado para transformação.

3.16.2 Obtenção dos transgênicos estáveis de superexpressão de NtSCI1 (prom35S::NtSCI1-GFP e prom35S::NtSCI1-HIS)

As plantas selvagens de *N. tabacum* (SR1) crescidas em condições estéreis foram utilizadas para obtenção das plantas transgênicas estáveis. Plantas com aproximadamente seis semanas (após semeadura), em cultura de tecido, tiveram suas as folhas coletadas e cortadas em pequenos discos foliares, machucando-se toda a borda com uma lâmina de bisturi, permitindo assim a liberação de moléculas-sinal (acetoseringona) das células foliares, que induzem a transferência do T-DNA de interesse, presente em *Agrobacterium*, para o genoma vegetal (Stachel *et al.*, 1985). Os discos foliares foram imersos em 20 ml de meio MS líquido em placas de Petri (Figura 13-A). Para cada transformação (prom35S::NtSCI1-GFP e prom35S::NtSCI1-HIS), foram utilizadas as colônias de *Agrobacterium* que continham a construção de interesse, consideradas positivas através de checagem por PCR. Um inóculo (meio LB líquido) de cada colônia positiva foi deixado por 48 horas sob agitação. Uma alíquota de 750 µl de cada inóculo, contendo *Agrobacterium* transformado com cada construção, foi separadamente acrescentada aos 20 ml de meio MS contidos nas placas de Petri. As placas foram incubadas a 28°C por dois dias, no escuro, e, posteriormente, os discos foram lavados com água destilada estéril e transferidos para placas de Petri contendo meio M-300 sólido (item 3.26) de indução de calos (Figura 13-B), sendo mantidas em câmara de germinação (16 horas de luz e 8 horas de escuro, a 28°C).

Após aproximadamente 2 semanas, os calos foram isolados dos discos com o auxílio de um bisturi e distribuídos sobre uma placa contendo novamente meio M-300, para permitir o crescimento dos calos, durante aproximadamente 15 dias. Após crescimento, os calos foram transferidos para o meio M-250 sólido (item 3.26) de indução de parte aérea (Figura 13-C) e incubados na câmara de germinação (16 horas de luz e 8 horas de escuro, a 28°C) até a formação de brotos. De cada calo, foram transferidos no mínimo dois brotos, como medida de segurança para ocasional perda de um dos brotos nas manipulações durante a cultura de tecido (contaminação com fungos e bactérias, ou ausência de enraizamento). Dessa forma, foram geradas plântulas de diversas transformações independentes (cada calo representa um evento de transformação) e, também, representantes de um mesmo evento de transformação (brotos

originados no mesmo calo). Os brotos formados foram, então, transferidos para placas de Petri contendo meio MS com o antibiótico canamicina (200µg/ml), para indução do enraizamento. Após início do crescimento das raízes, as plântulas foram transferidas, uma a uma, para potes de vidro maiores e estéreis, contendo meio MS + canamicina (Figura 13-D), ainda mantidos na câmara de germinação para crescimento até aproximadamente 10 cm.

Figura 13. Principais etapas na obtenção das plantas transgênicas. **A)** Discos foliares estéreis de *N. glauca* (cultivar SR1) foram infectados com agrobactéria contendo a construção de interesse. **B)** Calos originados das bordas dos discos foliares foram transferidos para meio de indução de broto. **C)** Brotos originados a partir dos calos em meio de indução de parte aérea; cada calo representa um transformante independente, sendo que brotos originados do mesmo calo são considerados iguais. **D)** Planta em meio de indução de raiz. **E)** As plantas foram transferidas para saquinhos contendo substrato e adubo natural, cobertas por saco umedecido para aclimação. **F)** Planta transgênica adulta, em vaso contendo substrato, terra e adubo, mantida em casa de vegetação com irrigação controlada.

Após cultura *in vitro*, as plantas já enraizadas foram transferidas para saquinhos contendo terra, substrato Bioplant® de fabricação comercial e adubo natural, cobertas por saco umedecido para aclimação (Figura 13-E). Os saquinhos foram mantidos em câmara de germinação com temperatura (26°C), umidade (55%) e luminosidade (12 horas de luz e 12 horas de escuro) controladas, até serem então definitivamente transplantadas para vasos de 10 kg e mantidas em casa de vegetação com irrigação controlada (Figura 13-F).

3.17 Extração de DNA genômico de folhas

A extração do DNA genômico de folhas de *N. tabacum* foi feita de acordo com o protocolo descrito em Edwards *et al.* (1991). Uma amostra de tecido foliar de cada planta foi coletada utilizando-se a tampa de um tubo Eppendorf estéril, de 1,5 ml. Para isso, um pedaço de folha foi colocado entre a tampa e o corpo do tubo, e a tampa foi pressionada para baixo até fechar o tubo. Com isso, forma-se um disco foliar com tamanho uniforme para uniformizar as extrações das diferentes plantas. O tecido foi macerado dentro do mesmo tubo, utilizando-se pistilos estéreis, durante 15 segundos ou até o material estar bem macerado. Foram adicionados 400 µl do tampão de extração (200 mM Tris HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5% SDS) e as amostras foram agitadas em vortex por 5 segundos. As amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 1 hora. Após esse período, procedeu-se com a centrifugação dos tubos a 13000 rpm por 1 minuto (centrífuga Eppendorf 5415 D) e 300 µl do sobrenadante foram transferidos para novo tubo. Foram adicionados 300 µl de isopropanol e as amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 2 minutos. Centrifugou-se a 13000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente, sendo posteriormente ressuspensionado em 100 µl de água ultrapura autoclavada. As amostras foram deixadas no gelo, pois as reações de PCR, para confirmação da presença do inserto nos transgênicos foram feitas no mesmo dia. Depois, foram armazenadas na geladeira, a 4°C.

3.18 Checagem dos transgênicos por reações de PCR

A confirmação das plantas transgênicas foi realizada por meio de reações de PCR para cada um dos transformantes da construção prom35S::NtSCI1-HIS. No caso das plantas prom35S::NtSCI1-GFP a confirmação foi realizada pela observação da proteína fluorescente em microscópio de fluorescência. Para as plantas, prom35S::NtSCI1-HIS foi utilizado um *primer* interno (dentro da região do fragmento de interesse) denominado SCI1-qPCR-Fw e um *primer* externo, que reconhece uma sequência externa a sequência de interesse, porém pertencente à região do T-DNA. Neste caso, foi utilizado o primer TERM35S que parecia na região do terminador 35S.

As reações de PCR foram feitas com 2,5 µl de cada extração de DNA genômico de folhas, 2,5 µl de 10X PCR Buffer minus Mg, 0,5 µl de mistura de dNTPs (10 mM cada), 0,75

μl de MgCl₂ (50 mM), 0,5 μl de *primer forward* e 0,5 μl de *primer reverse* (10 μM cada), 0,2 μl da enzima *Taq* DNA Polymerase – 5U/μl (*Invitrogen*) e quantidade suficiente de água ultrapura autoclavada para volume final de 25 μl. O programa estabelecido foi: um passo inicial de desnaturação a 94°C por 10 minutos, passando para 34 ciclos de 94°C por 90 segundos (desnaturação), 30 segundos a temperatura de 53°C (pareamento) e 72°C por 1 minuto e 30 segundos (extensão). Após os ciclos, a reação foi submetida a 72°C por 10 minutos e mantida a 10°C até serem retiradas do termociclador. As amostras foram armazenadas em freezer -20°C.

3.19 Ensaios de co-localização por meio de expressão transiente em folhas

De Paoli *et al.* (2011) observaram a localização de NtSCI1 no núcleo de células epidérmicas de *Nicotiana tabacum* expressando a proteína NtSCI1-GFP. Entretanto, é nítida a concentração de NtSCI1 em corpúsculos nucleares, assemelhando-se a corpos nucleares, como Nucléolo, *Cajal Bodies* e *Speckles* (Shaw & Brown, 2004). Marcadores de corpos nucleares descritos por Koroleva *et al.* (2009) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Peter J. Shaw, do Departamento de Biologia Celular do Centro John Innes, Reino Unido.

3.19.1 Infiltração de folhas de *Nicotiana benthamiana*

Uma colônia de *Agrobacterium* contendo a construção pK7FWG2-NtSCI1 (proteína NtSCI1 com GFP fusionada em sua região C-terminal) e uma colônia de cada construção dos marcadores de corpúsculos nucleares utilizados (AtCOILIN-mRFP, AtFIBRILLARIN-mRFP, AtCYC64-mRFP e AtSRP34-mRFP), já checadas por PCR, foram inoculadas em 5 ml de meio LB líquido com os antibióticos adequados, deixando-se os inóculos a 28°C com agitação de 200 rpm. Após 24 horas de cultivo, cada cultura foi centrifugada em um tubo de 1,5 ml, a 8000 rpm por 2 minutos. O precipitado de células foi ressuscitado em 500 μl de meio de infiltração (MES 10 mM e MgCl₂ 10 mM). A densidade óptica (D.O.) de cada suspensão foi determinada por leitura da absorbância a 600 nm, sendo a D.O. entre 0,2-0,3 ideal para infiltração (Sawers *et al.*, 2006). A D.O. foi ajustada para o valor 0,3, acrescentando-se mais meio de infiltração.

Para a infiltração, a dupla de vetores foi unida em meio de infiltração, com a D.O. de 0,3 para cada um. Posteriormente, foi adicionado acetoseringona ao meio (concentração final:

100 μM), e cada suspensão foi colocada em uma seringa de 1 ml, utilizada para infiltrar o meio nas folhas de *N. benthamiana*. Após leve ferimento com a seringa, na superfície abaxial das folhas, uma pequena pressão foi exercida permitindo a entrada do meio de infiltração dentro dos tecidos foliares, contendo as agrobactérias transformadas. Após infiltração, as plantas foram mantidas a temperatura ambiente por 2-3 dias.

3.19.2 Análises no microscópio confocal

Cortes das folhas infiltradas foram colocados em tampão PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7,2) contendo o corante DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) na concentração de 1,25 $\mu\text{g/ml}$. Os cortes foliares foram mantidos nesta solução, em vácuo de 10-15 pol Hg, por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em tampão PBS 1x e depositados em lâminas, cobertas por lamínulas e analisados em microscópio confocal (Leica TCS SP2 Confocal Microscope), localizado no Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal, FMRP-USP (professor responsável: Prof. Dr. Roy Edward Larson). O *software* utilizado foi o *Leica LAS – AF LITE*.

A captura das imagens foi realizada de acordo com Koroleva *et al* (2009). Para a captura da marcação com DAPI a amostra foi excitada com laser no comprimento de onda 405nm e a emissão foi capturada entre 415-460nm. Já a proteína NtSCI1-GFP foi excitada com o laser de argônio, com comprimento de onda 488 nm e a captação no detector foi feita nos comprimentos de onda 500-550 nm. Para os marcadores de corpúsculos nucleares fusionados a proteína mRFP, a excitação foi realizada com o laser 543nm e a captação da emissão foi realizada entre 630-680nm.

As aquisições foram feitas no modo sequencial, isto é, cada laser foi ligado por vez para evitar *cross-talk* entre as aquisições (excitação de um fluoróforo em comprimento de excitação diferente do seu). As imagens adquiridas foram editadas utilizando-se o mesmo *software*. Como controle negativo dos experimentos, foram utilizadas folhas de *N. benthamiana* não infiltradas.

3.20 Ensaios de co-localização de NtSCI1-GFP com Hoechst durante o ciclo celular

3.20.1 Transformação de células BY-2 (cultivar *Bright Yellow-2*) de tabaco

O cultivo, manipulação e transformação de células BY2 foram realizados de acordo com o descrito em Nagata *et al* (1992) e Nocarova & Fischer (2009). Células BY-2 foram cultivadas em meio MS (*Murashige and Skoog*) modificado para este tipo de células (item 3.26). Suspensões de células foram preparadas, ressuspendendo aproximadamente 1ml de calo fresco de células em 50 ml de meio líquido. As células em suspensão foram subcultivadas a cada sete dias (1ml de células em 50 ml de meio líquido), no escuro, a 26°C e rotação de 150rpm. Para obter culturas de células em fase de crescimento exponencial, a suspensão de células foi subcultivada por, ao menos, 4 semanas. Estoques de calos de células BY-2 foram mantidos em meio sólido com 0,7% (w/v) de ágar, 26°C, no escuro, e subcultivado mensalmente.

Para transformação de células BY-2, uma alíquota de 2ml de uma cultura de células com 3 dias (subcultivada após atingir a fase de crescimento exponencial) foi co-cultivada com 200 µl de uma cultura de *Agrobacterium tumefaciens* carregando a construção *prom35S::NtSCI1-GFP*, crescida *overnight*. A esta mistura de células, foi adicionada acetoseringona (concentração final: 100 µM) e a cultura foi colocada no escuro, a 26°C, sem agitação, por dois dias. Após este período, as células foram lavadas com 50 ml de sucrose 3% estéril e 20 ml de meio líquido contendo 100µg/ml de cefotaxima utilizando filtros de 45µm (Millipore) estéreis. Em seguida, as células foram plaqueadas em meio MS sólido contendo 50 µg/ml de canamicina e 100 µg/ml de cefotaxima. As células foram mantidas no escuro, a 26°C até o aparecimento de calos após cerca de 4 semanas. Estes calos foram delicadamente transferidos para novas placas contendo meio MS suplementado com os antibióticos descritos anteriormente. Neste momento, deve-se tomar cuidado para evitar a contaminação com células não transformadas durante a transferência. As células foram mantidas nas mesmas condições por cerca de 1 mês até que os calos se desenvolvessem. Nesta etapa, culturas de linhagens estáveis de BY-2 *prom35S::NtSCI1-GFP* puderam ser obtidas, ressuspendendo aproximadamente 1ml de calo fresco de células em 50 ml de meio líquido acrescido do antibiótico adequado e subcultivando estas células a cada 7 dias durante 4 semanas.

3.20.2 Marcação de células BY-2 com o corante Hoechst

Para facilitar a identificação dos núcleos nas diferentes fases do ciclo celular, as células foram marcadas com o corante Hoechst 33342. Este composto é conhecido como *supravital*, ou seja, permite que as células sobrevivam durante o tratamento. O procedimento

de marcação e identificação, baseada no padrão de disposição da cromatina marcada com Hoechst, foi realizado conforme o descrito em Cook *et al* (2013).

Uma alíquota de 2 ml de uma cultura estável de células BY-2 prom35S::NtSCI1-GFP de 3 dias, foi transferida para um tubo Falcon de 50 ml. A estas células foi adicionado o corante Hoechst (5 µg/ml) e a cultura foi mantida a 26°C, 150rpm, *overnight*. Para captura das imagens, uma alíquota de células foi depositada sobre uma lâmina juntamente com uma gota de meio MS líquido. Após cobrir as células com uma lamínula, procedeu-se com a análise das mesmas em um microscópio confocal, como descrito no item 3.19.2. Para a captura da marcação com Hoechst, a amostra foi excitada com luz ultravioleta (UV) no comprimento de onda de 405nm e a emissão foi capturada entre 440-470nm.

3.20.3 Marcação de plântulas de *N. tabacum* prom35S::NtSCI1-GFP com o corante Hoechst

Sementes oriundas de autofecundação das plantas transgênicas prom35S::NtSCI1-GFP descritas no item 3.16.2 foram germinadas em condições estéreis, como descrito no item 3.16.1. Quando estas plântulas apresentavam de 2-3 folhas (2 semanas após plantio) foram retiradas do meio sólido e transferidas para um tubo Falcon de 50 ml juntamente com 5 ml de meio MS líquido acrescido do corante Hoechst (5 µg/ml) e incubadas no escuro, a 26°C, rotação de 150 rpm, *overnight*. Os primórdios foliares e meristemas radiculares destas plântulas foram então lavados em meio MS e analisados por microscopia confocal, de maneira idêntica à descrita no item anterior.

3.21 Construção de uma biblioteca de duplo-híbrido a partir de cDNA de estigma/estilete de *N. tabacum*

Para a construção da biblioteca de cDNA foi utilizado o Kit *Clone Miner II cDNA Library Construction Kit* da Invitrogen. O protocolo utilizado foi adaptado a partir do fornecido pelo fabricante.

3.21.1 Extração do RNA total e Isolamento de RNA mensageiro

Os estigmas/estiletos de flores de *N. tabacum* foram coletados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer -70°C, até o momento da extração de

RNA. Foram coletados estigmas e estiletos dos estádios 1 a 11 do desenvolvimento floral descritos por Koltunow *et al.* (1990). Utilizando soluções e materiais livres de RNases, a extração do RNA total foi realizada utilizando-se Trizol (Invitrogen), de acordo com protocolo padrão fornecido pelo fabricante, descrito no item 3.8.1. A quantificação das amostras foi realizada por espectrometria utilizando-se o aparelho NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

Para averiguar a qualidade do RNA total obtido, 1 µg de cada amostra foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, com 0,02M de tiocianato de guanidina e 0,5 µg/ml de brometo de etídeo. Após a confirmação da qualidade do RNA extraído, procedeu-se a purificação do RNA mensageiro, utilizando-se o Kit *GenElute mRNA Miniprep* (Sigma). Foram utilizados 40 µg de RNA total de cada estágio de desenvolvimento floral, somando um total de 440 µg de RNA. Após a purificação do mRNA, foi feita a quantificação por espectrofotometria (NanoDrop ND-1000).

3.21.2 ETAPA 1 - Construção da primeira e segunda fitas de cDNA e Reação de recombinação BP com vetor pDONR222.

A síntese das duas fitas de cDNA foi realizada conforme o protocolo do kit *CloneMiner II cDNA Library Construction* (Invitrogen). O protocolo foi feito no modo *Standard*. Para a síntese da primeira fita, foram utilizados 4 µg de mRNA (recomendado pelo kit: 50ng - 5 µg) e 800U de enzima *SuperScript*[®] III RT, sob as seguintes condições: 45°C por 20 min., 50°C por 20 min. e 55°C por 20 min. A síntese da segunda fita e ligação do adaptador *attB1* à extremidade 5' dos cDNAs foram realizadas de acordo com o protocolo que acompanha o kit. Em seguida, realizou-se o fracionamento dos cDNAs por tamanho, onde seis efluentes foram coletados. Os efluentes dos tubos 1 e 2 foram usados para atingir o número mínimo de 5×10^6 de transformantes. Para inserção dos cDNAs no vetor de entrada do sistema Gateway, foram realizadas 4 reações BPs. Em cada reação, foram utilizados 230 ng de cDNA, 375 ng de vetor pDONRTM222 (Invitrogen) e 6 µL do mix de enzima BP clonase II (Invitrogen). A reação foi mantida a 25°C por 20 horas.

Para testar a biblioteca, o DNA resultante da reação BP foi utilizado para transformar células DH10B eletrocompetentes, produzidas a partir do protocolo descrito por Wu *et al.* (2010). Vinte e quatro colônias resultantes desta primeira transformação foram inoculadas em meio LB líquido, suplementado com canamicina. Após crescerem *overnight* a 37°C, 220 rpm, as culturas foram centrifugadas e o *pellet* submetido à minipreparação de DNA. Em seguida,

o DNA proveniente destas amostras foi digerido com as enzimas NheI e EcoRV (*New England Biolabs*) e os tamanhos dos insertos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, permitindo verificar a qualidade da biblioteca. Após verificação da qualidade, diversas eletroporações foram realizadas até que o mínimo de 5×10^6 cfu (unidades formadoras de colônias) fosse obtido. À medida que os transformantes eram obtidos, estes eram removidos das placas, lavando as mesmas com meio LB líquido, com o auxílio de uma alça de vidro. A suspensão de células era, então, armazenada em um tubo Falcon de 50ml. Este procedimento foi repetido até que todos os transformantes fossem removidos das placas. O *pellet* de células presente nos diversos tubos foi utilizado para extração de DNA pelo método de Maxi-prep descrito pelo Prof. Dr. Jurgen Denecke (comunicação pessoal). O DNA obtido foi quantificado por espectrometria - NanoDrop ND-1000. Este DNA foi devidamente anotado como correspondente a primeira fase da construção da biblioteca – biblioteca de cDNA de estigma e estilete de *Nicotiana tabacum* no vetor de entrada pDONR222.1.

3.21.3 ETAPA 2 - Obtenção da biblioteca de cDNA no vetor de expressão pDEST22

Para transferência dos cDNAs da biblioteca para o vetor de expressão pDEST22, foram realizadas 5 reações LRs. Em cada reação, foram utilizados 150 ng de DNA da biblioteca no vetor pDONR222.1 (item 3.3.2), 450 ng de vetor pDEST22 (Invitrogen), e 6 μ L do mix de enzima LR clonase II (Invitrogen). A reação foi mantida a 25°C por 20 horas. Para testar a biblioteca, o DNA resultante da primeira reação LR, foi utilizado para transformar células DH10B eletrocompetentes. Vinte e quatro colônias resultantes desta primeira transformação foram analisadas como descrito no item anterior. Para isso, foram utilizadas as enzimas XhoI e SacI (*New England Biolabs*).

Uma vez confirmada a qualidade da biblioteca, diversas eletroporações foram realizadas até que o mínimo de 5×10^6 cfu (unidades formadoras de colônias) fosse obtido. A coleta dos transformantes e a extração dos DNAs correspondentes foram realizados como descrito no item anterior. Este DNA foi devidamente anotado como correspondente a biblioteca de cDNA de estigma e estilete de *Nicotiana tabacum* no vetor de expressão pDEST22.

3.22 Screening da Biblioteca do Sistema do Duplo-Híbrido, utilizando BD-NtSCI1 como isca.

Para realizar o *screening* da biblioteca de cDNAs, os experimentos de duplo-híbrido foram realizados com o kit *ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway Technology* (Invitrogen), baseado no sistema Gateway de recombinação. Os controles positivos e negativo, utilizados para os experimentos foram: controle positivo de interação forte (Krev1-RalGDS-wt); controle positivo de interação fraca (Krev1-RalGDS-m1), e controle de interação negativa (Krev1-RalGDS-m2), todos presentes no kit. Para os experimentos, a proteína D-NtSCI1 foi utilizada como isca. As presas utilizadas foram aquelas presentes na biblioteca de cDNAs de estigmas/estiletos, construída em vetor de expressão adequado ao sistema de duplo-híbrido. O meio de cultura SC (item 3.26), utilizado nos experimentos, tem como característica ausência de todos os suplementos nutritivos. Para seleção das colônias de interesse, o meio SC foi preparado adicionando-se todos os suplementos, exceto leucina, triptofano e histidina, que foram adicionados ou não, de acordo com a seleção desejada. Soluções de cada um destes aminoácidos foram apropriadamente preparadas para suplementação quando necessário (leucina 100 mM; triptofano 40 mM; histidina 100 mM), adicionando-se 80 µl de cada solução requerida para cada 10 ml de meio SC.

3.22.1 Preparação de células de levedura competentes

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4a (trp1-901; leu2-3,112; ura3-52; his3-200; gal4Δ; gal80Δ; GAL2-ADE2; lys2::GAL1-HIS3; met2::GAL7-lacZ), que apresenta os genes repórteres *HIS3* (para histidina), *ADE2* (para adenina) e *lacZ*, foi recuperada do estoque em glicerol, estriando-se em uma placa contendo meio YPAD (item 4.23), incubada por 3 dias, a 30°C. Uma colônia isolada foi raspada da placa com o auxílio de uma alça de platina e ressuspensa em 50 µl de água ultrapura estéril. A suspensão de células foi plaqueada novamente em meio YPAD, incubando-se a placa a 30°C durante a noite. No dia seguinte, as células crescidas no centro da placa foram coletadas e ressuspensas em 5 ml de água ultrapura estéril. A suspensão foi transferida para um Erlenmeyer contendo 100 ml de meio YPAD líquido, até que a D.O. atingisse um valor próximo a 0,1, a 600 nm.

O frasco foi colocado em incubadora a 30°C, sob agitação, até que a D.O. atingisse o valor próximo a 0,4. A cultura foi dividida em dois tubos Falcon de 50 ml, sendo centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos (centrifuga *Eppendorf* 5810 R), a temperatura ambiente. Descartou-

se o sobrenadante e o precipitado de células foi gentilmente ressuspensionado em 20 ml de água destilada e autoclavada, a temperatura ambiente. Os tubos foram novamente centrifugados nas mesmas condições. O precipitado de células foi ressuspensionado em 10 ml de TE/LiAc 1X (solução estoque: 10X TE [100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA, autoclavado] e 10X LiAc [acetato de lítio 1 M, esterilizado em filtro]). Centrifugou-se novamente e o precipitado foi ressuspensionado em 175 µl da mesma solução, juntando-se o volume dos dois tubos. Foram preparadas alíquotas de 50 µl cada, sendo armazenadas em *freezer* -80°C.

3.22.2 Leveduras competentes contendo a construção pDEST32-NtSCI1

Uma alíquota de células competentes (50 µl) foi adicionada em um tubo de 1,5 ml juntamente com 600 ng da construção pDEST32-NtSCI1. As leveduras foram transformadas com essa construção, como descrito no item a seguir (3.22.3). A transformação foi plaqueada em meio SC sem Leucina (SC-Leu) para seleção das células que incorporaram a construção. Posteriormente, uma colônia isolada foi selecionada para preparação de células competentes contendo a construção de interesse, como mostrado acima (item 3.22.1).

3.22.3 Transformação de leveduras

A transformação de leveduras foi feita pelo método do choque-térmico. Para tanto, adicionou-se, em um tubo de 1,5 ml, 50 µl de células de levedura competentes, 5 µl de carreador de DNA fresco (esperma de salmão sonificado – 50 µg) e o DNA de interesse (600 ng para preparação de leveduras competentes contendo a construção pDEST32-NtSCI1 e para os testes de auto ativação; 1 µg para transformação com a biblioteca). O tubo foi gentilmente agitado por pipetagem. Foram adicionados 300 µl de 40% PEG-3350 (*polyethylene glycol*) / 1X LiAc / 1X TE estéril, misturando-se o conteúdo. No caso da transformação de células para *screening* da biblioteca de cDNA, para aumentar a eficiência da transformação, foram adicionados 36 µl de DMSO (Dimetilsulfóxido) estéril a cada tubo. Os tubos foram incubados, em banho-maria, a 30°C por 30 minutos, e imediatamente transferidos para outro banho, a 42°C, deixados por 15 minutos, para que ocorresse o choque-térmico. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 7000 x g por 30 segundos (centrifuga *Eppendorf* 5415 D). O sobrenadante foi removido e o precipitado de células foi ressuspensionado em 200 µl de solução NaCl 0,09%. Cada suspensão foi plaqueada no meio de cultura adequado.

3.22.4 Teste de auto-ativação

Da isca: Células de levedura competentes contendo a construção pDEST32-NtSCI1 foram transformadas com 500 ng do vetor pDEST22 vazio, para testar se a proteína híbrida BD-NtSCI1, expressa juntamente com o domínio AD, e capaz de auto ativar o sistema. O produto da transformação foi distribuído em placa contendo meio de cultura SC sem Leucina e sem Triptofano (SC-Leu-Trp), para seleção dos transformantes, incubada a 30°C por 48 horas. Uma colônia isolada obtida foi inoculada em meio líquido SC-Leu-Trp e incubada a 30°C, 220 rpm por 48 horas. Após este período, a concentração de células foi estimada medindo-se a DO_{600} da cultura. Esta foi diluída para a concentração $DO_{600} = 0,2$, a qual foi novamente submetida a diluições seriadas 1:5. Todas estas diluições foram aplicadas em placas contendo SC-Leu-Trp-His (sem Histidina), incubadas a 30°C por 48 horas. Se houver crescimento de colônias, a isca, sozinha, auto ativa o sistema. Neste caso é necessário a titulação de 3AT necessária para inibir a auto ativação. Se não houver crescimento, a isca não ativa o sistema, podendo ser utilizada para o *screening* na biblioteca de duplo-híbrido.

Das presas: O teste de auto ativação para as presas foi feito da mesma forma que para a isca. Porém, foi feita co-transformação em células de levedura sem nenhuma construção, com o vetor pDEST22 contendo a presa de teste e o vetor pDEST32 vazio. A co-transformação foi plaqueada em meio SC-Leu-Trp para seleção dos transformantes para ambos os vetores. Após crescimento em meio líquido, a transformação foi plaqueada em meio SC-Leu-Trp-His, como descrito para o teste com a isca.

3.22.5 *Screening* da biblioteca

Para o *screening* da biblioteca de cDNAs, construída para uso no sistema de duplo-híbrido, foram utilizadas células de levedura competentes contendo a construção pDEST32-NtSCI1. Foram realizadas 30 transformações, quantidade necessária para obtenção de 10^6 transformantes (a eficiência de transformação foi previamente determinada em nosso laboratório), sendo, de acordo com o protocolo, a quantidade ideal de transformantes para a realização do *screening*. Para cada uma das transformações, foram utilizados: uma alíquota da levedura competente contendo a construção pDEST32-NtSCI1; 1 µg de DNA da biblioteca; 5 µl de espermatozoides de salmão sonificado (50 µg) e 300 µl de 40% PEG-3350 / 1X LiAc / 1X TE

estéril. Os 30 tubos foram cuidadosamente homogeneizados e incubados a 30°C por 30 minutos. Em seguida, a cada tubo foram adicionados 36 µl de DMSO (*dimethyl sulfoxide*) estéril (*Sigma*) e a preparação foi agitada cuidadosamente. As transformações por choque térmico foram feitas de acordo com o descrito em 3.22.3. Cada suspensão de células foi plaqueada em uma placa de Petri de 15 cm contendo meio SC-Leu-Trp-His, sendo o gene *HIS3* utilizado como gene repórter neste momento. As 30 placas foram incubadas a 30°C por 48 horas e, em seguida, mais 48 horas a temperatura ambiente.

Após este período, as colônias que cresceram neste meio seletivo foram inoculadas em 1,5 ml de meio líquido SC-Leu-Trp em placas de cultura de 96 poços (Greiner) e mantidas a 30°C, 250 rpm por 48 horas. Após crescimento, 300 µl de cada cultura foram utilizados para a obtenção de estoque em glicerol 20% e armazenados a -80°C. Uma alíquota de 200 µl de cada cultura foi transferida para placas de 96 poços (Corning). O restante da cultura, presente na placa de cultura, foi centrifugado a 1250 x g por 5 minutos (centrifuga *Eppendorf* 5810 R). O precipitado de células foi armazenado a -20°C até o momento de extração do DNA plasmidial das leveduras.

3.22.6 Análise do fenótipo dos transformantes para os genes repórteres

A placa de 96 poços (Corning) contendo os 200 µl de cada cultura foi utilizada como molde para replicar as culturas em placas de Petri de 15 cm, contendo os meios seletivos de cada um dos genes repórteres (SC-Leu-Trp-His para *HIS3*; YPAD para *lacZ*). Os meios seletivos apropriados para os testes dos genes repórteres são descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Resumo do procedimento utilizado para os testes dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ* com os clones positivos do *screening* da biblioteca.

MEIO SELETIVO	OBJETIVO
SC – LEU – TRP	Comprovar que as leveduras presentes em cada cultura de células estão vivas e são portadoras da construção isca (pDEST32-NtSCI1) e de ao menos uma construção da biblioteca (pDEST22-presas).
SC – LEU – TRP – HIS	Teste da ativação do gene repórter <i>HIS3</i> pela interação BD-NtSCI1 e AD-presas
YPAD	Permitir o crescimento de todas as células para teste do gene repórter <i>lacZ</i> realizado no ensaio com X-gal para análise do gene repórter <i>lacZ</i> .

Para tanto, um replicador de 96 pocos (Boekel), estéril, foi inserido nos 96 poços da placa. O replicador (carimbo) foi levantado e colocado em cima de cada um dos meios para

seleção de cada gene repórter, preparados em placas de Petri de 15cm. A primeira réplica foi realizada em meio seletivo SC-Leu-Trp, servindo de controle do crescimento das células para os testes com os genes repórteres. As células foram obtidas em formato de *spots*.

A segunda réplica foi feita em meio seletivo SC-Leu-Trp-His, para testar novamente os clones de interação com NtSCI1 para o gene repórter *HIS3*. A terceira réplica foi feita em meio YPAD, contendo uma membrana de nylon Hybond -N+ (*Amersham Biosciences*) estéril sobre o meio. Todas as células devem crescer neste meio, sobre a membrana. As réplicas foram incubadas a 30°C por 48 horas. Após esse período, foram analisadas as colônias que cresceram nos diferentes meios seletivos. Para o teste com o *lacZ*, a membrana foi delicadamente retirada da placa com auxílio de uma pinça e imersa em nitrogênio líquido por 30 segundos, para rompimento das células.

Cada membrana foi posicionada sobre duas folhas de papel filtro (125-mm *Whatman* 541), sobre uma placa de Petri de 15 cm, e saturadas em uma solução de 100 µl de X-gal em DMF (10 mg X-gal – 5-bromo-5-chloro-3-indolul- β -Dgalactoside; 100 µl DMF – *N,N*-dimethyl formamide), 60 µl de 2-mercaptoethanol e 10 ml de Buffer Z (pH 7,0; 16,1g Na₂HPO₄•7H₂O; 5,5 g NaH₂PO₄•H₂O; 0,75 g KCl; e 0,246 g MgSO₄•7H₂O por litro). As placas foram incubadas em estufa a 37°C. O acompanhamento do processo de coloração azul deve ocorrer no período de 24 horas. A coloração ocorre a partir da ativação do gene repórter *lacZ*, que codifica a enzima β -galactosidase, capaz de converter X-gal em galactose e 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo, sendo este último de coloração azul. Após esse teste, as colônias que apresentarem coloração azul, são consideradas positivas.

Os clones que apresentaram ativação dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ* foram selecionados e procedeu-se com a extração de DNA plasmidial dos *pellets* de células de leveduras correspondentes, que estavam armazenados a -20°C. Durante a transformação das células de leveduras no procedimento de *screening* da biblioteca, mais de uma construção da biblioteca pode entrar em uma mesma célula de levedura, gerando um único transformante com várias construções de presas. Neste caso, em uma mesma célula serão encontrados: a construção isca (pDEST32-NtSCI1) e algumas construções presas diferentes (pDEST22-biblioteca). Em cada clone positivo, apenas uma das construções pDEST22-biblioteca codifica uma proteína que interage com NtSCI1 e, portanto, está efetivamente ativando o sistema. Com o objetivo de resolver este problema, procedeu-se com o isolamento dos cDNAs das presas através da extração do DNA dos clones de levedura positivos e, subsequente, introdução do DNA em células de *E. coli*.

3.22.7 Extração de DNA plasmidial de leveduras

Algumas das colônias positivas para o teste com os genes repórteres foram selecionadas para identificação da presa, podendo corresponder a um parceiro de interação de NtSCII. Para isso, colônias precipitadas na placa de cultura (descrito em 3.22.5) foram ressuspensas em 100 µl de solução SDS 3% e NaOH 0,2 N, recém preparadas, sendo transferidas para tubos de 1,5 ml. Estes foram incubados a temperatura ambiente por 15 minutos, mexendo-se ocasionalmente por inversão. Foram adicionados 500 µl de TE, agitando-se novamente por inversão. Foram adicionados 60 µl de acetato de sódio 3 M, agitando-se os tubos. Adicionou-se 600 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), agitando-se os tubos em vortex por 2 minutos. Os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 2 minutos (centrifuga *Eppendorf* 5415 D). O sobrenadante foi transferido para novo tubo, sendo novamente adicionado 600 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico.

Centrifugou-se e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Adicionou-se 650 µl de isopropanol gelado, mexendo-se por inversão. Os tubos foram incubados a -20°C por pelo menos 20 minutos. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao precipitado 100 µl de etanol 70%, para lavagem. Novamente centrifugou-se nas mesmas condições, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspendido em 10 µl de TE e armazenado em *freezer* -20°C.

3.22.8 Identificação das presas

Para identificação dos possíveis parceiros de interação (presas) de NtSCII, 1 µl do DNA plasmidial extraído de levedura de cada clone foi inserido em células DH10B de bactérias, por eletroporação. Posteriormente, todo o conteúdo da transformação (1 ml) foi plaqueado em meio LB suplementado com ampicilina (100µg/ml) para seleção das células que incorporaram apenas o plasmídeo da presa, o pDEST22. Após crescimento, seis colônias isoladas foram selecionadas e inoculadas no mesmo meio de cultura, contendo o mesmo antibiótico. Após 16-20 horas, o DNA plasmidial de todas as colônias foi extraído pelo método da lisozima (item 3.4.1) e, posteriormente, checados com as enzimas de restrição XhoI e SacI (*New England Biolabs*) e submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%. Os DNAs de todos os clones que apresentaram perfis distintos de digestão enzimática foram selecionados e sequenciados, utilizando o *primer* DEST22-AD502-Fw. Após obtenção das

sequências, estas foram analisadas nos bancos de dados *GenBank* e *TAIR (The Arabidopsis Information Resource)*, pela ferramenta *tblastx*, comparando-se com as sequências já existentes nestes bancos.

3.22.9 Re-transformação das leveduras com pDEST22-presas

Cada DNA obtido das presas foi novamente inserido em leveduras competentes contendo a construção pDEST32-NtSCII. As transformações foram realizadas de acordo com o item 3.22.3 e as células foram plaqueadas em meio SC-Leu-Trp e mantidas a 30°C por 48 horas até a obtenção dos transformantes. Em seguida, uma colônia foi inoculada em meio SC-Leu-Trp líquido e incubada a 30°C, 220 rpm, por 48 horas. Após este período, as células foram diluídas em meio SC-Leu-Trp-His líquido para a D.O. 0,2 e plaqueadas em meio SC-Leu-Trp-His sólido para testar a interação mediante a ativação do gene repórter *HIS3*. Neste caso, o crescimento dos transformantes neste meio indica que a interação entre NtSCII e a presa correspondente é positiva. Estes ensaios foram sempre conduzidos utilizando controles para os níveis de interação, auto-ativação da isca e auto-ativação da presa.

Após este procedimento, o fenótipo das células correspondentes a cada teste de interação e para cada gene repórter pode ser comparado aos controles de nível de interação e auto-ativação. A interação entre SCII e uma presa era considerada positiva para o gene repórter *HIS3*, quando as células correspondentes ao teste de interação eram capazes de crescer em meio SC sem leucina, sem triptofano e sem histidina, enquanto que os controles de auto-ativação da isca e da presa não eram capazes. Para o gene repórter *lacZ*, o teste de interação foi considerado positivo quando a coloração azulada nos *spots* de células submetidas ao teste com X-gal e correspondentes ao teste de interação eram mais evidentes do que os *spots* correspondentes aos testes de auto-ativação.

3.23 Confirmação da interação de NtSCII com as proteínas obtidas no *screening* da biblioteca

Buscando confirmar a interação de NtSCII com seus possíveis parceiros, identificados através do *screening* da biblioteca de duplo-híbrido, testes complementares foram realizados, utilizando a técnica de BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*) (item 3.25.2).

