# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

# Caracterização do gene NtCDKG;2 expresso no pistilo de *Nicotiana tabacum* L.

**GREICE LUBINI** 

RIBEIRÃO PRETO, SP 2012

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

# Caracterização do gene NtCDKG;2 expresso no pistilo de *Nicotiana tabacum* L.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de MESTRE em CIÊNCIAS – Área de concentração GENÉTICA GERAL.

Aluna Greice Lubini Orientadora Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman

Ribeirão Preto -2012-

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

#### Lubini, Greice

Caracterização do gene NtCDKG;2 expresso no pistilo de *Nicotiana tabacum* L./ Greice Lubini; orientadora Maria Helena de Souza Goldman – Ribeirão Preto – 2012. 125p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração Genética Geral.

1.CDKs. 2. Ciclo celular. 3. Desenvolvimento do pistilo. 4. Plantas transgênicas. 5. Localização subcelular. 6. Expressão heteróloga.



	,	
<b>DEDICA</b>	TODIA	
DEDICA	LIONIA	

A todos os professores que tive, mestres de minha vida...

Aos que conheci e aos que li.

#### **AGRADECIMENTOS**

Meus agradecimentos mais sinceros...

À Prof. Dra. Maria Helena de Souza Goldman, por sua excelência profissional, por ter me aceitado no laboratório e também por confiar em meu trabalho, orientar, encorajar e dar todo suporte para que eu vencesse os obstáculos. A minha também mãe de coração e amiga, Maria Helena, agradeço por todo apoio, paciência e carinho oferecido nos momentos em que mais precisei, por toda preocupação com nosso bem estar dentro e fora do laboratório, pelos inúmeros conselhos e abraços. Agradeço também pelos alegres momentos de entretenimento e por tentar traduzir o meu "idioma" e fazer com que nos estendêssemos. Muito, muito obrigada!

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, primeiramente, por ter me aceitado no Curso de Verão em Genética e, após, pela valiosa oportunidade e suporte oferecido durante a realização do meu mestrado. Em especial, agradeço ao Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares e à secretária Susie Adriana Penha Nalon pelo incansável apoio, motivação e amizade.

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

À CAPES, pela bolsa concedida inicialmente.

Ao CNPq pela bolsa concedida (processo nº 153503/2010-6), a qual permitiu o desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES, ao CNPq e a FAPESP por todo o suporte financeiro oferecido para odesenvolvimento da pesquisa em nosso laboratório.

À FAEPA, pelo suporte financeiro concedido para a participação de eventos científicos.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman, pela constante disponibilização da estrutura de seu laboratório e pelos auxílios prestados.

À Prof. Dra. Zilá Luz Paulino Simões, por disponibilizar o acesso à estrutura de seu laboratório e também pelo carinho pelos membros do nosso laboratório.

À Dea, por ser o braço direito do laboratório e por mantermos uma bela amizade. Obrigada pelas inúmeras ajudas, risadas e palha italiana.

Ao Mikito e ao Niltão, pela ajuda prestada durante meus estágios no laboratório, pelo incentivo constante, por serem essas pessoas maravilhosas e me darem a honra de sua amizade.

À Anita, querida, pela ajuda, apoio, amizade e por ser mais louca que o Batman!

À Marcellitcha, pela amizade, ensinamentos, boas discussões e por tentar dividir comida comigo.

Aos amigos mais antigos do laboratório, Cris "Protein", Cris, Henrique e Douglas por me incentivarem e apoiarem.

À Fer, por sua imensa amizade, apoio e carinho em todos momentos. Obrigada por ter sido companheira de bancada, de mesa, de almoços e risadas.

À Breinha, tão querida com todos, obrigada por ter entrado em nossas vidas e por ser sempre tão solícita. Em especial, obrigada pela atenção e conselhos com esta dissertação.

Ao Ed Strrriiini, por todos seus ensinamentos tanto no campo profissional quanto na vida. Obrigada também por me dar um "cruzeiro à Serra Gaúcha".

À Sazita e ao Teu, irmãozinhos de Lab. Obrigada por entrarem "nessa" comigo, por me auxiliarem e incentivarem sempre. Obrigada, principalmente, pela amizade valiosa que construímos.

À Vivi, amiga querida, por todo auxílio e pela felicidade de tantas vezes compartilhar tua casa e família conosco. Obrigada por passarmos por momentos de dificuldade e por tantos outros momentos de alegria.

À Lígia, por toda ajuda, amizade e abraços amassados.

Ao Ian, pela amizade e alegria do convívio.

À Tamiris, pela amizade, risadas e agradável convívio. Agradeço também por nos deixar mais próximos das belezas literárias

Ao Paulão, pela ajuda e por ser só alegria.

À Dona Nina, pelos deliciosos cafezinhos, feijoadas e bolinhos-de-chuva. Obrigada pela alegria e convívio diário.

Aos membros do Laboratório do Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman (FCFRP-USP), principalmente à Patrícia e à Marcela, agradeço por toda ajuda.

À minha maravilhosa Mãe, obrigada pelo amor incondicional e por esse exemplo de pessoa. Junto a ela, agradeço também ao Luís que nos momentos de angústias e dificuldades, teve sempre uma palavra de incentivo, agradeço ternamente.

Ao meu Paizão que, mesmo sem entender direito o que faço me apoia e auxilia. Obrigada pelo amor, carinho e por entender que, mesmo longe, estamos sempre juntos.

A todos meus Familiares que sabem do valor dessa luta. Agradeço pelo afeto, solidariedade e compreensão dos parentes. Ao Vô Egon (*in memorian*) e à Vó Cadi que também foram super pais para mim. Ao vô Egon, faço um agradecimento especial, pois muito incentivou meus estudos, sempre ficando orgulhoso com cada conquista minha. Queria que estivesse aqui para participar de mais esta alegria.

À Jóice, irmã mais que irmã. Obrigada, mana, pela paciência, especialmente nos últimos meses, pelo carinho e incentivo e por estar aqui comigo e alegrar minha vida.

Ao Shin, querido companheiro e amigo, sempre paciente, compreensivo, solícito e incentivador. Obrigada por me encher de amor e carinhos. Obrigada por estar comigo sempre, inclusive me auxiliando na impressão deste trabalho. Obrigada também à família dele, por me deixar fazer parte de suas vidas e por todo carinho recebido.

Aos meus queridos amigos/irmãos do Sul e desse Brasilzão, por fazerem com que a distância não diminua o valor de nossa amizade. Sou muito feliz por cultivar tantas amizades maravilhosas. Não irei nominá-los, mas tenho certeza que todos sabem do valor que sua amizade representa.

Aos moradores, amigos e agregados da RePam (República dos Pampas), o nosso cantinho gaúcho nas terras vermelhas de Ribeirão. Obrigada por todos alegres momentos, pelo incentivo e força! Obrigada por matarmos um pouco da saudade do pago a cada chimarrão. "Sirvam nossas façanhas de modelo à toda terra"!

Às maravilhosas amizades que cultivei aqui em Ribeirão. Em especial, agradeço à Liah e à Jujubinha que tão carinhosamente me acolheram na Rep Bonsai. Obrigada, meus queridos, pela amizade, incentivo e por todos momentos felizes.

Sou muito agradecida a todos que contribuíram para a realização deste trabalho. Sem o apoio de inumeráveis pessoas, a execução desse trabalho teria sido impossível.

#### Gratidão!

## SUMÁRIO

ABREVIATURAS E SIGLAS	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A FLOR E SUAS ESTRUTURAS	1
1.2. SCI1: UM INIBIDOR DO CICLO CELULAR TECIDO ESPECÍFICO	3
1.3. QUINASES DEPENDENTES DE CICLINA: REGULAÇÃO E SEU ENVOLVIMENTO NO CICLO CELULAR	
1.4. CDKS PRESENTES EM PLANTAS	9
1.5. ESTUDOS REALIZADOS COM AS CDKGs	12
2. OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVO GERAL	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. MATERIAL VEGETAL	16
3.1.1. Esterilização de sementes	16
3.1.2. Coleta de material vegetal	17
3.2. PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES	17
3.2.1. Preparo Escherichia coli eletrocompetentes	17
3.2.2. Preparo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> eletrocompetentes	18
3.3. TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS POR ELETROPORAÇÃO	18
3.3.1. Transformação de <i>E. coli</i> eletrocompetentes por pulso elétrico	18
3.3.2. Transformação de A. tumefaciens eletrocompetentes por pulso elétrico	19
3.4. ESTOQUES SEMI-PERMANENTE EM GLICEROL	19
3.5. EXTRAÇÃO DE DNA PLAMIDIAL DE BACTÉRIAS EM PEQUENA ESCALA (MINI- PREPARAÇÃO)	19
3.5.1. Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> por lisozima	20
3.5.2. Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> com o <i>Kit</i> GeneJET <sup>TM</sup> Plasmid Miniprep ( <i>Fermen Life Sciences</i> )	
3.5.3. Extração de DNA plasmidial de <i>A. tumefaciens</i> por lise alcalina	21
3.6. QUANTIFICAÇÕES DAS AMOSTRAS	22

3.7. DIGESTÕES COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	23
3.8. GEL DE AGAROSE E ELETROFORESE PARA SEPARAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DN	
3.9. PURIFICAÇÃO DE DNA DE BANDAS EM GEL DE AGAROSE	
3.10. TRATAMENTO DAS MINI-PREPARAÇÕES DE DNA COM RNase	24
3.11. LIMPEZA DO DNA COM FENOL/CLOROFÓRMIO	25
3.12. PLASMÍDEOS UTILIZADOS	25
3.12.1. Plasmídeo intermediário para clonagem	25
3.12.2. Plasmídeos do Sistema Gateway Cloning Technology	26
3.13. SEQUENCIAMENTO	33
3.13.1. Preparo das reações	33
3.13.2. Programa de PCR utilizado	33
3.13.3. Precipitação das amostras	33
3.13.4. Primers utilizados	34
3.14. AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA DE NtCDKG;2	35
3.15. CLONAGEM DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA DE NtCDKG;2	35
3.16. REAÇÕES DE RECOMBINAÇÃO E CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO .	36
3.16.1. PCRs 1 – inserção de partes dos sítios attB1 e attB2	36
3.16.2. PCRs 2 e inserção completa dos sítios attB1 e attB2	39
3.16.3. Recombinação das construções no vetor pDONR221-Reações BP	39
3.16.4. Recombinação dos pENTRY com seus respectivos vetores de destino – reações LR	40
3.17. ANÁLISE DA EXPRESSÃO NtCDKG;2	41
3.17.1. Desenho dos <i>primers</i>	41
3.17.2. Coleta do material vegetal para extração de RNA	42
3.17.3. Extração de RNA de N. Tabacum	42
3.17.4. Confirmação da integridade do RNA	43
3.17.5. Tratamento com DNase	44
3.17.6. Detecção de contaminação com DNA genômico	44
3.17.7. Reação de cDNA com a transcriptase reversa	45
3.17.8. Análises quantificação dos transcritos	45
3.17.9. Análise dos resultados	46
3.18. TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS	46
3.18.1. Transformação e seleção dos clones de <i>A. tumefaciens</i>	46

	3.18.2. Infecção de discos foliares e obtenção de transgênicos estáveis	47
	3.18.3. Extração de DNA genômico de N. tabacum	49
	3.18.4. PCR para checagem dos transgênicos	50
	3.18.5. Expressão transiente de NtCDKG;2_GFP em folhas de N. tabacum	50
	3.19. EXPRESSÃO HETERÓLOGA	51
	3.19.1. Indução da expressão da proteína NtCDKG;2	52
	3.19.2. Lise bacteriana para liberação das proteínas	54
	3.19.3. SDS-PAGE	54
	3.20. TRANSFERÊNCIA PARA MEMBRANA E WESTERN BLOT	55
	3.20.1. Revelação do Western por ECL (Enhanced Chemiluminescent)	56
	3.21. MEIOS DE CULTURA	5 <i>e</i>
	3.21.1. Meio LB (Luria-Bertani)	56
	3.21.2. Meio MAS para Agrobacterium (Mininum A sucrose)	57
	3.21.3. Meio 5X A	57
	3.21.4. Meio MS para plantas (Murashige e Skoog, 1962)	57
	3.21.5. Meio MS 300 – Indução de calos	57
	3.21.6. Meio MS 250 – Indução de parte aérea	58
	3.21.7. MES (100 mM) – 25 ml	58
	3.22. ANTIBIÓTICOS	58
	3.23. TAMPÕES E SOLUÇÕES	59
	3.23.1. Tampão de transferência	59
	3.23.2. Solução corante de Ponceau	59
	3.23.3. TBS	59
	3.23.4. ECL-Solução 1	59
	3.23.5. ECL-Solução 2	60
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
	4.1. ANÁLISES <i>IN SILICO</i> EM BUSCA DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA COMPLETA DA CDK DE <i>N. TABACUM</i>	
	4.2. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DE NtCDKG;2	
	4.3. ANÁLISES <i>IN SILICO</i> DA SEQUÊNCIA NtCDKG;2	
	4.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE NtCDKG;2 EM PLANTAS SELVAGENS	
	4.4.1. NtCDKG;2 é expressa nos diferentes órgãos de <i>N. tabacum</i>	
	4.4.2. A expressão de NtCDKG:2 é regulada ao longo do desenvolvimento do estigma/estilete	
	THE TENTH OF THE PROPERTY OF T	/ \