3.23.1 Amplificação e Clonagem da CDS (*Coding Domain Sequence*) das proteínas parceiras de NtSCI1 obtidas no *screening* da biblioteca.

Para amplificar a CDS das proteínas que interagem com NtSCI1, identificadas nos ensaios de duplo-híbrido, foram realizadas duas reações de PCR. Na primeira amplificação, *primers* específicos foram utilizados para amplificar a CDS em questão, utilizando como molde o DNA da presa que gerou os resultados positivos nos ensaios de duplo-híbrido. Nesta reação, foi inserida uma parte dos sítios de recombinação attB1 e attB2 no fragmento amplificado, o qual está presente na sequência dos *primers* específicos. Componentes da reação: 10ng/μL de DNA molde, 10pmoles de *primer forward*, 10 pmoles de *primer reverse*, 10mM dNTP e 1U de enzima *Phusion High Fidelity* (New England BioLabs).

Na segunda reação (PCR2), os sítios de recombinação attB1 e attB2 que flanqueiam o fragmento gerado na PCR1 são complementados, utilizando o produto da PCR1 como molde. Componentes da reação: 10ng/μL de DNA molde, 10pmoles de *primer* BP1, 10pmoles de *primer* BP2, 10mM dNTP e 1U de enzima *Phusion High Fidelity* (New England BioLabs).

No Sistema Gateway, o fragmento amplificado é inicialmente clonado em um vetor de entrada via recombinação (*Kit BP Clonase*, Invitrogen) e, posteriormente, pode ser transferido para diferentes vetores de expressão. Assim, o fragmento foi inicialmente clonado no vetor de entrada pDONR221, através da reação BP. Nesta reação foi utilizado 200ng do produto de PCR2, 150 ng do vetor pDONR221 e 1μL da mistura da enzima BP clonase. A reação foi incubada a 25°C *overnight*.

3.23.2 Transferência da região codificadora do gene, para o vetor pK7m34GW para os ensaios de BiFC.

Os cDNAs codificantes de proteínas candidatas a interação com NtSCI1 foram fusionados a tGFP (aminoácidos 150 a 238) e ao promotor 35S, utilizando-se o vetor do sistema Gateway, pH7m34GW. As inserções foram realizadas mediante recombinações múltiplas com o kit *LR clonase II Plus* (Invitrogen), descritas no item 3.14.4.

3.24 Ensaio de *pull-down* utilizando extrato protéico nuclear de estigmas e estiletos de *N. tabacum*

A sequência codificadora (CDS) de SCII de *N. tabacum* foi inserida no vetor de expressão pDEST15 (Invitrogen, *Gateway Technology*) via recombinação (*LR Clonase*, Invitrogen), o qual permitirá a produção da proteína de interesse com a tag GST (*Glutathione S-Transferase*) fusionada à extremidade N-terminal de NtSCII (GST-NtSCII). Para isso, células eletrocompetentes da linhagem BL21(DE3) Rosetta de *E. coli* foram transformadas com a construção citada anteriormente. Uma colônia foi utilizada para inocular meio LB suplementado com o antibiótico adequado, e incubada a 37°C, sob agitação (200rpm) até atingir uma D.O._{600nm} ~ 0,4 – 0,6, quando foi adicionado IPTG (0,1mM), para indução da expressão. Ao término da indução, as culturas foram centrifugadas a 4°C, por 10 minutos, a 5.000 rpm, para a obtenção dos precipitados celulares. A fração sobrenadante foi descartada, e o precipitado de células foi ressuscitado em tampão de lise [Tampão L - (Tris-HCl 50mM pH 7,4, NaCl 150 mM)], acrescido do inibidor de proteases [*Protease Inhibitor Cocktail for General Use* - 1mM (Sigma)], e lisozima (10mg/ml). A suspensão de células foi, então, submetida à sonicação, e centrifugada por 20 minutos, a 10.000 rpm, a 4°C para obtenção da fração sobrenadante. A quantificação do extrato protéico foi realizada pelo método de Bradford.

Para obtenção de um extrato protéico enriquecido com proteínas nucleares, 10g de estigmas e estiletos de plantas SR1 de *N. tabacum* foram coletados e a extração realizada de acordo com o protocolo descrito por Escobar *et al.* (2001).

A proteína recombinante GST-NtSCII foi imobilizada em uma coluna GSTrap (*GE Healthcare*), segundo protocolo do fabricante. Após duas etapas de lavagem com tampão PBS, pH7.3 (140 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄), o extrato protéico nuclear, obtido dos estigmas e estiletos, foi aplicado na coluna e, após uma nova lavagem, os complexos protéicos retidos na coluna foram recuperados com tampão de eluição (50mM Tris-HCl, 10mM glutathione reduzida, pH 8.0). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel gradiente 4-12% Bis-Tris Nu-PAGE (Invitrogen). Com a finalidade de obter quantidade suficiente de proteína para análise, as amostras foram aplicadas no gel em triplicatas. Bandas individualizadas foram excisadas do gel e identificadas por espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF), na Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Instituto Pasteur de Montevideo – Uruguai.

3.25 Confirmação da interação de NtSCII com as proteínas obtidas em ensaios de *pull-down*

Buscando confirmar a interação de NtSCI1 com seus possíveis parceiros, identificados através dos ensaios de *pull-down*, testes complementares foram realizados, utilizando técnicas bioquímicas clássicas de investigação de interação proteína-proteína, como Duplo-Híbrido e BiFC ((*Bimolecular Fluorescence Complementation*). Cada proteína obtida foi testada juntamente com NtSCI1 por mais um ensaio experimental complementar.

3.25.1 Confirmação por meio da técnica de Duplo-Híbrido

Para os testes de duplo-híbrido, foi utilizado o Kit *ProQuest Two-Hybrid System with Gateway Technology* (Invitrogen), utilizando-se a proteína NtSCI1 como “isca”. Os testes de interação da proteína de interesse serão realizados mediante a co-transformação de células competentes de leveduras PJ69-4a com vetores de expressão contendo NtSCI1 (*bait plasmid*) e vetores contendo a CDS de um dos candidatos a interação com NtSCI1 (*prey plasmid*), conforme descrito no item 3.22.

3.25.2 Confirmação por meio da técnica de BiFC

Os ensaios de BiFC foram realizados de acordo com Bracha-Drori *et al.* (2004). Uma colônia de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV2260/pGV2260, portadora da construção Pro35S::BAIT-hGFP (sequência codificadora da proteína isca fusionada à extremidade N-terminal da proteína hGFP - aminoácidos 1 a 149 da proteína GFP, sob o controle do promotor CaMV 35S) foi inoculada em 5 ml de meio LB suplementado com os antibióticos adequados e mantida overnight, a 28°C, com agitação de 200 rpm. O mesmo foi realizado com uma colônia de *Agrobacterium* contendo a construção Pro35S::PREY-tGFP (sequência codificadora da proteína presa fusionada à extremidade N-terminal da proteína tGFP - aminoácidos 150 a 238 da proteína GFP, sob o controle do promotor CaMV 35S). Após o crescimento das células, 3 ml de cada cultura foram centrifugados durante 2 minutos a 8000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e cada precipitado de células foi ressuspensionado em 500 µl de meio MES/MgCl₂ (10mM MES, 10 mM MgCl₂ pH 5.6). Novamente, cada suspensão de células foi lavada em 500 µl de meio MES/MgCl₂ e ressuspensionada novamente em 500 µl de meio MES/MgCl₂. Em seguida, procedeu-se com a estimativa do número de células em cada suspensão celular. Para isso, mediu-se a OD₆₀₀ de uma alíquota de 10 µl de cada suspensão celular diluída em 990 µl água (diluição de 100x). Cada suspensão celular foi diluída em meio

MES/MgCl₂ + 100 µM acetoseringona, para uma concentração final de células equivalente a OD₆₀₀ ~ 0.3, considerando-se o volume total da combinação ISCA + PRESA a ser testada. Após a combinação das suspensões celulares (ISCA + PRESA), espera-se obter uma concentração de células equivalente a OD₆₀₀ ~0.6.

Com o auxílio de uma seringa de 1ml, a suspensão de células foi infiltrada na região abaxial de folhas de *Nicotiana benthamiana*. O processo de infiltração foi realizado da seguinte maneira: pequenos orifícios foram produzidos na região abaxial da folha, com o auxílio de uma ponteira branca de 10 µl e a abertura da seringa foi posicionada nestes orifícios. Com o dedo apoiado na parte de trás da folha, o conteúdo da seringa foi aplicado delicadamente enquanto não houvesse resistência por parte do tecido foliar e a suspensão de células se espalhasse pelo tecido. Este procedimento foi repetido até que toda a área da folha fosse infiltrada. Plantas jovens de *Nicotiana benthamiana*, com cerca de 2 a 3 meses de idade, foram utilizadas, pois geralmente apresentam melhores resultados.

A restauração da fluorescência da proteína GFP, resultante da interação BAIT-hGFP e PREY-tGFP foi analisada no microscópio confocal Leica TCS SP2 (Leica Microsystems – FMRP/USP), de 24 a 72 horas após a infiltração. Para captura do sinal de fluorescência, a proteína GFP foi excitada no comprimento de onda de 488nm e a imagem capturada entre 500-550nm.

3.25.3 Confirmação por meio da técnica de Co-Imunoprecipitação

Os experimentos de co-imunoprecipitação foram realizados de acordo com o protocolo de Fiil *et al.* (2008).

3.25.3.1 Extração de proteínas de estigmas e estiletos de *N. tabacum*

A proteína NtSCI1-GFP (SCI1 com *tag GFP*) foi extraída de estigmas e estiletos (estádios 1 a 11) e botões florais (estádio <1) de plantas transgênicas de *N. tabacum* 35Sprom::SCI1-GFP. O material foi coletado e estocado a -80°C. Foram utilizados 3g de material vegetal para cada 9 ml de tampão de extração. O material foi macerado em nitrogênio líquido com a ajuda de um cadinho e imediatamente adicionado em tampão de extração (50mM Tris-HCl pH7.5, 75mM NaCl, 1% Triton X-100, 5% glicerol, 2 mM EDTA, 5mM Na₃VO₄, 5mM NaF e 20mM β-glicerolphosphate - adição de 1 pastilha de inibidor de proteases para cada 10 ml de tampão). Em seguida, o material foi agitado com a ajuda de um

vortex durante 10 minutos, com intervalos de 2 minutos em gelo. Após este período, o material foi armazenado no gelo por 30 minutos, sob agitação, e em seguida sonificado (6 pulsos de 30 segundos). O material foi então centrifugado a 12.000rpm, 4°C, durante 30 minutos e então transferido para um novo recipiente e armazenado em gelo até o momento de uso.

3.25.3.2 Extração da proteína recombinante de células de *E. coli*

A proteína recombinante HIS-Nt14-3-3D2 foi produzida em células de células da linhagem BL21(DE3) Rosetta de *E. coli* transformadas com a construção pDEST17-Nt14-3-3D2. Uma colônia foi utilizada para inocular meio LB suplementado com o antibiótico adequado, e incubada a 37°C, sob agitação (200rpm) até atingir uma D.O._{600nm} ~ 0,4 – 0,6, quando foi adicionado IPTG (0,1mM), para indução da expressão. Ao término da indução (aproximadamente 2 horas), as culturas foram centrifugadas a 4°C, por 10 minutos, a 5.000 rpm, para a obtenção dos precipitados celulares. A fração sobrenadante foi descartada, e o precipitado de células foi ressuscitado em tampão de lise [Tampão L - (Tris-HCl 50mM pH 7,4, NaCl 75 mM)], acrescido do inibidor de proteases [*Protease Inhibitor Cocktail for General Use* - 1mM (Sigma)], e lisozima (10mg/ml). A suspensão de células foi, então, submetida a sonicação (5 pulsos de 30 segundos), e centrifugada por 30 minutos, a 12.000 rpm, a 4°C para obtenção da fração sobrenadante.

3.25.3.3 Incubação dos extratos protéicos com anticorpo anti-GFP e imunoprecipitação dos complexos protéicos

Para o ensaio de co-imunoprecipitação cerca de 3 ml do extrato vegetal contendo a proteína NtSCI1-GFP (NtSCI1 com *tag GFP*) foi misturado com 3 ml do lisado de *E. coli* contendo a proteína heteróloga HIS-Nt14-3-3D2. Em seguida, foram adicionados 10 µg de anticorpo monoclonal anti-GFP produzido em camundongo (Sigma). Nesta etapa, espera-se que NtSCI1-GFP interaja com seus parceiros, dentre eles a proteína recombinante HIS-Nt14-3-3D2, e que os anticorpos anti-GFP se liguem à *tag GFP* fusionada à NtSCI1. O material foi armazenado a 4°C, sob agitação, durante 2 horas. Para imunoprecipitação dos complexos protéicos, 150µl de micro esferas de sepharose contendo proteína A (*nProtein A Sepharose 4 Fast Flow*- GE Helthcare), lavadas 4 vezes com tampão de extração, foram adicionadas ao sistema. O material foi incubado, sob agitação, por 1 hora e meia a 4 °C e então centrifugado a 12.000 rpm por 20 segundos para recuperação das esferas e do material imunoprecipitado. As

esferas foram então lavadas 4 vezes em tampão de extração e as proteínas imunoprecipitadas foram finalmente eluídas em 60 µl de tampão de amostra (SDS Page). O material foi fervido a 100°C por 5 minutos e imediatamente centrifugadas por 20 segundos a 12.000rpm.

3.25.3.4 Western Blotting para identificação das proteínas imunoprecipitadas

Para identificação das proteínas constituintes do complexo protéico imunoprecipitado, 20µl do material obtido no item anterior foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS Page) em duplicata. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond-C extra (Amersham Biosciences) e imediatamente colocadas em solução de bloqueio (20ml de tampão TBS + leite desnatado 10%), e armazenadas a 4°C *overnight*. Após este período, as membranas foram lavadas 3 vezes em tampão TBS por 15 minutos cada e incubadas com anticorpos primários específicos: anticorpos anti-SCI1, produzido em frangos, para identificação da proteína NtSCI1-GFP e anticorpos anti-HIS, monoclonal, produzidos em camundongos (Sigma) para identificação da proteína HIS-Nt14-3-3D2. Após 2 horas de incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes em tampão TBS e incubadas com os anticorpos secundários. Como anticorpos secundários foram utilizados os seguintes anticorpos: anti IgG de frango conjugado com Peroxidase (Sigma) para reconhecimento dos anticorpos anti-NtSCI1 e anti-mouse conjugado com Peroxidase (Sigma) para identificação dos anticorpos anti-HIS. Após uma hora de incubação com os anticorpos secundários, as amostras foram novamente lavadas 3 vezes em tampão TBS e submetidas ao processo de revelação.

3.26 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram preparados dissolvendo-se os respectivos componentes em água destilada, ajustando-se o pH quando necessário. Os meios foram autoclavados para esterilização.

Meio LB (*Luria-Bertani*) para bactérias – 1 litro: 10 g triptona; 5 g extrato de levedura; 10 g NaCl; quantidade suficiente de água destilada para 1 litro. Para o meio LB sólido, foram adicionados 15 g de ágar bacteriológico para cada litro de meio líquido (1,5%).

Meio MS para plantas (Murashige & Skoog, 1962): 4,4g/L de meio MS (*Sigma*), contendo os sais e as vitaminas; 30g/L de sacarose; 0,5 g de MES. O pH do meio foi ajustado para 5,8 com KOH 4 N. Para obtenção do meio sólido foram acrescentados 7 g de ágar (*DIFCO*) para cada litro de meio líquido.

Meio M-250: meio MS sólido, 1µg/ml de BAP (*benzilaminopurina*), 250µg/ml de cefotaxima e 200µg/ml de canamicina.

Meio M-300: meio MS sólido, 0,1µg/ml de NAA (*ácido naftaleno acético*), 1µg/ml de BAP (*benzilaminopurina*), 500µg/ml de cefotaxima e 200µg/ml de canamicina.

Meio 5XA: 13,8 g de K₂HPO₄; 4,5 g de KH₂PO₄; 1 g de (NH₄)₂SO₄; 0,5 g de citrato de sódio. Foi adicionada água destilada em quantidade suficiente para 200 ml. O meio foi autoclavado.

Meio MAS (*Minimum A Sucrose*): 50 ml de meio 5XA; 2,5 ml de sacarose 20% (esterilizada em filtro e armazenada a 4°C); 0,5 ml de MgSO₄ 20% (autoclavado e armazenado a 4°C); 0,125 ml de tiamina (10mg/ml - esterilizada em filtro e armazenada a -20°C). O volume foi completado para 250 ml com água destilada autoclavada contendo 3 g de ágar bacteriológico.

Meio YPAD para leveduras – 1 litro: 10 g extrato de levedura; 20 g peptona; 100 mg sulfato de adenina; 20 g dextrose; água destilada em quantidade suficiente para 1 litro. O pH foi ajustado para 6,0 com HCl.

Meio SC para leveduras (*Synthetic Complete Medium*) – 0,5 litro: 3,35 g *Yeast Nitrogen Base without aminoacids* (YNB); 0,675 g de mistura de suplementos nutritivos*; água destilada em quantidade suficiente para 0,5 L. O pH foi ajustado para 5,9 com NaOH. Para o meio SC sólido, adicionou-se 10 g de ágar para levedura. Após ser autoclavado, foi adicionado ao meio 25 ml de glicose 40%.

*mistura de suplementos nutritivos: 500 mg de cada componente: adenina, alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, cisteína, ácido glutâmico, glutamina, isoleucina, glicina, valina, tirosina, treonina, uracila, lisina, metionina, fenilalanina, prolina e serina.

Meio MS para BY-2 (modificado de Linsmaier & Skoog, 1964): 4,3g/l de sais basais para meio MS (*Sigma*) sem as vitaminas; 30g/L de sacarose; 0,5 g de MES, 10 ml de KH₂PO₄

(solução estoque - 440mM), 10ml de B1-inositol [solução estoque – Tiamina HCl (0,3mM) myo-inositol (55,5mM)], 1ml de 2,4D (10mM). O pH do meio foi ajustado para 5,8 com KOH 4N. Para obtenção do meio sólido foram acrescentados 6 g de ágar (*DIFCO*) para cada litro de meio líquido.

Resultados e Discussão

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento de Ferramentas para o trabalho.

4.1.1 Obtenção de plantas transgênicas de *N. tabacum* 35S_{prom}::NtSCI1-GFP e 35S_{prom}::NtSCI1-HIS para produção de proteínas para os ensaios de Co-imunoprecipitação e Localização Subcelular.

Para a realização de ensaios de interação proteína-proteína por meio de Co-imunoprecipitação, é necessária a obtenção de proteínas funcionais, capazes de interagir *in vitro*. Em geral, é realizada a tentativa de produção de proteínas heterólogas em células de *E. coli*, o que geralmente mostra resultados satisfatórios. Entretanto, no caso da proteína NtSCI1, algumas particularidades desta proteína, descritas abaixo, mostraram a necessidade de que a mesma fosse produzida de forma constitutiva em plantas transgênicas de *N. tabacum*.

Primeiramente, proteínas heterólogas produzidas em *E. coli* nem sempre são produzidas de forma idêntica à proteína nativa. Por ser produzida em um ambiente celular de procarioto, a aquisição das estruturas secundárias e/ou terciárias por meio de dobramentos e modificações pós-traducionais pode ser comprometida na proteína sendo expressa. Como a estrutura é imprescindível para a correta funcionalidade de uma proteína, alterações desta natureza podem levar à produção de proteínas com características distintas da sua forma nativa. Segundo, NtSCI1 é expresso preferencialmente em tecidos especializados da flor, como o estigma e estilete, e análises *in silico* revelaram que possui 15 sítios putativos de fosforilação, o que sugere que proteínas presentes nestes tecidos regulem a atividade de NtSCI1 por meio de fosforilações sítio-específicas. Além disso, muitas interações dependem da presença de outras proteínas, que formam complexos com os quais uma proteína específica interage. Neste caso, o ensaio de interação *in vitro* entre NtSCI1 e seus parceiros poderia ser prejudicado devido a ausência de proteínas importantes para o estabelecimento desta interação. Diante destas possibilidades, surgiu a necessidade da produção da proteína NtSCI1 em plantas transgênicas de *N. tabacum*, para que a mesma pudesse ser extraída de seu local de origem, ou seja, do estigma e estilete, e que a mesma apresentasse suas características funcionais preservadas.

Para que a proteína NtSCI1 pudesse ser identificada e/ou purificada dos tecidos, optou-se pela produção de proteínas híbridas, portadoras de uma *tag* universal. Foram selecionadas duas *tags* distintas: GFP (permite a visualização da proteína por meio de

fluorescência) e HIS (seis resíduos consecutivos de histidina que permitem a purificação da proteína por meio de cromatografia de afinidade). Dessa forma, foram produzidas plantas transgênicas de *N. tabacum* superexpressando as proteínas NtSCII-GFP e NtSCII-HIS, por sob controle do promotor CaMV 35S.

4.1.1.1 Obtenção de plantas transgênicas de *N. tabacum* 35S_{prom}::NtSCII-GFP.

A obtenção de plantas transgênicas de *N. tabacum*, superexpressando a proteína NtSCII-GFP, foi iniciada pela aluna Lígia T. Bertolino e teve continuidade no presente trabalho. Utilizando uma cultura de células de *Agrobacterium* portadora da construção 35S_{prom}::NtSCII-GFP, células foliares de *N. tabacum* foram transformadas resultando em calos, cada um correspondente a um evento de transformação independente. Sob condições hormonais adequadas, estes calos originaram pequenas plântulas que foram transferidas para frascos com meio adequado para estímulo do enraizamento e crescimento. Apesar das plantas terem sido selecionadas, durante todo o processo, com o uso de antibióticos adequados, neste momento foi realizada a análise e categorização dos transgênicos com base na observação da quantidade de proteína produzida. Para isso, duas características foram consideradas: intensidade do sinal de fluorescência da proteína GFP e número de células fluorescentes por área foliar. Apesar de 23 plantas terem sido obtidas, apenas 18 eram transgênicos independentes e foram selecionados para análise. O gráfico representado pela Figura 14 mostra os resultados obtidos na estimativa da expressão de NtSCII-GFP nos transgênicos, com base em dados empíricos resultantes da observação visual do sinal de fluorescência da proteína no tecido foliar. Para isso, foi considerada uma escala gradual de notas, atribuindo valores que variam de 0 a 4.

Como pode ser observado na Figura 14, o transgênico que apresentou, visualmente, maior produção da proteína NtSCII-GFP em células foliares foi o de número 1.3, o qual foi selecionado para extração de proteína dos tecidos do estigma e estilete. Sementes oriundas da autopolinização do transgênico 1.3 foram obtidas e germinadas. A análise de células foliares das plântulas geradas mostrou que as mesmas apresentavam quantidade de proteína NtSCII-GFP similar à do transgênico original. Estas plantas foram cultivadas até o momento do florescimento, quando foi possível a coleta de estigmas e estiletos em quantidade suficiente para a extração da proteína e utilização da mesma em ensaios de co-imunoprecipitação.

Dessa forma, a proteína NtSCI1-GFP foi produzida com sucesso em células do estigma e estilete de *N. tabacum*, permitindo a realização do ensaio de co-imunoprecipitação que confirmou a interação entre NtSCI1-GFP e HIS-Nt14-3-3D2, como descrito no item 4.3.3 deste trabalho. Além disso, plântulas originadas a partir da germinação de sementes destes transgênicos puderam ser utilizadas em ensaios de localização subcelular de NtSCI1-GFP durante as fases do ciclo celular, descritas no item 4.6.1 deste trabalho.

Figura 14: Esquema gráfico representando a estimativa da quantidade de proteína NtSCI1-GFP produzida em células foliares dos transgênicos 35S_{prom}::NtSCI1-GFP de *N. tabacum*, com base na observação da proteína fluorescente. Escala utilizada: 0 – nenhuma fluorescência, 1 - sinal de fluorescência baixo e em poucas células, 2 - sinal de fluorescência baixo observado em um número razoável de células, 3 - muitas células apresentando sinal de fluorescência baixo e 4 - muitas células com sinal de fluorescência forte.

4.1.1.2 Obtenção de plantas transgênicas de *N. tabacum* 35S_{prom}::NtSCI1-HIS.

Com base no sucesso obtido na produção da proteína NtSCI1-GFP em células do estigma e estilete de *N. tabacum* e na utilização da mesma nos ensaios de co-imunoprecipitação, surgiu a necessidade da produção desta proteína, nas mesmas condições, porém com uma *tag* distinta, que permitisse sua purificação. Para isso, células foliares foram

transformadas utilizando uma cultura de *Agrobacterium* portador da construção 35S_{prom}::NtSCI1-HIS, gentilmente cedida pela pós-doutoranda Hebréia O.A. Souza. Foram obtidos inúmeros calos independentes, sendo que cerca de 150 foram transferidos para meio de indução de parte aérea. Vinte e oito transgênicos sobreviveram até a fase adulta, sendo 25 destes transgênicos independentes.

Apesar das plantas terem sido selecionadas durante todo o processo com o uso de antibióticos adequados, a confirmação da presença da construção 35S_{prom}::NtSCI1-HIS no genoma das mesmas foi realizada por meio de PCR. Na Figura 15, é possível observar que todas as 28 plantas mostraram o cassete 35S_{prom}::NtSCI1-HIS inserido em seu genoma, uma vez que houve a amplificação do fragmento esperado, com tamanho idêntico ao controle positivo, onde foi utilizado como molde o plasmídeo com a construção 35S_{prom}::NtSCI1-HIS usado para a obtenção dos transgênicos em questão.

Figura 15: Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR obtido após a amplificação de parte da construção 35S_{prom}::NtSCI1-HIS, utilizando como molde o DNA genômico extraído das plantas transgênicas 35S_{prom}::NtSCI1-HIS. Na primeira linha observa-se a presença de um amplicon de aproximadamente 500pb em todas as raias, confirmando que todas as plantas possuem o cassete 35S_{prom}::NtSCI1-HIS integrado em seu genoma, sendo portanto confirmadas como transgênicas. Na segunda linha encontra-se o controle da reação de PCR, realizado com *primers* específicos capazes de amplificar parte do gene da actina, sendo importantes para confirmar que o DNA genômico extraído de todas as plantas é passível de ser amplificado. C+ (controle positivo) e C- (controle negativo). Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Apesar de todas as plantas terem sua transgenia confirmada por PCR, não há nenhuma garantia de que a proteína NtSCI1-HIS esteja sendo produzida de forma eficiente nas células destas plantas. A confirmação da produção da proteína NtSCI1-HIS foi realizada apenas em

uma amostra de plantas transgênicas. Para isso, extratos proteicos foram preparados utilizando-se 10g de uma mistura de folhas jovens (transgênicos 1.1, 34.1, 39.1 e 54.1). A proteína NtSCI1-HIS presente neste extrato foi purificada por cromatografia de afinidade, utilizando-se resina de níquel para promover a concentração da proteína. Amostras das frações eluídas foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE, porém como pode ser observado na Figura 16A, nenhuma proteína com tamanho aproximado à de NtSCI1-HIS (20,8 kDa) foi observada nestas frações. Apenas quando as amostras foram submetidas à análise por *Western Blotting* utilizando anticorpo anti-Histidina, a proteína NtSCI1-HIS foi observada nas frações 4 e 5, estando majoritariamente presente na fração 4 (Figura 16B).

Figura 16: Confirmação por *Western Blotting* da produção da proteína NtSCI1-HIS no tecido foliar das plantas transgênicas 35S_{prom}::NtSCI1-HIS. (A) Eletroforese SDS-PAGE de uma amostra das frações eluídas após a purificação da proteína por cromatografia de afinidade utilizando resina de níquel. Após a revelação do gel com o corante Azul de Coomassie, nenhuma proteína foi observada com o tamanho similar à da proteína heteróloga HIS-NtSCI1 (20,8 kDa) produzida em células de *E. coli* e utilizada como controle positivo (C+) neste experimento. M: marcador de peso molecular *LMW Calibration Kit for SDS Eletrophoresis* (GE Helthcare), Inp: amostra do extrato proteico de folhas das plantas transgênicas imediatamente antes da etapa de purificação. (B) *Western Blotting* das mesmas amostras presentes em A, marcado com anticorpo monoclonal anti-Histidina. Na imagem é possível observar que o anticorpo é capaz de realizar a marcação da proteína HIS-NtSCI1 produzida em *E. coli* (controle positivo) e também a proteína NtSCI1-HIS purificada de folhas das plantas transgênicas. Na

imagem, observa-se que a proteína está presente nas frações de eluição números 4 e 5, sendo que se apresenta em maior quantidade na fração 4.

Estes resultados comprovam que a proteína NtSCI1-HIS de aproximadamente 20,8 kDa foi produzida de forma eficiente em ao menos uma das plantas transgênicas 35S_{prom}::NtSCI1-HIS (1.1, 34.1, 39.1 ou 54.1). Estas plantas podem ser utilizadas como ferramentas na obtenção da proteína NtSCI1-HIS, diretamente de órgãos específicos da planta, como o estigma e estilete. Dessa forma, será possível a realização de novos ensaios de co-imunoprecipitação para confirmar a interação entre NtSCI1 e seus parceiros, com a garantia de que a proteína estará em condições muito semelhantes à sua forma nativa.

4.1.2 Construção de uma biblioteca de cDNAs de estigmas/estiletos de *N. tabacum* em vetor do sistema de duplo-híbrido em leveduras

A obtenção de um RNA intacto e de alta qualidade consiste no primeiro e mais crítico passo em vários ensaios de biologia molecular, como a construção de bibliotecas de cDNAs. Após a extração do RNA total de estigmas/estiletos dos 11 estádios de desenvolvimento floral de *N. tabacum*, a qualidade do material obtido foi averiguada por eletroforese em gel.

Na Figura 17 pode-se comprovar a integridade dos RNAs extraídos, sendo possível observar duas bandas bem delimitadas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S em todas as amostras. Outro parâmetro indicativo da qualidade do RNA obtido é que a banda correspondente aos RNAs ribossomais 28S apresenta intensidade de cerca de 2 vezes a da banda 18S.

Figura 17: Imagem da eletroforese em gel de agarose 1,2% com isotiocianato de guanidina, de 1 μ g de RNA total extraído de estigmas/estiletos de *N. tabacum*, correspondente aos 11 estádios de desenvolvimento floral indicados. Na imagem é possível observar que a integridade dos RNAs foi preservada devido à visualização de duas bandas bem delimitadas, correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S.

Após a confirmação da qualidade dos RNAs extraídos, procedeu-se para a purificação dos RNAs poliadenilados. Foram utilizados 440 μ g de RNA total (40 μ g de RNA total de cada estágio) resultando em 11,77 μ g de RNAs poliadenilados (mensageiro), um rendimento de aproximadamente 2,7 %.

Foram utilizados 4 μ g de mRNAs (recomendado pelo kit: 50ng - 5 μ g) para a síntese dos cDNAs fita dupla, os quais foram fracionados por tamanho. O material foi quantificado (Tabela 3) e os dados obtidos mostram a presença de 950 ng de cDNAs nas frações 1, 2.1 e 2.2, que em teoria seriam compostas por cDNAs com tamanho desejado (maior ou igual a 1.5kb).

Tabela 3: Resultado do fracionamento dos cDNAs. Nesta tabela encontram-se as concentrações dos cDNAs em cada fração coletada e a massa de cDNA total em cada fração.

Fração	Concentração (ng/μl)	Massa de cDNA (ng)
1	0,8	80
2.1	1,6	230
2.2	8,2	640
3	12,4	992
4	17,2	1376
5	74,3	7430

Segundo as características do fracionamento realizado, a fração número 2 contém cDNAs com tamanho médio de 1,5kb, que devem ser utilizados para a construção da biblioteca. Neste trabalho, optou-se por subdividir o material a ser eluído no tubo 2 em duas subfrações: 2.1 e 2.2 para aumentar as chances de obter fragmentos com tamanho próximo a 1,5kb. Nas etapas seguintes, foi utilizado preferencialmente o material do tubo 2.1, complementando com material da fração 2.2, para obter o número mínimo sugerido de 5×10^6 transformantes (ver abaixo). Após a inserção destes cDNAs no vetor de entrada pDONR222.1, via reação BP, o produto desta recombinação foi utilizado para eletroporação de células DH10B, preparadas por protocolo otimizado para uma eficiência de $1,5 \times 10^9$ transformantes/μg de DNA (para detalhes, ver Material e Métodos).

No total, foram realizadas três reações BPs com os cDNAs provenientes da fração 2.1 e uma reação com os cDNAs da fração 2.2. Após a primeira reação BP, testes preliminares foram realizados para averiguar a qualidade da biblioteca. A Figura 17 apresenta o perfil de digestão, com as enzimas NheI e EcoRV, dos DNAs plasmidiais extraídos de 24 colônias. Nesta figura é possível observar a presença das duas bandas (1794 e 277 pb) correspondentes ao vetor pDONR222.1. Do somatório do tamanho das demais bandas foram subtraídos 580 pb, parte remanescente do vetor, para inferir o tamanho aproximado do cDNA clonado em cada colônia. O tamanho médio dos insertos nesta amostra inicial da primeira fase de construção da biblioteca foi estimado em 1250 pb (Tabela 4), valor próximo do tamanho esperado de 1500pb. Além disso, dentre as 24 colônias analisadas, nenhum padrão de digestão mostrou-se repetido, evidenciando a diversidade de cDNAs entre os clones, o que é importante para a obtenção de uma biblioteca com alto grau de representatividade.

Figura 18: Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando o perfil de digestão, com as enzimas NheI e EcoRV, do DNA plasmidial extraído de 24 colônias oriundas da primeira fase de construção da biblioteca de cDNAs. As bandas de 1794pb e 277 pb pertencem ao vetor pDONR222.1, usado na clonagem. As demais bandas representam o cDNA inserido, acrescido de 580pb que ainda pertencem ao vetor. O tamanho médio dos cDNAs nesta amostra inicial, da primeira fase de construção da biblioteca, foi estimado em 1250 pb.

No total, foram obtidas aproximadamente 5.700.000 colônias nesta primeira fase da construção da biblioteca. Este número estimado garante uma representatividade satisfatória da biblioteca, uma vez que o protocolo sugere conseguir de 5 a 10×10^6 cfu (unidades formadoras de colônias). Portanto, esta primeira fase foi concluída com sucesso, tendo sido obtida uma biblioteca de cDNAs de estigmas/estiletes de *N. tabacum*, com alta representatividade, e pronta para ser transferida para qualquer vetor de destino do sistema Gateway. Assim, além da biblioteca de expressão para uso no sistema de duplo-híbrido, outras bibliotecas podem ser construídas com base no DNA obtido nesta etapa de construção da biblioteca. Por exemplo,

uma biblioteca de *one-hybrid* pode ser obtida facilmente utilizando parte do DNA obtido nesta etapa.

As células, de todas as colônias obtidas nesta primeira fase, foram removidas em conjunto, usando meio LB líquido para lavar a superfície das placas contendo as colônias. Estas células foram precipitadas e tiveram seu DNA plasmidial extraído, somando, no total, 114,718 mg de DNA.

Tabela 4: Resumo dos dados referentes ao teste de qualidade da biblioteca na primeira fase de construção. Pode-se observar o tamanho dos insertos encontrados numa amostra de 24 colônias da biblioteca, inferidos com base na visualização do perfil de digestão do DNA com enzimas de restrição. O tamanho médio dos insertos foi inferido em 1250 pb.

Colônia	Tamanho do Inseto (pb)	Colônia	Tamanho do Inseto (pb)
1	1100	13	650
2	750	14	750
3	2000	15	850
4	1100	16	400
5	700	17	2000
6	2100	18	2400
7	2000	19	2600
8	600	20	350
9	500	21	1150
10	600	22	750
11	2500	23	1700
12	750	24	1500
		MÉDIA	1250

A segunda fase da construção da biblioteca de expressão consistiu em transferir os cDNAs, clonados no vetor pDONR222.1, para o vetor de expressão do sistema de duplo-híbrido, o vetor pDEST22. Esta transferência foi realizada através de 5 reações LRs. Novamente, a qualidade da biblioteca foi testada em uma pequena amostra de 24 colônias. A Figura 19 mostra o perfil de digestão, com as enzimas XhoI e SacI, do DNA plasmidial extraído destas colônias. Nesta figura é possível observar a presença das duas bandas correspondentes ao vetor pDEST22 (5250 e 1493 pb). As demais bandas, somadas,

representam o tamanho aproximado do cDNA transferido por recombinação, do qual devem ser subtraídos 435pb remanescentes do vetor.

Figura 19: Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando o perfil de digestão, com as enzimas XhoI e SacI, do DNA plasmidial extraído de 24 colônias oriundas da segunda fase de construção da biblioteca de cDNAs. As bandas de 5250 pb e outra de 1493 pb pertencem ao pDEST22, vetor expressão do sistema de duplo-híbrido. As demais bandas representam o cDNA inserido, acrescido de 435pb que ainda pertencem ao vetor. O tamanho médio dos cDNAs nesta amostra inicial, da segunda fase de construção da biblioteca, foi estimado em 1044 pb.

O tamanho médio dos insertos da amostra inicial da segunda fase de construção da biblioteca foi estimado em 1052,5 pb (Tabela 5), que é considerado um valor bastante adequado e está próximo do tamanho médio estimado para os mRNAs de plantas. Além disso, dentre as 24 colônias analisadas, poucos padrões de digestão estavam repetidos, mostrando a variedade de cDNAs clonados, o que contribui para a obtenção de uma biblioteca com alto grau de representatividade. As colônias 2, 7, 9 e 24 apresentaram um padrão de digestão que é compatível com o vetor após a recombinação, porém nenhum inserto foi observado, de forma que estes clones não foram considerados no cálculo do tamanho médio dos insertos.

Tabela 5: Resumo dos dados referentes ao teste de qualidade da biblioteca na segunda fase de construção. Pode-se observar o tamanho dos insertos encontrados numa amostra de 24 colônias da biblioteca, inferidos com base na visualização do perfil de digestão do DNA com enzimas de restrição. O tamanho médio dos insertos foi inferido em 1052,5 pb.

Colônia	Tamanho do Inseto (pb)	Colônia	Tamanho do Inseto (pb)
1	600	13	1300
2	-	14	1000
3	700	15	1400
4	700	16	1000
5	1400	17	1500
6	1200	18	1250
7	-	19	2800
8	700	20	1500
9	-	21	600
10	250	22	550
11	700	23	500
12	1400	24	-
		MÉDIA	1052,5

No total, foram obtidas aproximadamente 6.070.000 colônias nesta segunda fase da construção da biblioteca, que garantem uma representatividade satisfatória da mesma, uma vez que o protocolo sugere de 5 a 10 x 10⁶ unidades formadoras de colônias. Nesta etapa, foi obtida com sucesso uma biblioteca de expressão de cDNAs de estigmas/estiletes de *N. tabacum*, com alta representatividade, e pronta para ser utilizada em *screenings* no sistema de duplo-híbrido, utilizado iscas específicas.

As células das colônias obtidas nesta segunda fase foram removidas das placas, precipitadas e tiveram seu DNA plasmidial extraído, somando, no total, 81,24mg de DNA, o suficiente para a realização de 2700 *screenings*.

4.2 Busca por potenciais parceiros de interação com SCI1

4.2.1 Ensaio de *pull-down* utilizando extrato protéico nuclear de estigmas/estiletes de *N. tabacum*

O primeiro passo para a realização de ensaios de *pull-down* consiste na obtenção da proteína de interesse. Neste caso, a proteína heteróloga GST-NtSCI1 (proteína SCI1 de *N. tabacum* em fusão N-terminal com a proteína *Glutathione S-transferase*) foi produzida em células de *E. coli* BL21(DE3)-Rosetta. Para isso, a sequência codificante de SCI1 de *N. tabacum* foi clonada por Strini (2010) no vetor pDEST15 (Invitrogen). Este vetor de expressão foi utilizado em testes preliminares de expressão, que indicaram que uma quantidade significativa da proteína heteróloga estava presente na fração solúvel do lisado de células crescidas sob as seguintes condições: 250 ml de meio de cultura LB e 3 horas de indução utilizando 0,05mM de IPTG, a 37°C. A Figura 20 apresenta o perfil proteico obtido após eletroforese de 15µl do lisado celular (fração insolúvel e fração solúvel) em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE) nas 3 primeiras horas de indução. Como pode ser observado, a proteína heteróloga de aproximadamente 46kDa estava presente na fração solúvel do lisado celular.

Figura 20: Análise da expressão da proteína heteróloga GST-NtSCI1 em *E. coli*, por SDS-PAGE (gel a 12,5%). Na primeira posição do gel é mostrado o perfil protéico do lisado de células de *E. coli* BL21(DE3)-Rosetta, imediatamente antes da indução da expressão (tempo zero – t0). Em seguida, são mostrados os perfis protéicos do lisado celular após 1, 2 e 3 horas (t1, t2 e t3), respectivamente. Na quinta e sexta posições do gel são mostrados os perfis protéicos do lisado celular após 3 horas de indução (frações não-solúvel (NS) e solúvel (S), respectivamente). Notar que a proteína heteróloga de aproximadamente 46 kDa aparece como banda majoritária na fração solúvel. M - Marcador de peso molecular *LMW Calibration Kit for SDS Eletrophoresis* (GE Helthcare).

Durante o ensaio de *pull-down*, a proteína recombinante GST-NtSCI1 interagiu com proteínas presentes em um extrato enriquecido com proteínas nucleares de estigmas e estiletos

de plantas SR1 de *N. tabacum*, retendo-as na resina utilizada. A Figura 21 apresenta os resultados obtidos após submeter uma alíquota do material eluído à SDS-PAGE. Na imagem é possível observar a presença de 24 bandas independentes, sendo a majoritária (banda 17) correspondente à proteína heteróloga GST-NtSCI1, a qual foi eluída simultaneamente a outras proteínas, as quais foram analisadas como potenciais parceiros de NtSCI1.

Figura 21: Análise por eletroforese (gel gradiente 4-12% Bis-Tris, Nu PAGE - Invitrogen) da amostra eluída do ensaio de *pull-down*, realizado com a proteína heteróloga GST-SCI1, expressa em células de *E. coli* BL21(DE3)-Rosetta, e extrato enriquecido para proteínas nucleares de estigmas/estiletes (E/E) de plantas SR1 de *N. tabacum*. Na primeira posição aparece o marcador de peso molecular e nos poços 1, 2 e 3 aparece a amostra eluída do ensaio, em triplicata. Setas indicam a localização das bandas que foram identificadas e numeradas. M: marcador de peso molecular *Prestained SDS-PAGE Standards* (BioRad).

O peso molecular da proteína heteróloga GST-NtSCI1 foi predito em 46kDa utilizando a ferramenta Compute pI/Mw do ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/) e, após o contato da mesma com o extrato protéico nuclear de estigma e estilete (Figura 21), é possível notar um significativo aumento em seu peso molecular. Análises *in silico* realizadas por DePaoli *et al.* (2011) indicam a presença de 12 a 15 sítios putativos de fosforilação na

sequência de SCII. Segundo Seo & Lee (2004) cada grupamento fosfato pode resultar em acréscimo de 80 Da no peso molecular de uma proteína, portanto, um acréscimo de até 1,2 kDa na proteína GST-NtSCII poderia ser resultante da adição de grupamentos fosfato na sequência de aminoácidos que codifica NtSCII, por proteínas quinases presentes no extrato protéico nuclear de estigma e estilete. Além disso, outros tipos de modificações pós-traducionais podem eventualmente ter ocorrido sobre a proteína GST-NtSCII justificando o aumento do peso molecular da proteína em questão.

A Tabela 6 apresenta as proteínas identificadas no ensaio de *pull-down*, por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF/MS, e suas respectivas funções biológicas. Como o genoma de *N. tabacum* ainda não está montado, a identificação das proteínas foi feita com base em sequências presentes em bancos de dados, ou com base nos homólogos de outras plantas. Das 24 bandas processadas, as análises sugerem que a banda identificada como número 19, de aproximadamente 80 kDa, seja correspondente a uma proteína quinase, portadora de um domínio PITSLRE, homóloga à proteína humana *galactosyltransferase-associated protein kinase*, (p58/GTA), um importante regulador negativo da progressão do ciclo celular em mamíferos. Esta proteína foi também identificada em *Arabidopsis thaliana*, sendo classificada por Menges *et al.* (2005) como membro de uma nova classe de CDKs de plantas, uma CDKG;2 (At1g67580).

Segundo Leene *et al.* (2010), esta proteína interage com CDKF;1 e com CICLINA-L1, uma ciclina cuja função no ciclo celular ainda permanece desconhecida. Segundo Doonan & Kitsios (2009), a proteína CDKG possivelmente está envolvida na regulação da transcrição e processamento de mRNA, o que sugere um modo alternativo e mais indireto de ação. Em adição ao seu papel na regulação transcricional, também está envolvida na regulação da maquinaria de *splicing* (Trembley *et al.*, 2004). A sequência codificadora do gene homólogo da CDKG;2 de *N. tabacum* foi amplificada e clonada pela aluna de Doutorado Greice Lubini, para permitir a realização de ensaios bioquímicos para confirmação de sua interação com NtSCII.

Tabela 6: Proteínas identificadas por MALDI-TOF/MS após ensaio de *pull-down*, utilizando a proteína recombinante GST-NtSCII como isca e extrato protéico de estigma/estilete de *N. tabacum*, enriquecido com proteínas nucleares, como presas. A função biológica de cada proteína foi inferida com base na anotação da proteína homóloga de *Arabidopsis thaliana*, presente no banco de dados TAIR. *A proteína HEN2 descrita abaixo foi identificada em outro ensaio de *pull-down*, descrito em Strini (2010), após a reanálise dos resultados.

Banda	Proteína Identificada	Função Biológica
05	<i>Transducin/WD40</i>	Transdução de sinal, regulação da tradução para controle do ciclo celular, autofagia e apoptose
09	<i>NAC Domain Protein</i>	Desenvolvimento multicelular, regulação da transcrição, DNA-dependente
09	<i>Calcium/calmodulin dependent protein kinase</i>	Ligação de ATP, ligação a íons de cálcio, atividade quinase de serina/treonina
11	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase MAPK</i>	Transdução de sinal, fosforilação de proteínas do ciclo celular
12	<i>14-3-3 OMEGA (GRF2)</i>	Transdução de sinal, ligação a proteínas fosforiladas, via de sinalização medida por brassinosteróides
12	<i>14-3-3 LAMBDA (GRF6)</i>	Transdução de sinal, ligação a proteínas fosforiladas, via de sinalização medida por brassinosteróides
13	<i>CYCLIN-B1</i>	Regulação do ciclo celular, regulação da fosforilação
14	<i>Cyclin-Dependent Kinase B1</i>	Endoduplicação do DNA, crescimento unidimensional da célula, controle do ciclo celular mitótico
19	<i>Cyclin-Dependent Kinase G</i>	Fosforilação de proteínas, controle do ciclo celular, processamento de RNA
*	<i>HUA ENHANCER 2 (HEN-2)</i>	Helicase de RNA, regulação do desenvolvimento floral, processamento de RNA, <i>splicing</i> de mRNA, ciclo celular, produção de miRNAs envolvidos no silenciamento de genes por miRNAs.

Além da CDKG;2, um membro de outra classe de CDK (CDKB1) e a CICLINA-B1 foram identificados no ensaio de *pull-down*, reforçando a hipótese de que NtSCII participa da regulação do ciclo celular. Outra proteína identificada é uma quinase dependente de cálcio/calmodulina, a qual possivelmente deve fosforilar NtSCII como parte de uma via de sinalização. De forma semelhante, seria possível inferir que uma proteína MAPK poderia transduzir sinais importantes para NtSCII, através da fosforilação de sítios específicos. Uma vez fosforilado, NtSCII pode ser reconhecido pelas proteínas 14-3-3 (GRF2 e GRF6), e a interação destas proteínas com NtSCII seria essencial para a sua correta funcionalidade no controle do ciclo celular e diferenciação do pistilo. Como parte de sua funcionalidade, seria

possível que NtSCI1 atuasse como uma molécula chave na transdução de sinais juntamente com outras proteínas, como a Transducina. Além disso, poderia regular a atividade de fatores de transcrição como NAC, garantindo o correto desenvolvimento do pistilo. A identificação de uma proteína helicase de RNA DExH-box (HEN-2) no ensaio de *pull-down* reforça a teoria do envolvimento de NtSCI1 no processamento de RNAs.

Várias proteínas foram identificadas como GST ou NtSCI1, fato este explicado pela alta sensibilidade da técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF/MS, associada à abundância desta proteína no ensaio. As demais proteínas foram identificadas como proteínas de *E. coli*, e correspondem a artefatos da técnica utilizada, uma vez que certas proteínas podem se ligar inespecificamente à matriz utilizada para imobilização da proteína GST-NtSCI1.

4.2.2 Busca por possíveis parceiros de interação de SCI1 através do *screening* de uma biblioteca de cDNAs em vetor do sistema de duplo-híbrido em levedura

Outra ferramenta molecular capaz de revelar os parceiros de interação de uma proteína específica, quando estes ainda não são conhecidos, ou não existem dados suficientes do funcionamento da mesma, trata-se do *screening* de uma biblioteca de duplo-híbrido em levedura (Y2H). Para isso, foi realizado o *screening* da biblioteca de cDNA descrita no item 4.1.2, utilizando a proteína BD-NtSCI1 como isca.

Para realizar o *screening* da biblioteca de cDNA, foi utilizado o kit *ProQuest Two-Hybrid System with Gateway Technology* (Invitrogen), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante com algumas alterações.

4.2.2.1 Transformação de levedura PJ69-4a com a construção pDEST32-NtSCI1 e teste de auto ativação da isca

Antes do início do *screening*, realizou-se o teste de auto ativação do sistema pela proteína BD-NtSCI1. Para isso, células de levedura PJ69-4a contendo as construções pDEST32-NtSCI1 e o vetor pDEST22 vazio foram plaqueadas em meio seletivo (SC sem leucina, sem triptofano e sem histidina). Após um período de incubação de 48 horas a 30°C, em meio seletivo com concentrações crescentes de 3-Amino-1,2,4-Triazole (0mM, 2,5mM, 5mM, 10mM, 25mM, 50mM) não foi evidenciado crescimento celular em nenhuma das concentrações de 3AT, indicando que a proteína híbrida BD-NtSCI1 e o domínio AD não são

capazes de auto ativar o sistema. Dessa forma, não foi necessário o uso de 3AT durante o *screening*.

4.2.2.2 Análise do fenótipo dos transformantes para os genes repórteres HIS3 e lacZ

Inicialmente, o *screening* da biblioteca utilizando BD-NtSCI1 como isca resultou em 88 clones positivos para o gene repórter HIS3, sendo, portanto capazes de crescer em meio SC não suplementado com histidina. Os clones positivos obtidos foram novamente testados para o gene repórter HIS3 e também para o gene lacZ.

O procedimento para análise do fenótipo dos transformantes para o gene repórter HIS3 resultou em 46 clones positivos, conforme pode ser observado na Figura 22. Até aqui, nenhuma inferência pode ser feita com relação à força de interação dos clones obtidos, devido a não padronização da quantidade de células plaqueadas em cada *spot*. Entretanto, os controles de interação forte e fraca utilizados confirmam a capacidade de crescimento celular nas condições utilizadas.

Figura 22: Imagem obtida no teste de indução do gene repórter HIS3 com os 88 clones iniciais do *screening*. É possível observar que nem todos os clones apresentaram crescimento celular, descartando a hipótese de interação positiva nestes casos. Interações positivas foram identificadas em 46 clones. Controles de interação forte e fraca confirmam a capacidade de crescimento celular nas condições utilizadas, e não foi evidenciado crescimento celular no controle negativo e de auto ativação da isca. Também é nítida a presença de contaminações, exemplificadas em alguns clones das colunas 4 e 5, os quais foram descartados.

O procedimento para análise do fenótipo dos transformantes para o gene repórter *lacZ* resultou em 39 clones positivos (dados não mostrado). Novamente, nenhuma inferência pode ser realizada com relação à força de interação dos clones obtidos, devido a não padronização da quantidade de células plaqueadas em cada *spot*. Entretanto, os controles de interação forte e fraca utilizados confirmam a ativação do gene em questão, mesmo em casos de interações fracas. O aparecimento da coloração azulada nos controles negativo e de auto ativação da isca é sugestivo de que o sistema pode apresentar um nível basal de ativação do gene repórter *lacZ* na cepa utilizada, o que pode ser ajustado através da diminuição do tempo da reação de coloração.

Após a caracterização dos transformantes para os genes repórteres *HIS3* e *lacZ*, dos 88 clones iniciais, 9 não apresentaram crescimento, 15 foram considerados possíveis contaminações, restando 64 clones. Destes, 39 clones (aproximadamente 45% dos clones iniciais) apresentaram ativação dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ* e foram selecionados para a próxima etapa de testes. A inexistência de crescimento celular no controle negativo e de auto ativação da isca, quando em meio sem histidina, indicam a adequada funcionalidade deste ensaio para a identificação dos candidatos à interação.

4.2.2.3 Análise dos DNAs plasmidiais contidos nos clones positivos do *screening*

Os clones de levedura, identificados no *screening* descrito acima, foram cultivados e usados para extração de DNA plasmidial. Este DNA foi introduzido em *E. coli*, gerando colônias transformadas em meio seletivo adequado para selecionar os plasmídeos derivados da biblioteca de cDNAs. De cada clone positivo de levedura foram escolhidas, aleatoriamente, 5-6 colônias de bactérias, para extração do DNA plasmidial e análise por digestão enzimática. Isto decorre do fato que as leveduras podem ser transformadas com mais de um plasmídeo original da biblioteca de cDNAs. A Figura 23 apresenta a imagem de uma das eletroforeses em gel de agarose do DNA extraído de colônias de *E. coli*, quando submetidos a digestão enzimática com as enzimas *XhoI* e *SacI*. Os perfis de digestão distintos, para um mesmo clone original de levedura, confirmam a presença de cDNAs distintos dentro deste. Por exemplo, quando o DNA plasmidial extraído do clone C7 de levedura foi transformado em células de *E. coli*, houve o isolamento das moléculas de DNA entre as colônias de bactérias. No caso do clone C7, a digestão enzimática do DNA de cada colônia de bactéria (C7.1 a C7.5) resultou em três padrões distintos, revelando a presença de pelo menos três cDNAs diferentes dentro

do clone C7 de levedura. Os DNAs de todos os clones bacterianos, que apresentaram perfis de digestão distintos, foram selecionados para sequenciamento.

Figura 23: Imagem da eletroforese em gel de agarose 1% do DNA extraído de 5 colônias de *E. coli*, que foram transformadas com o DNA extraído dos clones positivos de levedura (nesta figura, os clones B8, C7, C9 e E7), quando submetidos a digestão enzimática com as enzimas XhoI e SacI. Os perfis de digestão distintos, para um mesmo clone de levedura, confirmam a presença de cDNAs distintos dentro deste.

4.2.2.4 Ensaios de “re-teste” da interação por Y2H

As sequências dos cDNAs, com diferentes padrões de digestão conforme descrito acima, foram usadas em buscas por similaridade de sequências pelo programa *blast* em bancos de dados. Este procedimento resultou na identificação das proteínas codificadas por estas diversas sequências. A Tabela 7 apresenta uma amostra dos resultados encontrados para os clones obtidos.

Tabela 7: Uma amostra de dados referentes aos clones obtidos através da transformação de células de *E. coli* utilizando o DNA extraído dos clones de levedura. A primeira parte do nome do clone corresponde ao clone original de levedura, positivo para interação com SCII. A segunda parte do nome indica o clone de *E. coli*, que corresponde a um dos diferentes DNAs presentes no clone original. Nesta tabela também é possível observar o resultado do teste de interação após o isolamento dos DNAs plasmidiais, a força da interação e o teste de auto ativação da presa para os casos positivos.

CLONE	IDENTIFICAÇÃO	TESTE INTERAÇÃO	FORÇA	AUTO-ATIVAÇÃO	RESULTADO
A10.4	AT5G62300.2 Ribosomal protein S10p/S20e family protein	negativo			
A11.2	AT1G27430.1 GYF domain-containing protein	negativo			
A11.5	AT5G51280.1 DEAD-box protein abstrakt, putative	POSITIVO			
A11.6	AT3G52050.3 5'-3' exonuclease family protein	negativo			
A2.1	AT5G20620.1 ubiquitin 4	negativo			
A2.2	AT5G14180.1 induced lipase 1				
A2.3	AT4G28500.1 NAC domain containing protein 73	negativo			
A9.1	AT5G19470.1 nudix hydrolase homolog 24	negativo			
B11.1	unknown protein	POSITIVO	média	negativo	interação média
B2.1	AT1G07890.6 ascorbate peroxidase	negativo			
B3.1	unknown protein	POSITIVO			
B8.3	AT5G42300.1 ubiquitin-like protein 5				
B8.5	AT5G51280.1 DEAD-box protein abstrakt, putative	POSITIVO	forte	negativo	interação forte
C1.1	AT4G25580.1 Symbols: CAP160 protein	negativo			
C1.3	AT4G24660.1 homeobox protein 22	POSITIVO	forte	negativo	interação forte
C11.1	AT4G10340.1 light harvesting complex of photosystem II 5				
C11.3	AT5G59850.1 Ribosomal protein S8 family protein	negativo			
C11.5	AT5G51280.1 DEAD-box protein abstrakt, putative	POSITIVO			
C2.1	AT3G04770.1 40s ribosomal protein SA B	negativo			
C7.1	AT5G18280.2 apyrase 2	negativo			
C7.2	AT5G10050.1 NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	negativo			
C7.3	AT3G04770.1 40s ribosomal protein SA B	negativo			
C7.4	AT5G15800.2 SEPALLATA K-box region and MADS-box transcription factor family protein	negativo			
C7.5	ATCG00680.1 photosystem II reaction center protein B	negativo			
C8.1	AT4G35090.2 catalase 2				
C8.3	AT5G51280.1 DEAD-box protein abstrakt	POSITIVO			
C9.2	AT2G01100.3 unknown protein;	negativo			
C9.5	AT5G44290.4 CKL5 - Protein kinase superfamily protein	negativo			
D2.2	ATMG00020.1 mitochondrial 26S ribosomal RNA protein				
D2.3	AT1G01620.1 plasma membrane intrinsic protein				

Após a identificação das sequências, ensaios de re-teste em Y2H foram realizados com os plasmídios isolados. Estes testes resultaram na identificação correta de alguns parceiros de interação com NtSCII. Estes resultados encontram-se sumarizados na Tabela 7 e Figura 24. Como exemplo, na Tabela 7, pode-se observar o resultado positivo para a interação de NtSCII com o clone B8.5, identificado como uma proteína DEAD-BOX, que corresponde ao clone número 5 de *E. coli*, derivado do clone B8 de levedura. Neste caso, a comparação do fenótipo das células para os genes repórteres HIS3 e lacZ com controles específicos resultou

na identificação de uma interação forte e o teste de auto ativação da presa foi negativa, caracterizando um resultado positivo verdadeiro (Figura 24).

Figura 24: Resumo dos dados referente ao *screening* da biblioteca de cDNAs de estigmas/estiletes de *N. tabacum*, no sistema de duplo-híbrido, utilizando BD-NtSCI1 como isca. Na primeira coluna estão representados os fenótipos dos clones positivos para o gene repórter *HIS3* e a segunda coluna para o gene repórter *lacZ*, após o tratamento com X-gal.

Na Figura 24, na primeira coluna estão representados os fenótipos dos clones positivos para o gene repórter *HIS3*, mostrando que em todos os casos as células são capazes de crescer em meio não suplementado com histidina, de maneira semelhante ao controle positivo. A segunda coluna mostra a coloração azulada presente nos clones positivos após o

tratamento com X-gal, mostrando que a interação com NtSCI1 ativa o gene repórter lacZ, assim como o observado no controle positivo.

Dentre os parceiros de interação com NtSCI1, houve a identificação da sequência codificadora de uma proteína DEAD-BOX (homóloga de AT5G51280.1 de *Arabidopsis* - RNA helicase DEAD-BOX 35) em 10 dos 39 clones originais, representando cerca de 25,6% dos candidatos do *screening*. Neste caso, a alta frequência deste clone já era indicativa de se tratar de um parceiro positivo de interação com NtSCI1 e o clone D6.4 foi escolhido para os testes de confirmação da interação. Novos ensaios de transformação de leveduras, incluindo ensaios de auto ativação da isca (BD-NtSCI1) e da presa (AD-D6.4) foram conduzidos. A ativação do gene repórter HIS3 somente foi evidenciado em células que expressavam BD-NtSCI1 e AD-D6.4, confirmando a interação da proteína codificada pelo clone D6.4 com NtSCI1. Nenhum crescimento celular foi observado em células que expressavam BD-NtSCI1 + AD ou BD + AD-D6.4, confirmando que as proteínas em questão não eram capazes de auto ativar o sistema de Y2H quando isoladas. Proteínas DEAD-BOX são helicases de RNA envolvidas em diferentes passos do metabolismo do RNA. No núcleo, estes processos incluem a biogênese do ribossomo, transcrição e *splicing* de mRNA (Linder *et al.*, 2011).

As proteínas DEAD-box representam a maior família de helicases de RNA e são responsáveis pela regulação de diversos processos que envolvem o RNA, da transcrição à degradação (Cordin *et al.*, 2006). Todos os membros da família DEAD-box possuem um motivo conservado de oito aminoácidos, incluindo a sequência Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD) que inspirou o nome do grupo. Comparações das sequências de aminoácidos levou à identificação das famílias DEAH- e DExH-box que, junto à família DEAD-box, formam a superfamília II de helicases (Gorbalenya *et al.*, 1989; Linder *et al.*, 1989).

Em plantas, as famílias de helicases de RNA são grandes e diversificadas. O genoma de *Arabidopsis* codifica um total de 113 helicases, sendo 58 delas classificadas como possíveis proteínas DEAD-box, entretanto, apenas algumas foram analisadas experimentalmente (Linder & Owtrrim, 2009; Umate *et al.*, 2010). Inicialmente, genes codificadores das proteínas DEAD-box eIF-4A (fatores de iniciação da transcrição) foram identificados como estando diferencialmente expressos em tabaco (Owtrrim *et al.*, 1994). Em *Arabidopsis*, a proteína DEAD-box AtRH36 está envolvida na divisão mitótica durante a gametogênese feminina e possui um papel importante na biogênese do RNA ribossômico (Huang *et al.*, 2010). A proteína CAF (CARPEL FACTORY), homóloga à proteína Dicer, foi caracterizada como tendo um domínio N-terminal do tipo helicase DExH/DEAD-box e um domínio C-terminal do tipo RNaseIII. Esta helicase está aparentemente envolvida no

processamento do RNA e na regulação da divisão celular no meristema floral (Jacobsen, *et al.*, 1999), bem como no metabolismo de miRNAs (Park *et al.*, 2002). A análise de mutantes *esp* (*enhanced silencing phenotype*) de *Arabidopsis* revelaram a associação de uma putativa DEAH RNA helicase com o processamento e silenciamento do RNA no controle do desenvolvimento floral (Herr *et al.*, 2006). A putativa helicase DEVH-box, codificada pelo gene *ISE2*, está envolvida no silenciamento gênico pós-transcricional durante a embriogênese em *Arabidopsis* (Kobayashi *et al.*, 2007). Genes codificadores de diversas DEAD-box foram identificados como essenciais ao desenvolvimento correto em *Arabidopsis* (Schmidt *et al.*, 2011) e *Brachypodium* (Vain *et al.*, 2011), enquanto outros estão aparentemente envolvidos em respostas a diferentes estresses abióticos (Kim *et al.*, 2008; Koroleva *et al.*, 2009).

As helicases da família DEAD-box possuem diversas atividades enzimáticas caracterizadas, incluindo atividade ATPásica dependente ou estimulada por RNA e atividade de desenrolamento do RNA dupla fita (dsRNA). Tipicamente, as helicases possuem uma série de motivos envolvidos nos processos de ligação e hidrólise do ATP, que é utilizada para mediar uma variedade de rearranjos estruturais do RNA, incluindo a dissociação de complexos RNA-proteína. Embora as helicases de RNA desempenhem funções muito específicas *in vivo*, as atividades enzimáticas destas proteínas são dificilmente detectadas *in vitro*, sugerindo que tais proteínas possam requerer proteínas acessórias ou cofatores (Silverman *et al.*, 2003; Rocak & Linder, 2004). Uma hipótese é a de que NtSCI1 possa atuar como uma proteína acessória ou cofator para a DEAD-BOX, caracterizando-se assim como um membro importante do complexo proteico necessário para a correta funcionalidade desta helicase de RNA nos processos citados anteriormente. Também é possível que, ao ser fosforilado em domínios específicos por outras proteínas, NtSCI1 possa realizar a transdução de sinais para esta DEAD-BOX, ativando, desligando ou alterando sua(s) funcionalidade(s).

Outro parceiro de interação com NtSCI1, revelado pelo *screening* da biblioteca de duplo-híbrido, foi o clone F5.3. Análises *in silico* identificaram o clone F5.3 como portador do cDNA codificador de uma proteína de *Solanum tuberosum* (código de acesso XM_006352452) homóloga de um fator regulador de *splicing*, portador de um domínio SURP. Este domínio existiu em um ancestral comum de todos os eucariotos e é conservado, aparentemente de forma exclusiva, na contemporânea superfamília SURP, constituída por reguladores de *splicing* do tipo SWAP e fatores de *splicing* constitutivos *prp21* (Spikes *et al.*, 1994). Evidências indicam que ambas as famílias de proteínas portadoras do módulo SURP atuem na mesma etapa (ou muito similar) da montagem do pré-spliceossomo (Spikes *et al.*, 1994).

O domínio SWAP é derivado do termo *Suppressor of White-APricot*, um regulador de *splicing* descrito primeiramente no organismo modelo *Drosophila melanogaster*, e encontrado em proteínas reguladoras de *splicing* (Denhez & Lafyatis, 1994; Spikes *et al.*, 1994). Outro domínio presente nesta proteína é o DRY-EERY, constituído de dois motivos conservados (DRY e EERY) que parecem ser sítios para o *splicing* alternativo do próprio mRNA de SWAP (autoregulação).

Apesar da interação entre NtSCII e este fator de *splicing* ainda não ser compreendida, ela sugere o envolvimento de NtSCII no processamento de RNAs. Uma hipótese bastante interessante seria que NtSCII, juntamente com esta proteína, modulasse o processamento de pré-mRNAs codificadores de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular. Neste caso, NtSCII poderia atuar de 2 maneiras, dependendo dos pré-mRNAs que são processados por este fator de *splicing*. Num primeiro cenário, considerando que o fator de *splicing* em questão teria como alvo pré-mRNAs codificadores de proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular, NtSCII atuaria inibindo a atividade desta proteína, o que ocasionaria um déficit na produção dos mRNAs maduros destas proteínas, levando à inibição do processo mitótico. Alternativamente, caso os pré-mRNAs alvos deste fator de *splicing* fossem codificadores de reguladores negativos do ciclo celular, NtSCII atuaria ativando esta proteína, o que resultaria na correta produção de mRNAs maduros destes reguladores, levando à inibição do ciclo celular.

As sequências correspondentes aos clones B11.1 e B3.1 (5,1% dos clones) foram identificadas como um fator de transcrição da família *STOREKEEPER* (*STK*), com função ainda desconhecida, e aparentemente exclusivo da família *Solanaceae*. Tal conclusão se deve ao fato de sequências homólogas apenas serem encontradas no genoma de tomate (*Solanum lycopersicum*) e batata (*Solanum tuberosum*) e *Nicotiana benthamiana*, todos membros da família *Solanaceae*. Buscas em bancos de dados por sequências homólogas em outros organismos não resultaram em nenhum resultado significativo, nem mesmo em bancos de dados de organismos que apresentam genoma sequenciado, como *Arabidopsis thaliana*.

Ao submeter a sequência parcial do clone B11.1, para buscas de similaridade no genoma de batata, utilizando a ferramenta *tblastx*, o programa retorna o transcrito PGSC0003DMT400079215 como sequência de melhor *score* (Evalue = 4,6 e⁻⁴⁹). Este transcrito está anotado como codificador de um regulador de transcrição. A mesma anotação é obtida ao submeter a sequência para buscas de similaridade no genoma de tomate. No genoma de *N. benthamiana*, a ferramenta *tblastx* retorna como melhor resultado novamente uma sequência codificadora de um regulador de transcrição relacionado à proteína

STOREKEEPER de ligação ao DNA (*storekeeper DNA-binding protein-related transcriptional regulator*). Proteínas *STK* são definidas como uma nova classe de proteínas de ligação ao DNA, que são específicas de plantas (Zourelidou *et al.*, 2002). Neste trabalho, os autores apresentam a caracterização inicial da proteína que definiu esta família, a qual é capaz de reconhecer especificamente o motivo B-box, *in vitro* e *in vivo*, dentro da sequência promotora do gene da patatina e controlar sua expressão em tubérculos de batata.

A análise *in silico* da sequência parcial do clone B11.1 revelou a presença de um domínio DUF573 (*Domain of Unknown Function 573*) na proteína em questão. Este domínio vem sendo encontrado em uma série de proteínas cuja função ainda é desconhecida (família DUF). Apenas recentemente, uma única proteína de plantas, portadora do domínio DUF573, foi caracterizada por He *et al* (2013). Os autores descrevem que esta proteína (*CentO-binding protein* - Os02g0288200 de *Oryza sativa*) é capaz de se ligar, *in vitro*, ao DNA satélite centrômero, e o domínio DUF573 se mostrou ser responsável por esta ligação.

As sequências correspondentes aos clones C1.3 e G8.2 (5,1% dos clones) foram identificadas como portadores de uma sequência codificadora de um fator de transcrição similar à proteína *homeobox ZF-HD* de *Solanum tuberosum* (código de acesso XM_006346684), a qual é homóloga da proteína ATHB22 - *homeobox 22* (AT4G24660.1) de *Arabidopsis thaliana*. Análises *in silico* revelaram a presença de um domínio ZF-HD (*Zinc Finger HomeoDomain*) na região N-terminal desta proteína, o qual é responsável pela formação de homo e heterodímeros entre proteínas *homeobox*. Na região C-terminal da proteína é encontrado o domínio *homeo_ZF_HD* (domínio *homeobox* da classe ZF-HD). O domínio HD (*HomeoDomain*), composto por 60 aminoácidos, é encontrado em fatores de transcrição de diversos organismos como humanos, *Drosophila* e plantas, onde desempenham importantes funções no desenvolvimento (Tan & Irish, 2006). Entretanto, proteínas da família ZF-HD foram identificadas apenas em plantas, onde acredita-se que desempenhem papéis específicos. Análises da expressão de proteínas ZF-HD, realizadas por Tan & Irish (2006), mostram que estas proteínas são expressas predominantemente ou exclusivamente em tecidos florais. Altos níveis de expressão de ATHB22 e ATHB29 foram encontrados em flores tardias e sementes, sugerindo que estas proteínas desempenham um papel regulatório importante no desenvolvimento de flores e sementes.

Recentemente, Bueso e colaboradores (2014) observaram um considerável decréscimo na longevidade de sementes do duplo mutante ATHB22 e ATHB25, provando que estas proteínas são necessárias para a sobrevivência do embrião. Ensaios de duplo-híbrido indicam que além de ser capaz de formar homodímeros, ATHB22 forma heterodímeros com

ATHB21, ATHB23, ATHB24, ATHB25, ATHB28, ATHB29, ATHB30, ATHB31, ATHB33 e ATHB34 (Tan & Irish, 2006), o que sugere o envolvimento deste fator de transcrição numa complexa rede regulatória da transcrição de diversos genes. Os autores acreditam que a heterodimerização de diferentes fatores promova um melhor controle na especificidade da ligação destes ao DNA, levando ao maior refinamento na regulação da transcrição gênica.

Ensaio de imunoprecipitação de cromatina (*ChIP* – *Chromatin Immunoprecipitation*) utilizando a proteína homóloga de ATHB22 de *N. tabacum* poderiam indicar os possíveis genes controlados por esta proteína. A interação de NtSCI1 com este fator de transcrição sugere que estas proteínas atuem no controle da transcrição gênica, promovendo a ativação/inativação de genes nos tecidos do estigma/estilete, onde NtSCI1 é preferencialmente expresso, em processos relacionados ao desenvolvimento floral.

O produto protéico codificado pelo cDNA presente em outros dois clones, F3.3 e H6.1 (5,1% dos clones), foram identificados como um fator de regulação geral 6 (*G-box Regulating Factor 6* – *GRF6* - AT5G10450.3), também denominado 14-3-3 λ em *Arabidopsis* e 14-3-3D2 em *N. tabacum*. Proteínas 14-3-3 correspondem a uma classe ubíqua de proteínas regulatórias, capazes de reconhecer resíduos de serina/treonina fosforilados e se ligar aos mesmos. A interação entre uma proteína fosforilada e a 14-3-3 leva a mudanças na conformação final da primeira, importantes para a correta atividade da mesma (Chevalier *et al.*, 2009). O fato de NtSCI1 possuir 15 sítios putativos de fosforilação sugere que, ao ser fosforilado por outra proteína, seja reconhecido por esta 14-3-3, interagindo com a mesma e possivelmente alterando sua conformação e/ou atividade.

Em mamíferos, proteínas 14-3-3 desempenham funções particularmente importantes no controle da progressão do ciclo celular e resposta a danos no DNA (Gardino & Yaffe, 2011; Reinhardt & Yaffe, 2013). Quinases de *checkpoints* usam proteínas 14-3-3 para estabelecer e manter o ciclo celular no *checkpoint* G2 por meio da marcação, por fosforilação, das proteínas CDC25 e WEE1 (Gardino & Yaffe, 2011). Durante os *checkpoints* do ciclo celular, a decisão de progressão ou parada do ciclo é um evento molecular orquestrado basicamente por proteínas quinases de *checkpoints*, que desempenham sua função de transdução de sinais através da fosforilação de outras proteínas. Dependendo do sítio que sofreu fosforilação, a proteína pode ser levada a um estado de ativação ou inativação. WEE1 é uma quinase alvo de quinases de *checkpoints*, identificada em *Schizosaccharomyces pombe*, e capaz de fosforilar de maneira inibitória o resíduo Tyr-15 (Tirosina 15) da proteína CDC2 (*Cell Division Cycle protein 2*) durante o *checkpoint* G2/M, inibindo a progressão do ciclo celular (Russell & Nurse, 1986). Este cenário é revertido pela remoção deste grupamento

fosfato pela proteína CDC25, que atua como uma fosfatase, responsável por decidir se a célula avança ou não de G2 para a mitose (O'Farrell, 2001).

Estudos recentes mostram que a participação das 14-3-3 no controle do ciclo celular é preservada em células de plantas. Uma vez que o homólogo da proteína CDC25 ainda não foi identificado em plantas, estudos vêm sendo realizados utilizando-se a proteína de *S. pombe*. Ensaios de duplo-híbrido mostraram que a proteína SpCDC25 é capaz de interagir com as proteínas 14-3-3 κ (GRF8), 14-3-3 λ (GRF6) e 14-3-3 ω (GRF2) de *Arabidopsis* (Sorrell *et al.*, 2003). Estas três proteínas foram superexpressas, independentemente, no mutante *rad24* (mutante para proteínas 14-3-3) de *S. pombe*, e células transformadas com 14-3-3 ω (GRF2) mostraram recuperação do fenótipo deste mutante, sendo capazes de restaurar os efeitos de danos ao DNA e os *checkpoints* de replicação do DNA (Sorrell *et al.*, 2003).

Ensaios de duplo-híbrido também foram realizados a fim de investigar a interação de proteínas 14-3-3 com a quinase WEE1 de *Arabidopsis*. Como resultado, foi observada a interação de AtWEE1 com as seguintes proteínas 14-3-3 (GF14 ω , GF14 λ , GF14 κ , GF14 χ , GF14 ϕ , GF14 ψ , GF14 ν e GF14 υ) (Grønlund *et al.*, 2009). Estes resultados sugerem que a atuação da proteína AtWEE1 no ciclo celular é dependente da interação das mesmas com proteínas 14-3-3. A interação das proteínas SpCDC25 e AtWEE1 com At14-3-3 λ (GRF6) é particularmente interessante. O fato de NtSCII interagir com a 14-3-3, homóloga de GRF6, reforça a hipótese da participação de NtSCII no controle do ciclo celular.

A heterogeneidade e o grande número de proteínas que são reconhecidas por proteínas 14-3-3 permitiu a predição de dois motivos de reconhecimento, RSx[pS/pT]xP e Rxxx[pS/pT]xP, em proteínas alvos de 14-3-3 de mamíferos e *S. pombe* (Yaffe *et al.*, 1997), onde x pode ser qualquer aminoácido e pS/pT são resíduos fosforilados de serina ou treonina, respectivamente. A análise *in silico* da sequência de aminoácidos da proteína SCII de *N. tabacum* (Figura 25), mostra a presença de um domínio de reconhecimento de proteínas 14-3-3 que se sobrepõe a um sítio de fosforilação (pS¹⁷) predito pela ferramenta MotifScan. Bertolino (2014) realizou análises utilizando outras ferramentas, e encontrou dois domínios de reconhecimento de proteínas 14-3-3 na sequência de NtSCII. O primeiro coincide com a pS¹⁷ e o segundo aponta para dois putativos sítios de fosforilação pS⁵⁴ ou pS⁵⁶. Desta forma, é possível que a interação de NtSCII e Nt14-3-3D2 ocorra devido ao reconhecimento do resíduo pS¹⁷ e pS⁵⁴ ou pS⁵⁶ de NtSCII.