4.5. NtCDKG;2 É REGULADO, A NÍVEL TRANSCRICIONAL, POR AUXINA	72
4.6. CONSTRUÇÕES DE VETORES DE EXPRESSÃO EM PLANTAS	75
4.6.1. Obtenção das construções de superexpressão, RNAi e fusão com GFP	75
4.6.2. Recombinação dos fragmentos de interesse com o vetor de entrada pDONR221	
4.6.3. Reações de recombinação entre as construções pENTRY e vetores de expressão	80
4.7. OBTENÇÃO DE COLÔNIAS DE <i>AGROBACTERIUM</i> CONTENDO OS PLASMÍDEOS EXPRESSÃO EM PLANTA	
4.8. LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA PROTEÍNA NtCDKG;2 EM CÉLULAS EPITELLA N. TABACUM	
4.9. OBTENÇÃO DAS PLANTAS TRANSGÊNICAS ESTÁVEIS: SILENCIAMENTO E SUPEREXPRESSÃO DE NtCDKG;2	88
4.10. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE NtCDKG;2 NAS PLANTAS TRANSGÊNICAS DE SUPEREXPRESSÃO E SILENCIAMENTO	91
4.11. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA NtCDKG;2 EM <i>E. COLI</i>	94
4.11.1. Produção heteróloga da proteína recombinante NtCDKG;2-GST	95
4.11.2. Produção da proteína recombinante NtCDKG;2-HIS	98
4.12. CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
5. CONCLUSÕES	104
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
ANEXOS	114
ANEXO I	114
ANEXO II	115
ANEXO III	116
ANEXO IV	118
ANEXO V	120
ANEXO VI	123

#### **ABREVIATURAS E SIGLAS**

AtCDKG;2 - CDKG;2 de Arabidopsis thaliana

atm - atmosfera

CDK – Cyclin Dependent Kinase

D. O. – Densidade Óptica

E/E - estigmas/estiletes

GST - <u>G</u>lutathione <u>S</u>-<u>t</u>ransferase

His - Histidina

NtCDKG;2 - CDKG;2 de Nicotiana tabacum

pb – pares de base

q. s. p. – quantidades suficientes para

qRT-PCR - (Real Time quantitative Reverse Transcription PCR)

RNAi – interferência por RNA

rpm – rotações por minuto

SCI1 - Stigma/style Cell-cycle Inhibitor 1

T.A. – temperatura ambiente

Tm – Temperatura de *melting* 

#### Caracterização do gene NtCDKG;2 expresso no pistilo de Nicotiana tabacum L.

#### **RESUMO**

A biologia da reprodução sexual de plantas é um campo de pesquisa de grande importância, já que a maioria dos alimentos consumidos pelo homem é composta de partes reprodutivas das plantas (frutos e sementes), oriundas do desenvolvimento de partes do pistilo fertilizado. Em Nicotiana tabacum, identificou-se um gene específico de estigma/estilete, SCI1 (Stigma/style Cell-cycle Inhibitor 1), que atua na inibição da proliferação celular (DePaoli et al., 2011). Através de ensaios de pull-down, verificou-se a interação da proteína SCI1 com uma proteína quinase dependente de ciclina (CDK) (Strini, dados não publicados). Este trabalho visou à caracterização dessa nova CDK, ortóloga da CDKG;2 de Arabidopsis. A sequência correspondente de N. tabacum (NtCDKG;2) foi amplificada por PCR, a partir de cDNAs de estigmas/estiletes, clonada e sequenciada, o que permitiu a confirmação de sua identidade. A expressão de NtCDKG;2 foi analisada nos diferentes órgãos vegetativos e reprodutivos, por qRT-PCR, o que evidenciou um perfil de expressão ubíqua. Ao estudar o perfil de expressão desse gene nos estigmas/estiletes dos doze estádios de desenvolvimento floral de N. tabacum, observa-se que NtCDKG;2 é mais expresso nos estádios tardios do desenvolvimento em direção à antese, indicando uma função importante de sua proteína ao final do desenvolvimento do pistilo. Análises de expressão de NtCDKG;2 em estigmas/estiletes, de plantas de N. tabacum com produção aumentada do hormônio auxina no pistilo, sugerem que NtCDKG;2 é regulado transcricionalmente por esse hormônio. A expressão transiente da proteína de fusão NtCDKG;2-GFP, em folhas de N. tabacum, evidenciou a localização nuclear da proteína em estudo. Também foram geradas plantas transgênicas estáveis com superexpressão e com silenciamento por RNAi de NtCDKG;2. Apesar dos altos níveis de transcritos de NtCDKG;2 nas plantas de superexpressão e dos baixos níveis nas plantas silenciadas, não foram observadas alterações fenotípicas macroscópicas nessas plantas. Adicionalmente, obteve-se a expressão da proteína NtCDKG:2, fusionada a uma tag de histidina em sua porção N-terminal, em células de Escherichia coliBL21(DE3)CodonPlusRP. Através dos estudos realizados neste trabalho e análises conjuntas da literatura, é possível propor que NtCDKG;2 codifique uma proteína que está envolvida no controle do ciclo celular nos estigmas/estiletes de N. tabacum.

**Palavras-chave**: 1.CDKs. 2. Ciclo celular. 3. Desenvolvimento do pistilo. 4. Plantas transgênicas. 5. Localização subcelular. 6. Expressão heteróloga.

#### Caracterization of the gene NtCDKG;2 express in Nicotiana tabacum L. pistil

#### **ABSTRACT**

The biology of plant sexual reproduction is a research field of great importance, since most of the food consumed by humans is composed of plant reproductive parts (fruits and seeds), originated by the development of fertilized pistil parts. In Nicotiana tabacum, it was identified a stigma/style-specific gene, SCI1 (Stigma/style Cell-cycle Inhibitor 1), which acts in the inhibition of cell proliferation (DePaoli et al., 2011). Through pull down assays, the interaction of the SCI1 protein with a cyclin-dependent protein kinase (CDK) was verified (Strini, unpublished). This work aimed the characterization of this new CDK, orthologous to the Arabidopsis CDKG;2. The N. tabacum corresponding sequence (NtCDKG;2) was PCR amplified, from stigmas/styles cDNAs, cloned and sequenced, which allowed the confirmation of its identity. The NtCDKG;2 expression was analyzed in the different vegetative and reproductive organs, by qRT-PCR, evidentiating an ubiquitous expression pattern. Studying the expression pattern of this gene in stigmas/styles of the twelve stages of N. tabacum flower development, it was observed that NtCDKG;2 is more expressed at the later developmental stages towards anthesis, indicating an important function of its protein in the end of pistil development. NtCDKG;2 expression analyses in stigmas/styles of N. tabacum plants with an enhanced auxin production in the pistil suggest that NtCDKG;2 is transcriptionally regulated by this hormone. The transient expression of the fusion protein NtCDKG;2-GFP, in N. tabacum leaves, evidentiated the nuclear localization of the studied protein. Stable transgenic plants overexpressing and silencing NtCDKG;2 by RNAi were also generated. Despite the high transcript levels in the plants overexpressing NtCDKG;2 and the low transcript levels in the silencing plants, macroscopic phenotypic alterations were not observed on these plants. Additionally, the expression of the NtCDKG;2 protein, with a histidine tag fused in its N-terminal, was obtained in Escherichia coli BL21(DE3)CodonPlusRP cells. Through studies performed on this work and literature analyses, it is possible to propose that NtCDKG;2 encodes a protein that is involved in the control of cell cycle at the N. tabacum stigmas/styles.

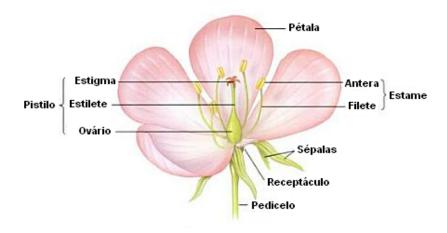
**Key words**: 1. CDKs. 2. Cell cycle. 3. Pistil development. 4. Transgenic plants. 4. Subcellular localization. 5. Heterologous expression.

### 1. INTRODUÇÃO

Nas angiospermas, a flores são as estruturas responsáveis pela reprodução e abrigam o pistilo, o qual originará frutos e sementes. Há uma grande dependência de frutos e sementes na alimentação de muitos grupos animais, inclusive na dieta humana. Assim, as pesquisas com ênfase no estudo da reprodução de plantas, especialmente estudos voltados ao pistilo, são de grande interesse e importância.

#### 1.1. A FLOR E SUAS ESTRUTURAS

As plantas apresentam estruturas vegetativas (raiz, caule e folhas) e reprodutoras (flores e frutos). A flor é composta por folhas modificadas que compõem os verticilos florais internos e externos. Os verticilos externos são estéreis e constituídos pelo cálice e pela corola, os quais são formados por sépalas e pétalas, respectivamente. Os verticilos florais internos, por sua vez, são ditos férteis e são compostos pelo androceu e o gineceu. O androceu é a parte masculina da flor, formado pelo conjunto de estames, onde são produzidos os grãos de pólen (gametófitos masculinos). O gineceu, porção feminina da flor, quando constituído por um carpelo (apocárpico) ou por carpelos fundidos (sincárpicos), é denominado pistilo simples e composto, respectivamente (Esau, 1997). O pistilo, geralmente, se diferencia em estigma, estilete e ovário, sendo esse último o local onde são produzidos óvulos (gametófitos femininos), que contêm os sacos embrionários. A Figura 1 esquematiza a constituição de uma flor completa.



**Figura 1.** Flor esquemática de angiospermas (adaptado de Mauseth, 2009).

O processo reprodutivo das plantas se inicia com a transferência do grão de pólen para a superfície do estigma, a qual o gametófito masculino se adere. Após sua adesão, o pólen hidrata, germina e produz o tubo polínico, que penetra e cresce através do tecido transmissor (Lord, 2003). Dessa forma, o tubo polínico percorre o estilete, dirigindo-se ao ovário, onde se encontram os óvulos. No ovário, ocorrerá a fecundação, levando à formação da semente e ao desenvolvimento do fruto. O sucesso da reprodução das plantas depende, intrinsecamente, da capacidade funcional do pistilo em receber e discernir os grãos de pólen, além de garantir condições favoráveis para o crescimento do tubo polínico (Taiz & Zeiger, 2010).

Há duas estratégias de interação pólen-pistilo que evoluíram nas angiospermas: 1) espécies que apresentam estigma seco, como *Arabidopsis thaliana*, e 2) espécies com estigma do tipo úmido, como é o caso do modelo de planta utilizado neste trabalho, *Nicotiana tabacum*. Nas plantas de estigma úmido, os grãos de pólen entram em contato com o exsudato da superfície do estigma, que abrange completamente os grãos e os estimula a germinar. O exsudato é secretado nos pistilos maduros e preenche os espaços intercelulares da zona secretória do estigma (Sanchez *et al.*, 2004). Ele também está presente no tecido transmissor do estilete, onde é conhecido como matriz extracelular. É através dessa matriz que os tubos polínicos crescem em direção ao ovário. A importância dos compostos presentes no exsudato já foi evidenciada nos processos de hidratação e penetração do pólen e crescimento direcional do tubo polínico em *N. tabacum*(Goldman *et al.*, 1994; Cheung *et al.*, 1995; Wolter-Arts *et al.*, 1998).

Portanto, o órgão reprodutor feminino das plantas desempenha um papel crucial durante o processo reprodutivo através de muitas funções por ele exercidas, como: discriminação entre os gametófitos masculinos das diferentes espécies (congruidade) e seleção dos compatíveis, direcionamento do tubo polínico em crescimento, além da produção e proteção dos gametófitos femininos no ovário (Sanchez *et al.*, 2004). A espécie *N. tabacum* é amplamente utilizada como organismo experimental dentre as plantas de estigma úmido por ter características que facilitam o estudo da reprodução vegetal. Elapossui um ciclo de vida relativamente curto (em torno de seis meses), produz muitas sementes (em torno de 1000 sementes por lóculo; Huang & Russel, 1992), possui órgãos florais grandes e de fácil manuseio, além de estar bem adaptada a climas tropicais e seu cultivo *in vitro* é relativamente fácil. Entretanto, além do fato da espécie ser alotetraplóide, seu genoma é relativamente grande e não foi completamente sequenciado, o que acarreta algumas dificuldades, porém, não impede estudos com esse modelo.

### 1.2. SCI1: UM INIBIDOR DO CICLO CELULAR TECIDO ESPECÍFICO

Genes expressos de forma específica ou preferencial no pistilo possivelmente estão associados a processos como desenvolvimento dos tecidos especializados e/ou interação pólenpistilo. Devido à relevância do estudo de genes com expressão preferencial ou específica na espécie *N. tabacum*, foi construída uma biblioteca subtrativa de cDNAs de estigma/estilete de *N. tabacum* em nosso laboratório (DePaoli, 2006). Um dos clones desta biblioteca foi caracterizado por DePaoli (2010). Foram observadas características interessantes em plantas transgênicas de *N. tabacum* produzidas através do silenciamento e superexpressão do gene. As plantas de silenciamento por RNAi apresentaram uma área estigmática aumentada se comparadas a plantas selvagens. Além disso, o estilete é evidentemente mais alongado nessas plantas. Em contrapartida, as plantas com superexpressão desse gene mostraram uma redução na área do estigma. Análises histológicas possibilitaram a contagem do número de células em cortes de estigmas/estiletes nas plantas transgênicas e selvagem. Esses estudos mostraram que o aumento da área do estigma nas plantas com o gene silenciado se deve ao aumento do número de células deste órgão. A menor área estigmática em plantas com superexpressão desse gene, por sua vez, é devida à redução do número de células (DePaoli *et al.*, 2011). Portanto, o produto proteico desse

gene mostrou ser importante na inibição da proliferação celular, controlando, coordenadamente, a diferenciação apical do pistilo, e por isso, denominado SCI1 - *Stigma/Style Cell-Cycle Inhibitor I*.