Figura 25: Análise *in silico* da sequência de aminoácidos da proteína NtSCI1, descrita por DePaoli *et al.* (2011). Na imagem, observa-se dois putativos domínios de interação com ciclinas (realçados em cinza) e 11 putativos sítios de fosforilação, encontrados utilizando-se a ferramenta MotifScan. Um motivo putativo de reconhecimento por proteínas 14-3-3 (Grønlund *et al.*, 2009) aparece realçado em amarelo. Resíduos de serina fosforilados aparecem destacados em vermelho (pS¹⁸ e pS⁵⁴ ou pS⁵⁶) e representam sítios putativos de interação entre NtSCI1 e a proteína Nt14-3-3D2, segundo Bertolino (2014).

A interação entre NtSCI1 e o produto protéico do clone F6.2 foi confirmada (interação fraca) e mostra a interação entre NtSCI1 e uma proteína putativa de *Arabidopsis thaliana* (AT3G47280), com função ainda desconhecida e muito semelhante a uma transposase da família MuDR (*Mutator-like*). Segundo Makarova *et al.* (2002) transposases da família MuDR (maior família de elementos móveis em plantas) contém o domínio SWIM. Este domínio seria importante para a ligação desta proteína em sequências específicas do DNA, possivelmente pelo reconhecimento de características estruturais específicas. Entretanto, existem relatos de funcionalidades diferentes para estas proteínas. Comparações de sequências mostraram que a proteína FAR1 é uma versão divergente, e aparentemente não transponível, da transposase MuDR que pode atuar como um fator de transcrição (Marakova *et al.*, 2002). Considerando o que se conhece até o momento sobre o papel de NtSCI1 no desenvolvimento do estigma/estilete, a possível interação entre NtSCI1 e uma proteína

semelhante a proteínas que se ligam a DNA é interessante de ser investigada em maiores detalhes.

Finalmente, o último clone positivo encontrado no *screening* foi o H6.5. O sequenciamento do cDNA presente neste clone revelou que o mesmo é codificador da isoforma 2S da proteína quinase de adenosina (NtADK2S – *ADenosine Kinase 2S isoform*) descrita em *N. tabacum* (código de acesso AY695053), envolvida com o metabolismo de citocininas. Citocininas foram descobertas como fatores promotores de divisão celular em culturas de tecidos de tabaco (Miller *et al.*, 1955) e são derivadas da base nitrogenada adenina. Um dos principais passos no metabolismo das citocininas é a conversão de bases livres e ribosídeos, presentes em sua molécula, para nucleotídeos (Kwade *et al.*, 2005), sendo estes últimos propostos como uma forma inativa da citocinina (Kaminek, 1992). Uma vez que a conversão de nucleosídeos para nucleotídeos ocorre mediante a adição de um grupamento fosfato no nucleosídeo, é provável que a fosforilação seja uma via metabólica que as plantas utilizam para promover níveis adequados de citocinina ativa, essenciais para o seu correto crescimento e desenvolvimento (Kwade *et al.*, 2005). Proteínas ADK - quinases de adenosina são enzimas com atividade 5'fosfotransferase, que apresentam papel fundamental na regulação do nível intracelular de adenosina (Kwade *et al.*, 2005), por meio da conversão de ribosídeos de citocinina em seus respectivos nucleotídeos (Kaminek, 1992, Mok & Mok, 2001). Dessa forma, proteínas ADK seriam responsáveis pela inativação de citocininas. Os resultados apresentados por Kwade *et al* (2005) sugerem que a proteína NtADK2S pode atuar especificamente no *checkpoint* G2-M do ciclo celular, reduzindo rapidamente a quantidade de citocininas ativas, promovendo níveis basais e controlando a progressão do ciclo celular.

Em *Arabidopsis*, raízes e folhas de plantas deficientes em ADK revelaram divisão celular irregular, com diminuição do tamanho e aumento da abundância das células nas folhas (Schoor *et al.*, 2011). Segundo os autores, a análise dos padrões de expressão dos repórteres *cyclinB1;1::β-glucuronidase* e *ArabidopsisResponseRegulator5::β-glucuronidase* nestas plantas mostrou ser consistente com a alteração do ciclo celular e aumento da atividade de citocininas, respectivamente. Estes resultados não apenas provam que a ADKs realizam, *in vivo*, a interconversão de citocininas ativas para inativas por meio da fosforilação de seus ribosídeos, como sugerem uma relação entre esta interconversão e a regulação dos processos de crescimento e desenvolvimento da planta.

Considerando que a interação entre NtSCI1 e NtADK2S seja caracterizada pela ativação de NtADK2S por NtSCI1, a superexpressão de NtSCI1 levaria a um estado ativo de NtADK2S, o que ocasionaria um aumento na taxa de interconversão de citocininas ativas para

inativas no *checkpoint* G2-M, o que consequentemente resultaria em uma inibição da progressão do ciclo celular, fortalecendo a hipótese de NtSCI1 se tratar de um inibidor de ciclo celular.

Considerando a lógica e funcionalidade do sistema de duplo-híbrido, duas considerações devem ser feitas. A primeira consiste na possibilidade de ocorrência de falsos positivos, o que é, em parte, corrigido com a realização de testes de auto ativação do sistema pela isca (NtSCI1) e presas, separadamente. O teste de auto ativação das presas foi negativo para todas as interações descritas anteriormente (dados não mostrados), comprovando que a ativação do sistema é única e exclusivamente devida à interação entre BD-NtSCI1 e AD-presas. Mesmo assim, a literatura exige a realização de testes para confirmação da interação *in vivo* e *in vitro*. Para testar a interação *in vivo*, foi escolhida a técnica de BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*) e para testar a interação *in vitro*, a técnica de co-imunoprecipitação.

A segunda consideração consiste na característica da técnica de duplo-híbrido, de reportar apenas interações diretas, que não necessitem de proteínas acessórias, cofatores ou outros complexos proteicos. Para encontrar os parceiros de interação de NtSCI1 que necessitam de outras proteínas, foi realizado um ensaio de *pull-down* utilizando-se um extrato proteico nuclear de estigma e estilete.

4.3 Confirmação da interação de NtSCI1 com as proteínas obtidas no ensaio de *pull-down* e no *screening* da biblioteca de duplo híbrido

Para confirmar a interação de NtSCI1 com seus possíveis parceiros, identificados no ensaio de *pull-down* e no *screening* da biblioteca de duplo-híbrido, testes complementares foram realizados, utilizando técnicas bioquímicas de investigação de interação proteína-proteína, como duplo-híbrido, BiFC e/ou Co-Imunoprecipitação.

4.3.1 Confirmação da interação de NtSCI1 com as proteínas identificadas no ensaio de *pull-down*

Para confirmação da interação de NtSCI1 com as proteínas identificadas no ensaio de *pull-down*, procedeu-se à obtenção da sequência codificadora e clonagem das mesmas em vetores de duplo-híbrido e/ou BiFC.

A proteína CDPK encontrada mostrou ser homóloga à proteína CDPK1 de *Arabidopsis*. A amplificação da CDS e clonagem no vetor pDEST22 foram realizadas com auxílio das alunas Tamiris Tinti Volcean e Lúcia Lopes, respectivamente. Devido a existência de várias CDPKs e a grande similaridade entre as mesmas, a correta identificação do ortólogo de *N. tabacum* foi um processo bastante difícil, assim como o desenho de *primers* para amplificação de sua sequência codificadora. Utilizando *primers* degenerados foram obtidas as sequências de duas CDPKs. Até o presente momento, foi testada a interação de NtSCI1 com uma destas CDPKs (NtCDPK9), cuja análise de semelhança de sequências indica ser a proteína homóloga de AtCDPK1. A interação entre BD-NtSCI1 e AD-NtCDPK9 foi testada em leveduras pela técnica de duplo-híbrido. Na Figura 26 é mostrado que não houve crescimento celular em meio não suplementado com histidina, mesmo após 10 dias de ensaio, o que caracteriza um resultado negativo de interação entre NtSCI1 e NtCDPK9.

Dentre as proteínas identificadas no ensaio de *pull-down*, apenas duas, *NAC Domain Protein* e *Transducin/WD40* ainda não foram testadas para confirmação da interação das mesmas com NtSCI1. Entretanto, a amplificação da sequência codificadora e clonagem das mesmas estão em andamento e fazem parte do trabalho de outros membros do laboratório.

A interação entre as proteínas NtSCI1 e Nt14-3-3A (GRF2 de *Arabidopsis*) foi testada pela técnica de BiFC pela mestrandia Lígia T. Bertolino. Como resultado, a interação entre estas proteínas foi observada no núcleo de células foliares de *N. benthamiana* (Bertolino, 2014). Entretanto, ensaios de duplo-híbrido foram negativos para o teste de interação entre estas proteínas (Figura 26), sugerindo que outras proteínas sejam necessárias para esta interação, ou que a interação de NtSCI1 ocorra com o heterodímero de Nt14-3-3A e Nt14-3-3D2. A interação de NtSCI1 com proteínas 14-3-3 é descrito em Strini *et al.* (em preparação) anexado a este trabalho. A interação entre NtSCI1 e Nt14-3-3D2 (GRF6 de *Arabidopsis*) encontra-se descrita no item 4.3.2.

Especificamente, a CICLINAB1 identificada no ensaio de *pull-down* foi a CICLINA B1;5 de *Oryza sativa*. Apesar do homólogo desta proteína ter sido identificado como a CICLINA B1;2 de *Arabidopsis* (AT5G06150), buscas no genoma de batata e tomate revelaram não existir uma CICLINAB1;2 em Solanáceas. Na verdade, nesta família, o homólogo da CICLINA B1;2 de *Arabidopsis* e CICLINA B1;5 de *Oryza sativa* seria a CICLINA B1;1. Buscas no banco de dados do NCBI revelaram que a sequência codificadora desta proteína em *N. tabacum* já estava descrita (código de acesso Z37978), permitindo o desenho de *primers* específicos para sua amplificação por PCR, a partir de cDNAs. Ensaios

de BiFC e duplo-híbrido (Figura 26) foram conduzidos e revelaram que não há interação física entre as proteínas NtSCI1 e NtCICLINAB1;1.

Ciclinas são proteínas que recebem este nome devido ao comportamento característico de apresentar ciclos de síntese e degradação em momentos específicos do ciclo celular. A degradação destas proteínas durante o ciclo celular ocorre via sistema ubiquitina-proteassomo, capaz de reconhecer uma pequena sequência, altamente conservada, na extremidade N-terminal da proteína a ser degradada. Este domínio, denominado D-BOX (*Destruction-BOX*), foi determinado primeiramente nas sequências das ciclinas do tipo A e B de tabaco, e definido como sendo RxxLxx(L/I)xN (Bush *et al.* 1997, Genschik *et al.*, 1998), onde R e L são resíduos altamente conservados e X representa qualquer aminoácido.

Foi proposto que o domínio D-box, consiste em um sítio de reconhecimento para o sistema ubiquitina-proteassomo conduzir estas proteínas à degradação. Genschik *et al* (1998) observaram que estes domínios eram importantes para a proteólise, uma vez que ciclinas A e B fusionadas a proteína fluorescente GFP desapareciam em fases específicas do ciclo celular e a deleção do domínio D-Box revertia este efeito, conferindo maior estabilidade para estas proteínas. O papel do domínio D-Box também foi confirmado por Yang *et al.* (2013), que fusionaram este domínio a proteínas fluorescentes e observaram a degradação das mesmas durante o ciclo celular.

Figura 26: Ensaios de duplo híbrido realizados para confirmação da interação de NtSCI1 com as seguintes proteínas: CDPK, CICLINAB1;1, CICLINAB1;1DDB, CICLINA-L1, CICLINA-RELATED e CICLINA-RELATED-DDB. Em nenhum dos casos foi observado crescimento celular em meio não suplementado com histidina, mostrando não haver ativação do gene repórter HIS3.

Visando aumentar a estabilidade da proteína NtCICLINAB1;1 nos ensaios de BiFC e duplo-híbrido, realizou-se a deleção do domínio D-Box na sequência codificadora desta proteína. A análise *in silico* da sequência levou ao reconhecimento do domínio D-Box e ao desenho de um *primer* específico que permitiu a deleção deste domínio por PCR. A sequência obtida foi denominada NtCICLINAB1;1-DDB, e apesar do aumento da estabilidade da proteína, os resultados dos ensaios de BiFC e duplo-híbrido para a interação entre NtSCI1 e NtCICLINAB1;1-DDB foram novamente negativos (Figura 26).

No ensaio de *pull-down* foram identificados peptídeos que correspondem a proteínas da família CDKB1. Em *N. tabacum* existem duas sequências, descritas como NtCDKB1;1 e NtCDKB1;2, que foram obtidas por PCR a partir de cDNAs, utilizando-se *primers* específicos. Os ensaios *in vivo* de BiFC, realizados em folhas de *N. benthamiana* foram negativos, mostrando que a proteína NtSCI1 não interage com as proteínas NtCDKB1;1 e nem com NtCDKB1;2 (dados não mostrados).

Nove peptídeos permitiram a identificação da proteína CDK10/11 de *Ricinus communis*. A busca pela proteína homóloga de Arabidopsis revelou se tratar da proteína CDKG;2. Como a sequência codificadora desta proteína em *N. tabacum* ainda não se encontra descrita, foram realizadas buscas em bancos de dados para identificação de sequências, mesmo que parciais, da mesma. Todo processo de busca em bancos de dados, análise *in silico* da sequência, construção de *primers*, amplificação por PCR e clonagem foi realizado pela doutoranda Greice Lubini, e encontra-se descrito em Lubini (2012).

Durante o ensaio de BiFC, a fluorescência da proteína GFP, restaurada pela interação entre as proteínas NtSCI1-hGFP (proteína NtSCI1 com o fragmento *head* da proteína GFP fusionado à sua extremidade C-terminal) e NtCDKG-tGFP (proteína NtCDKG;2 com o fragmento *tail* da proteína GFP fusionado à sua extremidade C-terminal), foi observada no núcleo das células foliares de *N. benthamiana* (Figura 27). Apesar da marcação com DAPI não ter sido eficiente, o padrão de fluorescência da GFP, restaurada pela interação entre as proteínas em estudo, mostrou-se bastante semelhante ao padrão de localização subcelular de NtSCI1, observado por DePaoli *et al.* (2011). Nota-se que o padrão de fluorescência não aparece de forma uniforme no núcleo, mas sim de forma compartimentada, assemelhando-se a corpúsculos nucleares, como o Nucléolo.

Figura 27: Ensaio de BiFC da interação de NtSCI1-hGFP com NtCDKG;2-tGFP em folhas de *N. benthamiana*. As imagens de microscopia de fluorescência mostram células epidérmicas, que foram transformadas com a combinação das construções que codificam as proteínas híbridas indicadas na imagem. hGFP e tGFP são os fragmentos contendo os resíduos de aminoácidos 1-149 e 150-238 da proteína eGFP, respectivamente. Imagens obtidas em microscopio de fluorescência invertido Observer Z1; AxioVision 4.8.

Buscando confirmar a interação da proteína NtSCI1 com NtCDKG;2 por uma terceira técnica, a sequência codificadora de NtCDKG;2 foi transferida para os vetores pDEST22 e pDEST32, permitindo a realização de ensaios de duplo-híbrido. Os ensaios foram realizados nos dois sentidos, ou seja, foi testada a interação entre BD-NtSCI1 e AD-NtCDKG;2 e também entre BD-NtCDKG;2 e AD-NtSCI1 (Figura 28). Nos dois casos o resultado de interação entre estas duas proteínas foi negativo. Este resultado de interação negativa, apesar de ter sido positiva nos experimentos de BiFC e *pull-down*, poderia ser explicado por uma interação indireta entre NtSCI1 e NtCDKG;2. Como mencionado anteriormente, análises *in silico*, realizadas por DePaoli *et al* (2011), mostraram um sítio putativo de interação com ciclina na sequência de NtSCI1, sugerindo que a putativa interação com o complexo CDK-ciclina ocorra através da ciclina. Como o ensaio de duplo-híbrido é realizado em células de leveduras, acredita-se que evidencie apenas interações diretas entre proteínas e, portanto, não seria capaz de detectar a interação indireta de NtSCI1 com a NtCDKG;2.

Figura 28: Ensaios de duplo-híbrido realizados para confirmação da interação de NtSCI1 com a proteína NtCDKG;2. Os ensaios foram realizados nos dois sentidos, ou seja, foi testada a interação entre BD-NtSCI1 e AD-NtCDKG;2 e também entre BD-NtCDKG;2 e AD-NtSCI1. Em nenhum dos casos foi observado crescimento celular em meio não suplementado com histidina, mostrando não haver ativação do gene repórter HIS3.

Como nenhuma ciclina foi encontrada nos ensaios de interação com NtSCI1, foi necessário procurar na literatura informações sobre qual ciclina atuaria como subunidade regulatória de AtCDKG;2. Ensaios de TAP (*Tandem Affinity Purification*) realizados por Van Leene *et al.* (2010) utilizando a proteína AtCDKG;2 como isca mostraram a presença de uma ciclina (AtCICLINAL;1) dentre os complexos proteicos eluídos. Desta forma, foi proposto que AtCICLINAL-L1 seria a putativa subunidade regulatória de AtCDKG;2.

A sequência codificadora da proteína homóloga de AtCICLINAL-L1 de *N. tabacum* foi amplificada e clonada em vetores específicos, para que testes de interação com NtSCI1 pudessem ser conduzidos. Os resultados destes ensaios serão apresentados no item 4.4.

No ensaio de *pull-down* descrito em Strini (2010), a proteína NtSCI1-HIS (proteína SCI1 de *N. tabacum*, produzida em células de *E. coli*, com uma *tag* de histidinas na extremidade C-terminal) foi utilizada como isca para um *pool* de proteínas extraídas de estigmas e estiletes. A reanálise dos resultados obtidos permitiu a identificação da proteína HEN2 (*Hua ENhancer 2*). A análise *in silico* da sequência codificadora desta proteína, desenho de *primers*, amplificação e clonagem em vetores específicos do sistema de duplo-híbrido e BiFC estão sendo realizados pelo aluno de Iniciação Científica Danilo Sasso Augusto e os testes para confirmação da interação desta proteína com NtSCI1 serão realizados em breve.

4.3.2 Confirmação da interação de NtSCI1 com as proteínas obtidas no *screening* da biblioteca de duplo-híbrido por meio da técnica de BiFC.

Como mencionado anteriormente, o *screening* de uma biblioteca de duplo-híbrido construída com cDNAs de estigma/estilete, revelou sete possíveis parceiros de interação com NtSCI1. Estes parceiros foram identificados como: NtSTOREKEEPER (B11.1), NtDEAD-BOX (D6.4), Nt14-3-3D2 (H6.1), NtHOMEBOX22 (C1.3), NtREGULADOR-DE-SPLICING (F5.3), NtTRANSPOSASE (F6.2) e NtADENOSINE-KINASE (H6.5). Para confirmar a interação de NtSCI1 com estas proteínas foram realizados ensaios de BiFC. Até o presente momento, apenas três candidatos foram testados: NtDEAD-BOX (D6.4), Nt14-3-3D2 (H6.1) e NtSTOREKEEPER (B11.1); os demais encontram-se em processo de análise.

Vários clones obtidos no *screening* foram identificados como portadores do cDNA codificador de uma mesma HELICASE DE RNA DEAD-BOX, homóloga de AtDEAD-BOX-35. A interação entre NtSCI1 e esta helicase foi testada, utilizando-se o clone D6.4. Analisando o sequenciamento de quatro clones (A11.5, C11.5, D6.4 e F10.3) codificadores desta mesma helicase, foi observado que o clone D6.4 apresentava uma sequência mais longa na extremidade 5' do que os demais. O alinhamento entre a sequência de aminoácidos codificada por este clone e a sequência da proteína homóloga de tomate (código de acesso AK322205.10), constituída de 596 aminoácidos, revelou que a sequência parcial da proteína DEAD-BOX de *N. tabacum*, obtida neste trabalho, corresponde à região C-terminal da proteína de tomate (aminoácidos 155 a 596). Análises *in silico* da sequência de tomate, utilizando a ferramenta *MotifScan* mostraram que o domínio Helicase de RNA ATP-dependente encontra-se presente na região entre os aminoácidos 142 e 545 da proteína, e, portanto, está quase totalmente presente na sequência parcial da proteína obtida de *N. tabacum*, referente ao clone D6.4.

Já os clones A11.5, C11.5 e F10.3 eram ainda menores, sendo o primeiro aminoácido de seu produto proteico correspondente ao aminoácido 210 da sua homóloga de tomate. A interação entre NtSCI1 e o produto proteico codificado por estes clones não foi testada por duplo-híbrido, uma vez que esta interação já havia sido confirmada com o clone D6.4.

Para a amplificação e clonagem da sequência codificadora parcial da proteína DEAD-BOX de tabaco, o códon codificador de uma metionina foi inserido imediatamente antes da sequência codificadora presente no vetor pDEST22 através de PCR, para permitir a expressão da mesma, uma vez que a metionina inicial não está presente na sequência obtida do *screening* da biblioteca. Imediatamente depois do códon da metionina, foi inserido o códon

correspondente a uma arginina, da mesma forma como o observado na sequência correspondente de tomate.

Após duas reações de PCR consecutivas, um fragmento de aproximadamente 1500 pares de base foi amplificado, conforme o esperado, e clonado no vetor pDONR221. Para testar a interação de NtSCI1 com a porção C-terminal da proteína DEAD-BOX por meio de BiFC, foi necessária a fusão da CDS desta última ao fragmento *tail* da GFP, mediante recombinação múltipla. A fluorescência da proteína GFP, restaurada pela interação entre as proteínas NtSCI1-hGFP e NtDEAD-BOX-tGFP, foi observada no núcleo das células vegetais transformadas simultaneamente com as duas construções (Figura 29).

Figura 29: Ensaio de BiFC da interação de NtSCI1 com a proteína NtDEAD-BOX. As imagens foram obtidas por microscopia confocal, utilizando-se o aparelho Leica TCS SP2 (Leica Microsystems – FMRP/USP) e mostram células epidérmicas de folhas de *N. benthamiana* que foram transformadas simultaneamente com as construções que codificam as proteínas híbridas indicadas na imagem. hGFP e tGFP são os fragmentos contendo os resíduos de aminoácidos 1-149 e 150-238 da proteína eGFP, respectivamente. Na imagem é possível observar que a interação entre NtSCI1 e a proteína NtDEAD-BOX ocorre no núcleo, em áreas com pouca ou nenhuma cromatina que se assemelham ao nucléolo.

Na imagem é possível observar que o padrão de fluorescência da GFP, restaurada pela interação entre as proteínas em estudo, mostrou-se bastante semelhante ao padrão de localização subcelular de NtSCI1-GFP, observado por DePaoli *et al.* (2011). Nota-se que o padrão de fluorescência não aparece de forma uniforme no núcleo, mas sim de forma compartimentada, em regiões com pouca ou nenhuma cromatina, semelhante ao principal corpúsculo nuclear, o nucléolo.

O sequenciamento do clone H6.1 mostrou que a CDS da proteína identificada como uma 14.3.3D2 estava completa. A amplificação da CDS foi realizada por PCR utilizando *primers* específicos e clonada no vetor pDONR221. Para testar a interação de NtSCI1 com a proteína Nt14.3.3D2, foi necessária a fusão da CDS desta última ao fragmento *tail* da GFP, mediante recombinação múltipla. A interação entre as proteínas híbridas NtSCI1-hGFP e Nt14.3.3D2-tGFP foi testada através da introdução das construções que codificam tais fusões em células epidérmicas de folhas de *N. benthamiana*.

Figura 30: Ensaio de BiFC da interação de NtSCI1 com a proteína Nt14-3-3D2. As imagens foram obtidas por microscopia confocal, utilizando-se o aparelho Leica TCS SP2 (Leica Microsystems – FMRP/USP) e mostram células epidérmicas de folhas de *N. benthamiana*, que foram transformadas simultaneamente com as construções que codificam as proteínas híbridas indicadas na imagem. hGFP e tGFP são os fragmentos contendo os resíduos de aminoácidos 1-149 e 150-238 da proteína eGFP, respectivamente. Nas imagens é possível observar que a interação entre NtSCI1 e Nt14-3-3D2 ocorre no núcleo, em áreas de intensa atividade transcricional, ou seja, junto à eucromatina.

A restauração da proteína GFP, devido à interação entre as proteínas NtSCI1-hGFP e Nt14.3.3D2-tGFP, foi evidenciada no núcleo das células. A fluorescência da proteína GFP, revelou que as proteínas em questão interagem no núcleo celular, em regiões onde não há marcação com DAPI (Figura 30). A habilidade do marcador DAPI em se intercalar no sulco menor da dupla fita de DNA (dsDNA) confere a este marcador a característica de marcar a heterocromatina em azul. Regiões ricas em eucromatina se caracterizam por áreas de pouca ou nenhuma marcação por DAPI. Segundo Shaw & Brown (2004), a heterocromatina é observada em núcleos de células vegetais como raios que partem do nucléolo em direção à membrana nuclear. Entre estes raios se localiza a eucromatina, caracterizada por áreas de intensa atividade transcricional. Como pode ser observado na Figura 30A, a interação de NtSCI1 com a proteína Nt14.3.3D2 ocorre exatamente na região da eucromatina.

Além disso, pode-se observar que as proteínas interagem também no interior de uma região central do núcleo, delimitada por cromatina intensamente condensada. A literatura relata esta região como a periferia do nucléolo, a qual é rica em rDNA condensado (Beven *et al.*, 1996). Desta forma, a interação entre NtSCI1 e Nt14-3-3D2 ocorreria junto a eucromatina e também no interior do nucléolo. Uma vez que proteínas 14.3.3 são importantes para alterar a atividade e a localização de outras proteínas, pode-se inferir que a proteína Nt14.3.3D2, como parte de uma cascata de sinalização, altere a localização subcelular de NtSCI1, para que esta proteína desempenhe uma atividade importante junto à eucromatina, possivelmente no processamento de RNAs. Outra hipótese seria de que, em momentos específicos, a proteína Nt14-3-3D2 encaminharia NtSCI1 para dentro do nucléolo, onde NtSCI1 desempenharia novas funções ou permaneceria sequestrado (inativo) até que sua funcionalidade fosse novamente requisitada na célula.

O sequenciamento do clone B11.1 mostrou que a CDS da proteína NtSTOREKEEPER codificada pelo mesmo estava completa. A amplificação da CDS foi realizada por PCR utilizando *primers* específicos e clonada no vetor pDONR221. Para testar a interação de NtSCI1 com a proteína codificada pelo clone B11.1 por BiFC, foi necessária a fusão da CDS desta última ao fragmento *tail* da GFP, mediante recombinação múltipla. A interação entre as proteínas híbridas NtSCI1-hGFP e NtSTK-tGFP foi testada através da introdução das construções que codificam tais fusões em células foliares de *N. benthamiana*.

A restauração da proteína GFP, devido à interação entre as proteínas NtSCI1-hGFP e NtSTOREKEEPER-tGFP, foi evidenciada no interior do nucléolo das células (Figura 31). A fluorescência da proteína GFP revelou que as proteínas em questão interagem em um compartimento subnucleolar. Pode-se observar que a interação entre estas proteínas ocorre no

centro de uma região do núcleo onde não há cromatina, ou seja, no interior do nucléolo. Entretanto, a interação é restrita a região central do nucléolo, que a literatura denomina de cavidade nucleolar (Shaw & Brown, 2004). Ensaios de co-localização, utilizando marcadores específicos, devem ser realizados para indicar a correta localização subnucleolar da interação entre estas proteínas.

Figura 31: Ensaio de BiFC da interação de NtSCI1 com a proteína NtSTOREKEEPER. As imagens foram obtidas por microscopia confocal, utilizando-se o aparelho Leica TCS SP2 (Leica Microsystems – FMRP/USP) e mostram células epidérmicas de folhas de *N. benthamiana* que foram transformadas simultaneamente com as construções que codificam as proteínas híbridas indicadas na imagem. hGFP e tGFP são os fragmentos contendo os resíduos de aminoácidos 1-149 e 150-238 da proteína eGFP, respectivamente. Nas imagens é possível observar que a interação entre NtSCI1 e NtSTK ocorre no núcleo, possivelmente no interior da cavidade nucleolar.

A cavidade, ou também denominado vacúolo, consiste em uma área encontrada no centro de nucléolos muito ativos, particularmente no de plantas (Beven *et al.*, 1996). Apesar de ser conhecido pela literatura há muito tempo, pouca informação encontra-se disponível a respeito dos eventos moleculares que ocorrem neste compartimento subnucleolar. Sabe-se que, em culturas de células de tabaco, a formação e contração dos vacúolos nucleolares estão

intimamente relacionadas à síntese de RNA no nucléolo (Johnson, 1969). Entretanto, dados recentes mostram que este compartimento poderia estar associado ao sequestro temporário e estocagem de fatores celulares. Os componentes ubiquitina e proteassomo do sistema ubiquitina-proteassomo foram evidenciados por imunofluorescência exclusivamente no interior do vacúolo de nucléolos de células de meristemas radiculares de soja. Estes dados não mostram apenas que este compartimento pode ser sítio de degradação de proteínas ubiquitinadas, mas também que este pode ser um local de sequestro temporário ou estocagem dos componentes do sistema ubiquitina-proteassomo ou conjugados de ubiquitina (Stępiński, 2012).

Estudos realizados com células meristemáticas das gemas cotiledonares de ervilhas mostraram que o nucléolo destas células frequentemente apresenta aglomerados de cromatina nos vacúolos nucleolares. Estes vacúolos contendo cromatina são encontrados preferencialmente em contato com o componente fibrilar do nucléolo, sítio de transcrição de genes codificadores de RNA ribossômico, sugerindo que os vacúolos nucleolares possam estar envolvidos na dispersão e/ou ativação da cromatina ribossomal (Jennane *et al.*, 2000). He *et al* (2013) demonstraram a capacidade de uma proteína STK de *Oryza sativa*, portadora do domínio DUF573 (o mesmo encontrado na proteína NtSTK em questão), em se ligar especificamente à região CentO (*rice centromere satellite DNA*) localizada no domínio funcional do centrômero dos cromossomos de arroz.

4.3.3 Confirmação da interação de NtSCI1 com as proteínas obtidas no *screening* da biblioteca de duplo-híbrido por meio da técnica de Co-Imunoprecipitação.

O primeiro passo para a realização de um ensaio de Co-Imunoprecipitação consiste na obtenção das proteínas em estudo, em quantidade e qualidade adequadas para a realização do mesmo. Além disso, deve-se obter anticorpos específicos contra as proteínas em questão, ou anticorpos capazes de reconhecer uma sequência (*tag*) adicionada às proteínas estudadas. No trabalho desenvolvido pela Pós Doutoranda Hebréia Oliveira Almeida Souza, foi possível obter aproximadamente 500mg da proteína HIS-NtSCI1, com 95% de pureza, a qual foi enviada à empresa IgY Biotecnologia, para a produção de anticorpo contra HIS-NtSCI1. O anticorpo produzido em galinhas foi capaz de reconhecer a proteína HIS-NtSCI1 e passou a somar mais uma ferramenta em experimentos para a confirmação de interações proteína-proteína, como o descrito abaixo.

Dentre todos os parceiros de interação com NtSCI1 identificados neste trabalho, optou-se pela proteína Nt14-3-3D2 para dar início aos testes de Co-Imunoprecipitação. A sequência codificadora da proteína Nt14.3.3D2 (amplificado a partir do clone H6.1) foi clonada em vetor de expressão pDEST17 (do sistema Gateway), permitindo a expressão da proteína recombinante HIS-Nt14-3-3D2 na linhagem BL21(DE3) Rosetta de *E. coli*. Foram realizados experimentos com diferentes condições de cultivo e indução, os quais permitiram estabelecer as condições adequadas para a expressão desta proteína recombinante na fração solúvel do extrato proteico. Como controle, foi utilizada a proteína HIS-NtSCI1, cujas condições de expressão em *E. coli* já haviam sido descritas em Strini (2010). Na Figura 32A, pode-se observar que as proteínas HIS-NtSCI1 e HIS-Nt14-3-3D2 foram produzidas em células de *E. coli*, a temperatura de 37°C, rotação de 200 rpm, duas horas após a indução da expressão com IPTG.

Figura 32: Expressão da proteína heteróloga HIS-Nt14-3-3D2 em células de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta. Em A, observa-se o perfil proteico de amostras das proteínas HIS-NtSCI1 e HIS-Nt14-3-3D2 produzidas em *E. coli*, cepa BL21 (DE3) Rosetta, submetidas a eletroforese SDS-PAGE. M: marcador de peso molecular *LMW Calibration Kit for SDS Eletrophoresis* (GE Helthcare). Na segunda, terceira e quarta posições do gel aparecem amostras do tempo zero (t0), fração insolúvel (P) e fração solúvel (S) do lisado celular de HIS-NtSCI1, respectivamente. Observe que a proteína HIS-NtSCI1 de aproximadamente 21kDa, utilizada como controle da expressão, está presente principalmente na fração insolúvel (seta), porém uma fração significativa desta proteína pode ser observada na fração solúvel. Na quinta, sexta e sétima posição do gel, observa-se o perfil proteico de amostras do tempo zero (t0), fração insolúvel (P) e fração solúvel (S) do lisado celular de HIS-Nt14-3-3D2, respectivamente. A proteína HIS-Nt14-3-3D2, de aproximadamente 33kDa, mostra-se

majoritariamente presente na fração insolúvel (seta). (B) *Western Blotting* realizado com a fração solúvel do lisado de células de *E. coli* expressando 1 – HIS-NtSCI1 e 2 – HIS-Nt14-3-3D2 marcadas com anticorpo monoclonal anti-Histidina. Na imagem é possível observar que ambas as proteínas estão presentes na fração solúvel.

Em ambos os casos, as proteínas apareceram preferencialmente na fração insolúvel, fato evidenciado pela banda majoritária no perfil de expressão. Para confirmar a presença das proteínas em estudo, na fração solúvel do lisado celular, as amostras foram submedidas a um ensaio de *Western Blotting*, utilizando-se um anticorpo monoclonal anti-Histidina para marcação. A Figura 32B apresenta os resultados obtidos, onde pode-se observar a presença de uma quantidade significativa das proteínas HIS-NtSCI1 e HIS-Nt14-3-3D2 na fração solúvel do lisado de células de *E. coli*. Dessa forma, a proteína HIS-Nt14-3-3D2 foi obtida com sucesso, permitindo a realização do ensaio de Co-Imunoprecipitação.

Em paralelo, foram obtidas plantas transgênicas superexpressando NtSCI1-GFP sob controle do promotor 35S. A descrição dos resultados obtidos no processo de obtenção de plantas transgênicas de *N. tabacum* para a produção das proteínas NtSCI1-GFP e HIS-NtSCI1 em estigmas e estiletes encontra-se presente no item 4.1. Foi escolhida uma planta transgênica 35Sprom::NtSCI1-GFP com alto nível de expressão do transgene, da qual foram coletados estigmas/estiletes em diferentes estádios do desenvolvimento floral. Foi preparado um extrato de proteínas dos estigmas/estiletes, o qual foi incubado com o extrato de proteínas solúveis de *E. coli*, expressando a proteína recombinante HIS-Nt14-3-3D2. Posteriormente, foi adicionado o anticorpo monoclonal anti-GFP (Sigma) e realizada nova incubação. “Beads” de sepharose-proteína A (GE Healthcare) permitiram a recuperação dos complexos proteicos ligados ao anticorpo anti-GFP. Após desnaturação, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE e analisadas por *Western Blotting*, com 2 anticorpos diferentes (anti-NtSCI1 policlonal e anti-HIS monoclonal, Sigma). Como pode ser visto na Figura 33, o anticorpo anti-NtSCI1 revelou a presença da proteína NtSCI1-GFP no material imunoprecipitado. No *Western Blotting* revelado com anticorpo anti-Histidina, foi observada a marcação de uma proteína de aproximadamente 33kDa no material imunoprecipitado, que coincide com o tamanho esperado da proteína HIS-Nt14-3-3D2, confirmando a interação *in vitro* entre NtSCI1 e a Nt14.3.3D2.

É interessante notar que existem 2 bandas de tamanho ligeiramente distintos, identificadas pelo anticorpo anti-NtSCI1. Considerando que proteínas da família 14-3-3,

como a Nt14-3-3D2, normalmente se ligam a proteínas fosforiladas, e que NtSCI1 possui 15 sítios putativos de fosforilação, é possível sugerir que estas 2 bandas representem 2 formas diferencialmente fosforiladas de NtSCI1. Esta hipótese é bastante plausível, principalmente se for considerado que a proteína NtSCI1-GFP foi extraída de estigmas/estiletes, seu local de expressão natural nas plantas, onde devem existir as quinases necessárias à(s) sua(s) fosforilação(ões) adequada(s).

Figura 33: Ensaio de co-imunoprecipitação, usando extrato proteico de estigmas/estiletes (E/E) de plantas transgênicas de *N. tabacum*, expressando a construção 35Sprom::NtSCI1-GFP, o qual foi incubado com a proteína recombinante HIS-Nt14-3-3D2, produzida em *E. coli*. As proteínas imunoprecipitadas com o anticorpo anti-GFP foram analisadas por *Western Blotting*, utilizando-se os anticorpos contra NtSCI1 e contra o HIS-tag (Sigma). 1- Extrato de proteínas obtido de estigmas/estiletes de plantas transgênicas de *N. tabacum* 35Sprom::NtSCI1-GFP. 2 – Fração solúvel do lisado de células de *E. coli* superexpressando HIS-Nt14-3-3D2. 3- Lavagem da coluna, contendo o material imunoprecipitado, recolhida imediatamente antes da eluição. 4 – Material eluído da coluna, resultante da imunoprecipitação de NtSCI1-GFP e HIS-Nt14-3-3D2.

Deve ser mencionado que experimentos como o descrito acima, no qual a proteína candidata a interação é produzida em *E. coli*, só são possíveis de serem realizados quando a proteína em questão é expressa de forma solúvel e funcional neste organismo heterólogo. Até o momento, foram realizadas diversas tentativas para produzir outras proteínas candidatas à interação com NtSCI1 (ex.: NtCDKG;2, NtCYCLIN-L1 e NtDEAD-BOX), de forma solúvel e funcional, em *E. coli*. Entretanto, os resultados ainda são inconclusivos.

4.4 Identificação de parceiros de interação com NtSCII a partir de análises *in silico* da sua sequência e dados da literatura.

Na busca por proteínas parceiras de interação com NtSCII foram realizados os diversos experimentos bioquímicos descritos acima. No item 4.1.1 deste trabalho, o ensaio de *pull-down*, utilizando a proteína GST-NtSCII como isca, resultou na identificação de várias proteínas, dentre elas uma CDK da família G (NtCDKG;2), cuja interação com NtSCII foi confirmada por BiFC (item 4.3.1). Entretanto, nos experimentos de *pull-down* e *screening* realizados, nenhuma ciclina foi encontrada. Dessa forma, na tentativa de identificar ciclina(s) candidata(s) à interação com SCII e NtCDKG;2, foram realizadas buscas na literatura e em bancos de dados (Genemania - <http://www.genemania.org/>, AttedII - <http://atted.jp/>) para verificar o que já se sabe sobre as sequências homólogas em *Arabidopsis*. No trabalho de Van Leene *et al.* (2010), os autores descrevem um experimento de larga escala, realizado em *Arabidopsis thaliana*, que identificou a CICLINA-L1 como parceira de interação de CDKG;2, sem que fosse descrita a função de nenhuma destas duas proteínas. No site Genemania, foi identificada uma “CYCLIN-RELATED” que é co-expressa com At1g79200, ortólogo de SCII em *Arabidopsis*.

O próximo passo consistiu na clonagem das regiões codificadoras dos ortólogos da CICLINA-L1 e da “CYCLIN-RELATED” de *N. tabacum*, de maneira a viabilizar os experimentos de interação com NtSCII. Como o genoma de *N. tabacum* não está disponível, a definição de *primers* para amplificar estas sequências não é uma tarefa trivial. Assim, foram feitas buscas por estas sequências em bancos de dados de ESTs, como o SOL (<http://solgenomics.net/>), DFCI (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>) e nosso banco de dados TOBEST, que contém apenas sequências parciais (ESTs) de cDNAs de estigmas/estiletos de *N. tabacum*. Com as sequências codificadoras destas ciclinas, encontradas nos bancos de dados, foram desenhados os *primers* necessários. Apesar das dificuldades inerentes a trabalhar com uma espécie cujo genoma não está disponível, as clonagens das regiões codificadoras da NtCICLINA-L1 e da “NtCYCLIN-RELATED” de *N. tabacum* foram feitas com sucesso. Abaixo, segue a descrição dos passos realizados para a obtenção e clonagem da sequência codificadora de NtCICLINA-L1.

Como a sequência de NtCICLINA-L1 não encontra-se descrita, foram desenhados *primers* degenerados com base em sequências genômicas presentes em bancos de dados. Estes *primers* foram utilizados para a amplificação da sequência codificadora de NtCICLINA-L1 a partir de cDNAs de estigma/estilete dos estádios 1 e 2, por meio de uma reação de PCR. A

eletroforese em gel de agarose de uma amostra desta PCR (Figura 34A) mostra a amplificação de uma sequência de aproximadamente 1300pb, compatível com o tamanho esperado de 1299pb.

Figura 34: Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. **(A)** Imagem da amostra de PCR para amplificação da CDS de NtCICLINA-L1. **(B)** Amostras de DNAs extraídos de 20 clones oriundos da construção TOPO-PCR-BluntII + NtCICLINA-L1, digeridos com a enzima EcoRI. Notar que na imagem A aparece um fragmento de aproximadamente 1300pb, compatível com o tamanho esperado de NtCICLINA-L1. Este mesmo fragmento é observado em todos os DNAs plasmidiais após a digestão com EcoRI, e liberação do inserto. M: marcador de peso molecular 1 kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

O fragmento obtido foi purificado e ligado no vetor TOPO-PCR-BluntII. Uma amostra desta ligação foi utilizada para a transformação de células DH10B. Vinte transformantes obtidos foram cultivados e tiveram o DNA extraído e submetido à digestão enzimática utilizando-se a enzima EcoRI. Como pode ser observado na Figura 34B, todos os 20 transformantes mostram o padrão de digestão compatível com o esperado. O transformante número 6 foi escolhido para sequenciamento e mostrou que a CDS de NtCICLINA-L1 havia sido clonada com sucesso. Para a clonagem desta sequência no vetor de entrada no sistema Gateway, *primers* específicos foram desenhados com base na sequência oriunda do clone descrito acima. Estes *primers* foram utilizados em uma primeira reação de PCR (PCR1), usando o DNA da construção TOPO-PCR-BluntII + NtCICLINA-L1 como molde, com o

objetivo de inserir parte dos sítios attBs necessários para as reações de recombinação. Em seguida, o fragmento resultante foi submetido a uma segunda reação de PCR (PCR2) para complementação dos sítios attBs. A Figura 35A mostra que as amplificações foram realizadas com sucesso.

Figura 35: Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. **(A)** Imagem da amostra de PCR para amplificação da CDS de NtCICLINA-L1 (com códon de terminação), para inserção no sistema Gateway. No primeiro gel observa-se a amplificação de um fragmento de DNA com o tamanho esperado de 1333pb, com parte dos sítios attBs (PCR1). No segundo gel, o fragmento foi amplificado com os oligos BP1 e BP2, com o objetivo de completar os sítios attBs (PCR2), gerando um fragmento de aproximadamente 1375pb. **(B)** Amostra da PCR para amplificação da sequência codificadora de NtCICLINA-L1ss (sem códon de terminação) para inserção no sistema Gateway. Primeiro e segundo géis: PCR1 (fragmento de 1330pb) e PCR2 (fragmento de 1372pb), respectivamente. M: marcador de peso molecular 1 kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Para a realização dos ensaios de BiFC, foi necessário obter a CDS de NtCICLINA-L1 sem o códon de terminação, para permitir a fusão C-terminal da *tag* tGFP. Esta deleção foi realizada por PCR (Figura 35B) utilizando um *primer* reverso sem o códon de terminação. Este fragmento de PCR foi clonado no vetor pDONR221, por recombinação. A transferência da CDS presente na construção pDONR221-CICLINA-L1ss (sem códon de terminação) para o vetor pk7m34GW, juntamente com a pENTRY-35S (promotor 35S) e pENTRY-tGFP (sequência codificadora do fragmento C-terminal da proteína GFP), mediante uma recombinação múltipla. Uma amostra desta recombinação foi utilizada para a transformação de células DH10B. Onze transformantes obtidos foram cultivados e tiveram o DNA extraído e

submetido à digestão enzimática com BsrGI. Como pode ser observado na Figura 36, todos os transformantes apresentaram um fragmento de cerca de 1300pb, correspondente a CDS de NtCICLINA-L1. O transformante número 3 foi escolhido para sequenciamento, confirmando a correta inserção das três sequências no vetor pk7m34GW. Este DNA foi, então, utilizado para transformar células de *Agrobacterium* eletrocompetentes que foram utilizadas nos ensaios de BiFC.

Para os ensaios de duplo-híbrido, a CDS da NtCICLINA-L1 foi clonada no vetor pDEST22. Esta construção foi feita pela pós-doutoranda Dra. Hebréia Oliveira Almeida Souza e gentilmente cedida para este trabalho.

Todas as construções realizadas neste trabalho foram realizadas de maneira semelhante à descrita para NtCICLINA-L1. Para a clonagem de sequências já conhecidas, *primers* específicos foram desenhados já incluindo as sequências dos sítios attBs. Desta forma, a amplificação pode ser realizada diretamente com as PCRs 1 e 2. Com o intuito de priorizar os resultados mais importantes, as demais clonagens realizadas (PCRs, e digestões) não estão descritas neste trabalho.

Figura 36: Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, de amostras do DNA extraído de 11 clones oriundos da construção pk7m34GW + P35S + NtCICLINA-L1 + tGFP, digeridas com a enzima BsrGI. Notar que um fragmento de aproximadamente 1300pb está presente em todas as amostras, compatível com o tamanho esperado de NtCICLINA-L1. M: marcador de peso molecular 1 kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Para confirmar a interação entre NtSCI1 e estas ciclinas, foram realizados ensaios de duplo-híbrido e BiFC. Os ensaios de duplo-híbrido utilizando BD-NtSCI1 e AD-NtCICLINA-L1 foram negativos, assim como aqueles utilizando BD-NtSCI1 e AD-NtCYCLIN-RELATED. Ainda na tentativa de confirmar as interações citadas anteriormente, foram realizados ensaios de BiFC utilizando NtSCI1-hGFP + NtCICLINA-L1-tGFP e NtSCI1-hGFP + NtCYCLIN-RELATED-tGFP. Nestes ensaios, a interação *in vivo* de NtSCI1 com estas duas ciclinas foi confirmada, observando-se a restauração da fluorescência da GFP no núcleo das células (Figuras 36 e 37, respectivamente).

Figura 37: Ensaio de BiFC da interação de NtSCI1-hGFP com a proteína NtCICLINA-L1. As imagens foram obtidas por microscopia confocal, utilizando-se o aparelho Leica TCS SP5 (Leica Microsystems – FMRP/USP) e mostram células epidérmicas de folhas de *N. benthamiana*, que foram transformadas simultaneamente com as construções que codificam as proteínas híbridas indicadas na imagem. hGFP e tGFP são os fragmentos contendo os resíduos de aminoácidos 1-149 e 150-238 da proteína eGFP, respectivamente. Na imagem A, apesar da marcação com DAPI não ter sido eficiente, é possível observar que a interação entre NtSCI1 e a proteína NtCICLINA-L1 ocorre no núcleo (visível na imagem de campo claro), na periferia de uma região central do mesmo. Em B, nota-se um padrão de interação semelhante, porém a marcação com DAPI revela que a interação entre NtSCI1-hGFP e NtCICLINA-L1-tGFP ocorre em uma área intensamente rica em cromatina, sugerindo se tratar da região organizadora do nucléolo – NOR (*Nucleolus Organizer Region*).

Como pode ser observado nas imagens da Figura 37, a interação de NtSCI1 com a proteína NtCICLINA-L1 foi observada no núcleo, porém com um padrão de localização bem definido e distinto das localizações descritas para outras interações deste trabalho. Por meio da restauração da fluorescência da proteína GFP, a interação entre estas proteínas foi observada na periferia de uma região central do núcleo, padrão este que se assemelha à Região Organizadora do Nucléolo - NOR (*Nucleolus Organizer Region*).

Uma vez que outros inibidores de ciclo celular atuam inibindo complexos CDK-CICLINA, DePaoli *et al* (2011) sugerem que NtSCI1 também exerça esse papel. Assim, ao observar a interação *in vivo* de NtSCI1 e NtCICLINA-L1, pressupõe-se que NtSCI1 esteja interagindo com o complexo CDKG;2-CICLINA-L1, cuja função ainda não é conhecida.

A interação entre NtSCI1 e NtCYCLIN-RELATED também foi observada *in vivo*, no núcleo de células foliares de *N. benthamiana*. Como pode ser observada na Figura 38, a interação entre estas proteínas apresenta dois padrões de localização no ambiente nuclear. Na primeira imagem (Figura 38A), a interação parece restrita ao interior do nucléolo. É interessante notar que apesar destas proteínas interagirem dentro deste compartimento, pouca ou nenhuma fluorescência é observada na região da cavidade nucleolar, também denominado vacúolo. Já a Figura 38B mostra um padrão distinto de localização da interação, onde as proteínas NtSCI1-hGFP e NtCYCLIN-RELATED-tGFP aparecem interagindo no ambiente nuclear, entretanto, pouca ou nenhuma interação é observada no interior do nucléolo.

O padrão difuso de fluorescência da proteína GFP no interior do núcleo revela que estas proteínas parecem interagir em corpúsculos nucleares que se assemelham a *Speckles*. Neste caso, ao interagirem, NtSCI1-hGFP e NtCYCLIN-RELATED-tGFP poderiam desempenhar atividades relacionadas ao metabolismo de RNA, uma vez que estes corpúsculos são canonicamente conhecidos como domínios nucleares dinâmicos, ricos em fatores de *splicing* de pré-mRNAs. Uma explicação para a observação destes dois padrões de localização da interação NtSCI1-NtCYCLIN-RELATED seria que as células observadas estariam em momentos distintos do ciclo celular. Com base na disposição da cromatina revelada por DAPI, a primeira célula da Figura 38 parece estar em Interfase, enquanto a segunda estaria em G2/Prófase. Estes resultados reforçam a hipótese de que NtSCI1 permanece no interior do nucléolo durante a Interfase, sendo re-localizado no início da mitose.

O fato da interação de NtSCI1 com as proteínas NtCICLINA-L1 e NtCYCLIN-RELATED só ter sido confirmada pela técnica de BiFC pode ser entendido de duas formas, como discutido no item 4.3. A primeira hipótese seria de que a interação entre NtSCI1 e estas proteínas fosse dependente de outras proteínas existentes no ambiente celular vegetal, ou de

modificações como fosforilações, que não ocorreriam no ambiente celular da levedura, nos ensaios de duplo-híbrido. A segunda hipótese se baseia em dados da literatura que relatam que proteínas ciclinas são extremamente instáveis, sendo sintetizadas e degradadas rapidamente durante o ciclo celular. Dessa forma, a confirmação da interação de NtSCI1 com tais proteínas nos ensaios de duplo-híbrido seria dificultada pela instabilidade das ciclinas. Para contornar este problema, estratégia utilizada foi a de deletar a sequência correspondente ao *D-Box* na sequência de DNA codificadora destas proteínas, de tal forma a produzir proteínas sem o *D-Box* e, portanto, mais estáveis.

Figura 38: Ensaio de BiFC da interação de NtSCI1-hGFP com a proteína NtCYCLIN-RELATED-tGFP. As imagens foram obtidas por microscopia confocal, utilizando-se o aparelho Leica TCS SP5 (Leica Microsystems – FMRP/USP) e mostram células epidérmicas de folhas de *N. benthamiana*, que foram transformadas simultaneamente com as construções que codificam as proteínas híbridas indicadas na imagem. hGFP e tGFP são os fragmentos contendo os resíduos de aminoácidos 1-149 e 150-238 da proteína eGFP, respectivamente. Na imagem A, nota-se que a interação entre NtSCI1 e a proteína NtCYCLIN-RELATED ocorre no núcleo, mais exatamente no interior do nucléolo. Em B, observa-se um padrão distinto de localização da interação, onde as proteínas NtSCI1-hGFP e NtCYCLIN-RELATED-tGFP aparecem interagindo no ambiente nuclear, exceto no interior do nucléolo. O padrão difuso de fluorescência da proteína GFP no interior do núcleo revela que estas proteínas parecem interagir em corpúsculos nucleares que se assemelham a *Speckles*.

A sequência D-Box foi encontrada na sequência codificadora da NtCICLINA-L1 e NtCYCLIN-RELATED e deletada por meio de PCR utilizando *primers forward* específicos, capazes de iniciar a síntese da sequência codificadora das ciclinas após o *D-Box*. O processo de amplificação e clonagem destas sequências em vetores do sistema Gateway foi idêntico ao apresentado para NtCICLINA-L1. Dessa forma, foram obtidas as sequências codificadoras das ciclinas em questão, sem a porção N-terminal portadora do *D-Box*, denominadas NtCICLINA-L1-DDB e NtCYCLIN-RELATED-DDB. Estas sequências foram, então, clonadas nos vetores específicos para os ensaios de duplo-híbrido e BiFC, segundo a metodologia relatada nos itens 3.25.1 e 3.25.2, respectivamente.

O ensaio de duplo-híbrido entre as proteínas BD-NtSCI1 + AD-NtCYCLIN-RELATED-DDB mostraram resultados negativos (Figura 26). Entretanto, como pode ser observado na Figura 39, o ensaio de duplo-híbrido utilizando as proteínas BD-NtSCI1 e AD-NtCICLINA-L1-DDB (proteína CYCLIN-L1 de *N. tabacum*, com o *D-Box* deletado e fusionada ao domínio de ativação do fator GAL4) foi positivo, onde é possível notar a ativação do gene repórter HIS3. Uma vez que a proteína AD-NtCICLINA-L1-DDB foi estabilizada devido à remoção do domínio D-Box, a interação desta com BD-NtSCI1 foi capaz de ativar o sistema. Este resultado confirma a interação de NtSCI1 com NtCICLINA-L1.

Figura 39: Imagem ilustrando os dados referentes ao ensaio de duplo-híbrido, utilizando BD-NtSCI1 como isca e AD-NtCICLINA-L1-DDB e AD-NtCYCLIN-RELATED-DDB como presas. Na imagem é possível observar que apenas as células transformadas com BD-NtSCI1 e AD-NtCICLINA-L1-DDB são capazes de crescer em meio não suplementado com histidina, ou seja, possuem o gene repórter HIS3 ativado pela interação entre as mesmas. Nesta mesma imagem observa-se que células transformadas com a presa AD-CICLINA-L1-DDB e BD não são capazes de ativar o sistema (controle de autoativação da presa negativo). Com relação à interação entre BD-NtSCI1 e AD-NtCYCLIN-RELATED-DDB, os resultados de duplo-híbrido indicam que estas proteínas não interagem, uma vez

que nenhum crescimento celular foi observado nas células portadoras destas duas proteínas híbridas. Também é possível observar que BD-NtSCI1 não interage com AD-GUS (controle negativo) confirmando a funcionalidade do sistema.

Apesar da interação entre BD-NtSCI1 e NtCICLINA-L1-DDB ter sido confirmada no ensaio de duplo híbrido, os resultados de BiFC entre estas proteínas foram negativos, apesar de já terem sido positivos quando a proteína NtCICLINA-L1 completa era utilizada (com D-Box). Apesar de contraditórios, estes resultados possuem uma explicação, uma vez que ao realizar a deleção do domínio D-Box (resíduos 1-121 da extremidade N-terminal da proteína de 433 aminoácidos), é possível que sinais de localização subcelular também tenham sido deletados. A análise *in silico* da sequência polipeptídica de NtCICLINA-L1, utilizando as ferramentas CELLO, SubCellProt e Plant-mPLOC, revelaram sinais de localização nuclear na região N-terminal da proteína. Desta forma, existe a possibilidade da proteína NtCICLINA-L1-DDB-tGFP, ao ser produzida nas células foliares de *N. benthamiana* durante o ensaio de BiFC, não ter sido direcionada de forma eficiente para o núcleo, onde interagiria com NtSCI1.

4.5 Estudo da localização subcelular de NtSCI1

DePaoli *et al* (2011) descreveram dois padrões de localização subcelular da proteína NtSCI1-GFP, expressa de forma transiente em células foliares de *N. benthamiana* via agroinfiltração. No primeiro destes padrões, encontrado com maior frequência, a proteína estava presente no interior de uma ou mais estruturas circulares no interior do núcleo, os quais os autores sugeriram que fosse(m) o(s) nucléolo(s). O segundo padrão apresentava a proteína espalhada no interior do núcleo, porém condensada em pequenos corpúsculos nucleares não identificados pelos autores. Estes ensaios foram repetidos e, como pode ser observado na Figura 40, novamente foram identificados dois padrões de localização subcelular da proteína NtSCI1-GFP, que coincidem com a descrição dos autores.

Figura 40: Localização subcelular da proteína NtSCI1-GFP em células foliares de *N. benthamiana*. **(A)** Imagens mostram a localização da proteína (em verde) em corpúsculos nucleares bem definidos que coincidem com regiões negativas para a marcação com DAPI (não coradas em azul), sugerindo serem os nucléolos. **(B)** Proteína aparece espalhada de forma difusa no interior do núcleo e também no interior de estruturas circulares semelhantes aos nucléolos. Em vermelho estão representados os cloroplastos. As imagens foram obtidas por microscopia confocal, utilizando-se o aparelho Leica TCS SP5 (Leica Microsystems – FMRP/USP).

Na Figura 40B, observa-se a proteína espalhada pelo núcleo, porém a mesma parece também estar concentrada em duas grandes estruturas circulares que possivelmente são os nucléolos. Nestes compartimentos, a proteína parece ocupar apenas a região periférica, não sendo observada na cavidade do nucléolo (vacúolo). Na Figura 40A este detalhe não pode ser observado, possivelmente porque a imagem foi capturada em um plano que não inclui o centro dos nucléolos.

4.5.1 Co-localização de NtSCI1 com marcadores de corpúsculos nucleares

Para melhor compreender a real localização subnuclear de NtSCI1-GFP, ensaios de co-localização foram realizados utilizando-se proteínas descritas na literatura como

marcadores de corpúsculos nucleares. Foram testados marcadores para os seguintes corpúsculos nucleares: Corpos de Cajal – proteína AtCOILIN-mRFP, Nucléolo – proteína AtFIBRILLARIN-mRFP e *Speckles* – proteína CICLOPHILIN (AtCyc64-mRFP) e fator de *splicing* SR (AtSRP34-mRFP).

Figura 41: Imagens de microscopia confocal que mostram a co-expressão de NtSCI1-GFP e AtCOILIN-mRFP (A) em células foliares de *N. benthamiana*, onde é possível visualizar que SCI1 não se apresenta co-localizado com a proteína *coilin*, mostrando que SCI1 não se caracteriza como uma proteína de Corpos de Cajal. Em B pode-se observar a co-expressão de NtSCI1-GFP e AtFIBRILLARIN-mRFP, onde é possível visualizar que SCI1 apresenta-se totalmente co-localizado com os corpúsculos nucleares denominados nucléolos. Microscópio Leica TCS SP2 (Leica Microsystems – FMRP/USP).

A transformação simultânea de células epidérmicas de *N. benthamiana* com a construção NtSCI1-GFP e cada um dos marcadores dos corpúsculos nucleares descritos acima, resultou em células co-expressando as duas proteínas híbridas (SCI1 e marcador) com *tags* diferentes. Através de análises utilizando microscopia confocal, foi possível observar que NtSCI1 não está co-localizado com o marcador de Corpos de Cajal (Figura 41A), uma vez que o sinal de fluorescência das duas proteínas não se sobrepõem. Já a Figura 41B mostra a total co-localização de NtSCI1 com a proteína AtFIBRILLARIN-mRFP, confirmando que NtSCI1-GFP encontra-se presente no nucléolo.

Nos ensaios de co-localização de NtSCI1 com os marcadores de *Speckles* (Figura 42), NtSCI1-GFP aparece totalmente co-localizado com a proteína AtCICLOPHILIN-mRFP (Figura 42C), entretanto existem regiões (setas) em que NtSCI1-GFP está presente e não se observa o marcador. Dessa forma, NtSCI1 estaria localizado nos *speckles* e também em outras regiões se assemelham a região periférica do nucléolo.

Na Figura 42A (projeção ortogonal) observa-se que a proteína NtSCI1-GFP, presente no nucléolo, não aparece co-localizada com outro marcador de *speckles*, a proteína AtSRP34-mRFP. Entretanto, na Figura 42B, pode-se observar regiões do núcleo em que ocorre a co-localização parcial destas proteínas (seta apontando para a esquerda), sugerindo a presença de NtSCI1 junto a maquinaria de *splicing*.

O fato de NtSCI1-GFP não aparecer co-localizado com *splicing speckles* em todas as células observadas, como presente nas Figuras 42A e B, pode sugerir que sua localização sofra alterações durante as fases do ciclo celular. Na figura 42A, o padrão de DAPI é compatível com um núcleo em interfase, sugerindo que no início do ciclo celular NtSCI1-GFP estaria localizado no nucléolo. Já na Figura 42B, com base no estado mais avançado de condensação da cromatina, é possível que a célula esteja em um estágio um pouco mais avançado do ciclo celular, provavelmente no início da prófase. Assim, seria possível que no início da mitose NtSCI1-GFP fosse retirado do nucléolo e, neste momento específico do ciclo celular, NtSCI1 se associaria à maquinaria de *splicing*.

O fato da proteína NtSCI1-GFP ser raramente observada fora do nucléolo pode sugerir que isto ocorra em um breve período do ciclo celular. Considerando que as fases do ciclo celular possuem durações variáveis e que as células podem estar em fases diferentes do ciclo celular no momento da captura das imagens, seria possível que um padrão de localização fosse mais difícil de ser observado e, portanto, registrado. Neste caso, NtSCI1 se caracterizaria como uma proteína nucleolar até que sua função fosse requisitada em outro compartimento. Neste momento, a proteína seria conduzida para fora do nucléolo a fim de exercer novas funções no ambiente nuclear. Esta hipótese é particularmente interessante, uma vez que a interação de NtSCI1 e a proteína Nt14-3-3D2 foi observada, *in vivo*, pela técnica de BiFC, junto à eucromatina, comprovando a presença de NtSCI1 fora do ambiente nucleolar.

Figura 42: Imagens mostrando o ensaio de co-localização de NtSCI1-GFP com a proteína SRP34-mRFP de Arabidopsis, realizado em células foliares de *N. benthamiana*. **(A)** Na sequência de cinco imagens é possível observar, respectivamente, a marcação com DAPI (azul) sinalizando a presença da proteína NtSCI1-GFP (verde) no núcleo, onde também encontra-se a proteína AtSRP34-mRFP (vermelho). Na quarta imagem (*merge*) é possível notar que NtSCI1-GFP não está co-localizada com AtSRP34-mRFP, fato confirmado pela não sobreposição do sinal de fluorescência de ambas as proteínas na imagem de projeção ortogonal. **(B)** Imagens do núcleo celular expressando as mesmas proteínas descritas em A. Na imagem de projeção ortogonal é possível observar que as proteínas encontram-se co-localizadas em certas regiões (seta apontando para a esquerda), enquanto em outras áreas do núcleo esta co-localização não é evidenciada (seta apontando para a direita). Em **C** pode-se observar a co-expressão de NtSCI1-GFP e AtCYC64-mRFP, onde é possível visualizar que NtSCI1-

GFP apresenta-se co-localizado com *splicing speckles*. Ainda na imagem C, é possível observar a presença da proteína NtSCI1-GFP concentrada em uma região nuclear onde não é observada a proteína AtCYC64-mRFP utilizada como marcador de *Speckles* (seta), sendo este compartimento, muito provavelmente o nucléolo. Imagens obtidas no microscópio Leica TCS SP5 (Leica Microsystems – FMRP/USP).

A hipótese de o padrão de localização de NtSCI1-GFP difusamente espalhado no núcleo ser resultante da superexpressão da proteína sob controle do promotor 35S também foi considerada. Entretanto, se realmente se tratasse de artefato por excesso de proteína, esta deveria ser observada de forma aleatória no núcleo e não localizada de forma precisa e co-localizando com os *splicing speckles*.

Segundo Shaw & Brown (2004), Corpos de Cajal são corpúsculos nucleares associados ao nucléolo e correspondem a agrupamentos de proteínas envolvidas na maturação e transporte de *small nuclear ribonucleoproteins* (componentes de *spliceossomos*) e *small nucleolar RNAs* (RNAs que guiam modificações químicas em outros RNAs). Já os *Speckles*, acredita-se que sejam sítios de montagem e estocagem dos componentes dos spliceossomos (*splicing factors*). O nucléolo corresponde a um compartimento multifuncional presente no núcleo de células eucarióticas, com papel bem estabelecido nos processos de transcrição de DNA ribossomal (rDNA), processamento de pré-mRNAs e montagem de subunidades ribossomais (Cockell & Gasser, 1999; Pendle *et al.*, 2005, Brown & Shaw, 2008). Entretanto, estudos recentes vêm reforçando a multifuncionalidade do nucléolo, revelando novas particularidades deste compartimento, como o envolvimento de proteínas nucleolares específicas na regulação do ciclo celular, apoptose e controle do envelhecimento. Estas funções são principalmente realizadas pelo nucléolo durante a Interfase e se tornam reprimidas durante a mitose, quando o nucléolo é desmontado (Zharskaya & Zatsepina, 2007).

A análise proteômica do nucléolo de células humanas revelou que aproximadamente 30% das proteínas identificadas neste compartimento tem função relacionada à biogênese ribossomal (Biosvert *et al.*, 2007), sendo as demais relacionadas a processos adicionais que ainda permanecem desconhecidos. A primeira análise proteômica do nucléolo de plantas (*Arabidopsis thaliana*) foi realizada por Pendle *et al.* (2005) e identificou 217 proteínas nucleolares. A comparação deste proteoma com o realizado em humanos revelou a presença de várias proteínas em comum, proteínas específicas de plantas, proteínas *unknown* e proteínas nucleolares em plantas que são consideradas não-nucleolares em humanos. Estes dados sugerem a possibilidade de que, em plantas, o nucléolo possa ter funções adicionais que

envolvam a exportação e monitoramento de mRNAs (Pendle *et al.*, 2005). Segundo Brown & Shaw (2008), além de sítio de biogênese ribossomal, o nucléolo de plantas apresenta outras funcionalidades que incluem o silenciamento gênico transcricional; a biogênese, o controle de qualidade e a exportação de mRNAs; a montagem de ribonucleoproteínas (RNPs); o sensoramento de estresse; e controle do ciclo celular e senescência.

A presença, no nucléolo, de proteínas envolvidas com a regulação do ciclo celular e replicação do DNA sugerem que este compartimento desempenhe um papel importante durante a mitose. Esta hipótese é reforçada pelo fato de várias proteínas se mostrarem associadas ao nucléolo em estágios específicos do ciclo celular, como resultado de modificações pós-traducionais do tipo fosforilação, que regem a dinâmica das mesmas neste compartimento. Assim, o nucléolo desempenharia um importante papel na regulação do estado de fosforilação de proteínas que são responsáveis pela progressão do ciclo celular (Boisvert *et al.*, 2007). Outro mecanismo utilizado pelo nucléolo para regular atividades proteicas específicas durante o ciclo celular é descrita por Carmo-Fonseca *et al.* (2000). Os autores sugerem que o nucléolo atuaria como um compartimento sequestrador de complexos regulatórios, os quais são mantidos inativos neste compartimento em momentos específicos do ciclo celular. Diante destes dados, seria sensato propor que NtSCI1 fosse mantido inativo no nucléolo até que sua função fosse requisitada no núcleo em um momento específico (início) do ciclo celular. Outra hipótese, que melhor representa os resultados apresentados até o momento, seria que NtSCI1 atuasse sequestrando proteínas específicas e mantendo-as inativas no nucléolo, até que sinais moleculares originados pela maquinaria de controle da progressão do ciclo celular, possivelmente o início da mitose, indicassem para NtSCI1 deixar de inativar estas proteínas, as quais passariam a atuar no controle do ciclo celular.

4.6 Localização Subcelular de NtSCI1-GFP durante as fases do ciclo celular.

DePaoli *et al.* (2011) descreveram a observação de dois padrões de localização subcelular da proteína NtSCI1-GFP, 1- concentrado no nucléolo, 2- espalhado no núcleo. Diante dos resultados obtidos até o momento, foi sugerido que o segundo padrão, menos frequentemente encontrado, fosse dependente da fase do ciclo celular. Neste caso, NtSCI1 seria uma proteína dinâmica, capaz de alterar sua localização de acordo com a progressão do ciclo. Com o objetivo de investigar a possível alteração da localização subcelular de NtSCI1 durante as fases do ciclo celular, duas estratégias foram executadas. Primeiro, células dos

meristemas apical e radicular de plântulas transgênicas $35S_{prom}::NtSCI1$ -GFP (descritas no item 4.1.1) foram observadas, buscando-se células em diferentes fases do ciclo celular. Segundo, a mesma estratégia foi realizada em culturas de células BY-2 de tabaco transformadas de forma estável com a construção $35S_{prom}::NtSCI1$ -GFP.

Para facilitar a identificação dos núcleos nas diferentes fases do ciclo celular, as células foram marcadas com o corante Hoechst 33342, um composto dito *supravital*, uma vez permite a sobrevivência das células durante o tratamento. Por se intercalar na fita dupla de DNA, o corante Hoechst 33342 permite a localização da cromatina e revela o padrão de organização da mesma durante o ciclo celular, permitindo a identificação da fase em que cada célula se encontra. Esta identificação, baseada no padrão de disposição da cromatina marcada com Hoechst, foi realizada conforme o descrito em Cook *et al* (2013).

4.6.1 Localização subcelular da proteína NtSCI1-GFP durante as fases do ciclo celular em meristemas de plântulas transgênicas de *N. tabacum* $35S_{prom}::NtSCI1$ -GFP

Para investigar a localização subcelular de NtSCI1 durante as fases do ciclo celular, foi necessária a observação de células em intensa atividade mitótica e superexpressando a proteína NtSCI1-GFP. Para isso, foram observadas células dos meristemas radicular e apical (e primórdios foliares) de plântulas transgênicas de *N. tabacum* $35S_{prom}::NtSCI1$ -GFP. Apesar da marcação com Hoechst ter sido bastante eficiente nas células do meristema radicular, pouca ou nenhuma proteína NtSCI1-GFP foi observada, não permitindo o registro de imagens e tão pouco o entendimento da dinâmica espacial de NtSCI1. Já as células do meristema apical e primórdios foliares mostraram resultados satisfatórios, apesar da marcação com Hoechst não ser tão eficiente neste tecido quanto o observado no meristema radicular. Como mostra a Figura 43, células em diferentes fases do ciclo celular puderam ser observadas, baseando-se na disposição da cromatina revelada pelo marcador Hoechst.

Na Figura 43A, como esperado, podem ser observadas inúmeras células em Interfase, como representada pela célula I. Células em Interfase apresentaram a proteína NtSCI1-GFP concentrada no interior de um nucléolo relativamente grande. De fato, em plantas, células meristemáticas são caracterizadas por grandes nucléolos (González-Camacho & Medina, 2005) devido à intensa atividade de biogênese ribossomal previamente necessária para a produção de novas células.

Nenhuma alteração na localização subcelular da proteína NtSCI1-GFP foi observada no início da Prófase (Figura 42A, célula II), uma vez que a proteína continua a ser observada

no interior do(s) nucléolo(s). No final da Prófase e início da Prometáfase, ocorre a desmontagem do nucléolo, e os componentes nucleolares migram para o nucleoplasma se posicionando na periferia dos cromossomos (Zharskaya & Zatsepina, 2007; Boisvert *et al.*, 2007; Shaw & Brown, 2012). Nenhuma célula foi visualizada no final da Prófase e Prometáfase, talvez pela difícil identificação e visualização de núcleos nestas fases do ciclo, ou pela curta duração das mesmas. Apenas uma célula (número IV, Figura 43C) apresenta características de Prometáfase, com cromossomos condensados e aparentemente se posicionando no centro da célula. Entretanto, também há a possibilidade de que esta célula estivesse no início da Anáfase, uma vez que não é possível saber se os cromossomos estão dando início à formação da placa metafásica ou iniciando a separação das cromátides irmãs. Seja em Prometáfase ou início de Anáfase, pouca proteína NtSCI1-GFP está presente na célula IV. Apenas um pequeno sinal de fluorescência é observado nesta célula, o que poderia se tratar da proteína NtSCI1-GFP dispersa no citoplasma, uma vez que o envelope nuclear já foi desfeito nesta etapa. Também é possível que a proteína NtSCI1-GFP estivesse sofrendo o processo de degradação, uma vez que a quantidade de proteína é significativamente menor do que o observado em células em Interfase, por exemplo. Finalmente, outra interpretação para esta observação é que o sinal poderia se tratar apenas de *background*. Estas duas últimas hipóteses sugerem que NtSCI1 não esteja presente em determinadas fases do ciclo celular.

Na Figura 43B observa-se uma célula em Metáfase (célula III) com a típica disposição dos cromossomos no centro da célula constituindo a placa metafásica. Novamente, pouco ou nenhum sinal de fluorescência da proteína é observado, reforçando a hipótese de que NtSCI1-GFP não esteja presente em algumas fases do ciclo celular. A proteína NtSCI1-GFP também não é visualizada em células no início de Anáfase (célula V, Figura 43A), e só volta a ser observada na Telófase (Figura 43B, célula VI), onde novamente apresenta-se no interior do núcleo, com sinais de concentração no nucléolo.

É importante ressaltar que nenhuma das células observadas apresentou o segundo padrão de localização subcelular descrito por DePaoli *et al* (2011), e também observado neste trabalho, onde a proteína estaria dispersa dentro do núcleo. A não observação deste padrão de localização subcelular de NtSCI1-GFP em meristemas de transgênicos estáveis é sugestivo de que ele ocorra em um momento muito específico e de curta duração do ciclo celular.

Figura 43: Imagens de microscopia confocal do meristema apical de plântulas transgênicas de *N. tabacum* expressando NtSCI1-GFP. A primeira coluna mostra núcleos destas células em diferentes fases do ciclo celular corados com Hoechst33342. A segunda coluna apresenta a localização subcelular da proteína NtSCI1-GFP nestes núcleos, e finalmente a terceira coluna representa a sobreposição das duas primeiras. (A) Núcleo de células em Interfase (I), Prófase (II) e Anáfase (V). (B) Núcleo de células em Metáfase (III) e Telófase (VI). (C) Núcleo celular possivelmente em Prometáfase ou início de Anáfase (IV). Imagens obtidas utilizando-se o aparelho Leica TCS SP5 (Leica Microsystems – FMRP/USP).

4.6.2 Localização subcelular da proteína NtSCII-GFP durante as fases do ciclo celular em culturas de células BY-2 expressando 35S_{prom}::NtSCII-GFP de forma estável.

Para confirmar os resultados descritos no item anterior, optou-se por investigar a localização subcelular da proteína NtSCII durante as fases do ciclo celular em culturas de células BY-2 de *N. tabacum* transformadas de forma estável com a construção 35S_{prom}::NtSCII-GFP. Novamente, a marcação do DNA com o corante Hoechst 33342 serviu para guiar a identificação da fase do ciclo celular em que cada célula se encontra. Como pode ser observado nas Figuras 43B e D (célula I), a proteína NtSCII-GFP encontra-se localizada no interior de um grande nucléolo em células interfásicas. A Figura 44A, apresenta, em detalhes, a localização de NtSCII-GFP em uma célula em Interfase. Na imagem, a proteína aparece ocupando o interior do nucléolo, porém nenhuma proteína é observada na região da cavidade do nucléolo. Este resultado é muito semelhante ao encontrado em células do meristema apical de plântulas transgênicas superexpressando NtSCII-GFP e comprova a presença de NtSCII no nucléolo de células em Interfase.

Em células na fase de Prófase (Figuras 43A, B e C, células II) a proteína NtSCII-GFP também é observada no interior do nucléolo, porém estes são significativamente menores, e geralmente mais numerosos do que os observados em células em Interfase. Em algumas células em Prófase, é possível visualizar a proteína NtSCII-GFP no interior de 2 (Figura 45B) ou até 6 nucléolos (Figura 45C), fato incomum diante dos dados presentes na literatura. A utilização de células BY-2 permitiu a observação, em detalhes, da localização da proteína NtSCII-GFP no interior do nucléolo. Comparando as imagens de células em Interfase com as em Prófase, além da quantidade e tamanho dos nucléolos em cada célula serem diferentes, a proteína NtSCII-GFP parece não ocupar a periferia deste compartimento durante a Prófase, permanecendo restrita à região mais central (Figura 45B) incluindo a região da cavidade nucleolar (Figura 45C).