Sabe-se que SCI1 atua inibindo o ciclo celular, porém, ainda não são conhecidos seu mecanismo de ação bem como em qual fase do ciclo essa proteína atua Um modo de estudar a função de um gene é estudar as proteínas com as quais o seu produto proteico interage. Para isso, o doutorando Edward José Strini realizou um ensaio de *pull down* no qual a proteína recombinante SCI1-GST foi retida por sua cauda de GST em uma coluna de afinidade. Aplicouse na coluna um extrato proteico de estigmas e estiletes, enriquecido com proteínas nucleares. As proteínas que interagiram com SCI1 foram eluídas da coluna, desnaturadas e analisadas em espectrômetro de massa (4800 MALDI TOF/TOF Analyser). Assim, os peptídeos puderam ser identificados pelo *softwareMascot*, o qual analisa bancos de dados de sequências disponíveis, como SOL (Solanaceae Genomics Network; http://solgenomics.net/) e NCBI (National Center for Biotechnology Information; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Uma das proteínas identificadas pelo *Mascot* foi uma putativa proteína quinase dependente de ciclina (CDK10/11) da espécie *Ricinus communis*. A sequência correspondente em *N. tabacum* não pode ser identificada, visto que o genoma desta espécie não está totalmente sequenciado e muitas sequências ainda não estão disponíveis. A sequência de aminoácidos da CDK de *Ricinus* foi utilizada para fazer buscas de similaridade no TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*; http://www.arabidopsis.org). Identificou-se a CDKG;2 (At1g67580) de *A. thaliana*, a qual possui uma identidade de 50% e uma similaridade de 62% com a proteína CDK10/11 de *Ricinus*. As CDKs são conhecidas por atuarem diretamente nos eventos de ciclo celular, mediante a realização de fosforilações em seus substratos.

# 1.3. QUINASES DEPENDENTES DE CICLINA: REGULAÇÃO E SEU ENVOLVIMENTO NO CICLO CELULAR

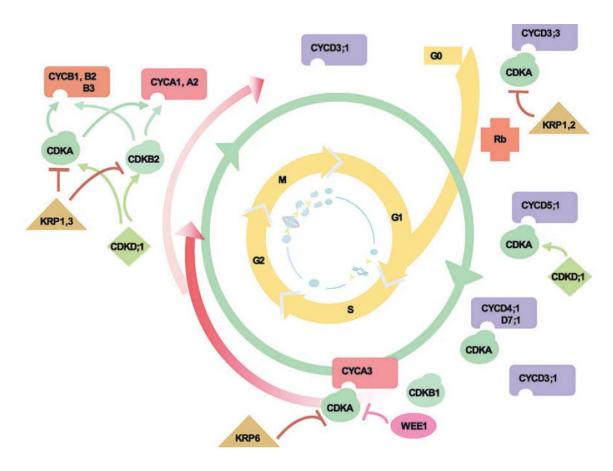
A expressão gênica deve ser regulada adequadamente para que haja um correto desenvolvimento e funcionamento dos organismos. Em eucariotos, esse controle da expressão pode ocorrer em vários níveis, desde o transcricional até o pós-traducional. As proteínas reguladas após a tradução podem sofrer uma série de modificações, as quais definem sua localização, atividade e interação com outras proteínas. Dentre as mais importantes formas de regulação pós-traducional da célula eucariótica estão os ciclos de fosforilação (Snustad & Simmons, 2008).

A fosforilação consiste na adição de um grupamento fosfato a uma cadeia lateral de resíduos de aminoácidos. Devido ao fosfato ser carregado negativamente, essa adição poderá alterar as características conformacionais da proteína e, por conseguinte, sua atividade na célula. A fosforilação é um processo reversível. Portanto, através dessa modificação pós-traducional a proteína pode ser ativada ou inativada, conforme a necessidade celular, reduzindo, portanto, o gasto energético. A transferência do fosfato é realizada por proteínas quinases e a remoção do mesmo é realizada por fosfatases. Proteínas quinases e fosfatases estão envolvidas no controle do ciclo celular, bem como em vias de transdução de sinal (Morgan, 1997), através das fosforilações reversíveis.

Os genomas vegetais codificam um número muito maior de proteínas quinases, se comparados a outros organismos (Becraft, 2002). Aproximadamente 4% e 5% das sequências codificantes de *A. thaliana* e *Oryza sativa*, respectivamente, correspondem a putativas proteínas quinases (Champion *et al.*, 2004; Dardick *et al.*, 2007). Essa quantidade significativa de genes que codificam quinases sugere que a fosforilação seja essencial na regulação de diversas proteínas das células vegetais. As quinases podem ser divididas e classificadas de acordo com seu ativador. Por exemplo, quinases que necessitam de cálcio para seu funcionamento são denominadas CDPKs (*Calcium-dependent Protein Kinase*) e as quinases que precisam estar associadas às ciclinas são denominadas CDKs (*Cyclin Dependent Kinase*). As fosforilações mais comuns ocorrem nos grupos hidroxílicos dos resíduos serina, treonina e tirosina, a uma taxa estimada de 1000/100/1, respectivamente (Hunter, 1998). Por isso, as quinases que fosforilam esses resíduos podem ser subdivididas em duas grandes famílias: tirosina quinases e

serina/treonina quinases (Becraft, 2002). As CDKs pertencem à família de quinases responsáveis pelas fosforilações dos resíduos serina/treonina das proteínas. Como nos animais, nas plantas, a divisão celular também é controlada através da atividade de CDKs (De Veylder *et al.*, 2007). No entanto, embora o mecanismo básico seja conservado em ambos os organismos, as plantas possuem elementos inovadores de controle do ciclo, como, por exemplo, CDKs específicas.

O ciclo celular é dividido em interfase e mitose. A interfase é composta das fases de parada – *gaps*1 e 2 - e da fase de síntese e replicação do DNA - S. As fases *gap* permitem o controle da fase anterior ter sido concluída adequadamente e possuem os maiores pontos de checagem do ciclo celular. O *gap* 1 (G1), imediatamente anterior à síntese (S), consiste no ponto em que a célula integra sinais externos antes de tomar a decisão de iniciar a duplicação cromossômica. Na passagem da fase G1 para S, ocorre a maior mudança na expressão genética (Menges, 2005). Durante a fase S, todo o DNA celular será duplicado. O *gap*2 (G2), compreende o período no qual há síntese de RNAs e proteínas necessários para a mitose. Na mitose, ocorre a divisão celular propriamente dita, com segregação dos cromossomos, divisão nuclear e citocinese (Taiz & Zeiger, 2010). As CDKs estão presentes durante todo o ciclo celular, porém cada qual só é ativada em determinadas fases e quando ligada a uma ciclina (Dewitte & Murray, 2003). Conforme mostrado na Figura 2, o complexo ciclina/CDK possui papel determinante em diversos eventos importantes do ciclo celular e sua regulação.



**Figura 2**: Visão combinada da regulação transcricional no controle do ciclo celular em *A. thaliana*, descrito por Menges *et al.* (2005). Em amarelo, estão as fases do ciclo celular (G0 e G1-S-G2-M). CDK: quinases dependentes de ciclina; CYC: ciclina; KRP: *Kip-related proteins*; Rb: *Retinoblastome protein*; WEE1, uma quinase inibidora de CDK.

As CDKs possuem papel-chave na regulação do desenvolvimento vegetal através do controle da proliferação e diferenciação celular (De Veylder *et al.*, 2007). Como o próprio nome sugere, para serem ativas, elas precisam se complexar com ciclinas (Jeffrey *et al.*, 1995). As ciclinas são proteínas que determinam os ciclos de divisão das células. Elas são muito instáveis e rapidamente degradadas pela via ubiquitina-proteassomo. As CDKs podem interagir com diferentes tipos de ciclina e, por isso, o princípio fundamental da transição através das diferentes fases do ciclo celular consiste na síntese e degradação das ciclinas, gerando picos de atividade das CDKs e dirigindo as duas transições cruciais do ciclo celular: a entrada na fase de síntese de DNA, após o *gap1* (G1/S) e a entrada na mitose, após o *gap2* (G2/M). As ciclinas que participam da transição G1/S (geralmente do tipo D) respondem tanto à sinalização celular externa (por

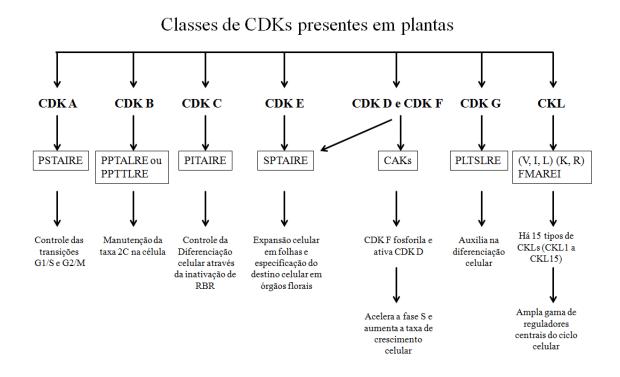
exemplo, hormônios) quanto a sinais internos, como taxa de crescimento e tamanho celular (Inzé, 2007).

De forma adicional à associação com ciclinas, a atividade das CDKs também é controlada mediante fosforilações. Existem dois a três sítios de fosforilação inibitória e um sítio de fosforilação ativadora nas CDKs. As fosforilações inibitórias são realizadas pelas proteínas quinases WEE1 e MYT1 e removidas por fosfatases da família CDC25 (Inzé, 2007). As fosforilações ativadoras ocorrem em um resíduo treonina conservado do T-loop e são realizadas por outras quinases que ativam as CDKs (as CAKs - CDKs-activating kinases). Após a fosforilação do resíduo treonina o T-loop permite a entrada do substrato no centro catalítico da CDK (Inzé, 2007). De forma suplementar, as CDKs podem ser inibidas por proteínas inibidoras de CDK (os CKIs - CDK inhibitors). Após todas essas regulações, as CDKs poderão, enfim, interagir com seus substratos. A fosforilação das histonas, por exemplo, altera a condensação da cromatina e torna o fragmento de DNA mais ou menos acessível à transcrição (Banerjee & Chakravarti, 2011). Assim, eventos como a condensação da cromatina, replicação do DNA, início da transcrição e processamento de mRNA, montagem de fusos mitóticos e desaparecimento da membrana nuclear são dependentes de fosforilações mediadas por CDKs. Dessa forma, os diferentes complexos ciclina/CDK promovem a divisão celular ao longo das fases do ciclo celular, G1-S-G2-M (Menges et al., 2005; Inzé & De Veylder, 2006).

As primeiras CDKs descritas foram CDC28 (Hartwell *et al.*, 1974) e CDC2(Nurse & Thuriaux, 1980) nos fungos *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, respectivamente. Essas são as únicas CDKs existentes nesses fungos e elas são capazes de dirigir as células através das fases do ciclo celular ao se ligarem com diferentes ciclinas. Após caracterizações dos produtos proteicos dos genes (Nasmyth & Reed, 1980) e através de estudos com mutantes, observou-se que o gene CDC28 restitui o fenótipo selvagem em mutantes para o gene CDC2 (Hindley & Phear, 1984), sugerindo que ambos os genes possuam funções semelhantes na progressão do ciclo celular. Essa nomenclatura foi mantida para os fungos. Os genes estruturalmente relacionados em outros organismos foram denominados de quinases dependentes de ciclina (CDKs) e as classes foram definidas com base nas similaridades encontradas nas sequências de aminoácidos. Nos mamíferos, as diversas classes de CDKs são apontadas por números. Em plantas, essa distinção é feita por meio da associação de letras e números (Doonan & Kitsios, 2009).

#### 1.4. CDKS PRESENTES EM PLANTAS

A primeira lista de putativos genes codificantes para CDKs em plantas foi publicada em 2000 (Joubès *et al.*) e levou em consideração a sequência de aminoácidos das proteínas, similaridades e características de domínios conservados. O domínio de ligação às ciclinas serviu como critério para extensão dessa lista e classificação das CDKs em oito classes: CDKA a CDKG e CDK-*Like* - CKL (Vandepoele *et al.*, 2002; Menges *et al.*, 2005). Em *A. thaliana*, organismo modelo que possui o genoma totalmente sequenciado, existem 29 CDKs que estão distribuídas nas oito classes da seguinte forma: uma CDKA, quatro CDKB, duas CDKC, três CDKD, uma CDKE, uma CDKF, duas CDKG e quinze CKL (Tank & Thaker, 2011). A distribuição das CDKs de plantas em categorias, os motivos conservados e algumas de suas funções estão resumidas na Figura 3.



(Adaptado de Tank & Thaker, 2011)

**Figura 3**: Divisão das CDKs em oito classes de acordo com seus domínios de ligação às ciclinas e seu putativo papel exercido nas células. **RBR**: *Retinobasltoma-related protein*.

A classe CDKA é ortóloga a cdc28 de levedura e possui um domínio conservado PSTAIRE. Essa classe constitui o maior grupo de CDKs conhecidos em plantas, incluindo 48 genes distribuídos em 33 espécies (Tank & Thaker, 2011). Enquanto existe apenas uma CDKA descrita em *A. thaliana*,em *N. tabacum* são conhecidos quatro genes (CDKA1;1 a CDKA1;4). Foi demonstrado que a expressão de um dominante negativo do gene CDKA;1 de *A. thaliana*,em plantas de *N. tabacum*, é regulador-chave do controle da transição entre o *gap*1 e a síntese de DNA (G1/S) e entre o *gap*2 e mitose (G2/M) do ciclo celular (Hemerly *et al.*, 1995). Em *A. thaliana*, CDKA;1 é uma quinase indispensável para a divisão celular durante a gametogênese do pólen (Harashima *et al.*, 2007). Estudos de imunofluorescência em *Zea mays*, *N. tabacum* e *A. thaliana* mostraram que as CDKAs são encontradas no núcleo celular durante a intérfase e o início da prófase e, em menor quantidade, no citoplasma celular (Mews *et al.*, 2000; Dissmeyer *et al.*, 2007)

A segunda maior classe, CDKB, requer uma atenção especial já que compõe uma classe de CDKs específica de plantas. Em *A. thaliana*, a expressão constitutiva de um dominante negativo de CDKB1;1 demonstrou que essa quinase é fundamental para o desenvolvimento dos estômatos e a manutenção da identidade do meristema apical caulinar (Boudolf *et al.*, 2004; Andersen *et al.*, 2008). Além disso, a superexpressão de um dominante negativo de CDKB1;1 de *A. thaliana* atrasou a transição do *gap2* para a mitose em células de *N. tabacum* (Porceddu *et al.*, 2001), sugerindo que essa CDKB é crucial para a entrada na mitose. Estudos de imunofluorescência em células BY2 de *N. tabacum* revelaram que o padrão de localização de CDKB1;1 nessas células é nuclear e citoplasmático durante a interfase e citoplasmático após a divisão do envelope nuclear (Tank & Thaker, 2011).

A classe CDKC, por sua vez, atua juntamente com a ciclina T na extensão da transcrição através da fosforilação do domínio C-terminal (CTD) da RNA Polimerase II (Fülöp *et al.*, 2005). Adicionalmente, foram feitas análises de localização subcelular em células BY2 de *N. tabacum* e em células em suspensão de *A. thaliana* através da fusão C-terminal da proteína CDKC2 de *A. thaliana* com a proteína repórter GFP - *Green Fluorescent Protein* (Kitsios *et al.*, 2008). Esses estudos mostram que CDKC2 se localiza no núcleo e em corpos nucleares, além de possuir colocalização com fatores de *splicing*, modificando a localização desses componentes. A maquinaria de *splicing* está localizada no núcleo em uma distribuição já bem caracterizada

(Lorkovic & Barta, 2004; Tillemans *et al.*, 2005) e, se CDKC2 desempenha papel no *splicing*, pode-se esperar que a proteína encontre-se co-localizada com fatores de *splicing*. Visto que essas localizações são dependentes do estado transcricional da célula, esses estudos apontam que CDKC2 pode estabelecer uma ligação entre a transcrição e a maquinaria do *splicing*.

A classe CDKE possui apenas um membro em cada uma das cinco espécies vegetais onde foi encontrada (Tank & Thaker, 2011). Seus membros interagem com ciclinas C e possuem um efeito negativo na transcrição através da fosforilação da subunidade CTD da RNA polimerase II (Rickert *et al.*, 1996 *apud* Tank & Thaker, 2011). Somado a isso, através de estudos com mutantes de *A. thaliana*, mostrou-se que a CDK do tipo E também é necessária para a especificação da identidade dos estames e carpelos e para o término adequado da divisão das células tronco do meristema floral (Wang & Chen, 2004).

Conforme mencionado anteriormente, para serem funcionais, as CDKs também necessitam estar fosforiladas adequadamente. Essa fosforilação no resíduo treonina do T-loop (Thr160 ou resíduo equivalente) é mediada por CDKs e induz a mudanças conformacionais, além de tornar possível para a CDK o reconhecimento de seus substratos (Inzé, 2007). As classes de CDKs que fosforilam outras CDKs são ditas CAKs (quinases ativadoras de CDK). O genoma de *A. thaliana* codifica 4 CAKs: três delas são diméricas e estão compreendidas na classe CDKD e a outra, monomérica, designa a única CDKF presente nesse organismo. Se as condições forem favoráveis, as CDKFs fosforilam as CDKDs, ativando-as e desencadeando outros processos de fosforilações e a divisão celular (Shimotohno*et al.*, 2004). Portanto, a CDKF;1, particularmente, é uma CAKAK (quinase ativadora de quinase ativadora de CDK) e somente é encontrada em plantas (Umeda *et al.*, 2005).

No entanto, além de fosforilar outras CDKs (Shimotohno*et al.*, 2006), as CDKDs e a CDKF de *A. thaliana* também estão envolvidos na iniciação e alongamento da transcrição. Os heterodímeros CAK/ciclina são componentes do complexo multiproteico do fator geral de transcrição TFIIH (Rossignol *et al.*, 1997), o qual é recrutado para ativar a RNA Polimerase II mediante fosforilações no domínio CTD. Esse domínio possui repetições em *tandem* dos resíduos Tyr<sub>1</sub>-Ser<sub>2</sub>-Pro<sub>3</sub>-Thr<sub>4</sub>-Ser<sub>5</sub>-Pro<sub>6</sub>-Ser<sub>7</sub> (Morin & Storey, 2006). As CDKDs são responsáveis pelas forforilações nos resíduos S<sub>2</sub> e S<sub>5</sub> e CDKF é responsável pela fosforilação de resíduos S<sub>7</sub>P conservados. Foi demonstrado que a fosforilação pela CDKD em S<sub>5</sub> é necessária para o início da transcrição e o 5'-*capping* de precursores de pequenos RNAs. Já a fosforilação

em S<sub>7</sub> pela CDKF altera a quantidade de mRNAs totais, em especial, de pequenos RNAs, além de causar defeitos ao final do processamento 3' e melhorar o *splicing* de precursores de miRNAs (Hajheidari *et al.*, 2012). Assim, mutações nesses genes alteram o padrão de fosforilações do domínio CTD, levando a defeitos característicos na transcrição e no processamento cotranscricional de miRNAs, ta-siRNAs e alguns transcritos que codificam componentes-chave das vias de síntese de pequenos RNAs.

Até o momento, há poucos estudos envolvendo as CDKGs. Elas serão abordadas no próximo tópico, já que uma delas é alvo desse estudo. As CKLs foram identificadas recentemente (Menges *et al.*, 2005) em experimentos de larga escala realizados com o genoma de *A. thaliana*. Nesse organismo, foram identificadas 15 CKLs e pouco se sabe a respeito delas.

Para avaliar a expressão absoluta de genes reguladores de ciclo celular e genes relacionados à regulação em *A. thaliana*, dados de 327 experimentos de microarranjo foram analisados (Menges *et al.*, 2005). Esses estudos revelam que, exceto as CKLs, a maior parte dos genes regulatórios centrais do ciclo celular e genes relacionados mantém uma expressão ubíqua nos diferentes tecidos. Através dessas análises, constatou-se que CDKA possui os sinais de expressão mais elevados em todos tecidos. A CDKC;1 possui baixos níveis de expressão em todos tecidos. As CDKD;2 e CDKD;3 possuem níveis de expressão médio e baixo, respectivamente, em todos tecidos analisados. No pólen as CDKB2, a CKL1, a CKL3 e a CKL5 são os genes com maiores níveis de expressão quando comparados a outras CDKs e ciclinas. As outras CKLs, de modo geral, apresentam maior tecido-especificidade na expressão se comparadas a outros genes de ciclo celular. A CKL12, por exemplo, é mais expressa em folhas em detrimento a outros tecidos, já a CKL9 possui expressão mais elevada em calos tumorais.

#### 1.5. ESTUDOS REALIZADOS COM AS CDKGs

As CDKGs foram recentemente identificadas por Menges *et al.* (2005) através de análises de microarranjo de genes centrais na regulação do ciclo celular de *A. thaliana*. Essas quinases compreendem uma nova classe de CDK por possuírem um motivo PLTSLRE (Anexo V). Foram descritas duas representantes nessa espécie: CDKG;1 e CDKG;2. As CDKG;2 são homólogas à proteína quinase humana do tipo *galactosyltransferase-associated* p58/GTA.

Análises filogenéticas mostram que os genes CDKG;1 e CDKG;2 são proximamente relacionados aos genes humanos CDK10 e CDK11 (Doonan & Kitsios, 2009). Estas CDKs também tiveram suas funções associadas à regulação do processamento do mRNA. A CDK11 de humanos pode regular a maquinaria do *splicing* além do seu papel na regulação transcricional (Trembley *et al.*, 2004). Sua isoforma p110 é capaz de se associar, *in vivo*, com os fatores de *splicing* RNPS1 (*RNA-binding protein with serine-rich domain 1*) e 9G8 (*Serine/arginine-rich splicing factor 7*), além dos promotores do *splicing* pré-mRNA (Loyer *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2003). Além disso, CDK11<sup>p110</sup> se associa com ciclinas do tipo L (CycL), as quais possuem um domínio SR (*Serine-rich*). Este complexo CDK/ciclina se localiza no núcleo, em compartimentos de fatores do *splicing*, e interage com proteínas SR (Loyer et al., 2008). Os autores sugerem que a CDK11 é marcada para a maquinaria do *splicing* através da interação física/funcional com a CycL.

Interações entre CDKG;2 de *A. thaliana* e demais proteínas do ciclo celular foram testadas através de ensaios por BiFC (<u>Bimolecular Fluorescence Complementation</u>) e TAP (<u>Tandem Affinity Purification</u>) em culturas celulares BY2 de *N. tabacum* e *A. thaliana*, respectivamente. Foram identificadas interações entre a referida quinase e seis ciclinas (CycA3;4/CycD4;1/CycD4;2/CycF1/CycH1/CycL1), duas CDKs (CDKB;1/CDKF;1) e um inibidor de CDK (KRP4) (Van Leene *et al.*, 2007; Boruc *et al.*, 2010a; Van Leene *et al.*, 2010).

Embora a função das CDKGs ainda permaneça desconhecida, experimentos de localização celular sugerem o envolvimento dessas proteínas na regulação transcricional: a proteína recombinante GFP-CDKG;1 é localizada exclusivamente no núcleo de células de *A. thaliana*, mais precisamente em *speckles* nucleares (Kitsios, 2006 *apud*Doonan & Kitsios, 2009). Entretanto, a localização celular da GDKG;2 ainda não é conhecida. De acordo com análises de similaridade de sequência, CDKG;1 pode também regular a transcrição pela alteração da dinâmica da cromatina, através da fosforilação de componentes do sistema de remodelamento da cromatina (Doonan & Kitsios, 2009). As CDKGs são transcricionalmente reguladas durante as fases do ciclo celular, sendo que a CDKG;1 atinge um nível máximo de expressão durante as fases G0/G1 e a CDKG;2 possui menor taxa de expressão durante fase de síntese do DNA e expressão constante nas outras fases, como determinado em experimentos de microarranjos e MPSS (*Massively Parallel Signature Sequencing*) (Menges *et al.*, 2005).

Como pode ser observado, até o momento, foram realizados apenas estudos em larga escala para verificar a expressão de CDKG;2 e ensaios somente em culturas celulares testaram interações entre CDKG;2 e outras proteínas envolvidas no ciclo celular. Porém, até o presente trabalho, não foi realizado um estudo mais detalhado para a caracterização de CDKG;2. Em vista disso, esse trabalho teve como objetivo a caracterização de CDKG;2 em *N. tabacum*, visando entender seu papel na planta, em especial no desenvolvimento do pistilo e a putativa relação dessa CDK com a progressão do ciclo celular.

#### 2. OBJETIVOS

#### 2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi caracterizar uma putativa proteína quinase, ortóloga à CDKG;2 de *Arabidopsis*, identificada como candidata à interação com SCI1. Esta caracterização tem o intuito de gerar dados que permitam a compreensão do papel destas proteínas no desenvolvimento e funcionamento do estigma e estilete de *N. tabacum*.

#### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar a sequência codificadora (CDS) da proteína quinase em questão (NtCDKG;2), a partir de cDNAs de estigmas e estiletes de *N. tabacum*,e realizar a clonagem da mesma em vetores específicos;
- Realizar o sequenciamento completo do cDNA da NtCDKG;2;
- Analisar a expressão do gene da NtCDKG;2 por qRT-PCR nos diferentes órgãos vegetativos e reprodutivos;
- Análise, por qRT-PCR, a expressão do gene da quinase nos diferentes estádios do desenvolvimento do estigma/estilete;
- Analisar a localização subcelular da NtCDKG;2 através da fusão da sequência codificadora deste gene com o gene repórter GFP ("Green Fluorescent Protein");
- Produzir plantas transgênicas de silenciamento por RNAi e de superexpressão de NtCDKG;2.
- Analisar os fenótipos das plantas transgênicas comparando-os com o tipo selvagem.

#### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL VEGETAL

Sementes de *N. tabacum*, cultivar Petit Havana SR-1 cedidas pelo Jardim Botânico da *University of Nijmegen* (Holanda) foram distribuídas em caixas (Magenta) contendo substrato Tropstrato HT (Vida Verde) e adubo natural. As sementes foram mantidas em câmara de germinação com temperatura (22°C), luminosidade (16 horas/dia de luz e 8 horas/dia de escuro) e umidade (55%) controladas. Após germinarem e atingirem, aproximadamente, 2 cm, as plântulas foram transferidas para sacos com substrato contendo pequenos furos. Quando as mudas atingiram entre 10 cm e 15 cm de altura, foram transferidas para vasos contendo terra eo mesmo substrato e adubo anteriormente mencionados. As plantas foram mantidas em casa de vegetação situada no campus da USP/Ribeirão Preto – SP, Brasil (latitude - 21° 12' 42" Sul, longitude - 47° 48' 24" oeste, com média de temperatura mínima de 20°C e máxima de 25°C). A irrigação foi controlada para 45 minutos, duas vezes ao dia.

#### 3.1.1. Esterilização de sementes

Todo o processo de esterilização de sementes foi realizado sob condições assépticas. Primeiramente, sementes secas foram lavadas com etanol 70%(Merck) e, posteriormente, mantidas em solução de hipoclorito de sódio 7% (Sigma) durante 40 minutos, sob agitação em vórtex. A solução de hipoclorito de sódio foi trocada e as sementes foram mantidas por 20 minutos nessa solução. A seguir, elas foram enxaguadas em água deionizada e mantidas sobre papel filtro, dentro de placas de Petri seladas, até secarem completamente. Após secas, as sementes foram transferidas para tubos *Eppendorf* devidamente etiquetados e previamente esterilizados a vapor em autoclave. As sementes foram mantidas a 4°C até sua posterior utilização.

#### 3.1.2. Coleta de material vegetal

Amostras de raiz, caule, folha, sépala, pétala, estame, estigma/estilete e ovário de *N. tabacum* selvagem foram coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido, estocadas a -80°C para posterior extração de RNA. Para os estudos de expressão gênica no desenvolvimento floral, estigmas/estiletes foram excisados de flores de *N. tabacum*nos estádios 1 a 12. Os estádios de desenvolvimento utilizados foram descritos por Koltunow et al. (1990) e levam em consideração análises feitas em antera, corola e tamanho do botão floral. As plantas transgêncas desenvolvidas tiveram estigmas/estiletes coletados de forma idêntica à coleta realizada nas plantas selvagens.

### 3.2. PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES

#### 3.2.1. Preparo Escherichia coli eletrocompetentes

As células de *E. coli* das cepas *DH10B*, *BL21(DE3)CodonPlusRP*, BL21(DE3)*Rosetta e Arctic Express*<sup>TM</sup>(DE3)RIL foram estriadas em 20 ml de meio LB sólido (item 3.21.1) com o auxílio de uma alça de platina. A placa foiincubada de 16 a 20 horas a 37°C. No dia seguinte, foi feito um inóculo de uma colônia isoladaem 5 ml de LB líquido e esse foi mantido a 37°C, de 16 a 20 horas, sob agitação de 220 rpm. Após esse período, o inóculo foi transferido para 200 ml de meio líquido LB e mantido a 37°C, sob agitação de 220 rpm até que a absorbância a 600nm (A<sub>600</sub>) atingisse um valor entre 0,5 e 0,8. A cultura foi mantida em gelo por 30 min, transferida para tubos Falcon, centrifugada a 4000 rpm por 10 min, a 4°C em centrifuga *Eppendorf* 5810 R. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular de cada Falcon foi ressuspendido em 50 ml de água deionizada e os tubos foram, novamente, centrifugados nas condições anteriores. A seguir, o sobrenadante foi descartado e os precipitados de cada Falcon foram ressuspendidos em 25 ml de água deionizada. O volume total (100 ml) foi separado em dois novos tubos Falcon e submetido a uma nova centrifugação. O sobrenadante foi descartado, novamente, e as células foram ressuspendidas em 5 ml de glicerol 10%. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm, durante 10 min, a 4°C. O precipitado de células de cada Falcon foi, delicadamente,

ressuspendido em 500 µl de glicerol 10%. Alíquotas de 40 µl foram feitas e estocadas a -80°C. A água deionizada e o glicerol 10% utilizados para ressuspender as células haviam sido, previamente, resfriados a 4°C. Todas as manipulações das células foram realizadas em fluxo laminar, sob condições de assepsia.

#### 3.2.2. Preparo de *Agrobacterium tumefaciens* eletrocompetentes

Estriou-se *A. tumefaciens* da cepa C58C1RifR (pGV2260) em uma placa contendo meio MAS sólido (item 3.21.2). A placa foi incubada a 28 por 48 horas. Uma colônia isola da foi inoculada em 50 ml de meio LB 2X líquido e incubada a 28 por 16 horas sob agitação a 150 rpm. O inóculo foi centrifugado a 12000 rpm (centrifuga *Eppendorf* 5810 R) por 1 minuto. As células foram, gentilmente, ressuspendidas em 500 μl de HEPES [(*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*] 1 mM a 4C. Os tubos foram, novamente, centrifugados por 1 minuto. O procedimento foi repetido por duas vezes. Ao final, as células foram ressuspendidas em 20 μl de glicerol 10%. Preparou-se alíquotas de 40 μl que foram estocadas a-80°C.

## 3.3. TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS POR ELETROPORAÇÃO

#### 3.3.1. Transformação de *E. coli* eletrocompetentes por pulso elétrico

Para introdução de DNA nas células bacterianas, uma alíquota de 40 μ1 de células competentes de *E. coliDH10B* (item 3.2.1) foi mantida no gelo até descongelar. Juntamente, uma cubeta de eletroporação estéril de 0.1 cm (BioAgency) foi deixada no gelo por 10 min. Foram adicionados 1-2 μL da amostra contendo DNA de interesse à alíquota de células eletrocompetentes. A mistura, incubada por 1 min no gelo, foi transferida ao fundo da cuveta evitando deixar bolhas de ar ou aquecer a cubeta. O conjunto foi submetido a um pulso elétrico (eletroporador Gene Pulse II, BioRad) de, aproximadamente, 5 segundos, mantendo as seguintes condições: voltagem de 1.8Kv, capacitância de 25μF e resistência de 200 ohms. Imediatamente após o pulso, foi adicionado 1 ml de LB líquido e as células foram, gentilmente, ressuspendidas e

transferidas para um tubo de ensaio, o qual foi incubado de 40 minutos a 1 hora a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Após esse período de incubação, um volume entre 200 µl e 500µl foi plaqueado com auxílio de uma alça de Drigalski, em meio LB sólido contendo antibióticos apropriados (item 3.22). As placas foram incubadas de 16 a 20 horas a 37°C.

#### 3.3.2. Transformação de A. tumefaciens eletrocompetentes por pulso elétrico

A eletroporação de agrobactérias é feita de modo similar à realizada em *E. coli*. Entretanto, algumas particularidades devem ser respeitadas, já que as agrobactérias são encontradas no solo, o qual possui uma temperatura relativamente mais baixa que a temperatura ótima de crescimento das bactérias *E. coli*. Se colocadas a uma temperatura muito superior a 28°C, as agrobactérias podem perder o plasmídeo que contém os genes *vir*, responsáveis pelo processo de infecção das células vegetais e transferência do T-DNA. Desse modo, é dado um tempo maior de recuperação a essas bactérias e as mesmas são incubadas por 4 horas, a 28°C e agitação de 150 rpm antes de serem plaqueadas. O conteúdo eletroporado foi plaqueado (de 200 μ1 a 500 μ1) e deixado a 28°C por 48 horas.

#### 3.4. ESTOQUES SEMI-PERMANENTE EM GLICEROL

Durante as construções, foram feitos estoques semi-permanentes das células bacterianas contendo o plasmídeo desejado. Esses estoques foram feitos respeitando o mínimo de 20% de glicerol concentrado em seu volume final, seguindo recomendações de Sambrook (1989). Em geral, 500 µl de cultura bacteriana foram misturados a 500 µl de glicerol 50%. Os estoques foram armazenados a -80°C.

# 3.5. EXTRAÇÃO DE DNA PLAMIDIAL DE BACTÉRIAS EM PEQUENA ESCALA (MINI-PREPARAÇÃO)

Uma colônia isolada obtida em cultura nas placas de Petri foi transferida para um tubo de ensaio contendo 5 ml de meio líquido LB e antibiótico apropriado. Esse inóculo foi incubado por

16-20 horas, a 37°C, sob agitação (200 a 250 rpm). Após esse período, foi feito um estoque semipermanente dessa cultura. O estoque foi mantido a -80°C.

#### 3.5.1. Extração de DNA plasmidial de E. coli por lisozima

Um volume de 1.5 ml do inóculo foi transferido a um tubo Eppendorf e centrifugado a 13200 rpm (centrífuga Eppendorf 5415 D) por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o processo foi repetido mais uma ou duas vezes. O precipitado foi ressuspendido em 175 ul de tampão TES [10mM de Tris-HCl pH 8; 1mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) pH 8; 15% de Sacarose]. Para lisar as membranas celulares, foram adicionados 20 µl (correspondentes a 500 mg) de lisozima, agitando, delicadamente, com a ponteira. A seguir, a mistura foi incubada a T.A. por 10 minutos e colocada em banho-maria a 73°C, por 15 minutos. O tubo foi centrifugado (13200 rpm) por 15 minutos para separação de debris celulares. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a ele foi acrescentado 1/10 de seu volume de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol absoluto a fim de precipitar o DNA plasmidial. O tubo foi mantido a -20°C por, no mínimo, 1 hora ou a -80°C por 15 minutos. O tubo foi centrifugado (13200 rpm) por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70% resfriado. O tubo foi, novamente, centrifugado a 13200 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi mantido aberto até a completa evaporação do etanol. O precipitado de DNA plasmidial foi ressuspendido em 50 µl de água deionizada e armazenado a -20°C.

# 3.5.2. Extração de DNA plasmidial de E. coli com o Kit GeneJET $^{TM}$ Plasmid Miniprep (Fermentas Life Sciences)

A mini-preparação de DNA plasmidial foi somente realizada, com utilização de *kit*, para clones que seriam submetidos à reação de sequenciamento, devido à necessidade de DNA de melhor qualidade para tal reação. O kit utilizado faz a mini-preparação através de lise alcalina. Todo o processo foi feito usando luvas e seguindo todos os padrões recomendados pelo fabricante.

Inicialmente, foram transferidos 1.5 ml do inóculo para um tudo Eppendorf e submetidos a uma centrifugação de 8000 rpm, por 2 minutos. O sobrenadante foi removido e o processo foi repetido mais uma ou duas vezes. O pellet gerado foi ressuspendido (em vórtex) em 250 µl de Ressuspension Solution, que contém RNase. Foram, então, acrescentados 250 µl de Lysis Solution e o conteúdo foi homogeneizado por inversão do tubo (4 - 6 vezes). Ao produto viscoso, foram acrescentados 350 µl de Neutralization Solution. O conteúdo foi, gentilmente, homogeneizado por inversão de 4 a 6 vezes e submetido a uma centrifugação, 13200 rpm, por 5 minutos a temperatura ambiente (T.A.). Após precipitados debris celulares e DNA genômico, o sobrenadante foi transferido a uma coluna porosa (fornecida com o Kit). O aparato foi centrifugado por 1 minuto (13200 rpm, T.A.) e o flow-through foi descartado. Foram pipetados 500 µl de Wash Solution no centro da coluna. Essa solução contém etanol. O conteúdo foi centrifugado por 1 minuto nas mesmas condições e o *flow-through* foi novamente descartado. O processo foi repetido e foi adicionado 1 minuto a mais na centrifugação. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor e foram adicionados 50 µl de água deionizada autoclavada no centro da coluna, deixando 2 minutos a T.A. a fim de eluir o DNA plasmidial. O aparato foi centrifugado por 2 minutos (13000 rpm, T.A.) e o DNA plasmidial correspondente foi armazenado a -20°C até posterior utilização.

#### 3.5.3. Extração de DNA plasmidial de A. tumefaciens por lise alcalina

A extração do DNA plasmidial das agrobactérias foi feita através do método de lise alcalina adaptado do protocolo de Brasileiro & Carneiro (1998). Diferentemente do método de extração e purificação de DNA plasmidial descrito nos itens anteriores, o método por lise alcalina, como o próprio nome sugere, baseia-se na diferença de desnaturação, em condições alcalinas, que são apresentadas entre o DNA plasmidial e o DNA cromossomal.