Da mesma forma que descrito no item anterior, a proteína NtSCII-GFP não foi observada em células em Metáfase (Figura 44C e D, célula III). Mesmo em detalhe (Figura 45D), pouco ou nenhum sinal da proteína é observado nesta fase do ciclo celular. Como relatado na literatura, durante a Metáfase e Anáfase os componentes nucleolares se posicionam ao redor dos cromossomos condensados. Dessa forma, seria esperado que, caso NtSCII estivesse presente nestas fases, esta proteína seria observada na periferia dos cromossomos, o que não foi observado. Estes dados sugerem que NtSCII seja degradado durante a fase de Prófase, desaparecendo por completo durante a Metáfase e Anáfase (Figuras

44D, célula IV e 45E). A proteína NtSCI1-GFP só volta a ser observada no final da Telófase (Figura 44B, célula V), onde aparece novamente no interior de um ou mais nucléolos (Figura 45F).

Figura 44: Microscopia confocal de células BY-2 de tabaco, transformadas de forma estável com a construção 35S_{prom}::NtSCI1-GFP, marcadas com Hoerchst 33342. A primeira coluna apresenta núcleos marcados com Hoerchst33342. A segunda coluna apresenta a proteína NtSCI1-GFP. Na terceira coluna aparece a sobreposição das duas primeiras imagens. (A) Padrão de localização subcelular da proteína NtSCI1-GFP em células em Prófase (células II). (B) Localização de NtSCI1-GFP em células em Interfase (I), Prófase (II) e Telófase (V). (C) A proteína NtSCI1-GFP está presente no nucléolo de células em Prófase (II), mas desaparece na Metáfase (III). (D) A proteína NtSCI1-GFP também não está presente em células em Anáfase (IV). Na imagem também se observa uma célula em Interfase (I) e outra em Metáfase (III). Imagens obtidas utilizando-se o aparelho Leica TCS SP5 (Leica Microsystems – FMRP/USP).

O fato da proteína NtSCI1-GFP não ser observada durante as fases de Metáfase e Anáfase sugere duas hipóteses. 1) A proteína NtSCI1 não é necessária nestas fases do ciclo celular, portanto a célula deixa de sintetizá-la neste período. Neste caso, existiria um controle transcricional capaz de inibir a expressão e consequentemente a síntese da proteína NtSCI1 durante estas fases do ciclo. 2) A proteína NtSCI1 não deve estar presente nestas fases, de modo que um sistema de degradação proteica seja responsável pela sua eliminação. Nos ensaios de localização, como NtSCI1-GFP é expressa sob o controle do promotor 35S, seria esperado que a síntese da proteína não fosse afetada por um possível controle a nível de transcrição de NtSCI1. Dessa forma, a explicação mais coerente para o desaparecimento de NtSCI1-GFP durante a Metáfase e Anáfase, seria a degradação massiva desta proteína no final da Prófase.

Alguns detalhes da localização de NtSCI1-GFP e informações presentes na literatura reforçam esta teoria. Stępiński (2012) observou que o sistema ubiquitina-proteassoma está exclusivamente localizado na cavidade nucleolar de células do meristema radicular de soja, onde realiza a degradação de proteínas previamente marcadas. Já a proteína NtSCI1-GFP, que não era observada na cavidade nucleolar durante a Interfase, passa a ocupar este compartimento durante a Prófase. Estas informações fornecem indícios de que, durante a Prófase, se inicie um processo de marcação e encaminhamento da proteína NtSCI1-GFP para a via de degradação, por ação do sistema ubiquitina-proteassomo. Isto não quer dizer que o controle da quantidade da proteína NtSCI1 endógena, durante o ciclo celular, ocorra apenas via degradação pelo sistema ubiquitina-proteassomo. É provável que o controle também ocorra a nível transcricional, por meio da ativação/repressão da transcrição por fatores e reguladores do ciclo celular.

Os dados descritos até o momento sugerem que a proteína NtSCI1-GFP está presente no nucléolo de células em Interfase e começa a desaparecer no final da Prófase. A proteína

desaparece completamente durante a Metáfase e Anáfase, só voltando a aparecer no final da Telófase, ou seja, os dados sugerem fortemente que NtSCI1 seja regulada pelo ciclo celular. Este comportamento cíclico de NtSCI1, envolvendo ciclos de síntese e degradação, é característico de outros reguladores do ciclo celular e é coerente com a função de inibidor do ciclo celular descrita por DePaoli *et al* (2011). De fato, a regulação de NtSCI1 durante o ciclo celular é semelhante à regulação da proteína AtWEE1 (Cook *et al.*, 2013), o principal regulador negativo do ciclo celular em G2.

Também é na Interfase que ocorrem os *checkpoints* do ciclo celular ($G1 \rightarrow S$ e $G2 \rightarrow M$), fase crucial para a progressão do ciclo e que requer a atividade de reguladores, e na qual NtSCI1 está presente. Entretanto, não se sabe ainda se NtSCI1 atuaria no *checkpoint* $G1 \rightarrow S$ ou $G2 \rightarrow M$, ou até mesmo em ambos. Estudos da expressão de NtSCI1 durante estas subfases da Interfase poderiam ajudar na compreensão do modo de atuação desta proteína no controle do ciclo celular.

Vários reguladores do ciclo celular têm sido reportados se associando ao nucléolo em fases específicas do ciclo celular, sugerindo um papel para este compartimento na regulação de aspectos específicos da progressão do ciclo celular (Boisvert *et al.*, 2007). Existem evidências de que, no nucléolo, ocorra a regulação de proteínas do ciclo celular por meio de fosforilações reversíveis. Em *Schizosaccharomyces pombe*, a proteína CDC14 é uma fosfatase que promove a saída da célula do processo mitótico, ao desfazer a fosforilação inibitória de reguladores específicos. Esta proteína é sequestrada no nucléolo durante a Interfase, e mantida inativa neste compartimento até o início da Anáfase, de modo a prevenir um término não-coordenado do ciclo mitótico (Visintin *et al.*, 1998). Assim, como SpCDC14, seria sensato pensar que NtSCI1 pudesse estar sequestrado, ou manter proteínas sequestradas, no interior do nucléolo.

Entretanto, diferente da proteína SpCDC14, é esperado que NtSCI1 permaneça na forma ativa no nucléolo. Por exemplo, nos itens 4.2 e 4.3 são descritas as interações entre NtSCI1 e NtDEAD-BOX, NtSTK, NtCDKG;2 e NtCICLINA-L1, que ocorrem exclusivamente em subcompartimentos do nucléolo. Estas interações não apenas confirmam que NtSCI1 é uma proteína ativa no ambiente nucleolar, como participa de eventos relacionados à transcrição, processamento de RNAs e controle do ciclo celular que aí acontecem e que ainda não são totalmente compreendidos.

Figura 45: Microscopia confocal, em maior aumento, de células BY-2 de tabaco, transformadas de forma estável com a construção 35S_{prom}::NtSCI1-GFP, marcadas com Hoerchst 33342. Primeira coluna apresenta núcleos marcados com Hoerchst33342. A segunda coluna apresenta a proteína NtSCI1-GFP e a terceira coluna apresenta a sobreposição das duas primeiras imagens. (A) Padrão de localização subcelular da proteína NtSCI1-GFP em células em Interfase, (B e C) Prófase, (D) Metáfase, (E) Anáfase e (F) Telófase. Imagens obtidas utilizando-se o aparelho Leica TCS SP5 (Leica Microsystems – FMRP/USP).

Particularmente, o proteoma nucleolar de plantas revelou a presença de seis componentes do complexo de junção de exons (EJC), o qual também foi identificado no nucléolo em ensaios de localização com proteínas fusionadas à GFP (Pendle *et al.*, 2005). Adicionalmente, muitos componentes da transcrição, *splicing* de mRNAs e tradução, além de proteínas DEAD-BOX, de interação com RNA/DNA e chaperonas também foram encontrados no proteoma nucleolar de plantas (Pendle *et al.*, 2005). Estes dados não só mostram a diversidade de eventos moleculares que ocorrem no nucléolo, como chama a atenção para o fato de que conhecemos muito pouco sobre a complexidade e funcionalidade deste compartimento multifuncional.

4.7 Construção do Interactoma de SCI1

As diferentes estratégias utilizadas neste trabalho permitiram a identificação de vários potenciais parceiros de interação com NtSCI1, sendo que 11 destes tiveram sua interação confirmada. É importante esclarecer que *N. tabacum* não apresenta genoma sequenciado. Dessa forma, a identificação das sequências codificadoras dos parceiros de interação de NtSCI1 descritos neste trabalho foi feita, principalmente, com base nos homólogos de Arabidopsis. Apenas as proteínas 14-3-3D2, 14-3-3A e ADK2S (Quinase de adenosina isoforma 2S) foram identificadas com base nas sequências de *N. tabacum* já descritas na literatura, e a proteína STK (*Storekeeper*) identificada com base nos homólogos de tomate, batata e *N. benthamiana*.

Para a construção do interactoma, primeiramente foram estabelecidas as interações entre SCI1 e seus 11 parceiros proteicos identificados neste trabalho (nodos azuis – Figura 46). Análises *in silico* dos parceiros de interação de SCI1 (homólogos de Arabidopsis) utilizando a ferramenta GENEMANIA, permitiram a identificação de proteínas que interagem com seus parceiros de interação. Estas interações são baseadas em dados presentes na

literatura e correspondem a interações físicas (já comprovadas – conectores contínuos) e também preditas (conectores descontínuos). Dessa forma, foi possível a elaboração de uma rede de interações proteína-proteína (Figura 46), centrada em NtSCI1, seus parceiros de interação e proteínas que interagem com seus parceiros. A esta rede de interações foi dado o nome de Interactoma de NtSCI1.

Na Figura 46, a proteína Nt14-3-3A aparece como um dos seus parceiros de interação, pois como mencionado anteriormente, sua interação com NtSCI1 foi confirmada por Bertolino (2014). O interactoma mostra que NtSCI1 interage com grupos de proteínas com certas características em comum. Por exemplo, as proteínas NtCDKG;2 e NtCICLINA-L1 são possíveis homólogos de AtCDKG;2 e AtCICLINA-L1, respectivamente. Estas proteínas supostamente formam complexos (Van Leene *et al.*, 2010), e supõe-se que estejam envolvidas com o processamento de RNAs, uma vez que, possuem domínios SR que são encontrados em proteínas que atuam no processo de *splicing* (Huang *et al.*, 2013). Estas proteínas possuem interação confirmada (ou predita) com dois subgrupos de proteínas. O primeiro é composto por putativos reguladores de ciclo celular, inclusive um inibidor (KRP4) e ciclinas das classes T, L e H, com funções ainda desconhecidas. O segundo, formado por reguladores transcricionais e fatores de *splicing*, como SF2, SC35, *pre-mRNA-processing factor 19-2*, RSZ32 e RSZ33. Estes últimos também apresentam interação predita com a helicase de RNA 35 do tipo DEAD-BOX, homólogo de Arabidopsis da helicase de RNA aqui identificada e confirmada como parceira de interação de NtSCI1.

Como mencionado anteriormente, a proteína RSZ33 também interage com CDKG;1 (o outro membro da família da CDKG;2), que já teve seu papel comprovado no processamento do pré-mRNA do gene CalS5. Neste grupo de proteínas, envolvidas com o processamento de RNAs, ainda está incluído o fator de *splicing* com domínio SWAP, cujo homólogo de Arabidopsis possui interação confirmada com outro fator de *splicing* portador do domínio PWI e interação predita com ao menos outros quatro fatores (fator de *splicing* 4, CLPS3, CLPS4 e RNPS1). Ainda na Figura 46, é mostrado que NtSCI1 interage com dois fatores de transcrição, HOMEBOX-22 e *DNA-binding STK*, sugerindo a participação de NtSCI1 no controle da transcrição gênica. Estes resultados indicam a inter-relação entre as proteínas presentes no interactoma de NtSCI1 e sugerem que as mesmas atuem em ações coordenadas, ou formando complexos, para a execução de tarefas mais elaboradas associadas ao controle transcricional e *splicing*.

Finalmente, a interação de NtSCI1 com a quinase de adenosina NtADK2S é um forte indício de que NtSCI1 possa estar envolvido com o controle do ciclo celular mediante a

inativação de citocininas na célula. O fato do homólogo desta quinase em *Arabidopsis* interagir com um elemento responsivo à auxina – SAUR fortalece esta hipótese, uma vez que o controle da progressão do ciclo celular por citocininas ocorre em associação com o hormônio auxina.

4.8 Hipótese de atuação de NtSCI1 na inibição do ciclo celular por meio do controle transcricional e *splicing*.

Com base nos resultados apresentados neste trabalho e informações disponíveis na literatura, foi possível a elaboração de um modelo para o possível mecanismo de atuação de NtSCI1 no controle do ciclo celular. Nos ensaios de localização subcelular descritos no item 4.4, foi observado que a proteína NtSCI1-GFP está presente no nucléolo de células em Interfase e Prófase, porém a proteína desaparece na Metáfase e Anáfase, só reaparecendo no nucléolo no final da Telófase. Como mencionado no item 4.3, a interação entre NtSCI1 e NtCDKG;2 foi observada, *in vivo*, no interior do nucléolo. Nos ensaios de interação entre NtSCI1 e NtCICLINA-L1-DDB, a interação entre estas proteínas também foi observada no nucléolo, porém a interação estava restrita a uma região específica, próxima à periferia, mais especificamente na região NOR.

Como mencionado no item 4.5.1, o controle da entrada e saída do ciclo celular em células eucarióticas é regulado, respectivamente, pela ativação e inativação de *cyclin-dependent kinases* (CDKs). A inativação de CDKs pode ocorrer de duas maneiras: a primeira via sistema proteolítico dependente de ubiquitina, responsável pela degradação de ciclinas, proteínas necessárias para a ativação das CDKs; e a segunda, por inibidores de CDKs, que correspondem a proteínas que se ligam ao complexo CDK-ciclina, inibindo-o.

Figura 46: Interactoma de SCI1 construído com base nos seus parceiros de interação encontrados neste trabalho (nodos azuis). Conectores contínuos representam interações físicas confirmadas e conectores descontínuos representam interações previstas dos seus homólogos de Arabidopsis, segundo informações disponíveis pelas ferramentas GENEMANIA (<http://www.genemania.org/>) e ARABIDOPSIS-INTERACTIONS-VIEWER (<http://bar.utoronto.ca>). Os parceiros dos parceiros de interação de SCI1 (nodos verdes) foram encontrados utilizando-se as proteínas homólogas de Arabidopsis. Legenda: nodos azuis com linha única – identificados com base nas proteínas de *N. tabacum* já descritas na literatura; nodos azuis com linha dupla – homólogos de Arabidopsis).

Sabe-se que os homólogos de NtCDKG;2 e NtCICLINA-L1 de *Arabidopsis* são expressos durante todo o ciclo celular (Van Leene *et al.*, 2010), assim, seria esperado que moléculas regulatórias como SCII controlassem sua atividade no decorrer do ciclo celular. É proposto (Figura 47) que durante a interfase, NtSCII atue no nucléolo, mantendo NtCDKG;2 e NtCICLINA-L1 inibidas, de forma que sejam incapazes de estabelecer um complexo ativo prematuramente. Como NtSCII-GFP é visto no nucléolo até G2/Prófase, acredita-se que SCII mantenha estas proteínas sequestradas (inativadas) no nucléolo até o início do ciclo mitótico, quando o complexo CDKG;2-CICLINA-L1 desempenharia alguma atividade importante. O término da inativação de CDKG;2 e CICLINA-L1 por SCII seria resultado de sinais enviados pela própria maquinaria do ciclo celular, requisitando a atividade deste complexo. Neste momento, SCII seria reconhecido por proteínas 14-3-3s, que seriam responsáveis pela sua retirada do nucléolo, provavelmente encaminhando-o para a degradação. A interação de NtCDKG;2 com NtCDKF;1 em ensaios de duplo-híbrido (Lubini, 2012) permite sugerir que NtCDKF;1 fosforile NtCDKG;2, sinalizando a ativação do complexo.

A interação de Nt14-3-3D2 com a proteína NtWEE1 foi confirmada por duplo-híbrido (Figura 48) e reforça o envolvimento de NtSCII com proteínas do ciclo celular. Acredita-se que a interação entre Nt14-3-3D2 e a proteína NtWEE1 tenha o propósito de manter NtWEE1 inativa durante a divisão celular, como já descrito em outros organismos (Sorrell *et al.*, 2003; Grønlund *et al.*, 2009; Gardino & Yaffe, 2011, Cook *et al.*, 2013), impedindo-a de inativar o complexo CDK-ciclina, por meio de fosforilação inibitória.

A inexistência de NtSCII durante a Metáfase e Anáfase foi associada à degradação desta proteína durante a Prófase e coincide com a “desmontagem” do nucléolo no final desta fase do ciclo. No final da Telófase, SCII novamente acumula-se no nucléolo, onde novamente sequestraria CDKG;2 e CICLINA-L1, mantendo-as inativas até o início de um novo ciclo mitótico.

Figura 47: Modelo da hipótese de atuação de NtSCI1 na inibição do ciclo celular, mediante a inativação de NtCDKG;2 e NtCICLINA-L1. Primeira imagem: Interfase. Segunda imagem: entrada no ciclo mitótico: prófase.

Figura 48: Ensaio de duplo-híbrido mostrando a interação positiva entre as proteínas Nt14-3-3D2 e NtWEE1. Na imagem observa-se que apenas as células portando as proteínas híbridas BD-NtWEE1 e AD-Nt14-3-3D2 são capazes de crescer em meio não suplementado com histidina e 0,05mM de 3AT, comprovando a ativação do gene repórter *HIS3*. Já o ensaio para a interação entre NtWEE1 e Nt14-3-3A foi negativo, uma vez que não houve crescimento celular no meio sem histidina.

O complexo CDKG;2-CICLINA-L1 ainda não possui função bem estabelecida e/ou claramente envolvida com o ciclo celular. Entretanto, como descrito anteriormente, existem algumas evidências que associam AtCDKG;2 e AtCICLINA-L1 ao processamento de RNAs. As CDKs de plantas são divididas em oito classes, de CDKA a CDKG, com base nas sequências-motivo de ligação a ciclinas (Inzé, 2007). Algumas CDKs de *A. thaliana*, como as CDKCs, fosforilam o domínio C-terminal (CTD) da RNA polimerase II (RNAPII) e estão envolvidas com a extensão da transcrição (Fülöp *et al.*, 2005) e com o processamento de pré-mRNAs (Kitsios *et al.*, 2008). As CDKDs, associadas à ciclina H (CYCH) como subunidade regulatória, fosforilam a CTD da RNAPII (Hajheidari *et al.*, 2012). As CDKEs, em complexo com ciclinas C, fosforilam a CTD da RNAPII, tendo efeito negativo na transcrição (Tank & Thaker, 2011). A AtCDKF;1 fosforila outras CDKs, como a CDKA e a CDKD, causando a ativação destas quinases, ou seja, atuando como CAK ou CAKAK (*CDK-activating kinase-activating kinase*), respectivamente (Hajheidari *et al.*, 2012). A AtCDKF;1 também realiza a fosforilação sítio-específica de resíduos da CTD da RNAPII. Plantas de *Arabidopsis* mutantes para este gene possuem níveis reduzidos de determinados pequenos RNAs, como o miR156, mi162 e miR165 (Hajheidari *et al.*, 2012).

A CDKG é uma classe distinta de CDKs, possui apenas 2 membros em *Arabidopsis* (AtCDKG;1 e AtCDKG;2) e não tinha função conhecida até recentemente. Huang *et al.* (2013) demonstraram que a AtCDKG;1 interage com o fator de *splicing* RSZ33 (*Arginine/Serine-Rich Zinc Knuckle-Containing Protein 33*), por meio do seu motivo Ser/Arg

(SR) na porção N-terminal, e apresenta um papel importante na regulação do processamento do pré-mRNA do gene *CalS5*, necessário para a formação da parede dos grãos-de-pólen. AtCDKG;1 possui 4 motivos RS (*Arginine/Serine*) na região N-terminal, 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 (Ferreira, 2013). Além disso, como pode ser observado no interactoma de SCII (Figura 46) foram descritas interações de AtCDKG;2 e AtCICLINA-L1 com várias proteínas envolvidas no processo de *splicing*. Somados, estes dados sugerem que, assim como CDKG;1, também a CDKG;2 participe no processamento de mRNAs.

O fato de NtSCII não interagir com as principais, e canonicamente descritas, moléculas regentes do ciclo celular de plantas, como CDKAs, CDKBs, CYCBs e CYCDs, sugere que ele atue de uma maneira distinta dos demais inibidores descritos. A interação de NtSCII com o complexo CDKG;2-CICLINA-L1, supostamente envolvido no processamento de RNAs, sugere que NtSCII realize a inibição do ciclo celular de uma maneira bastante particular, e possivelmente associada ao processamento de RNAs. Esta inferência é também baseada nos resultados de interação presentes neste trabalho, que mostram a interação de NtSCII com fatores de transcrição (HOMEBOX-22 e a *DNA-binding STK*), uma helicase de RNA DEAD-BOX e um fator de *splicing* com domínio SWAP. Além disso, os homólogos destas proteínas de Arabidopsis apresentam interações com diversas proteínas envolvidas no processo de *splicing*. Esta hipótese é também corroborada pela co-localização de NtSCII-GFP com marcadores de *Speckles* em momentos específicos do ciclo celular.

Nesta hipótese levantada, SCII atuaria juntamente com outras proteínas, como fatores de transcrição (HOMEBOX-22 e a *STK*), fatores de *splicing* e a RNA Helicase DEAD-BOX em um complexo multiproteico, responsável pelo controle da transcrição e processamento de mRNAs de genes específicos. Recentemente, foi demonstrado que o complexo CDK11-CICLINA-L de *S. pombe* (possíveis ortólogos de AtCDKG;2 e AtCICLINA-L1) controla a montagem do complexo Mediator da RNA polimerase II mediante a ativação, por fosforilação, de uma de suas subunidades (Drogat *et al.*, 2012). Mediator é um complexo multiprotéico, que atua como uma interface para transmitir a mensagem dos fatores de transcrição para uma unidade transcricional basal, estruturada na região promotora de genes específicos, promovendo a ativação/repressão transcricional dos mesmos (Mathur *et al.*, 2011).

Diante deste cenário, é possível especular que ao manter as proteínas CDKG;2 e CICLINA-L1 inativas no nucléolo, SCII estaria impedindo a prematura estruturação do complexo Mediator e, consequentemente, inibindo a transcrição de genes específicos, possivelmente reguladores do ciclo celular. No início do ciclo mitótico, SCII deixaria de inibir a formação do complexo CDKG;2-CICLINA-L1, permitindo a ativação do complexo Mediator e a consequente transcrição dos genes necessários para a progressão do ciclo celular.

O fato da interação de NtSCII com NtSTK e NtDEAD-BOX (RNA helicase) ser observada no interior do nucléolo é sugestivo que NtSCII também mantenha estas proteínas inativas neste compartimento, liberando-as para exercer seu papel no controle transcricional e processamento de RNAs em momentos específicos do ciclo celular. Apesar da helicase de RNA 35 (NtDEAD-BOX), ainda não ter caracterizada, existem relatos do envolvimento de homólogos de outros membros desta família também no processo de *splicing*. Segundo Cordin & Beggs (2013), oito RNA helicases são requeridas para o *splicing* de pré-mRNAs em eucariotos, promovendo rearranjos conformacionais e assegurando que apenas substratos apropriados prossigam nas reações de *splicing*.

Entretanto, não está excluída a hipótese destas proteínas atuarem no controle da transcrição gênica no interior do nucléolo, uma vez que existem relatos da existência de cromatina associada ao nucléolo (*nucleolus-associated chromatin*) e aglomerados de cromatina já terem sido observados no interior do nucléolo de células de *Sinapis alba* (Deltour *et al.*, 1986), *Zea mays* (Motte *et al.*, 1988) e *Glycine max* (Stępiński *et al.*, 2013).

Outro parceiro de interação de NtSCII é uma proteína portadora do domínio SWAP. Apesar desta proteína ainda não ter sido estudada, domínios conservados presentes em sua sequência remetem a uma possível participação na montagem do pré-spliceossomo. A montagem do spliceossomo é um processo ordenado, no qual as snRNPs U1, U2, U4;U6 e U5 e fatores de *splicing* non-snRNP interagem com o substrato pré-mRNA, definindo os sítios de *splicing* (Cordin & Beggs, 2013). As snRNPs são constituídas por pequenos complexos proteicos ligados a *small nuclear RNAs* (snRNAs) que formam o núcleo dos complexos de *splicing*. Existem evidências de que as snRNPs U4, U6, U5 e U2 apresentam parte do processo de maturação e montagem no nucléolo (Gerbi & Lange, 2002, Shaw, 2005). Vários fatores de *splicing* de RNA, como o RGH3 α de milho (Fouquet *et al.*, 2011) e RSZp22 de *Arabidopsis* (Tillemans *et al.*, 2006) também foram evidenciados no nucléolo. Além disso, estudos da proteômica nucleolar de plantas confirmam a presença de snRNPs no nucléolo (Pendle *et al.*, 2005), apontando para um possível papel na maturação de snRNAs e

montagem de snRNPs (Brown & Shaw, 2008). Neste mesmo estudo, seis componentes do Complexo de Junção de Exons (EJC) foram encontrados associados ao nucléolo, em contraste com seus ortólogos de animais, que em humanos são encontrados no nucleoplasma e em *Drosophila* no nucleoplasma e *Speckles* (Pendle *et al.*, 2005). A descoberta de proteínas do complexo EJC e fatores de *splicing* e de transcrição, no nucléolo, sugere que aspectos da biogênese de mRNAs em plantas estejam associados ao nucléolo.

A presença de diversas classes de RNAs no nucléolo também tem sido motivo de muitos estudos. Até recentemente, relatos da presença de mRNAs no nucléolo era restrita a poucos mRNAs processados (e.g. c-myc) de mamíferos e o acúmulo de poly(A)+RNA em mutantes de componentes de exportação (Pederson, 1998; Kim *et al.*, 2009). Entretanto, recentemente, alguns microRNAs, como miR-206, e precursores de miRNAs foram encontrados no nucléolo de mioblastos de ratos (Politz *et al.*, 2009); RNAs completamente processados, com *splicing* aberrante e transcritos de genes de exon único também foram encontrados no nucléolo de plantas (Kim *et al.*, 2009). Finalmente, novas funções no metabolismo de RNA têm sido propostas para o nucléolo, como: produção de siRNAs (*small interfering RNAs*) envolvidos no silenciamento da transcrição gênica (Li *et al.*, 2006; Pontes *et al.*, 2006) e maturação de microRNAs (Fang & Spector, 2007), sugerindo que o nucléolo esteja associado com o processamento e tráfego de RNAs entre compartimentos nucleares, nucleoplasma e citoplasma (Gorski *et al.*, 2006; Boisvert, 2007) e detecção de mRNAs aberrantes (Kim *et al.*, 2009).

Considerando a interação de NtSCI1 com fatores de transcrição e *splicing*, a co-localização do mesmo com marcadores de *speckles* e os dados da literatura relatados acima, há fortes evidências de que NtSCI1 participe de aspectos da biogênese de mRNAs, como no controle da transcrição e no processo de montagem do complexo de *splicing*. A literatura apresenta ao menos uma proteína capaz de controlar a progressão do ciclo celular por meio da regulação do processamento de transcritos de proteínas que atuam como reguladores do ciclo celular. A proteína SON de mamíferos (Ahn *et al.*, 2011) seria constituinte de um complexo de *splicing* mais estável, promovendo a ligação de proteínas SR à CTD da RNA polimerase II, em genes cujos mRNAs apresentariam sítios de *splicing* fracos ou sub-ótimos. Curiosamente, tal complexo é construído sobre um conjunto de genes relacionados ao ciclo celular, constituindo um sistema sensor, mediado por SON, para a regulação do ciclo celular. Estes dados sugerem a existência de complexos de *splicing* distintos para conjuntos de genes específicos, como os relacionados ao ciclo celular. De fato, seria coerente que a célula

investisse em moléculas capazes de constituir um complexo mais rápido e eficiente de transcrição e *splicing* de genes reguladores do ciclo celular, uma vez que seus produtos proteicos devem exercer sua função em momentos muito precisos do ciclo celular.

Em suma, os dados relatados neste trabalho e a construção de uma primeira versão do interactoma de NtSCII mostraram seu envolvimento direto e indireto com proteínas associadas ao metabolismo de RNAs, controle da transcrição e regulação do ciclo celular, sugerindo que a atuação de NtSCII no controle do ciclo celular ocorra de forma não canônica, por meio de múltiplos processos paralelos que interconectam aspectos da regulação da transcrição e o processamento de RNAs com o controle do ciclo celular.

Conclusões

V. CONCLUSÕES

Durante a realização do presente trabalho, o gene *SCI1* de *N. tabacum* foi estudado sob vários aspectos, como sua localização subcelular, inclusive durante as fases do ciclo celular, e a identificação de seus parceiros de interação proteína-proteína. As seguintes conclusões finais podem ser apresentadas:

- 1) Plantas transgênicas de *N. tabacum*, superexpressando as proteínas NtSCI1-GFP e NtSCI1-HIS, foram geradas com sucesso e constituem uma importante ferramenta para a produção da proteína NtSCI1 em seu local nativo (estigma/estilete) para utilização nos ensaios de *pull-down* e co-imunoprecipitação.
- 2) Foi construída com sucesso uma biblioteca de cDNAs a partir de RNA extraído de estigma/estilete de *N. tabacum*, para uso no sistema de duplo-híbrido, com representatividade superior a 5×10^6 unidades formadoras de colônias, cDNAs com tamanho médio de 1,5kb e DNA suficiente para a realização de aproximadamente 2700 *screenings*.
- 3) O ensaio de *pull-down*, utilizando a proteína GST-NtSCI1 como isca, revelou a interação de NtSCI1 com várias proteínas interessantes. Dentre estas, a interação de NtSCI1 com a proteína NtCDKG;2 foi confirmada em ensaios de BiFC.
- 4) A interação de NtSCI1 com a proteína NtCICLINA-L1 (putativa subunidade regulatória de NtCDKG;2), foi observada por BiFC no nucléolo e, posteriormente, confirmada por duplo-híbrido.
- 5) A interação de NtSCI1 com NtCDKG;2 e também com NtCICLINA-L1 corrobora a hipótese do envolvimento de NtSCI1 no controle do ciclo celular, atuando como um inibidor do complexo CDK-ciclina, mantendo-os inibidos no interior do nucléolo até o início do ciclo mitótico.

- 6) O *screening* da biblioteca de duplo-híbrido, utilizando BD-NtSCI1 como isca, revelou a interação de NtSCI1 com: uma helicase de RNA DEAD-BOX, uma proteína 14-3-3D2, dois fatores de transcrição (HOMEODOMAIN-22 e STOREKEEPER), um fator de *splicing* portador do domínio SWAP e uma quinase de adenosina;
- 7) Para confirmar os resultados do *screening*, a interação entre NtSCI1 e a helicase de RNA DEAD-BOX foi comprovada em ensaios de BiFC, sendo visualizada no interior do nucléolo.
- 8) A interação de NtSCI1 e o fator de transcrição STOREKEEPER foi comprovada em ensaios de BiFC, a qual foi observada no interior da cavidade do nucléolo.
- 9) A interação entre NtSCI1 e a proteína 14-3-3-D2 foi observada por BiFC no núcleo e nucléolo. Esta interação foi também confirmada em ensaio de co-imunoprecipitação, utilizando a NtSCI1-GFP extraída do estigma/estilete de plantas transgênicas 35Sprom::SCI1-GFP como isca e a proteína recombinante HIS-Nt14-3-3D2, produzida em *E. coli*, como presa.
- 10) A interação de NtSCI1 com seus parceiros proteicos nos ensaios de BiFC ocorre em diferentes compartimentos subnucleares, sugerindo que NtSCI1 apresente uma dinâmica de localização espaço-temporal no ambiente nuclear, a qual seria dependente de sinais moleculares durante as fases do ciclo celular.
- 11) Os ensaios de co-localização de NtSCI1-GFP e marcadores de corpúsculos nucleares mostraram que NtSCI1-GFP aparece totalmente co-localizado com a proteína AtFIBRILLARIN-mRFP, comprovando se tratar de uma proteína nucleolar. A co-localização de NtSCI1-GFP com marcadores de *Speckles* pode ser devido a re-localização de NtSCI1 em fases específicas do ciclo celular;
- 12) A localização subnuclear da proteína NtSCI1-GFP, tanto em linhagens estáveis de células BY-2 como no meristema apical de plântulas transgênicas de *N. tabacum*, foi observada predominantemente no nucléolo de células em interfase e prófase. No início do ciclo mitótico NtSCI1 seria encaminhado para degradação, uma vez que a

proteína não é observada durante a metáfase e anáfase, só reaparecendo novamente no nucléolo no final da telófase. Este padrão cíclico de NtSCI1-GFP durante o ciclo celular é sugestivo de que seja regulado pela maquinaria de controle do ciclo celular

- 13) A interação da proteína Nt14-3-3D2 com NtWEE1 foi confirmada por duplo-híbrido, reforçando o envolvimento de NtSCI1 no controle do ciclo celular.
- 14) A construção de uma versão preliminar do interactoma de NtSCI1 mostrou seu envolvimento direto e indireto com proteínas associadas ao metabolismo de RNAs, controle da transcrição e regulação do ciclo celular, sugerindo que a atuação de NtSCI1 no controle do ciclo celular ocorra de forma não canônica, por meio de múltiplos processos paralelos que interconectam aspectos da regulação da transcrição e o processamento de RNAs com o controle do ciclo celular.

Referências Bibliográficas

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn, E.Y., DeKolver, R.C., Lo, M.C., Nguyen, T.A., Matsuura, S., Boyapati, A., Pandit, S., Fu, X.D., Zhang, D.E. (2011). SON controls cell-cycle progression by coordinated regulation of RNA splicing. *Molecular Cell*, 42(2):185-198.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the The Cell*. 4th ed. New York, NY: Garland Science.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17): 3389-402.
- Bauer, A., Kuster, B. (2003). Affinity purification-mass spectrometry, powerful tools for the characterization of protein complexes. *European Journal of Biochemistry*, 270:570–578.
- Bertolino, L. T. (2014). Estudo das proteínas 14-3-3A e 14-3-3D de *Nicotiana tabacum* L. e seu papel no desenvolvimento floral. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto, São Paulo, 120p.
- Beven, A. F., Lee, R., Razaz, M., Leader, D. J., Brown, J. W., Shaw, P. J. (1996). The organization of ribosomal RNA processing correlates with the distribution of nucleolar snRNAs. *Journal of Cell Science*, 109:1241-51.
- Bland, M. M.; Matzinger, D. F.; Levings, C. S. (1985). Comparison of the mitochondrial genome of *Nicotiana tabacum* with its progenitors species. *Theoretical and Applied Genetics*, 69: 535-541.
- Boisvert, F-M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J., Lamond, A. I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 8:42-49.
- Bracha-Drori, K., Shichrur, K., Katz, A., Oliva, M., Angelovici, R., Yalovsky, S., Ohad, N. (2004). Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant Journal*, 40(3):419-427.
- Brasileiro, A. C. M.; Carneiro, V. T. C. (1998). Manual de Transformação Genética de Plantas. Editora Embrapa Produção de Informação. Brasília.
- Brown, J.W.S., Shaw, P.J. (2008). The Role of the Plant Nucleolus in Pre-mRNA *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 326:291-311.
- Bruckner, A.; Polge, C.; Lentze, N.; Auerbach, D., Schlattner, U. (2009) Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 2763-2788.
- Bueso, E., Munoz-Betomeu, J., Campos, F., Brunaud, V., Martinez, L., Sayas, E., Ballester, P., Yenush, L., Serrano, R. (2014). ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 25 uncovers a role for gibberellins in seed longevity. *Plant Physiology*, 164(2):999-1010.

- Bush, K.T., Goldberg, A.L., Nigam, S.K. (1997). Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(14):9086-9092.
- Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L., Campos, I. (2000). To be or not to be in the nucleolus. *Nature Cell Biology*, (6):E107-12.
- Chen, X. (2005). MicroRNA biogenesis and function in plants. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 579(26):5923-5931.
- Cheung, A. Y.; Wang, H.; Wu, H. (1995). A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell*, 82:383-393.
- Chevalier, D.; Morris, E. R.; Walker, J. C. (2009). 14-3-3 and FHA Domains Mediate Phosphoprotein Interactions. *Annual Review of Plant Biology*, 60: 67-91.
- Chevray, P. M., Nathans, D. (1992). Protein Interaction Cloning in Yeast: Identification of Mammalian Proteins that React with the Leucine Zipper of Jun. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 5789-5793.
- Churchman, M. L., Brown, M. L., Kato, N., Kirik, V., Hülskamp, M., Inzé, D., De Veylder, L., Walker, J. D., Zheng, Z., Oppenheimer, D. G., Gwin, T., Churchman, J., Larkin, J. C. (2006). SIAMESE, a plant-specific cell cycle regulator, controls endoreplication onset in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 18: 3145-3157.
- Cockell, M., Gasser, S. M. (1999). Nuclear compartments and gene regulation. *Current Opinion in Genetics and Development*, 9(2):199-205.
- Cook, G. S., Grønlund, A. L., Siciliano, I., Spadafora, N., Amini, M., Herbert, R. J., Bitonti, M. B., Graumann, K., Francis, D., Togers, H. J. (2013). Plant WEE1 kinase is cell cycle regulated and removed at mitosis via the 26S proteasome machinery. *Journal of Experimental Botany*, 64(7):2093–2106.
- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N. K., Linder, P. (2006). The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*, 367:17-37.
- Cordin, O., Beggs, J. D. (2013). RNA helicases in splicing. *RNA Biology*, 10(1):83-95.
- Cornish, E. C.; Pettitt, J. M.; Boning, I.; Clarke, A. E. (1988). Molecular aspects of fertilization in flowering plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 4: 209-228.
- Cutsem, E. V., Simonart, G., Degand, H. Faber, A. M., Mosomme, P., Boutry, M. (2011). Gel-based and gel-free proteomic analysis of *Nicotiana tabacum* trichomes identifies proteins involved in secondary metabolism and in the (a)biotic stress response. *Proteomics*, 11(3):440-454.
- Deltour, R., Mosen, H., Bronchart, R. (1986). Three-dimensional electron microscopy of the internal nucleolus-associated chromatin and of the nucleolar vacuoles during early germination of *Sinapis alba*. *Journal of Cell Science*, 82:53-71.