Inicialmente, a cultura de *A. tumefaciens* contendo o plasmídeo desejado foi crescida em LB líquido e antibiótico de seleção apropriado por 24 horas a 150 rpm. O estoque semi-permanente da cultura glicerolizada foi feito de forma análoga ao item 3.4. A seguir, 1.5 ml de cultura foram transferidos a um tubo *Eppendorf* e submetidos a uma centrifugação por 2 minutos. Todas as centrifugações foram feitas a 12000 rpm e T.A. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 1 ml de Tampão I (NaCl 0,2 M em Tris-EDTA). O conteúdo

foi centrifugado por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido, novamente, em 1 ml de Tampão I e centrifugado nas mesmas condições. Após as lavagens, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 200 µl de Tampão I e foram acrescentados 200 µl de Solução I (NaOH 0,2 N; SDS 1%). O conteúdo foi homogeneizado por leves inversões (de 4 a 6 vezes) e mantido no gelo por 15 minutos. O detergente tem por finalidade lisar membranas e desnaturar proteínas celulares. Enquanto isso, o hidróxido de sódio eleva o potencial hidrogeniônico a valores muito alcalinos. Dessa forma, o DNA bacteriano é desnaturado e o DNA plasmidial permanece inalterado. A seguir, foram adicionados 150 µl de acetato de potássio 3 M (pH 5.2) refrigerado, o tubo foi invertido manualmente 4 vezes e mantido no gelo por 30 minutos. O conteúdo foi centrifugado por 5 minutos, precipitando o DNA cromossomal e debris celulares. O sobrenadante foi, cuidadosamente, transferido a um tubo limpo e a ele foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto, deixando a -20°C por 1 hora, no mínimo. Após, o conteúdo foi centrifugado por 30 minutos e o precipitado, DNA plasmidial, foi lavado com etanol 70%, centrifugado por 2 minutos, descartado o sobrenadante e o pellet foi seco em T.A. até completa evaporação do álcool. O DNA plasmidial foi ressuspendido em 20 µl de água deionizada.

# 3.6. QUANTIFICAÇÕES DAS AMOSTRAS

As dosagens das amostras de DNA e RNA foram feitas com o uso do NanoDrop<sup>TM</sup> 2000 (Thermo Scientific) ou do NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific). Ambos foram disponibilizados para o uso, gentilmente, pelo Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman (FCFRP-USP) e pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Zilá Luz Paulino Simões (FFCLRP-USP), respectivamente. Antes das quantificações, as amostras foram homogeneizadas manualmente. Para as quantificações, foram utilizados 1-2 μl da amostra. A concentração de ácidos nucleicos foi estimada a partir da leitura da absorbância das amostras a 260nm (A<sub>260nm</sub>). Como os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda de 260nm, o grau de pureza foi considerado através das análises das razões A<sub>260nm</sub>/ A<sub>280nm</sub> e A<sub>260nm</sub>/ A<sub>230nm</sub>. Para a razão 260/280, as amostras foram consideradas puras quando o valor foi 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 260/230, 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 em outras aplicações (Thermo Fisher Scientific).

# 3.7. DIGESTÕES COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Todas as amostras de DNA plasmidial extraído foram checadas com auxílio de enzimas de restrição. Foram utilizadas enzimas insensíveis a qualquer tipo de metilação, cujos produtos gerados pelas clivagens possuam tamanhos distinguíveis entre si em gel de agarose. As seleções das enzimas foram feitas de acordo com o *softwareNEBCutter* V2.0, o qual indica os sítios de restrição presentes nas sequências de interesse. Para cada enzima, foram respeitados a utilização do tampão correto, a necessidade de *Bovine Serum Albumin* (BSA), a temperatura e tempo adequados de incubação. Em geral, 1 unidade de enzima é necessária para a clivagem de 1 μg de DNA no tempo de 1 hora. As reações utilizaram água deionizada autoclavada em q.s.p. 20 μl.

# 3.8. GEL DE AGAROSE E ELETROFORESE PARA SEPARAÇÃO DEFRAGMENTOS DE DNA

As amostras foram preparadas com quantidades apropriadas de tampão de carregamento (*loading dye*). As corridas eletroforéticas foram realizadas em gel de agarose 1% preparado com 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) e brometo de etídeo 0,5 μg/ml (Sambrook *et al.*, 1989). O brometo de etídeo é um agente intercalante de ácidos nucléicos, permitindo a visualização de bandas quando exposto à luz ultravioleta (UV). O gel de agarose (ainda líquido) foi colocado em uma bandeja apropriada para inserção de pentes, possibilitando a formação de canaletas onde as amostras foram inseridas. Após solidificação, o gel ficou disposto em uma cuba de acrílico e esta foi preenchida com tampão TBE 0,5X e a cuba ligada a um gerador que a polariza. Devido ao DNA possuir carga elétrica negativa, ele migra entre os poros do gel em direção ao polo positivo da cuba. Tal

fenômeno permite a formação de bandas separadas de acordo com o tamanho molecular do fragmento de DNA. A voltagem utilizada e a duração do tempo de corrida variaram conforme o tamanho da cuba e do gel preparados, além do tamanho esperado dos fragmentos. As bandas foram visualizadas em fotodocumentador expondo os géis à luz ultravioleta. A excessiva exposição à luz UV foi evitada quando se tratavam de géis para purificação de bandas, a fim de evitar possíveis mutações no DNA. Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram inferidos comparando-os com a migração dos fragmentos do marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA Ladder – Invitrogen).

# 3.9. PURIFICAÇÃO DE DNA DE BANDAS EM GEL DE AGAROSE

Bandas oriundas de PCR que necessitavam ser recortadas e utilizadas para posterior reação, foram submetidas a um protocolo simples de purificação. Foram encaixados dois tubos *Eppendorf* de modo que simulassem uma coluna. A parte inferior do tubo interno foi perfurada com agulha quente e nele foi posicionada (em forma de funil) uma membrana de 0,22 μm de poro (Millipore) umedecida em TE (<u>Tris-EDTA</u>). A banda com o fragmento desejado foi recortada do gel com auxílio de um bisturi novo e colocada dentro da coluna que foi centrifugada por 10 minutos a 13200 rpm. O conteúdo filtrado que ficou no tubo externo foi recuperado, colocado em um novo tubo e submetido à limpeza por fenol/clorofórmio.

# 3.10. TRATAMENTO DAS MINI-PREPARAÇÕES DE DNA COM RNase

Quando necessário, as amostras de interesse foram submetidas a um tratamento com a enzima RNase, a qual degrada RNA presente nas amostras. Para tanto, o volume de amostra foi completado com q.s.p. 200 µl de água deionizada autoclavada. Ao volume final, foram acrescentadas 40 µg de RNase, permanecendo a 37°C por 30 minutos.

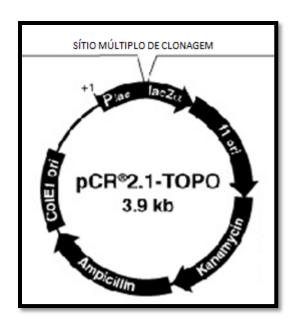
# 3.11. LIMPEZA DO DNA COM FENOL/CLOROFÓRMIO

Todo processo de manuseio de fenol e clorofórmio foi realizado em capela usando luvas. Cada amostra a ser tratada teve seu volume ajustado para 200 μl, adicionando, quando necessário, água deionizada autoclavada. A seguir, foi adicionado 1 volume de fenol tamponado pH 8.0 (*Invitrogen*). Após, a amostra foi agitada (em vórtex) e centrifugada (13200 rpm, por 3 minutos a T.A.). A fase superficial da mistura foi removida, cuidadosamente, e transferida a um novo tubo *Eppendorf*, ao qual foi adicionado um volume de álcool isoamílico:clorofórmio (1:24). Foi repetido o processo de agitação e centrifugação nas mesmas condições do fenol. Novamente, foi removida a fase superficial da mistura, à qual foi submetida à precipitação adicionando-se 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol absoluto gelado. A precipitação foi feita deixando a amostra por 15 minutos a -80°C ou, no mínimo, 1 hora a -20°C. Após esse período, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 13200 rpm, em T.A. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 500 μl de etanol 70% gelado. A amostra foi centrifugada por 3 minutos (13200 rpm em T.A.) e, após descarte do sobrenadante e evaporação do etanol, o precipitado foi ressuspendido em 50 μl de água deionizada autoclavada.

# 3.12. PLASMÍDEOS UTILIZADOS

# 3.12.1. Plasmídeo intermediário para clonagem

A clonagem em vetores circularizados oferece maior estabilidade aos fragmentos de interesse se comparado ao DNA dupla fita com as extremidades expostas. Portanto, após o isolamento do cDNA de NtCDKG;2, este material genético foi inserido no plasmídeo intermediário PCR® 2.1-TOPO® Cloning (Invitrogen) - apresentado na Figura 4.



**Figura 4**: Mapa do vetor PCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup>. Plac: promotor do gene lacZ•; lacZ•: gene codificador da •-galactosidase; o plasmídeo confere resistência aos antibióticos canamicina e ampicilina. O gene de interesse é inserido no gene lacZ•, impossibilitando sua transcrição.

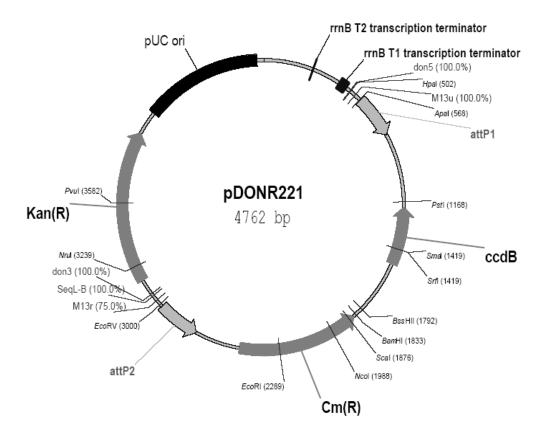
O vetor TOPO contém a sequência do gene lacZ codificadora da • -galactosidase. Quando expressa seu produto, utiliza o substrato fornecido X-gal, formando colônias azuladas. O gene da quinase foi inserido no meio da sequência do gene lacZ bloqueando sua transcrição e gerando colônias brancas, facilitando, assim, a seleção das colônias. Além disso, o vetor possui resíduos de desoxitimidina pendentes (*overhanging*) nas extremidades 3'. Este vetor se utiliza de uma DNA topoisomerase I ligada covalentemente a ele a qual possui uma atividade de transferase terminal que não depende de *template*. A enzima adiciona uma desoxiadenosina ao final das extremidades 3' de produtos de PCR.

# 3.12.2. Plasmídeos do Sistema Gateway Cloning Technology

Como vetor de entrada no sistema *Gateway*, foi utilizado o vetor pDONR221 (Figura 5) o qual possui sítios de recombinação attP1 e attP2. Foram utilizados vetores de destino (contendo sítios attR1 e attR2) para expressão em plantas e em bactérias. Para expressão em plantas, os vetores utilizados foram pK7WG2, pK7GWIWG2(I) e pK7FWG2, (Figuras 6, 7 e 8, respectivamente). Esses plasmídeos possuem como região regulatória o promotor do vírus do

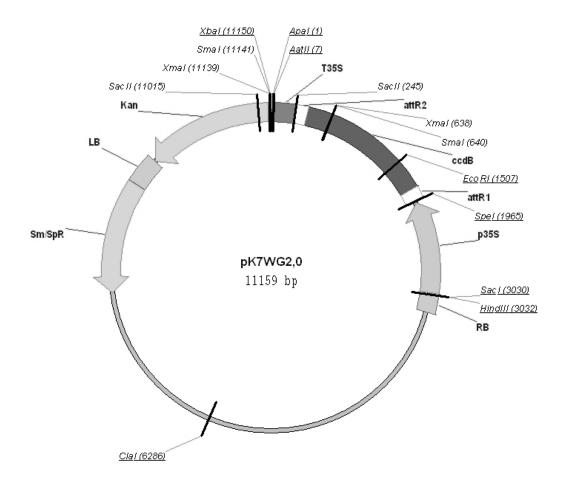
mosaico da couve-flor CaMV 35S, o qual confere transcrição constitutiva e em altas taxas nas células vegetais. Os plasmídeos conferem, em células procarióticas, resistência à estreptomicina e espectinomicina e apresentam, entre as bordas do T-DNA, um gene que confere resistência à canamicina às células vegetais transformadas. Já os vetores pDEST 15 e pDEST17 (Figuras 9 e 10) foram utilizados para expressão heteróloga de NtCDKG;2 em bactérias. Esses dois vetores foram utilizados para gerar uma fusão na porção N-terminal da NtCDKG;2 com tags que podem ser utilizadas para futura purificação por cromatografia por afinidade. O produto do gene ccdB, localizado entre os sítios de recombinação de cada plasmídeo, quando presente, inibe o crescimento na maioria das linhagens de E. coli. Isso se deve a proteína ccdB atuar como uma toxina ao ligar-se à DNA girase, dessa forma, facilitando a seleção dos clones desejados. Os vetores pDEST possuem o promotor T7, o qual é altamente expresso pela T7 polimerase, produzindo um alto rendimento da proteína de interesse. Para a produção de proteína de forma heteróloga, outro ponto de controle é crucial: o momento certo em que deve ocorrer a transcrição deve ser bem regulado. Nos vetores pDEST, a transcrição da T7 polimerase é induzida mediante a adição de IPTG (Isopropyl • -D-1-thiogalactopyranoside) e, somente então, ela poderá reconhecer o promotor T7 e iniciar o processo transcricional do gene alvo.