- Denhez, F., Lafyatis, R. (1994). Conservation of Regulated Alternative Splicing and Identification of Functional Domains in Vertebrate Homologs to the Drosophila Splicing Regulator, Suppressor-of-white-apricot. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(23):16170-16179.
- DePaoli, H. C. (2006). Análise da expressão gênica no pistilo de *Nicotiana tabacum*: identificação de genes específicos por hibridização subtrativa e caracterização temporal e celular. 104 páginas. Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP/USP, 104p.
- DePaoli, H. C., Brito, M. S., Quiapim, A. C., Teixeira, S. P., Goldman, G. H., Dornelas, M. C., Goldman M.H. (2011). Stigma/style cell cycle inhibitor 1 (SCI1), a tissue-specific cell cycle regulator that controls upper pistil development. *New Phytologist*, 190(4):882-895.
- DePaoli, H. C., Goldman, G. H., Goldman, M. H. (2012). SCI1, the first member of the tissue-specific inhibitors of CDK (TIC) class, is probably connected to the auxin signaling pathway. *Plant Signaling , Behavior*, 7(1):53-58.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Inzé, D. (2007). The ins and outs of the plant cell cycle. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 8:655-665.
- Dewitte, W., Murray, J. A. (2003). The plant cell cycle. *Annual Review of Plant Physiology*, 54:235-264.
- Doonan, J. H.; Kitsios, G. (2009). Functional Evolution of Cyclin-Dependent Kinases. *Molecular Biotechnology* 42:14–29.
- Drogat, J., Migeot, V., Mommaerts, E., Mullier, C., Dieu, M., Bake, H., Hermand, D. (2012). Cdk11-CyclinL Controls the Assembly of the RNA Polymerase II Mediator Complex. *Cell Reports*, 2:1068–1076.
- Edwards, K.; Johnstone, C.; Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19(6): 1349.
- Escobar, C., Aristizábal, F., Navas, A., Del Campo, F. F., Fenoll, C. (2001). Isolation of active DNA-binding nuclear proteins from tomato galls induced by root-knot nematodes. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 375a-375h.
- Esau, K. (1997). Anatomia das plantas com sementes. 3ª ed. São Paulo, Edgard Blücher. 293p.
- Fang, Y., Spector, D. L. (2007). Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living Arabidopsis plants. *Current Biology*, 17(9):818-823.
- Ferreira, P.B. (2013). Estudos de localização e interações proteína-proteína de uma putativa proteína kinase, NtCDKG;2, de *Nicotiana tabacum*. Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, 80p.
- Fields, S., Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340: 245-246.

- Fiil, B. K., Qiu, J. L., Petersen, K., Petersen, M. Mundy, J. (2008). Coimmunoprecipitation (co-IP) of nuclear proteins and Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) from *Arabidopsis*. *Cold Spring Harbor Protocol*, doi: 10.1101/pdb.prot5049.
- Fouquet, R., Martin, F., Fajardo, D. S., Gault, C. M., Gómez, E., Tseung, C. W., Policht, T., Hueros, G., Settles, A. M. (2011). Maize rough endosperm3 encodes an RNA splicing factor required for endosperm cell differentiation and has a nonautonomous effect on embryo development. *Plant Cell*, 23(12):4280-97.
- Fülöp, K., Pettkó-Szandtner, A., Magyar, Z., Miskolczi, P., Kondorosi, E., Dudits, D., Bakó, L. (2005). The Medicago CDKC1;1-CYCLINT1 kinase complex phosphorylates the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and promotes transcription. *The Plant Journal*, 42(6):810-820.
- Gardino, A. K., Yaffe, M. B. (2011). 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 22(7):688-695.
- Gavin, A. C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C. Jensen, L. J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., Edelmann, A., Heurtier, M. Hoffman, V., Hoefert, C. Klein, K., Hudak, M., Michon, A., Schelder, M., Schirle, M., Remor, M., Rudi, T., Hooper, S., Bauer, A., Bouwmeester, T., Casari, G., Drewes, G., Neubauer, G., Rick, J. M., Kuster, B., Bork, P., Russell, R. B., Superti-Furga, G. (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature*, 415:180–183.
- Genschik, P., Criqui, M. C., Parmentier, Y., Derevier, A., Fleck, J. (1998). Cell cycle - dependent proteolysis in plants. Identification Of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor mg132. *Plant Cell* 10:2063-2076.
- Ghosh, I., Hamilton, A. D., Regan, L. (2000). Reassembly: Application to the Green Fluorescent Protein. *Journal of the American Chemical Society*, 122:5658-5659.
- Gietz, R. D., Triggs-Raine, B., Robbins, A., Graham, K. C., Woods, R. A. (1997). Identification of proteins that interact with a protein of interest: Applications of the yeast two-hybrid system. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 172: 67-79.
- Goldman, M. H. S, Golderg, R. B., Mariani, C. (1994). Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. *The EMBO Journal*, 13: 2976–2984.
- Golemis, E. A.; Serebriiskii, I.; Finley Jr, R. L.; Kolonin, M. G.; Gyuris, J., Brent, R. (2009). Interaction Trap/Two-Hybrid System to Identify Interacting Proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 57: 19.2.1-19.2.35.
- Gonzalez, N., Gévaudant, F., Hernould, M., Chevalier, C., Mouras, A. (2007). The cell cycle-associated protein kinase WEE1 regulates cell size in relation to endoreduplication in developing tomato fruit. *The Plant Journal*, 51(4):642-55.
- González-Camacho, F., Medina, F. J. (2005). The nucleolar structure and nucleolar proteins as indicators of cell proliferation events in plants. *Journal of Applied. Biomedicine*, 3:167–174.

- Goodspeed, T. H. 1954. The genus *Nicotiana*. University of California, Bekerley, California.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P., Blinov, V. M. (1989). Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Research*, 17(12):4713-4730.
- Gorski, S. A., Dundr, M., Misteli, T. (2006). The road much traveled: trafficking in the cell nucleus. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(3):284-290.
- Gray, J. F., Kung, S. D.; Wildman, S. G. (1974). Origin of *Nicotiana tabacum* L. detected by polypeptide composition of fraction I protein. *Nature*, 252: 226-227.
- Grønlund, A. L., Dickinson, J. R., Kille, P., Harwood, J. L., Herbert, R. J., Francis, D., Rogers, H. J. (2009). Plant WEE1 Kinase Interacts with a 14-3-3 Protein, GF14 but a Mutation of WEE1 at S485 Alters Their Spatial Interaction. *The Open Plant Science Journal*, 3:40-48.
- Haag, J.R., Pikaard, C.S. (2011). Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(8):483-492.
- Hagan, I.M., Grallert, A. (2013). Spatial control of mitotic commitment in fission yeast. *Biochemical Society Transactions*, 41(6):1766-1771.
- Hajheidari, M., Farrona, S., Huettel, B., Koncz, Z., Koncz, C. (2012). CDKF;1 and CDKD protein kinases regulate phosphorylation of serine residues in the C-terminal domain of Arabidopsis RNA polymerase II. *The Plant Cell*, 24(4):1626-1642.
- He, Q., Chen, L., Xu, Y., Yu, W. (2013). Identification of centromeric and telomeric DNA-binding proteins in rice. *Proteomics*, 13(5):826-832.
- Herr, A. J., Molnar, A., Jones, A., Baulcombe, D. C. (2006). Defective RNA processing enhances RNA silencing and influences flowering of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(41):14994-15001.
- Hiscock, S. J.; Allen, A. M. (2008). Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus. *New Phytologist*, 179:286-317.
- Hu, C. D., Chinenov, Y., Kerppola, T. K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Cell*, 9(4):789-798.
- Huang, C. K., Huang, L. F., Huang, J. J., Wu, S. J., Yeh, C. H., Lu, C. A. (2010). A DEAD-box protein, AtRH36, is essential for female gametophyte development and is involved in rRNA biogenesis in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 51(5):694-706.
- Huang, X. Y., Niu, J., Sun, M. X., Zhu, J., Gao, J. F., Yang, J., Zhou, Q., Yang, Z. N. (2013). CYCLIN-DEPENDENT KINASE G1 Is Associated with the Spliceosome to Regulate CALLOSE SYNTHASE5 Splicing and Pollen Wall Formation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 25:637-648.

- Hunt, A.; Xu, R., Addepalli, B., Rao, S.; Forbes, K. P.; Meeks, L. R., Xing, D., Mo, M., Zhao, H., Bandyopadhyay, A., Dampanaboina, L., Marion, A., Von Lanken, C. , Li, Q. Q. (2008). Arabidopsis Mrna polyadenylation machinery: comprehensive analysis of protein-protein interactions and gene expression profiling. *BMC Genomics*, 9:220.
- Inzé, D., De Veylder, L. (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics*, 40:77-105.
- Inzé, D. (Ed.). Cell Cycle Control and Plant Development. *Annual Plant Reviews*, 2007, v.32.
- Iwata, H., Gotoh, O. (2011). Comparative analysis of information contents relevant to recognition of introns in many species. *BMC Genomics*, 12:45.
- Jacobsen, S. E., Running, M. P., Meyerowitz, E. M. (1999). Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in Arabidopsis causes unregulated cell division in floral meristems. *Development*, 126(23):5231-5243.
- Jennane, A., Thiry, M., Diouri, M., Goessens, G. (2000). Fate of the nucleolar vacuole during resumption of cell cycle in pea cotyledonary buds. *Protoplasma*, 210:172-178.
- Johnson, J. M. (1969). A study of nucleolar vacuoles in cultured tobacco cells using radioautography, actinomycin D, and electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 43(2):197-206.
- Kaminek, M. (1992). Progress in cvtokinin research. *Trends in Biotechnology*, 10:159–164.
- Kandasamy, M. K.; Dwyer, K. G.; Paolillo, D. J.; Doney, R. C.; Nasrallah, J. B.; Nasrallah, M. E. (1990). *Brassica* S-proteins accumulate in the intercellular matrix along the path of pollen tubes in transgenic tobacco. *Plant Cell*, 2: 39-49.
- Kawaji, H., Hayashizaki, Y. (2008). Exploration of small RNAs. *PLOS Genetics*, 4(1):e22. DOI: 10.1371/journal.pgen.0040022.
- Kobayashi, K., Otegui, M. S., Krishnakumar, S., Mindrinos, M., Zambryski, P. (2007). INCREASED SIZE EXCLUSION LIMIT 2 encodes a putative DEVH box RNA helicase involved in plasmodesmata function during Arabidopsis embryogenesis. *The Plant Cell*, 19(6):1885-1897.
- Kwade, Z., Swiatek, A., Azmi, A., Goossens, A., Inze, D., Van Onckelen, H., Roef, R. (2005) Identification of Four Adenosine Kinase Isoforms in Tobacco By-2 Cells and Their Putative Role in the Cell Cycle-regulated Cytokinin Metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(17):17512–17519.
- Kenton, A.; Parakonny, A. S.; Gleba, Y. Y.; Bennett, M. D. (1993). Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. *Molecular , General Genetics*, 240: 159-169.
- Kim, J. S., Kim, K. A., Oh, T. R., Park, C. M., Kang, H. (2008). Functional characterization of DEAD-box RNA helicases in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *Plant and Cell Physiology*, 49(10):1563-1571.

- Kim, S. H., Koroleva, O. A., Lewandowska, D., Pendle, A. F., Clark, G. P., Simpson, C. G., Shaw, P. J., Brown, J. W. (2009). Aberrant mRNA transcripts and the nonsense-mediated decay proteins UPF2 and UPF3 are enriched in the Arabidopsis nucleolus. *The Plant Cell*, 21(7):2045-2057.
- Kishore, S., Stamm, S. (2006). Regulation of alternative splicing by snoRNAs. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 71:329-334.
- Klahre, U., Kost, B. (2006). Tobacco RhoGTPase activating protein1 spatially restricts signaling of RAC/Rop to the Apex of pollen tubes. *The Plant Cell*, 18: 3033-3046.
- Kodama, Y., Hu, C. D. (2012). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): a 5-year update and future perspectives. *Biotechniques*, 53(5):285-298.
- Koltunow, A. M., Truettner J., Cox, K. H., Wallroth M., Goldberg, R. B. (1990). Different Temporal and Spatial Gene Expression Patterns Occur during Anther Development. *The Plant Cell*, 12:1201-1224.
- Komaki, S., Sugimoto, K. (2012). Control of the plant cell cycle by developmental and environmental cues. *Plant and Cell Physiology*, 53(6):953-964.
- Koroleva, O. A., Calder, G., Pendle, A. F., Kim, S. H., Lewandowska, D., Simpson, C. G., Jones, I. M., Brown, J. W. S., Shaw, P. J. (2009). Dynamic Behavior of Arabidopsis eIF4A-III, Putative Core Protein of Exon Junction Complex: Fast Relocation to Nucleolus and Splicing Speckles under Hypoxia. *The Plant Cell*, 21:1592-1606.
- Koyama, T., Okada, T., Kitajima, S., Takagi, M. O., Shinshi, H., Sato, F. (2003). Isolation of tobacco ubiquitin-conjugating enzyme cDNA in a yeast two-hybrid system with tobacco ERFE3 as bait and its characterization of specific interaction. *Journal of Experimental Botany*, 54: 1175-1181.
- Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Research*, 15 (20): 8125–8148.
- Lal, A., Haynes, S.R., Gorospe, M. (2005). Clean Western blot signals from immunoprecipitated samples. *Molecular and Cellular Probes*, 19(6):385-8.
- Lee, L. Y., Wu, F. H., Hsu, C. T., Shen, S. C., Yeh, H. Y., Liao, D. C., Fang, M. J., Liu, N. T., Yen, Y. C., Dokládál, L., Sykorová, E., Gelvin, S. B., Lin, C. S. (2012). Screening a cDNA library for protein-protein interactions directly in planta. *The Plant Cell*, 24(5):1746-1759.
- Leene, J. V.; Hollunder, J.; Eeckhout, D.; Persiau, G.; Slijke, E. V.; Stals, H.; Isterdael, G. V.; Verkest, A.; Neiryneck, S.; Buffel, Y.; Bodt, S.; Maere, S.; Laukens, K.; Pharazyn, A.; Ferreira, P. C. G.; Eloy, N.; Renne, C.; Meyer, C.; Faure, J. D.; Steinbrenner, J.; Beynon, J.; Larkin, J. C.; Peer, Y. P.; Hilson, P.; kuiper, M.; De Veylder, L.; Van Onckelen, H.; Inze, D.; Witters, M.; De Jaeger, G. (2010). Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Systems Biology* 6:397.

- Li, C. F., Pontes, O., El-Shami, M., Henderson, I. R., Bernatavichute, Y. V., Chan, S. W., Lagrange, T., Pikaard, C. S., Jacobsen, S. E. (2006). An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with Cajal bodies in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 126(1):93-106.
- Linder, P., Jankowsky, E. (2011). From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12(8):505-516.
- Linder, P., Lasko, P. F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P. J., Nishi, K., Schnier, J., Slonimski, P. P. (1989). Birth of the D-E-A-D box. *Nature*, 337(6203):121-122.
- Linder, P., Owtrim, G.W. (2009). Plant RNA helicases: linking aberrant and silencing RNA. *Trends in Plant Science*, 14(6):344-352.
- Linsmaier, E. M., Skoog, F. (1964). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 18:100-127.
- Loyer, P., Trembley, J. H., Grenet, J. A., Busson, A., Corlu, A., Zhao, W., Kocak, M., Kidd, V. J., Lahti, J. M. (2008). Characterization of cyclin L1 and L2 interactions with CDK11 and splicing factors: influence of cyclin L isoforms on splice site selection. *Journal of Biological Chemistry*, 283(12):7721-7732.
- Lord, E. M. (2003). Adhesion and guidance in compatible pollination. *Journal of Experimental Botany*, 54: 47-54.
- Lubini, G. (2012). Caracterização do gene NtCDKG;2 expresso no pistili de *Nicotiana tabacum* L. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto, São Paulo.
- Makarova, K. S., Aravind, L., Koonin, E. V. (2002). SWIM, a novel Zn-chelating domain present in bacteria, archaea and eukaryotes. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 27 (8): 384-386.
- Mathur, S., Vyas, S., Kapoor, S., Tyagi, A. K. (2011). The Mediator complex in plants: structure, phylogeny, and expression profiling of representative genes in a dicot (*Arabidopsis*) and a monocot (rice) during reproduction and abiotic stress. *Plant Physiology*, 157(4):1609-27.
- Mattick, J.S., Makunin, I.V. (2005). Small regulatory RNAs in mammals. *Human Molecular Genetics*, 14:121-132. DOI:10.1093/hmg/ddi101.
- Mauseth, J. D. (2003). Botany: An Introduction to Plant Biology. 3ª edição. University of Texas, Austin, Texas.
- Menges, M., Jager, S. M., Gruissem, W., Murray, A. H. (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *The Plant Journal*, 41:546-566.
- Miller, C. O., Skoog, F., von Saltza, M. H., Strong, M. (1995). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 77(5):1329-1334.

- Mohamed, M. R.; Rahmana, M. M.; Lanchbury, J. S.; Shattuck, D.; Neff, C.; Dufford, M.; Buuren, N. V.; Fagan, K.; Barry, M.; Smith, S.; Damond, I.; McFadden, G. (2009). Proteomic screening of variola virus reveals a unique NF- κ B inhibitor that is highly conserved among pathogenic orthopoxviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(22):9045-9050.
- Mok, D.W.S., Mok, M.C. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52:89–118.
- Motte, P., Deltour, R., Mosen, H., Bronchart, R. (1988). Three-dimensional electron microscopy of the nucleolus and nucleolus-associated chromatin (NAC) during early germination of *Zea mays* L. *Biology of the Cell*, 62:65-81.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Nagata, T., Nemoto, Y., Hasezawa, S. (1992). Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cells in the biology of higher plants. *International Review of Cytology*, 132:1-30.
- Nemhauser, J. L., Feldman, L. J., Zambryski, P. C. (2000). Auxin and ETTIN in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. *Development*, 127: 3877-3888.
- Nocarova, E., Fischer, L. (2009). Cloning of transgenic tobacco BY-2 cells; an efficient method to analyse and reduce high natural heterogeneity of transgene expression. *BMC Plant Biology*, 22(9):44.
- O’Farrell, P. H. (2001). Triggering the all-or-nothing switch into mitosis. *Trends in Cell Biology*, 11(12):512-519.
- Otsu, T. C., Silva, I., Molfetta, J. B., Silva, L. R., Engler, J. A., Engler, G., Torraca, P. C., Goldman, G. H., Goldman, M. H. S. (2004). NtWBC1, an ABC transporter gene specifically expressed in tobacco reproductive organs. *Journal of Experimental Botany*, 55: 1643-1654.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., Chen, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, 12(17):1484-1495.
- Parrish, J. .; Gulyas, K. D., Finley, R. L. (2006). Yeast two-hybrid contributions to interactome mapping. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 387-393.
- Pederson, T. (1998). The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Research*, 26(17):3871-3876.
- Pederson, T. (2011). The nucleolus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(3).
- Pendle, A. F.; Clark, G. P.; Boon, R.; Lewandowska, D.; Lam, Y. W.; Andersen, J.; Mann, M.; Lamond, A. I.; Brown, J. W. S.; Shaw, P. J. (2005). Proteomic Analysis of the *Arabidopsis* Nucleolus Suggests Novel Nucleolar Functions. *Molecular Biology of the Cell*, 16: 260-269.

- Phizicky, E.M., Fields S. (1995). Protein-Protein Interactions: Methods for Detection and Analysis. *Microbiological Reviews*, 59: 94–123.
- Politz, J. C., Zhang, F., Pederson, T. (2009). MicroRNA-206 colocalizes with ribosome-rich regions in both the nucleolus and cytoplasm of rat myogenic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50):18957-62.
- Pontes, O., Li, C. F., Costa Nunes, P., Haag, J., Ream, T., Vitins, A., Jacobsen, S. E., Pikaard, C. S. (2006). The Arabidopsis chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. *Cell*, 126(1):79-92.
- Preuss, D. (2002). Sexual signaling on a cellular level: lessons from plant reproduction. *Cellular and Molecular Biology*, 13: 1803-1805.
- Quiapim, A. C., Brito, M. S., Bernardes, L. A., Dasilva, I., Malavazi, I., DePaoli, H. C., Molfetta-Machado, J. B., Giuliatti, S., Goldman, G. H., Goldman M. H. (2009). Analysis of the *Nicotiana tabacum* stigma/style transcriptome reveals gene expression differences between wet and dry stigma species. *Plant Physiology*, 149: 1211-1230.
- Reddy, A. S., Marquez, Y., Kalyna, M., Barta, A. (2013). Complexity of the alternative splicing landscape in plants. *The Plant Cell*, 25(10):3657-3683.
- Reinhardt, H. C., Yaffe, M. B. (2013). Phospho-Ser/Thr-binding domains: navigating the cell cycle and DNA damage response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14:563-580.
- Richards, F. M. (1958). On the enzymatic activity of subtilisin-modified ribonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44(2):162-166.
- Rocak, S., Linder, P. (2004). DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 5(3):232-241.
- Rogers, K., Chen, X. (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant Cell*, 25(7):2383-2399.
- Ru, Y., Wang, B.B., Brendel, V. (2008). Spliceosomal proteins in plants. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 326:1-15.
- Russel, P., Nurse, P. (1986). cdc25⁺ Functions as an Inducer in the Mitotic Control of Fission Yeast. *Cell*, 45:145-153.
- Russell, P., Nurse, P. (1987) Negative regulation of mitosis by wee1⁺, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell*, 49(4):559-67.
- Sage, T. L., Hristova-Sarkovski, K.; Koehl, V.; Lyew, J.; Pontieri, V.; Bernhardt, P.; Weston, P.; Bagha, S.; Chiu, G. (2009). Transmitting tissue architecture in basal-relictual angiosperms: Implications for transmitting tissue origins. *American Journal of Botany*, 96(1):183-206.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. 2ª edição. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Estados Unidos.

- San-Segundo, P. A., Roeder, G. S. (1999). Pch2 links chromatin silencing to meiotic checkpoint control. *Cell*, 97(3):313-324.
- Sawers, R. J. H., Farmer, P. R., Moffett, P., Brutnell, T. P. (2006). In planta transient expression as a system for genetic and biochemical analyses of chlorophyll biosynthesis. *Plant Methods*, 2: 15. doi:10.1186/1746-4811-2-15.
- Scebba, F., DeBastiani, M., Bernacchia, G., Andeucci, A. Galli, A. Pitto, L. (2007). PRMT11: a new Arabidopsis MBD7 protein partner with arginine methyltransferase activity. *The Plant Journal*, 52: 210-222.
- Schmidt, A., Wuest, S. E., Vijverberg, K., Baroux, C., Kleen, D., Grossniklaus, U. (2011). Transcriptome analysis of the Arabidopsis megaspore mother cell uncovers the importance of RNA helicases for plant germline development. *PLOS Biology*, 9(9):e1001155.
- Schoonheim, P. J.; Veiga, H.; Pereira, D. C.; Friso, G.; Van Wijk, K. J. , Boer, A. H. (2007). A Comprehensive Analysis of the 14-3-3 Interactome in Barley Leaves Using a Complementary Proteomics and Two-Hybrid Approach1[C][OA]. *Plant Physiology*, 143: 670–683.
- Schoor, S., Farrow, S., Blaschke, H., Lee, S., Perry, G., von Schwartzberg, K., Emery, N., Moffatt, B. (2011). Adenosine kinase contributes to cytokinin interconversion in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 157(2):659-72.
- Seo, J. & Lee, K. 2004. Post-translational Modifications and Their Biological Functions: Proteomic Analysis and Systematic Approaches. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 37(1): 35-44.
- Shaw, P. J., Brown, J. W. S. (2004). Plant nuclear bodies. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:614–620.
- Shaw, P. J. (2005). Nucleolus. *Encyclopedia of Life Sciences*, doi: 10.1038/npg.els.0003958.
- Shaw, P., Brown, J. W. S (2012). Nucleoli: composition, function, and dynamics. *Plant Physiology*, 158(1):44-51.
- Sheludko, Y.V. (2008). Agrobacterium-mediated transient expression as an approach to production of recombinant proteins in plants. **Recent Patents on Biotechnology**, 2(3):198-208.
- Shine, J., Dalgarno, L. (1975). Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature*, 254(5495): 34–8.
- Silverman, E., Edwalds-Gilbert, G., Lin, R.J. (2003). DExD/H-box proteins and their partners: helping RNA helicases unwind. *Gene*, 312(0):1-16.
- Snustad, D. P., Simmons, M. J. *Principles of Genetics*. 6th ed. John Wiley , Sons, 2012.
- Sorrell, D. A., Marchbank, A. M., Chrimes, D. A., Dickinson, J. R., Rogers, H. J., Francis, D., Grierson, C. S., Halford, N. G. (2003). The Arabidopsis 14-3-3 protein, GF14 α , binds to

- the *Schizosaccharomyces pombe* Cdc25 phosphatase and rescues checkpoint defects in the rad24⁻ mutant. *Planta*, 218:50–57.
- Sorrell, D. A., Marchbank, A. M., McMahon, K., Dickinson, J. R., Rogers, H. J., Francis, D. (2002). A WEE1 homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 215(3):518-22.
- Spikes, D. A., Kramer, J., Bingham, P. M., Van Doren, K. (1994). SWAP pre-mRNA splicing regulators are a novel, ancient protein family sharing a highly conserved sequence motif with the prp21 family of constitutive splicing proteins. *Nucleic Acids Research*, 22(21): 4510-4519.
- Stachel, S. E., Messens, E., Van Montagu, M.; Zambryski, P. (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318: 624-629.
- Stępiński D. (2012). Immunofluorescent localization of ubiquitin and proteasomes in nucleolar vacuoles of soybean root meristematic cells. *European Journal of Histochemistry*, 56(2):e13. doi: 10.4081/ejh.2012.13.
- Stępiński D. (2013). Nucleolar chromatin organization at different activities of soybean root meristematic cell nucleoli. *Protoplasma*, 250(3):723-30.
- Streatfield, S.J. (2007). Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 5(1):2-15.
- Strini, E. J. (2010). SCI1 (*Stigma/style Cell-cycle Inhibitor 1*): análise *in silico* da sequência genômica de *Nicotiana tabacum* e estudo de parceiros de interação proteína-proteína. Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP/USP, 115p.
- Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F. C., Ruderman, J. V., Hershko, A. (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Molecular Biology of the Cell*, 6(2):185-197.
- Suryadinata, R., Sadowski, M., Sarcevic, B. (2010). Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Bioscience Reports*, 30(4):243-55.
- Tan, Q. K., Irish, V. F. (2006). The Arabidopsis zinc finger-homeodomain genes encode proteins with unique biochemical properties that are coordinately expressed during floral development. *Plant Physiology*, 140(3):1095-108.
- Tank, J. G., Thaker, V. S. (2011) Cyclin dependent kinases and their role in regulation of plant cell cycle. *Biologia Plantarum*, 55:201-212.
- Thiry, M., Lafontaine, D. L. (2005). Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends in Cell Biology*, 15(4):194-199.
- Thompson, J. D., Higgins. D. G., Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

- position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22):4673-80.
- Tillemans, V., Leponce, I., Rausin, G., Dispa, L., Motte, P. (2006). Insights into nuclear organization in plants as revealed by the dynamic distribution of Arabidopsis SR splicing factors. *Plant Cell*, 18(11):3218-34.
- Umate, P., Tuteja, R., Tuteja, N. (2010). Genome-wide analysis of helicase gene family from rice and Arabidopsis: a comparison with yeast and human. *Plant Molecular Biology*, 73(4-5):449-465.
- Vain, P., Thole, V., Worland, B., Opanowicz, M., Bush, M. S., Doonan, J. H. (2011). A T-DNA mutation in the RNA helicase eIF4A confers a dose-dependent dwarfing phenotype in *Brachypodium distachyon*. *The Plant Journal*, 66(6):929-940.
- Van Leene, J., Hollunder, J., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Stals, H., Van Isterdael, G., Verkest, A., Neiryndck, S., Buffel, Y., De Bodt, S., Maere, S., Laukens, K., Pharazyn, A., Ferreira, P. C., Eloy, N., Renne, C., Meyer, C., Faure, J. D., Steinbrenner, J., Beynon, J., Larkin, J. C., Van de Peer, Y., Hilson, P., Kuiper, M., De Veylder, L., Van Onckelen, H., Inzé, D., Witters, E., De Jaeger, G. (2010). Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Systems Biology*, 10(6):397.
- Venema, J., Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Genetics*, 33:261-311.
- Vidal, M., Brachmann, R. K., Fattaey, A., Harlow, E. (1996). Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 10321-10326.
- Visintin, R., Craig, K., Hwang, E.S., Prinz, S., Tyers, M., Amon, A. (1998). The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Molecular Cell*, 2(6):709-718.
- Visintin, R., Amon, A. (2000). The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(6):372-377.
- Voinnet, O. (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 136(4):669-687.
- Volkov, R. A.; Borisjuk, N. V.; Panchuk I. I.; Sshweizer, D.; Hemleben, V. (1999). Elimination and rearrangement of parental rDNA in the allotetraploid *Nicotiana tabacum*. *Molecular biology and evolution*, 16: 311-320.
- Wang, B. B., Brendel, V. (2004). The ASRG database: Identification and survey of *Arabidopsis thaliana* genes involved in pre-mRNA splicing. *Genome Biology*, 5(12):R102.
- Wang, H., Fowke, L. C., Crosby, W. L. (1997). A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Nature*, 386:451-452.

- Walhout, A. J. M.; Sordella, R.; Lu, X.; Hartley, J. L.; Temple, G. F.; Brasch, M. A.; Thierry-Mieg, N. , Vidal, M. (2000). Protein Interaction Mapping in *C. elegans* Using Proteins Involved in Vulval Development. *Science*, 287: 116–122.
- Walhout, A. J., Vidal, M. (2001). High-throughput yeast two-hybrid assays for largescale protein interaction mapping. *Methods*, 24: 297–306.
- Wang, H., Fowke, L. C., Crosby, W. L. (1997). A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Nature*, 386:451–452.
- Weber, J. D., Taylor, L. J., Roussel, M. F., Sherr, C. J., Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nature Cell Biology*, 1(1):20-26.
- Will, C.L., Lührmann, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. DOI: 10.1101/cshperspect.a003707.
- Wu, N., Matand, K., Kebede, B., Acquaaah, G., Williams, S. (2010). Enhancing DNA electrotransformation efficiency in Escherichia coli DH10B electrocompetent cells. *Eletronic Journal of Biotechnology*. DOI: 10.2225/vol13-issue5-fulltext-11.
- Xie, Z., Khanna, K., Ruan, S. (2010). Expression of microRNAs and its regulation in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 21(8):790-797.
- Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblim, S. J., Smerdon, S. J., Cantley, L. C. (1997). The Structural Basis for 14-3-3: Phosphopeptide Binding Specificity. *Cell*, 91:961-971.
- Yang, C. H., Kuo, W. T., Chuang, Y. T., Chen, C. Y., Lin, C. C. (2013). Cyclin B1 Destruction Box-Mediated Protein Instability: The Enhanced Sensitivity of Fluorescent-Protein-Based Reporter Gene System. *BioMed Research International*. Doi: 10.1155/2013/732307.
- Yin, J., Li, G., Ren, X., Herrler, G. (2007). Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, 127(3):335-347.
- Zharskaya, O. O., Zatsepina, O. V. (2007). [Dynamics and mechanisms of the nucleolus reorganization during mitosis]. *Tsitologiia*, 49(5):355-369.
- Zourelidou, M., de Torres-Zabala, M., Smith, C., Bevan, M. W. (2002). Storekeeper defines a new class of plant-specific DNA-binding proteins and is a putative regulator of patatin expression. *The Plant Journal*, 30(4): 489-497.

Anexo

SCI1 (Stigma/style Cell-cycle Inhibitor 1) INTERACTS WITH THE 14-3-3 PROTEINS INVOLVED IN CELL-CYCLE CONTROL

Edward J. Strini^{1,2#}, Lígia T. Bertolino^{1,2#}, Hebréia A. O. Souza¹, Luiz Eduardo V. Del Bem³, Andréa C. Quiapim¹, Gustavo H. Goldman⁴, Thiago S. Balbuena⁵, Maria Helena S. Goldman^{1,§}

¹Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 14040-901, Brazil;

²PPG-Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 14049-900, Brazil;

³Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 13083-970, Brazil;

⁴Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 14040-903, Brazil;

⁵Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, Brazil.

#These authors have equally contributed to this work.

§Author for correspondence: Phone +55 16 3602-3702; Fax: +55 16 3602-4886, email: mgoldman@ffclrp.usp.br

Running title:

Key words: SCI1; 14-3-3 proteins; protein-protein interaction; Wee1; cell-cycle control; homo and heterodimers;

ABSTRACT

We have recently identified and characterized the *SCI1* (*Stigma/style Cell-cycle Inhibitor 1*) gene, that controls cell proliferation in the specialized tissues of the upper tobacco pistil. To elucidate how SCI1 regulates the cell cycle, we constructed a tobacco stigma/style cDNA library in the yeast two-hybrid (Y2H) system and screened it for SCI1-interacting proteins. Among the candidates, two 14-3-3 proteins were identified: 14-3-3A and 14-3-3D from the Non-Epsilon group. A pull-down assay using a GST-SCI1 recombinant protein as bait and a nuclear enriched protein extract from tobacco stigmas/styles as prey, have also identified 14-3-3A and 14-3-3D as interaction partners. BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) and co-immunoprecipitation experiments have confirmed these interactions. Y2H experiments were used to show the same 14-3-3D protein interacts with NtWEE1 kinase, a cell cycle inhibitor. We have shown that during interphase SCI1 is localized in the nucleolus, while the homo- and heterodimers of the 14-3-3s are in the cytoplasm. However, at the initial phases of cell division SCI1 and 14-3-3s interact inside the nucleus, in a spread format. SCI1 is differentially phosphorylated by stigma/style kinases, which is consistent with the fact that it interacts with 14-3-3s. Our data also demonstrate that SCI1 is degraded at late prophase/metaphase and reappears at telophase. Taken together, our results suggest a mechanism of cell cycle inhibition, in which SCI1 would sequester cell-cycle regulators in the nucleolus, until it is relocated by 14-3-3 proteins and degraded, releasing the cells to complete mitosis.

INTRODUCTION

Successful plant reproduction depends on the proper development of the male and female reproductive organs, anthers and pistil, respectively. The upper pistil, formed by stigma/style, is responsible for receiving the pollen grains and providing the appropriate conditions for pollen tube germination and directional growth. Pistil organogenesis relies on the tight control of cell proliferation and differentiation, which is achieved through complex gene regulatory networks not fully understood. We have recently identified and characterized the *SCI1* (*Stigma/style Cell-cycle Inhibitor 1*) gene that controls cell proliferation in the specialized tissues of the upper pistil of tobacco (DePaoli et al., 2011) and Arabidopsis (DePaoli et al., submitted). Knockdown transgenic tobacco plants as well as Arabidopsis mutants display enlarged stigmas and elongated styles containing more cells than their corresponding controls expressing normal *SCI1* transcript levels (DePaoli et al., 2011; DePaoli et al., submitted). Based on several evidences, we have proposed that *SCI1* is a tissue-specific CDK inhibitor (DePaoli et al., 2012).

NtSCI1 is a small protein (154 amino acids) containing 15 putative phosphorylations sites (NetPhos, $\geq 96\%$) supporting the hypothesis that it participates in a signal transduction pathway (DePaoli et al., 2011). To elucidate how *SCI1* communicates with the cell cycle machinery, we have undertaken different approaches to identify *SCI1* interaction partners. The analysis of *SCI1* interactome in tobacco stigmas/styles (Strini et al., in preparation) revealed, among many other proteins, two 14-3-3 proteins of the Non-Epsilon group.

14-3-3s are conserved eukaryotic proteins that usually recognize proteins containing phosphoserine and/or phosphothreonine residues within a specific sequence motif (de Boer et al., 2013). More than hundred proteins have been described as being recognized by 14-3-3 proteins (Oecking and Jaspert, 2009). They are regulatory proteins that participate in the signal transduction of a wide range of cellular processes such as: cell cycle control (Laronga et al., 2000; reviewed in Hemert et al., 2001; Gardino et al., 2011), stress response (Denison et al., 2011), cytoskeleton organization, regulation of house-keeping proteins, like nitrate reductase (Lambeck et al., 2012) and H⁺-ATPase (Jahn et al., 1997), and hormonal signal transduction processes (Roberts, 2000; Aducci et al., 2002; Schoonheim et al., 2007; Chevalier, 2009; Denison et al., 2011).

14-3-3 proteins can form homo and heterodimers (Jones *et al.*, 1995; Chaudhri *et al.*, 2003) and it has been suggested that each type of dimer could undertake diverse functions (Paul *et al.*, 2012). The 14-3-3 dimer can interact with two different sites of a single protein or simultaneously interact with two distinct proteins (Yafee, 2002; Chevalier *et al.*, 2009). In the Arabidopsis genome there are thirteen genes encoding 14-3-3 proteins (DeLille *et al.*, 2001; Rosenquist *et al.*, 2001). A similar number of 14-3-3 genes were found in the tomato (13) and potato (12) (Bertolino *et al.*, in preparation). In *Nicotiana tabacum*, so far 17 sequences encoding 14-3-3 proteins were identified (Konagaya *et al.*, 2004). Therefore, plants have a higher number of 14-3-3 genes than other eukaryotic organisms (2 in yeast and 7 in humans) (de Boer *et al.*, 2013). Considering the number of genes encoding the monomeric subunits and the possibility of forming different combinations of homo- and heterodimers, 14-3-3 proteins can assume a multitude of functions. Binding of 14-3-3 dimers can cause a conformational change of the client proteins, stimulating or inhibiting their activity or modifying its stability (Fert *et al.*, 2002). Additionally, 14-3-3 binding can stimulate the interaction between two proteins or change their subcellular localization (van Heusden, 2009; reviewed in Chevalier *et al.*, 2009; Gökirmak *et al.*, 2010). Thus, plant 14-3-3 proteins can be considered as nodes in signaling networks and may establish a platform for crosstalk in diverse pathways (Oecking and Jaspert, 2009).

The 14-3-3 proteins can be phylogenetically divided in the Epsilon and the Non-Epsilon groups (Fert *et al.*, 2002). The Epsilon group is considered to contain the ancestral 14-3-3s undertaking essential functions, while the Non-Epsilon 14-3-3s would assume more specialized functions (Jaspert *et al.*, 2011).

Here, we addressed the biochemical and molecular mechanisms through which SCI1 may integrate/communicate with the cell-cycle machinery and regulate cell proliferation during upper pistil development. We report the identification and characterization of the interactions with 14-3-3 proteins from the Non-Epsilon group, which interact with Wee1 and, therefore, are involved in cell-cycle control. We show that at G2/prophase 14-3-3 proteins move from the cytoplasm to the nucleus, where they interact with SCI1, probably dislocating it from the nucleolus. The interaction with 14-3-3 proteins is consistent with SCI1 activity being regulated by phosphorylations and participating in a

developmental signaling pathway. Our data demonstrate that SCI1 is degraded at a specific time during cell division (late prophase/metaphase) and reappears at telophase. This behavior is consistent with our hypothesis that SCI1 is a CDK inhibitor, which protein levels also rise and fall at specific times during the cell cycle.

RESULTS

SCI1 interacts with 14-3-3 proteins from the Non-Epsilon group

To study the molecular mechanisms underlying the control of cell proliferation by SCI1, we constructed a tobacco stigma/style cDNA library in the yeast two-hybrid (Y2H) system and screened it for SCI1-interacting proteins. The complete SCI1 coding region was used as bait (BD-SCI1) and approximately 1×10^6 virtual transformants were screened. Among the yeast colonies able to grow on the selective medium lacking histidine (His), we identified two clones encoding 14-3-3D and one encoding the 14-3-3A protein, both from the Non-Epsilon group. In the retest Y2H assay, performed with the individualized candidate partners, only the interaction between SCI1 and the protein 14-3-3D could be confirmed (Figure 1A).

To identify novel and higher order SCI1-interacting proteins, we performed a pull-down assay using the GST-SCI1 recombinant protein as bait and a nuclear enriched protein extract from tobacco stigmas/styles as prey. In a previous work, we have observed that plants overexpressing SCI1 under the control of the 35S promoter showed an altered phenotype only in the reproductive organs (DePaoli et al., 2011). Therefore, we proposed that the functionality of SCI1 as a cell cycle inhibitor depends on post-translation modifications or the interaction with proteins that do not occur in other organs of the plant. Thus, whenever possible, proteins were extracted from tobacco stigmas/styles. After elution from the glutathione column and SDS-PAGE separation, the candidate interaction partners were identified by mass spectrometry. Among them, the 14-3-3A and 14-3-3D proteins were found again in the pull-down experiment.

To confirm these interactions, we have produced tobacco transgenic plants expressing SCI1-GFP, under the control of the 35S promoter, and

extracted total proteins from stigmas/styles. These proteins were incubated with proteins extracted from *E. coli* cells expressing the recombinant HIS-14-3-3D. Proteins were immunoprecipitated with anti-GFP antibody and two western blots prepared. They were probed with an antibody raised against NtSCI1 and an anti-HIS antibody. A band corresponding to the expected size of HIS-14-3-3D (33.6kDa) was detected, confirming the interaction between SCI1 and 14-3-3D (Figure 1B). It is interesting to note that two bands were revealed with the anti-SCI1 antibody, which is consistent with SCI1 protein being modified, probably differentially phosphorylated, by the stigma/style proteins.

14-3-3A and 14-3-3D form homo- and heterodimers in the cytoplasm

To investigate if 14-3-3A and 14-3-3D can form homo and/or heterodimers, we performed Y2H and Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) assay with split GFP. For the Y2H, yeast cells were co-transformed with different combinations of the four constructions (AD-14-3-3A; BD-14-3-3A; AD-14-3-3D; and BD-14-3-3D) and assayed for their ability to grow on the selective medium lacking histidine. The Y2H results have demonstrated the formation of 14-3-3D homodimers as a strong interaction, of 14-3-3A and 14-3-3D heterodimers (medium strength) and of 14-3-3A homodimers, like a weak interaction (Figure 2A).

To study the subcellular localization of 14-3-3A and 14-3-3D, each of these proteins was translationally fused to GFP, agroinfiltrated and transiently expressed in *N. benthamiana* leaves. Analysis under confocal microscope has shown that 14-3-3A is localized in the nucleus and cytoplasm (Figures 2B and 2D), while 14-3-3D is restricted to the cytoplasm (Figures 2C and 2E).

To confirm the *in vivo* formation of homo- and heterodimers, as well as to establish their cellular localization, BiFC assays were implemented. *N. benthamiana* leaves were agroinfiltrated with two of the following constructions in different combinations: 14-3-3A-hGFP; 14-3-3A-tGFP; 14-3-3D-hGFP; and 14-3-3D-tGFP. The restoration of GFP fluorescence confirmed that these proteins can form homo- and heterodimers. 14-3-3A homodimers were detected in cytosol and nucleus (Figures 2F-I), whereas 14-3-3D homodimers and the heterodimers were found only in the cytosol, as seen for the 14-3-3D localization (Figures 2J-Q).

BiFC experiments confirm the interaction between SCI1 and 14-3-3A and 14-3-3D proteins in the nucleus

To date, BiFC experiments have been performed in leaves, plant protoplasts or cells in suspension. For the reasons explained above, we have tried to perform transient expression by agroinfiltration of pistil tissues with SCI1-GFP. However, so far no pistil cell transiently expressing the recombinant protein was obtained. Thus, we have first examined and confirmed that SCI1-GFP has the same localization in both, stigma/style cells of stably transformed plants and epidermal cells of transiently transformed leaves of *N. tabacum* and *N. benthamiana* (data not shown). Then, to study the *in vivo* interaction of SCI1 with 14-3-3A and 14-3-3D proteins, BiFC experiments were performed in *N. benthamiana* leaves agroinfiltrated with the following constructions 35S::SCI1-hGFP and 35S::14-3-3D-tGFP or 35S::14-3-3A-tGFP. The restoration of the GFP by the interaction of SCI1 and 14-3-3D protein was observed in the nucleus, overlapping with DAPI unstained areas, in a specific cell cycle phase, probably at G2/prophase (Figures 3J-3R). Similarly, 35S::SCI1-hGFP and 35S::14-3-3A-tGFP constructions were introduced in *N. benthamiana* leaves and the interactions of SCI1 and 14-3-3A proteins were also visualized in the nucleus, but in this case the GFP restoration was seen spread around the nucleus and absent in the nucleolus area, probably at G1/S phase of the cell cycle (Figures 3A-3I).

SCI1 is a differentially phosphorylated in stigmas/styles

In an attempt to identify 14-3-3 binding motifs in SCI1 sequence, we have performed an *in silico* analysis using the MotifScan software (Pagni et al., 2004). Three putative 14-3-3 mode I (RSX-pS/pT-XP) binding motifs were found (Figure 4A). Additionally, when SCI1 sequence was analyzed by the NetPhosK 1.0 software (Blom et al., 2004), it was verified that the serines present at motif 1 are predicted to be phosphorylated by p38MAPK (Ser21 – score 0.52), CDK5 (Ser18 - score 0.55 and Ser21 score 0.67) and CDC2 (Ser20 – score 0.51), all cell-cycle related kinases. These kinases are homologs of the *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase 14 (accession number NM_119808.1), cyclin-dependent kinase A;1 (NM_114734.3) and cdc2 (M59198.1), respectively.

To investigate if SCI1 is phosphorylated in its natural cellular environment, we have extracted total proteins from stigmas/styles at stage 3 of tobacco flower development (as described by Koltunow et al., 1990), separated them by 2D gel electrophoresis and prepared a western blot. The anti-SCI1 antibody has recognized three differentially migrating bands with a more acidic isoelectric point (pI) than the expected pI of 9.81 of the unphosphorylated form of SCI1. These results are consistent with native SCI1 being phosphorylated at tobacco stigmas/styles and co-existing in at least three phosphorylated forms.

To test the hypothesis of tissue-specific phosphorylation of SCI1, we have produced tobacco transgenic plants overexpressing SCI1-HIS. Total protein extracts were separately prepared from leaves and stigmas/styles. Additionally, we produced recombinant SCI1-HIS protein in *E. coli* and purified it in Ni²⁺ column. The purified bacterial SCI1-HIS protein was used to enrich the plant extracts, which were incubated with the recombinant SCI1 protein in the presence of ATP. SCI1-HIS was chromatography purified and analyzed by mass-spectrometry (Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer). The results have shown that SCI1-HIS incubated with stigmas/styles protein extract was phosphorylated at Ser21 and that this phosphorylation was not present in SCI1-HIS incubated with the protein extract from leaves.

The 14-3-3D protein interacts with WEE1 kinase, a cell cycle inhibitor

To access the relationship between the *N. tabacum* 14-3-3 proteins under study and the Arabidopsis 14-3-3 protein family, we have performed a sequence comparison analyses. We used amino acid sequences (accession numbers in Table1 Supplementary Information) in an alignment performed with MUSCLE (Edgar, 2004) and then, conducted analyses using p-distance (number of differences/number of aligned residues) and Neighbor-Joining tree building method (Saitou & Nei, 1987). The obtained tree shows that 14-3-3A and 14-3-3D proteins belong to the Non-Epsilon group. The group that includes tobacco 14-3-3A, F and H are highly related to the Arabidopsis group that includes isoforms GF14omega, chi and phi, suggesting that the proteins of these groups are possible orthologous. Furthermore, isoforms D and G are possible orthologous of GF14kappa and lambda (Figure 5A).

Previous work established that some of the Arabidopsis Non-Epsilon 14-3-3 proteins could bind to the CDC25 phosphatase, as well as rescue cell-cycle defects in fission yeast mutants (Sorrell et al., 2003). Additionally, Arabidopsis Non-Epsilon 14-3-3 proteins were shown to interact with WEE1, a kinase that inhibits the cell-cycle, an interaction that occurs in the nucleus of interphase cells (Grønlund et al., 2009). Therefore, we decided to investigate if 14-3-3A and/or 14-3-3D would also interact with NtWEE1. We have performed yeast two-hybrid assays with BD-NtWEE1, AD-Nt14-3-3A and AD-Nt14-3-3D proteins. As shown in Figure 5B, the interaction between the cell-cycle kinase NtWEE1 and 14-3-3D protein was confirmed. These results show that NtWEE1 is able to interact with the Nt14-3-3D homodimer. Meanwhile, if there is an interaction between NtWEE1 and Nt14-3-3A, it is a very weak one. So far, it is only possible to speculate if the interaction between NtWEE1 and the heterodimer Nt14-3-3A/Nt14-3-3D would be stronger and able to be detected by Y3H. Taken together, these results confirm that at least 14-3-3D is involved in cell-cycle control.

To further support the hypothesis that 14-3-3A and 14-3-3D proteins are involved in cell-cycle control, plants individually silenced for 14-3-3A (A^{Ri}) or 14-3-3D (D^{Ri}) were generated. However, these plants were similar to control plants as several other 14-3-3 Arabidopsis mutant plants previously analyzed (Jaspert et al., 2011). Only two independent transgenic plants for each gene silenced (A9.1, A20.1/A20.2; and D13.1, D26.1) exhibit a different phenotype. A20.1/A20.2 and D26.1 transgenic plants showed reduced petals. While D13.1 had smaller flowers a whole, but with alteration in the relation of anthers and stigma positioning. The flowers of A9.1 were smaller too, but in the first flowering they showed bigger petals. The alterations are seen mainly in floral organs, but D13.1 exhibited a general smaller size when compared to the wild-type plants (Supplemental Figures 1 and 2). It is important to note that these plants were among the most silenced plants and that the silencing of 14-3-3D produced a stronger floral phenotype (Supplemental Figure 2). These plants were crossed to produce plants simultaneously silenced for both genes, which have resulted in some smaller plantlets (data not shown), which will be further analyzed. The lack of obvious phenotypes in our transgenic plants is consistent

with the general accepted idea of functional redundancy among members of the Non-Epsilon group (Jaspert et al., 2011).

SCI1 is degraded at prophase and reappears at telophase

To investigate SCI1 protein stability and subcellular localization, tobacco BY2 cells were stably transformed to express SCI1-GFP. These cells were stained with Hoechst 33342 and visualized under confocal microscopy. It was possible to detect all the cell division phases as shown on Figure 6. During interphase, the SCI1-GFP protein was observed in the interior of a large nucleolus. In G2/prophase, SCI1-GFP protein is localized in the numerous and smaller nucleoli present at this cell division phase. In later phases, it is no longer possible to detect SCI1-GFP protein, while it becomes visible again in the end of mitosis. Our data demonstrate that SCI1 is degraded at a specific time during cell division (late prophase/metaphase) and reappears at telophase. Thus, SCI1 sub-nuclear localization and stability are dependent on the cell-cycle phase, showing a similar behavior of other cell-cycle regulators, as WEE1. These results are consistent with our hypothesis that SCI1 is a CDK inhibitor, which protein levels also rise and fall at specific times during the cell cycle.

DISCUSSION (not finished yet)

The different large scale approaches used to identify SCI1-interacting partners (Y2H and pulldown) have identified only 14-3-3A and 14-3-3D and not other 14-3-3 proteins. The fact that we have identified 14-3-3A in the pulldown corroborates the idea that SCI1 may interact with it, probably as a heterodimer with 14-3-3D. The homodimerization of 14-3-3A is very weak in Y2H and, if it interacts with SCI1, it may depend on additional factors or protein modifications that do not occur in yeast or are difficult to be detected. Additionally, the screening of the stigma/style Y2H cDNA library using 14-3-3D as bait (experiment ongoing in our laboratory) so far has only identified 14-3-3D and 14-3-3G as partners. Despite the fact that 14-3-3D may form a heterodimer with 14-3-3G (data not shown), this dimer does not interact with SCI1, since it was present in the stigma/style Y2H cDNA library, but it was not recovered during the screening using SCI1 as bait. Therefore, it seems that a functional

specialization may exist among the Non-Epsilon 14-3-3 proteins, in which not all heterodimers are formed or functional interchangeable.

14-3-3 proteins were already described as a negative regulator of the cell cycle progression (Peng et al., 1997; Laronga et al., 2000; other references). The 14-3-3 proteins have an overall inhibitory effect on cell cycle progression and apoptosis, whereas in signal transduction they may act as stimulatory or inhibitory factors (Van Hemert et al., 2001). Previous work established that some of the Arabidopsis Non-Epsilon 14-3-3 proteins could bind to the CDC25 phosphatase, as well as rescue cell-cycle defects in fission yeast mutants (Sorrell et al., 2003). Additionally, Arabidopsis Non-Epsilon 14-3-3 proteins were shown to interact with WEE1, a kinase that inhibits the cell-cycle, an interaction that occurs in the nucleus of interphase cells (Grønlund et al., 2009).

Our previous results have shown that SCI1 acts as an inhibitor of cell proliferation (DePaoli et al., 2011). Here we have demonstrated that SCI1 interacts with 14-3-3D protein, which in turn interacts with WEE1, an inhibitor of cell-cycle. The localization of SCI1 in the nucleolus during interphase suggests that it acts sequestering cell-cycle regulators with a final cell division inhibitory effect.

Nucleolar sequestration (Boisvert et al., 2007; Brown and Shawn, 2009)

There are 14-3-3-dependent pathways taking place during interphase to inhibit the initiation of mitosis. Taken together, the interactions of WEE1 and SCI1 with the same 14-3-3D protein confirm the connection of SCI1 with the cell cycle control.

MATERIAL AND METHODS

Cloning procedures

All primer sets used for cloning are listed in Tables xx. pENTRY-NtSCI1 were kindly provided by DePaoli et al. (2011). Nt14-3-3A and Nt14-3-3D2 were amplified by PCR from the two-hybrid library's clones H6.1 and D9.4, respectively. NtWEE1 were amplified by PCR from stigma/stylet cDNA. All PCR products were subcloned into pDONR221 entry vector using BP Clonase (Invitrogen) and were fully sequenced to verify that no PCR or cloning errors occurred. Escherichia coli DH10B electrocompetent cells were used for all

cloning procedures. To transfer the coding sequences for the two-hybrid vectors was used LR clonase (Invitrogen) and for the multi-site BiFC vectors was used LR Clonase II Plus (Invitrogen). All constructions were sequenced at the fusion points to verify if correct reading phase was preserved.

Plant material

Nicotiana benthamiana plants were grown in 10 cm pots. Seeds were sown on Bioplant® soil with vermiculite and were irrigated from below. Plants were grown in environmental growth chamber under long days (16 h light/8 h dark cycles) at 24°C.

Bimolecular fluorescence complementation (BiFC)

To verify interaction partners in planta, green fluorescent protein (GFP)-based BiFC analysis was performed. The coding regions of NtSCI1, Nt14-3-3A and Nt14-3-3D2 genes were subcloned into pK7m34GW vector with nGFP/cGFP fragments and 35S promoter. The recombinant plasmids were transformed into *Agrobacterium* GV2260/pGV2260 competent cells before being used to infiltrate the leaves of 5-week-old *N. benthamiana* plants as previously described (Bracha *et al.*, 2002). Protein expression was examined 48 h following injection.

Protein extracts

To extract soluble proteins, *Nicotiana tabacum* 35Sprom::NtSCI1-GFP stigma/styles were batch-frozen in liquid N₂ and ground into powder using pestle and mortar. Leaf powder (3 g) was subsequently resuspended in 10 ml of extraction buffer [50mM Tris-HCl pH7.5, 75mM NaCl, 1% Triton X-100, 5% glycerol, 2 mM EDTA, 5mM Na₃VO₄, 5mM NaF e 20mM β-glycerolphosphate, and one protease inhibitor cocktail tablet (Roche)/10ml]. The material was vortexed for 10 minutes on ice and submitted to sonication (6 pulses/30 seconds) at 30% (Branson Sonifier™ S-450 digital ultrasonic cell disruptor/homogenizer, Fisher Scientific). To remove insoluble material, the resulting extracts were centrifuged at 18500g for 20 min. The supernatant were collected and used for co-immunoprecipitation. HIS-Nt14-3-3D2 protein expression was conducted on *E. coli* cells, BL21(DE3)Roseta strain. The pellet

of cells from 50 ml of culture was resuspended in 5 ml of lysis buffer [Tris-HCl 50mM pH 7,4, NaCl 75 mM, 1Mm *Protease Inhibitor Cocktail for General Use* (Sigma)]. To clean up the extract and obtain soluble proteins, were used the same protocol described above.

Protein Immunoblots

Proteins were resolved on 12,5% acrylamide gels and electrotransferred to PVDF membranes (GE Healthcare Hybond™ –P). Membranes were blocked for 1 h at room temperature in TBS [20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20) containing 5% (w/v) non-fat dry milk]. The membranes were then incubated either with α -GFP (1:4000) policlonal antibodies and α -HIS (Sigma) monoclonal antibodies (1:3500). All dilutions were made in TBS. Incubation with primary antibodies was for either 1 h at room temperature. Blots were washed in TBS for 10 min (three times) before incubation with secondary antibodies. Horseradish peroxidase-conjugated goat α -rabbit (Sigma) and α -mouse (Sigma) antibodies were used to α -GFP and α -HIS primary antibodies, both 1:2500. The blots were washed with TBS for 10 min (three times) and the bound antibodies were detected homemade ECL solution [ECL1 (1 ml TRIS/HCl 1 M pH 8.5, 100 μ l Luminol 250 mM, 44 μ l p-coumaric acid 90 mM, 8.85 ml dH₂O) + ECL2 (6 μ l H₂O₂ 30%, 1 ml TRIS/HCl 1 M pH 8.5, 9 ml dH₂O)] and exposure to X-ray film (High Performance Chemiluminescence Film, GE Healthcare).

Co-immunoprecipitations

Protein extracts were prepared as described above, mixed and incubated at 4°C. Before 1h, 250 μ l Protein G Sepharose beads 4-fast flow (GE Helthcare), washed three times in extraction buffer, were added and the mix of proteins were incubated for 4h at 4°C under agitation. Before, the material were centrifuged at 4°C, 10000g for 1 minute. The supernatant were discarded and precipitated immunocomplexes were washed six times with 1 ml of extraction buffer, and then eluted from the beads by boiling in SDS-PAGE sample buffer for 5 min. Equal amounts of immunoprecipitated and unbound proteins were resolved on 12,5% acrylamide gels. Immunoblots were carried out as described above.

Confocal imaging

Confocal imaging was carried out with Leica TCS SP2 confocal laser scanning microscope. Excitation was with argon laser at 488 nm and the spectral detector was set between 500 and 550 nm. Image analysis was carried out with Leica LCS, ImageJ and Illustrator CS6.

Two-hybrid assays

Yeast two-hybrid assays were performed following the protocol of *ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway Technology (Invitrogen)*. The coding regions of *Nicotiana tabacum* SCI1, 14-3-3A, 14-3-3D and WEE1 genes were subcloned into both, pDEST32 (BD) and pDEST22 (AD) vectors, using gateway system (LR clonase, Invitrogen). Then recombinant plasmids were transformed sequentially into yeast PJ69-4a competent cells according to the *ProQuest™ Two-Hybrid System Guide (Invitrogen)*. The interactions were tested by serial dilutions of yeast cell transformants spot both on non-selective SD-L-T (synthetic dropout without leucine and tryptophan), and on selective SD-L-T-H (SD–Leu–Trp–His). 3'AT were added on selective medium just in case of auto-activation. Plates were incubated at 30 °C for 2 days and 25°C for up to 7 d before being photographed.

NtSCI1–GFP transgenic BY-2 lines

NtSCI1 under the 35S promoter in the pK7FWG2 vector was assembled by LR reaction using pENTRY-NtSCI1 described above. The constructs were transformed into *A. tumefaciens* strain GV2260. The presence of the transgene was checked by PCR (data not shown). BY-2 cells were cultivated and transformed as described by Nagata *et al* (1992). Samples were stained with Hoechst 33342 and analyzed at confocal microscope.

Protein extraction from stigma/style for analysis by 2DE

Frozen sample was ground in a mortar with liquid nitrogen and incubated with extraction buffer (500 mM Tris, 50 mM EDTA, 700 mM sucrose, 100 mM KCl, pH 8,0, 2% β -mercaptoethanol and 1 mM PMSF) and vortexed (Faurobert *et al.* 2007). Afterward, an equal volume of Tris-buffered phenol was added and

the solution was vortexed for 10 min at room temperature. The sample was centrifuged (10 min, 5500g at 4°C) and the phenolic phase was recovered. Five volumes of precipitation solution (0.1 M ammonium acetate in cold methanol) were added. The tube was shaken by inverting and the sample was incubated overnight at -20°C. Proteins were pelleted by centrifugation (10 min, 5500g at 4°C) and the pellet was washed three times with cooled acetone. The pellet was vacuum dried, resuspended in resolubilization solution (7 M urea, 2 M thiourea 2% CHAPS, 0.3% DTT, 2% pharmalyte) and sonicated to extract proteins. Protein concentration was determined according to Bradford (1976).

2DE-PAGE

An IPGPhor apparatus (GE Healthcare) was used for IEF with immobilized pH gradient (IPG) strips (pH 3.0–10.0, linear gradient, 7 cm). The IPG strips were rehydrated 12 h with 150 µL rehydration buffer (7 M urea, 2% CHAPS, 2% pharmalyte, 0.002% bromophenol blue) containing 100 µg proteins. The voltage settings for IEF was 300 V for 2 h, 1000 V to 300 kVh, 1 h, 5000 V to 4000 kVh h and 5000 V to 2000 kVh. Following el75 mM Tris–HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue, 1% DTT) and then incubated with the same buffer containing 2.5% iodoacetamide instead of DTT for 30 min at room temperature. The second dimension electrophoresis was performed on a 14% gel using a *Mini Protean 3 Gel Electrophoresis System* (Bio-Rad). The gels were analyzed by western blot. The membrane were immunoblotted with His-SCI1-specific antibody in 1:400 dilution.

Phylogenetic analyses

The phylogenetic analyzes were performed using thirteen amino acids sequences of Arabidopsis 14-3-3 proteins and seventeen 14-3-3 proteins of *N. tabacum* cv. Sansum NN (Konagaya *et al.*, 2004). These sequences were aligned with MUSCLE (Edgar, 2004) using default parameters. The phylogenetic analysis was done using MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2011). The distance tree topology was obtained by Neighbor-Joining method (Saitou & Nei, 1987) with distances calculated by p-distance using 1000 bootstrap replicates.

FIGURE LEGENDS:

Figure 1: (A) Yeast two-hybrid assay retesting the interaction of BD-NtSCI1 with AD-Nt14-3-3D and AD-14-3-3A proteins. Yeast PJ69-4a cells with empty vectors are unable to grow on selective medium without histidine. The auto-activation of BD-SCI1, AD-14-3-3D and AD-14.3.3A was negative. The cells were only able to grow when BD-SCI1 and AD-14-3-3D proteins were presente, showing HIS3 reporter gene expression and confirming the interaction between these proteins. (B) Co-immunoprecipitation of HIS-14-3-3D protein using an extract of stigmas/styles from *N. tabacum* 35Sprom::SCI1-GFP plants.

Figure 2: Dimerization and subcellular localization of 14-3-3A and 14-3-3D. A) Yeast two-hybrid assay testing the dimerization of 14-3-3A and 14-3-3D proteins. Selective medium: SD-Leu-Trp-His + 1 mM 3AT. C-: Negative interaction control; C++: positive weak interaction control and C+++: positive strong interaction control. AD - Activation domain; DBD - DNA binding domain. B-E) Subcellular localization of 14-3-3A-GFP and 14-3-3D-GFP. B) Cytosolic and nuclear localization of 14-3-3A-GFP, bar 20 µm. C) Merged of 14-3-3A-GFP localization and nuclear DAPI staining, bar 20 µm. D) Cytosolic localization of 14-3-3D-GFP, bar 15 µm. E) Merged of 14-3-3D-GFP localization and nuclear DAPI staining, bar 15 µm. F-Q) BiFC assay showing the dimerization of 14-3-3A and 14-3-3D. F and H) 14-3-3A-hGFP x 14-3-3A-tGFP, showing 14-3-3A homodimers formation in cytosol and nucleus, bars 20 µm and 5 µm. G and I) Merged image of 14-3-3A homodimers and DAPI staining, bars 20 µm and 5 µm. J and L) 14-3-3D-hGFP x 14-3-3A-tGFP, showing 14-3-3D homodimers formation in cytosol, bars 20 µm and 10 µm. K and M) Merged image of 14-3-3D homodimers and DAPI staining, bars 20 µm and 10 µm. N and P) 14-3-3A-hGFP x 14-3-3D-tGFP, showing heterodimers formation in cytosol, bars 40 µm and 10 µm. O and Q) Merged image of heterodimers and DAPI staining.

Figure 3: Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) assays indicating that SCI1 interacts *in vivo* with 14-3-3D and 14-3-3A proteins in the nucleus of epidermal cells of *N. benthamiana* leaves. Blue indicates DAPI stained DNA.

Green indicates the interaction of SCI1-nGFP and 14-3-3A-cGFP (A to I) and 14-3-3D-cGFP protein (J to R). nGFP: N-terminal fragment of GFP (amino-acid residues 1-149), cGFP: C-terminal fragment of GFP (amino-acid residues 150-238). Scale bars - 5µm.

Figure 4: (A) *In silico* analysis of phosphorylation sites in SCI1 by MotifScan software (Pagni et al., 2004). Three putative 14-3-3 mode I interaction motifs were found in SCI1 amino acid sequence. Two motifs (1 and 2) are highlighted in gray, and a third mode I motif, which overlaps with motif 2, is underlined. (B) Western blot analysis. Crude protein from stigma/style of SR1 (100 µg) was resolved by 2-DE with pH 3–10 Immobiline DryStrip and in the second dimension by SDS-PAGE 14 % and transferred to PVDF membrane. Membrane were immunoblotted with His-SCI1-specific antibody.

Figure 5: (A) Neighbor joining tree of 14-3-3 proteins from Arabidopsis (At) and *N. tabacum* (Nt). Brackets identified proteins from epsilon and non-epsilon group. Bootstraps values for 1000 replicates are shown. The bar indicates number of substitutions. Accession numbers for all proteins are provided in Supplemental Table 1. (B) Yeast two-hybrid assay testing interaction of BD-WEE1 with AD-14-3-3D and AD-14-3-3A proteins. HIS3 reporter gene activation was only noticed in the cells carrying BD-WEE1 and AD-14-3-3D, confirming these proteins interaction. Selective medium: SD-Leu-Trp-His + 0,05mM 3AT.

Figure 6: SCI1 sub-nuclear localization is dependent on the cell-cycle phase. Confocal microscopy images showing NtSCI1-GFP subcellular localization during cell-cycle phases. Tobacco BY-2 cells stably transformed with 35Sprom::NtSCI1-GFP were stained with Hoechst 33342. (A) Interphase, (B e C) Prophase, (D) Metaphase, (E) Anaphase e (F) Telophase. Images were captured using Leica TCS SP5 (Leica Microsystems). Scale bars - 20 µm (for A, C, D, E and F) and 10 µm (for B).

Supplementary Information:

Table 1: Accession numbers of proteins used in the phylogenetic analysis.

Figures S1: Phenotypes of some transgenic plants silenced for 14-3-3A.

Figures S2: Phenotypes of some transgenic plants silenced for 14-3-3D.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Elizabete Rosa Milani and Dr. Roberta Ribeiro Costa (FMRP/USP) for their support and advices during the confocal microscopy work; and to VIB – Belgium for the plant expression vectors in the Gateway system. This work was supported by Fundação de Amparo da Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP, processo no. 12/50562-2) – Brazil to MHSG. The authors are also very grateful to the Brazilian agencies that financed their fellowships: EJS – CAPES; LTB - CNPq (Processo no. 130159/2012-3) and HAOS - FAPESP (processo no. 2011/51844-9). GHG and MHSG are indebted to CNPq - Brazil for their Research fellowships.

REFERENCES

- Aducci, P., Camoni, L., Marra, M., Visconti, S. (2002) From Cytosol to Organelles: 14-3-3 Proteins as Multifunctional Regulators of Plant Cell. *Plant Life*, **53**(1), 49-55.
- Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jul;8(7):574-85.
- Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4(6): 1633-49.
- Bracha K, Lavy M, Yalovsky S. (2002). The Arabidopsis AtSTE24 is a CAAX protease with broad substrate specificity. *J Biol Chem*, 277(33):29856-64.
- Bracha-Drori K, Shichrur K, Katz A, Oliva M, Angelovici R, Yalovsky S, Ohad N. (2004) Detection of protein–protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant Journal* **40**, 419–427.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein– dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Faroubert, M., E. Pelpoir , J. Chaib, 2007. Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. *Methods Mol Biol* 355, 9-14.
- Chaudhri, M., Scarabel, M., Aitken, A. (2003) Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms form distinct patterns of dimers in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*, **300**(3), 679-685.

- Chevalier, D., Morris, E.R., Walker, J.C. (2009) 14-3-3 and FHA domains mediate phosphoprotein interactions. *Annual Review of Plant Biology*, **60**, 67-91.
- de Boer, A.H., van Kleeff, P.J., Gao, J. (2013) Plant 14-3-3 proteins as spiders in a web of phosphorylation. *Protoplasma*, **250**(2), 425-440.
- Denison, F.C., Paul, A.-L., Zupanska, A.K., Ferl, R.J. (2011) 14-3-3 proteins in plant physiology. In *Seminars in cell & developmental biology*, Elsevier: pp 720-727.
- DeLille JM, Sehnke PC, Ferl RJ. (2001). The *Arabidopsis* 14-3-3 family of signaling regulators. *Plant Physiol.* 126:35-38.
- DePaoli, H.C., Brito, M.S., Quiapim, A.C., Teixeira, S.P., Goldman, G.H., Dornelas, M.C., Goldman, M.H.S. (2011) Stigma/style cell cycle inhibitor 1 (SCI1), a tissue-specific cell cycle regulator that controls upper pistil development. *New Phytologist*, **190**(4), 882-895.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC bioinformatics*, **5**(1), 113.
- Ferl, R.J., Manak, M.S., Reyes, M.F. (2002) The 14-3-3s. *Genome Biology*, **3**(7), 3010.1-3010.7.
- Ferl, R.J. (2004) 14-3-3 proteins: regulation of signal-induced events. *Physiologia Plantarum*, **120**(2), 173-178.
- Gardino, A.K. e Yaffe, M.B. (2011) 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. In *Seminars in cell & developmental biology*, Elsevier: pp 688-695.
- Grønlund, A.L., Dickinson, J.R., Kille, P., Harwood, J.L., Herbert, R.J., Francis, D., Rogers, H.J. (2009) Plant WEE1 kinase interacts with a 14-3-3 protein, GF14 omega but a mutation of WEE1 at S485 alters their spatial interaction. *Open Plant Sci J*, **3**, 40-48.
- Jahn, T., Fuglsang, A.T., Olsson, A., Brüntrup, I.M., Collinge, D.B., Volkmann, D., Sommarin, M., Palmgren, M.G., Larsson, C. (1997) The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H (+)-ATPase. *The Plant Cell Online*, **9**(10), 1805-1814.
- Karimi, M., Inzé, D., Depicker, A. (2002) GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, **7**(5), 193-195.
- Koltunow, A.M., Truettner, J., Cox, K.H., Wallroth, M., Goldberg, R.B. (1990) Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *The Plant Cell*, **2**(12), 1201.
- Konagaya, K.-i., Matsushita, Y., Kasahara, M., Nyunoya, H. (2004) Members of 14-3-3 protein isoforms interacting with the resistance gene product N and the elicitor of Tobacco mosaic virus. *Journal of General Plant Pathology*, **70**(4), 221-231.
- Laronga C, Yang HY, Neal C, Lee MH. (2000). Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression. *J Biol. Chem.* 2000 Jul 28;275(30):23106-12.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Muslin, A.J. e Xing, H. (2000) 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cellular signalling*, **12**(11), 703-709.

- Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M., Shaw, A.S. (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*, **84**(6), 889-897.
- Pagni M, Ioannidis V, Cerutti L, Zahn-Zabal M, Jongeneel CV, Falquet L. (2004) MyHits: a new interactive resource for protein annotation and domain identification. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jul 1;32(Web Server issue):W332-5.
- Paul, A.-L., Folta, K.M., Ferl, R.J. (2008) 14-3-3 proteins, red light and photoperiodic flowering. *Plant Signal Behav*, **3**, 511-515.
- Paul, A.-L., Sehnke, P.C., Ferl, R.J. (2005) Isoform-specific subcellular localization among 14-3-3 proteins in Arabidopsis seems to be driven by client interactions. *Molecular biology of the cell*, **16**(4), 1735-1743.
- Peng, C.-Y., Graves, P.R., Thoma, R.S., Wu, Z., Shaw, A.S., Piwnicka-Worms, H. (1997) Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*, **277**(5331), 1501-1505.
- Roberts, M.R. (2000) Regulatory 14-3-3 protein–protein interactions in plant cells. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**(5), 400-405.
- Rosenquist, M., Alsterfjord, M., Larsson, C., Sommarin, M. (2001) Data mining the Arabidopsis genome reveals fifteen 14-3-3 genes. Expression is demonstrated for two out of five novel genes. *Plant Physiology*, **127**(1), 142-149.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, **4**(4), 406-425.
- Sambroock, J., Russel, DW. (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. New York, NY: Cold Spring Harbor.
- Schoonheim PJ, Veiga H, Pereira Dda C, Friso G, van Wijk KJ, de Boer AH: A comprehensive analysis of the 14-3-3 interactome in barley leaves using a complementary proteomics and two hybrid approach. *Plant Physiol* 2007, **143**:670-683.
- Sorrell, D.A., Marchbank, A.M., Chrimes, D.A., Dickinson, J.R., Rogers, H.J., Francis, D., Grierson, C.S., Halford, N.G. (2003) The Arabidopsis 14-3-3 protein, GF14 ω , binds to the *Schizosaccharomyces pombe* Cdc25 phosphatase and rescues checkpoint defects in the rad24– mutant. *Planta*, **218**(1), 50-57.

Table 1: Primers used to amplify the coding regions of *N. tabacum* WEE1, 14-3-3A and 14-3-3D2 genes. Capital and bold letters indicate the gene-specific sequences of each primer. Small letters are part of the attB1 and attB2 recombination sites.

Primer name	Primer Sequences (5' - 3')
attB1-NtWEE1-Fw	gca ggc ttc gaa gga gat aga acc ATG AAG AGG AAA ACC CTA AAT C
attB2-NtWEE1-Rv	aag ctg ggt c TT ACT TGT TAG CAT TTC TTT G
EJS-attB1SDK-1433D-FW	gca ggc ttc gaa gga gat aga acc ATG GCC GTA CCG GAA AAT TTA AC
EJS-ATTB2-1433D-RV	aag ctg ggt c TC AAG CCT CGT CCA TCT GC
EJS-ATTB2-1433Dss-RV	aag ctg ggt c AG CCT CGT CCA TCT GCT CC
14-3-3A-FW	gca ggc ttc gaa gga gat aga acc ATG GCA TCG CCG CGC GAG
14-3-3A-RV	aag ctg ggt c TT ACT GCT GCT CCT CCG CTT
14-3-3ASS-RV	aag ctg ggt c CT GCT GCT CCT CCG CTT TT
BP1	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT C
BP2	GGC GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC

FIGURES

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

(A)

MGSDKKTPEEKRKHKRSPSSPRDEVKSKRQNIKGDEERRK
EKDKSKKEKHKSHSSEEKKSGEKHKTSHKHDKSKNKFE
ELSKDDYFSKNNEFATWLKDKKNLFFSDLSETARDLFSDF
VIQWNKGKLD SQYYEGIATGPRSSHAWNICK

(B)

Figure 5

Figure 6

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table 1: Access numbers of amino acid sequences used in the phylogenetic analysis.

Protein	Acession – GenBank
Nt-A1	BAD12168
Nt-B1	AB119467
Nt-B2	AB119468
Nt-C1	BAD12171
Nt-C2	AB119470
Nt-D1	BAD12173
Nt-D2	BAD12174
Nt-E1	BAD12176
Nt-E2	BAD12177
Nt-F1	BAD12178
Nt-F2	BAD12554
Nt-H1	BAD12180
Nt-H2	BAD12181
Nt-I1	BAD12182
Nt-I2	BAD12183
Nt-T(S)	BAD12555
At-Chi	AAA96254
At-Omega	NP_565176
At-Psi	AAA96252
At-Phi	NP_564453
At-Upsilon	NP_568325
At-Lambda	NP_568229
At-Nu	NP_566174
At-Kappa	AAA79700
At-Mu	NP_001031533
At-Epsilon	NP_564167
At-Omicron	AAG47840
At-Iota	NP_564249
At-Pi	AAO38438

Figure S1: Morphological alterations of 14-3-3A silenced *N. tabacum* plants. A) Flowers of the first flowering of the transgenic A9.1 in developmental stage 10 showing size alteration in petals, style and filament when compared to wild type (WT) flowers, bar 1mm. B) A9.1 plant and a wild type in greenhouse. C) Flowers of the second flowering of the transgenic plant A9.1 in developmental stage 10 showing size alteration in petals, style and filament when compared to wild type flowers, bar 1mm. D) Stigmas tripartite of A9.1 flower, bar 2mm. E) Flowers of A20.1 transgenic plant in developmental stages 11 and 12 showing size alteration in petals when compared to wild flowers, bar 1mm. F) Flowers of A20.2 transgenic plant in developmental stages 11 and 12 showing size alteration in petals and style when compared to wild flowers bar 1mm.

Figure S2: Morphological alterations of 14-3-3D silenced *N. tabacum* plants. A) Flowers of D13.1 transgenic plant in developmental stages 11 and 12 showing size alteration, bar 1 mm. B) Stigma and anther size alteration in D13.1 in relation of WT, bar 1 mm. C) D13.1 plant and two wild type plants in greenhouse. D) Flowers of D26.1 transgenic plant in developmental stages 11 and 12 showing petal size alteration, bar 1 mm.