O vetor pDONR221 (figura 5) é utilizado na clonagem de fragmentos com extremidades attB, por recombinação com os sítios attP presentes no vetor, permitindo que as sequências, quando inseridas no vetor de entrada, possam ser transferidas para diversos outros vetores de expressão do sistema *Gateway*. Na recombinação BP um segundo vetor recombinante é criado, chamado vetor de entrada (pENTRY), este vetor possui o inserto e os cassetes de recombinação.



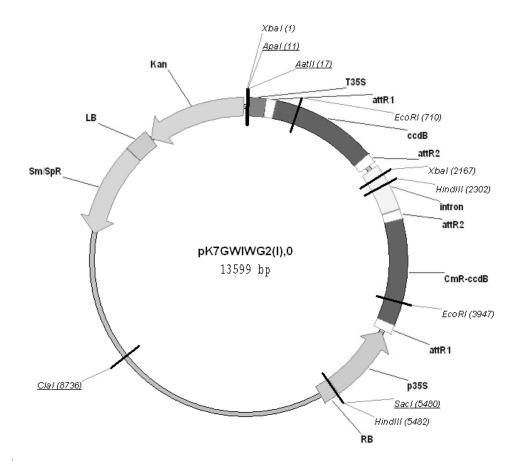
**Figura 5:** Mapa de restrição do vetor pDONR221; attP1 e attP2: sítios de recombinação; CmR: resistência a cloranfenicol; ccdB: sequência codificadora da proteína ccdB, a qual é responsável por se ligar à DNA girase, impedindo o crescimento da maioria das linhagens de *E. coli.*; Kan: marcador de resistência à canamicina.

O vetor pK7WG2, mostrado na Figura abaixo (6) é destinado à superexpressão da sequência de DNA. O promotor CaMV35S garante uma elevada e constitutiva taxa de transcrição.



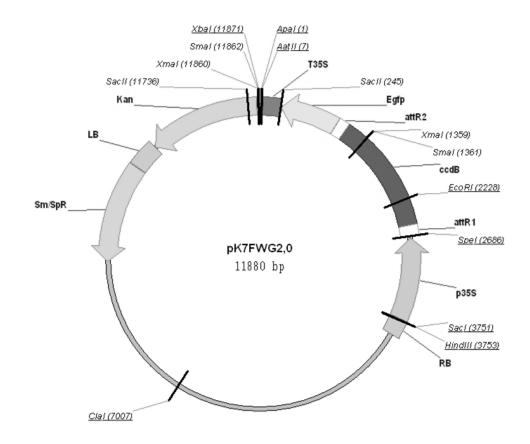
**Figura 6:** Mapa de restrição do vetor pK7WG2; RB: Borda direita do T-DNA; P35S: promotor do vírus do mosaico do couve-flor; attR1 e attR2: sítios de recombinação; ccdB: sequência codificadora da proteína ccdB, a qual é responsável por se ligar à DNA girase, impedindo o crescimento da maioria das linhagens de *E. coli.*; T35S: Terminador do vírus do mosaico do couve-flor; Kan: marcador de resistência à canamicina; LB: borda esquerda do T-DNA; Sm/SpR: marcador de resistência à espectinomicina e à estreptomicina.

Um dos meios para obter o silenciamento pós transcricional consiste na ativação de um mecanismo mediado por RNAs dupla-fita (*double-stranded* RNA - dsRNA) conhecido como interferência por RNA, RNAi (Hamilton *et al.*, 2002). Para isso, o vetor pK7GWIWG2(I) (Figura 7)possui duas cópias do ccdB flanqueadas pelos sítios attR1 e attR2 dispostos inversamente entre si e separados por uma sequência de íntron. Essa configuração permite, após a transcrição, a formação de um RNA em forma de grampo, o qual desencadeará o silenciamento gênico pós transcricional.



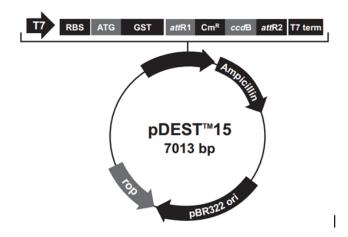
**Figura 7:** Mapa de restrição do vetor pK7WG2; RB: Borda direita do T-DNA; P35S: promotor do vírus do mosaico do couve-flor; attR1 e attR2: sítios de recombinação; CmR-ccdB: CmR: resistência a cloranfenicol, ccdB: sequência codificadora da proteína ccdB em ordem reversa; ccdB: sequência codificadora da proteína ccdB na orientação normal, a qual é responsável por se ligar à DNA girase, impedindo o crescimento da maioria das linhagens de *E. coli.*; T35S: Terminador do vírus do mosaico do couve-flor; Kan: marcador de resistência à canamicina; LB: borda esquerda do T-DNA; Sm/SpR: marcador de resistência à espectinomicina e à estreptomicina.

Por sua vez, vetor pK7FWG2 (Figura 8)apresenta um dos sítios de recombinação (attR2) entre a sequência do gene de interesse (sem o *stop codon*) e a sequência do gene repórter GFP (*Green Fluorescent Protein*), possibilitando a fusão da GFP na porção C-terminal da proteína de interesse.



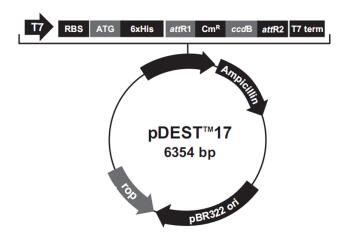
**Figura 8:** Mapa de restrição do vetor pK7FWG2; RB: Borda direita do T-DNA; P35S: promotor do vírus do mosaico do couve-flor; attR1 e attR2: sítios de recombinação; ccdB: sequência codificadora da proteína ccdB, a qual é responsável por se ligar à DNA girase, impedindo o crescimento da maioria das linhagens de *E. coli*. Egfp: sequência codificadora do gene da GFP; T35S: Terminador do vírus do mosaico do couve-flor; Kan: marcador de resistência à canamicina; LB: borda esquerda do T-DNA; Sm/SpR: marcador de resistência à espectinomicina e à estreptomicina.

O plasmídeo pDEST15 (Figura 9)é destinado à formação do vetor de expressão de proteínas em fusão com uma cauda (tag) de GST (Glutathione S-transferase), a qual é expressa na mesma fase de leitura e na porção N-terminal da proteína de interesse, auxiliando em experimentos de purificação e detecção da proteína recombinante. O cassete de expressão está sob controle do promotor T7 RNA polimerase viral. As células que conterão o plasmídeo de expressão apresentarão resistência ao antibiótico ampicilina.



**Figura 9**: Mapa de restrição do vetor pDEST15. T7: Promotor T7; GST: *tag* de <u>Glutathione S-transferase</u>; attR1 e attR2: sequências reconhecidas pelas recombinases; Cm: Resistência ao cloranfenicol; ccdB: sequência codificadora da proteína ccdB; T7: Terminador T7.

O plasmídeo pDEST17 (Figura 10) é semelhante ao pDEST15, porém, a construção final será a fusão do DNA de interesse com uma cauda de 6 resíduos de aminoácido histidina dispostos *upstream* ao gene de interesse. O cassete de expressão também está sobcontrole do promotor T7 RNA polimerase viral e a resistência conferida pelo plasmídeo é ao antibiótico ampicilina.



**Figura 10**: Mapa de restrição do vetor pDEST17. T7: Promotor T7; 6xHis: *tag* de seis histidinas; attR1 e attR2: sequências reconhecidas pelas recombinases; Cm: Resistência ao cloranfenicol; ccdB: sequência codificadora da proteína ccdB; T7: Terminador T7.

# 3.13. SEQUENCIAMENTO

# 3.13.1. Preparo das reações

As reações de sequenciamento foram preparadas com o kit *ABI PRISM*<sup>®</sup> *BigDye*<sup>TM</sup> *Terminator Cycle Sequencing Ready*(Applied Biosystems) Foram utilizadas microplacas de 96 poços. Para cada reação utilizou-se 200-500 ng de DNA (1 a 4 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 *Big Dye* (2,5X) e água deionizada estéril em q.s.p. 10 μl de volume final. As microplacas foram seladas, levadas ao vórtex e rapidamente centrifugadas até 800 rpm.

#### 3.13.2. Programa de PCR utilizado

- 1. Desnaturação 96°C por 2 minutos (passo inicial);
- 2. Desnaturação 96°C por 45 segundos;
- 3. Pareamento 50°C por 30 segundos;
- 4. Extensão 60°C por 4 minutos;
- 5. Repetição dos ciclos 2 a 4: 35 vezes;
- 6 Manutenção: 10°C por tempo indeterminado.

## 3.13.3. Precipitação das amostras

Após o término da reação, as amostras foram precipitadas para retirada dos dideoxinucleotídeos fluorescentes não incorporados durante a síntese das moléculas de DNA, pois estes interferem na leitura das bases durante o sequenciamento. A precipitação foi feita com isopropanol 75% (80 μl/ροςο).

Depois de adicionado o álcool, as amostras foram levemente agitadas em vortex e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Centrifugou-se por 45 minutos, a 4.000rpm (Centrífuga *Eppendorf* 5810R), e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado duas

vezes com 200 μl de etanol 70% e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. O etanol foi removido completamente por centrifugação (*spin* até 800 rpm), com a placa invertida e apoiada em papel absorvente. O precipitado foi incubado a temperatura ambiente por 1 hora e, posteriormente, ressuspendido em 10 μl de Formamida Hi-Di (Applied). As amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos e a placa foi levada ao sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems).

#### 3.13.4. *Primers* utilizados

Os *primers* utilizados para o sequenciamento completo da sequência codificadora de NtCDKG;2, bem como para checagem das construções após recombinação estão demonstrados na Tabela 1.

**Tabela 1**: *Primers* utilizados nas reações de sequenciamento de acordo com o vetor utilizado para cada construção. Tm: Temperatura de *melting* 

Construção	Vetor	Primer	Sequência (5'→3')	Tm (°C) 50mM	
Clonagem de	onagem de PCR®2.1- M13 F		GTAAAACGACGCCAGT		
NtCDKG;2	TOPO <sup>®</sup>	M13_Rv	CAGGAAACAGCTATGAC	50	
		SGN-U423624-Fw	ATGGCTGCCGGAAGACATGGT	61.7	
		SGN-U423624-Rv	TTAGCAAAACAAGCCACCAGTC	56	
		GL-Kin_Interno_Fw	GTAGGAAATCACTGACCCC	52.3	
		GL-Kin_Interno_Rv	CGGTTCTTTCCTCAGCAATTC	54.1	
		SGN-U423624-FW-qPCR	ACTGGTAGCTGCTAAGGTGCAGAA	60.1	
Entrada no	pDONR221	M13_Fw	Vide acima descrito	42	
Gateway		M13_Rv	Vide acima descrito	50	
Superexpressão	pK7WG2	Promotor 35S_Fw	ATGACGCACAATCCCACTATCC	57.1	
em planta		Terminador 35S_Rv	CCCTATAAGAACCCTAATTCCC	52.1	
Silenciamento	pK7GWIWG2(I)	Promotor 35S_Fw	Vide acima descrito	57.1	
em planta		Terminador35S_Rv	Vide acima descrito	52.1	
Fusão com GFP	pK7FWG2	Promotor 35S_Fw	Vide acima descrito	57.1	
em folha		GFP-Pk7WFS7-Rv	GAAGCACTGCACGCCGTAGGTC	68	
Expressão em E.	pDEST15	Seq p15 – ver com Ed	AACGTATTGAAGCTATCCCAC	52.4	
coli – GST tag					
Expressão em <i>E.</i> coli – His tag	pDESt17	Terminador T7-Fw	TAATACGACTCACTATAGGG	56	

# 3.14. AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA DE NtCDKG;2

Com base em análises *in silico*(item 4.1 dos Resultados e Discussão), foram desenhados *primers* especificamente localizados nas regiões da metionina inicial (*forward*) *e stop codon (reverse*) do gene NtCDKG;2, conforme descritos na tabela 2. Dessa forma, a sequência codificadora da referida proteína quinase foi amplificada por PCR a partir de cDNA de estigma e estilete (estádios 1 e 2) de *N. tabacum*.

**Tabela 2:** Primers para amplificação da sequência codificadora de NtCDKG;2

Primer	Sequência (5'→ 3')	Tm (°C) 50mM
SGN-U423624-Fw	ATGGCTGCCGGAAGACATGGT	61.7
SGN-U423624-Rv	TTAGCAAAACAAGCCACCAGT	56

A reação de PCR para clonagem da sequência codificadora da respectiva quinase foi feita com a enzima *Platinum*®*Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen). Para a reação, utilizou-se 30 ng de cDNA de estigma/estilete em estádios iniciais de desenvolvimento (1 e 2), 5 μ1 de 10X *High Fidelity PCR Buffer*, 0,2 μ1 *Platinum*®*Taq DNA Polymerase High Fidelity*, 1μ1 dNTP 10 mM, 2 μ1 de sulfato de magnésio 50 mM, 1μ1 de cada *primer* (*forward* e *reverse*) 10 μM e q.s.p 50 μ1 de água deionizada autoclavada.

A reação de PCR se baseou em um passo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, passando para 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos (desnaturação), 59°C por 30 segundos (pareamento dos *primers*) e 68°C por 2,5 minutos (extensão). Após os ciclos, a reação foi submetida a 68°C por 10 minutos para completa adição de nucleotídeos e mantida a 10°C.

Após a PCR, a identidade do material obtido foi investigada por eletroforese em gel de agarose ultrapura (item 3.8), a banda foi excisada e purificada (item 3.9).

# 3.15. CLONAGEM DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA DE NtCDKG;2

O fragmento gerado pela PCR e já purificado foi clonado no vetor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (*Invitrogen*). A reação de clonagem foi feita com 4µl do produto da PCR purificado, 1µl da solução 1,2M de NaCl e 0,06M DE MgCl<sub>2</sub> presente no kit do vetor diluída 4X e 1µl do vetor. A ligação foi mantida por, no mínimo, 30 minutos a temperatura ambiente.

A ligação foi eletroporada em células de *E. coli* eletrocompetentes da cepa *DH10B* (item 3.3.1), plaqueada em meio LB e antibiótico canamicina e deixada de 16-20 horas a 37°C. Da placa gerada, foram selecionadas 4 colônias, colocadas em meio LB líquido com canamicina e deixadas de 16 a 20 horas a 37°C sob agitação de 220 rpm. Após esse período, foram feitos estoques em glicerol e mini-preparações de DNA por lisozima, as quais foram digeridas com a enzima HinIII. As amostras foram aplicadas em um gel de agarose e submetidas a uma corrida eletroforética. O DNA relativo à mini-preparação escolhida foi tratado com RNase, limpo pelo método fenol/clorofórmio e o clone foi sequenciado de acordo com o item 3.13.

# 3.16. REAÇÕES DE RECOMBINAÇÃO E CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO

Para a introdução das sequências de interesse relativas ao gene NtCDKG;2 no sistema *Gateway*, é necessário a incorporação de seqüências para o reconhecimento na reação de recombinação, o que pode ser feito por reação de PCR. Assim, os *primers* utilizados para amplificar a região de interesse devem conter nas extremidades as sequências dos sítios attB1 e attB2. Essa inserção dos sítios foi feita através de duas reações de PCR, conforme descrito para cada construção.

## 3.16.1. PCRs 1 – inserção de partes dos sítios attB1 e attB2

Para dar início às clonagens pelo sistema *Gateway*, a primeira PCR foi realizada de modo semelhante, porém, atendendo a certas particularidades de cada tipo de construção. O *primer forward* foi o mesmo para todas construções. Porém, os *primers reverse* foram diferenciados, conforme constam na tabela 3. Por isso, as temperaturas de anelamento foram diferentes. Além disso, visto que o tamanho do *amplicon* esperado foi diferente entre as construções, o tempo de extensão dado à polimerase também diferiu.

**Tabela 3**: *Primers* utilizados nas primeiras reações de PCRs para entrada no Sistema Gateway

Primer	Sequência (5'→3')	Tm (°C) 50 mM
Nt-GL-KIN-attB1-Fw	AGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGCTGCCGGAAGAC	69.9
Nt-GL-KIN-New-attB2-Rv	CAAGAAAGCTGGGTCTTACGAAAACAAGCCACCAGTCC	66.4
Nt-GL-KIN-ss-attB2-Rv	GTACCAGAAAGCTGGGTCGCAAAACAAGCCACCAGTCC	68.6
Nt–GL-KIN–RNAi-Rv	GAAAGCTGGGTCGTGAAATTGTAC	56.4

O *primer*Nt-GL-KIN-attB1-Fw contém os primeiros 10 nucleotídeos da sequência de recombinação attB1 do *gateway*, sequência de reconhecimento *Shine Dalgarno* destinada à expressão em procariotos, sequência de *Kozak*, para reconhecimento e expressão em eucariotos e parte da sequência destinada ao alinhamento com o clone da quinase. Os outros *primers* estão no sentido reverso. O *primer* Nt-GL-KIN-New-attB2-Rv possui parte do sítio de recombinação attB2 e o restante com complementação à sequência da quinase incluindo o *stop códon*. Já o *primer* Nt-GL-KIN-ss-attB2-Rv difere desse último *primer* por não possui o códon de terminação, podendo ser usado em fusão C-terminal com outro gene para outras finalidades. Por sua vez, o *primer* Nt-GL-KIN-RNAi-Rv, possui parte do sítio de recombinação attB2 e o restante possui complementação à parte final da sequência da quinase que desejamos ter o *hairpin*.

As reações de PCR para inserção de partes dos sítios attB1 e attB2 foram feitas com 30ng de DNA molde (NtCDKG;2 no vetor pCR2.1-TOPO®), 1 μl de dNTPs (10 mM), 2 μl de MgSO4 (50mM), 5 μl de tampão 10X High Fidelity PCR Buffer, 0,2 μl de enzima *Platinum*® *Taq DNA Polymerase High Fidelity*, 1 μl de *primer forward* (10\_moles/μl), 1 μl de *primer reverse* (10 nmoles/μl) e água deionizada autoclavada em q.s.p. 50 μl de volume final.

As condições estabelecidas para cada reação no termociclador foram de: um passo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, passando para 34 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), segundos na temperatura de pareamento estabelecida para cada par de *primers* e 68°C por 60-160 segundos. Após os ciclos, a reação foi submetida a 68°C por 10 minutos e mantida a 10°C.

As particularidades de cada reação e o tipo de *amplicon* gerado são descritos nos itens abaixo.

#### Superexpressão de NtCDKG;2

Na construção para superexpressão de NtCDKG;2 em plantas, o fragmento amplificado abrange toda a região codificadora (da metionina inicial para transcrição até o *stop codon*). Os *primers*Nt-GL-KIN-attB1-Fw e Nt-GL-KIN-New-attB2-Rv foram utilizados nessa reação. A temperatura de anelamento dos *primers* foi de 65°C e o tempo de extensão dado à polimerase foi de 160 segundos.

#### RNAi de NtCDKG;2

O tamanho do fragmento selecionado para uma maior eficiência no silenciamento de plantas varia de 300 a 600pb (Helliwell & Waterhouse, 2003). Fragmentos entre esses valores parecem ser mais estáveis e efetivos nas construções de *hairpin* de RNA com íntron. Além disso, fragmentos muito grandes aumentam a probabilidade de perda de especificidade no silenciamento de um único transcrito alvo. Para o silenciamento de NtCDKG;2 em *N. tabacum*, foi escolhida para *hairpin* a região dos primeiros 373 pares de bases sem domínios conservados em quinases. Os *primers* para RNAi foram desenhados com base em análises feitas no *Motif Scan* (http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN) e *Conserved domains* do NCBI - *National Center for Biotechnology Information* - (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd). Para ver os resultados das análises, consultar o item 4.3 de Resultados e Discussão. O par de *primers* utilizado para essa reação foi Nt-GL-KIN-attB1-Fw e Nt–GL-KIN–RNAi-Rv. A temperatura de pareamento estabelecida para os *primers* nessa PCR foi de 56°C e o tempo de extensão foi de 1 minuto.

## NtCDKG;2 sem <u>stop codon</u> para fusões C-terminal

Na construção visando uma fusão na porção C-terminal da proteína NtCDKG;2, é necessária a ausência do códon de terminação, possibilitando, assim, a codificação conjunta de outra proteína sem mudança da fase de leitura. Para tanto, o par de *primers* Nt-GL-KIN-attB1-Fw e Nt-GL-KIN-ss-attB2-Rv foi utilizado a uma temperatura de anelamento de 66°C e um tempo de extensão de 160 segundos.

## 3.16.2. PCRs 2 e inserção completa dos sítios attB1 e attB2

A fim de complementar os sítios de reconhecimento pelas recombinases attB1 e attB2, fez-se outra PCR com os seguintes *primers* demonstrados na tabela 4.

**Tabela 4:** *Primers* utilizados para completar os sítios de recombinação (attB1 e 2) e permitir a entrada do inserto no sistema *Gateway* de recombinação

Nome do primer	Sequência (5'→ 3')	Tm (°C) 50mM
BP1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC	61.7
BP2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC	63.8

O DNA molde para as PCRs2 foi o produto gerado pela purificação das bandas das PCRs1. O programa de PCR usado foi: um passo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, passando para 34 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 1 minuto a 57°C (anelamento)e 3 minutos a 68°C (extensão). Após os ciclos, a reação foi submetida a 68°C por 10 minutos e mantida a 10°C. 40µl de cada reação foram aplicados em gel de agarose (ultrapura) 1% e, após corrida, as bandas esperadas foram recortadas e purificadas.

Os produtos finais gerados nas PCRs2 foram denominados: **NtCDKG;2\_cs** = contém a sequência codificadora completa de NtCDKG;2 com os sítios attB1 e attB2 completos; **NtCDKG;2\_ss** = contém a sequência codificadora de NtCDKG;2 excluíndo o *stop codon* e contendo os sítios attB1 e attB2 completos; e **NtCDKG;2\_373** = contém os primeiros 373 pb de NtCDKG;2 com os sítios attB1 e attB2 completos.

#### 3.16.3. Recombinação das construções no vetor pDONR221-Reações BP

As ligações foram feitas entre os fragmentos gerados pelas PCRs (contendo sítios attB1 e attB2) e o vetor para entrada do sistema *Gateway*, pDONR221 .Elas foram feitas com o auxilio do *Kit Gateway BP Clonase Enzime Mix* (Invitrogen). Em um tubo *Eppendorf*, foram misturados 250 ng de DNA de interesse a ser inserido no vetor, 150 ng de vetor pDONR221, 2 μl do tampão 5X BP Clonase <sup>TM</sup> e 1 μl do mix de enzimas BP Clonase e tampão TE em q.s.p. 10 μl de reação. A ligação foi deixada em temperatura ambiente por, no mínimo, 3 horas. A fim de parar a

ligação, foram acrescentados 2 μg de Proteinase K e a reação foi incubada em banho-maria a 37°C, por 10 minutos. As ligações foram eletroporadas em células eletrocompetentes de *DH10B* e 200μ1 a 250μ1 do conteúdo foi plaqueado em meio seletivo LB + canamicina. Após a incubação *overnight*, foram feitos inóculos que ficaram de 16 a 20 horas sob agitação de 220 rpm, à temperatura de 37°C. A seguir, foram feitos estoques em glicerol, mini-preparações através do método da lisozima, digestão e sequenciamento para confirmação dos plasmídeos. Os DNAs foram tratados com RNase, limpos pelo método fenol/clorofórmio. Todas as construções de entrada para o sistema *Gateway* foram quantificadas e ficaram assim denominadas: pENTRY-NtCDKG;2\_cs = NtCDKG;2 com *stop codon*; pENTRY-NtCDKG;2\_ss=NtCDKG;2 sem *stop codon*; pENTRY-NtCDKG;2\_para RNAi.

## 3.16.4. Recombinação dos pENTRY com seus respectivos vetores de destino – reações LR

A reação LR consiste na recombinação entre sítios L e sítios R. As transferências das regiões codificadoras das construções pENTRY-NtCDKG;2\_cs, pENTRY-NtCDKG;2\_ss e pENTRY-NtCDKG;2\_373 do pDONR221 para os vetores pK7WG2, pKF7WG2 e pK7GWIWG2(I), respectivamente, foram feitas via reação LR. Para cada uma das reações, foram utilizados 150 ng da construção pENTRY e 300 ng do respectivo vetor de expressão. Essas diferentes quantidades foram colocadas visto que os vetores de destino possuem, no mínimo, 7 kb a mais que o vetor pDNOR221. Aos plasmídeos, foram adicionados 2 μl do tampão 5X LR Clonase<sup>TM</sup> (*Invitrogen*), 1 μl do mix de enzima LR Clonase<sup>TM</sup> (*Invitrogen*) e tampão TE (pH 8.0) em q.s.p. um volume final de 10 μl. A reação foi incubada por, no mínimo 3 horas a T.A. e, logo após, foi adicionado proteinase K, deixando-se a 37°C por 10 minutos.

As ligações foram eletroporadas em células da linhagem *DH10B* de *E. coli* e plaqueadas em meio LB com seleção pelos antibióticos estreptomicina e espectinomicina. A seguir foram feitos inóculos, estoques em glicerol e mini-preparações de DNA.

As construções finais geradas foram assim denominadas:

pEXP-NtCDKG;2\_Ove = NtCDKG;2+pK7WG2 = plasmídeo de superexpressão overexpression - de NtCDKG;2 em células vegetais;

**pEXP-NtCDKG;2\_GFP** = NtCDKG;2\_ss +pK7FWG2 = <u>p</u>lasmídeo de <u>exp</u>ressão de NtCDKG;2 com fusão C-terminal a GFP;

**pEXP-NtCDKG;2\_RNAi** = NtCDKG;2\_373+pK7GWIWG2(I) = <u>p</u>lasmídeo de <u>exp</u>ressão dos primeiros 373 pb da sequência codificadora de <u>NtCDKG;2</u> para <u>RNAi</u> em células vegetais.

Os plasmídeos foram confirmados através de digestões com enzimas de restrição e por sequenciamento. As mini-preparações de DNA selecionadas para transformação em *A. tumefaciens* foram tratadas com RNase, limpas com fenol/clorofórmio e quantificadas.`

# 3.17. ANÁLISE DA EXPRESSÃO NtCDKG;2

# 3.17.1. Desenho dos *primers*

Para estudar somente o nível de expressão de NtCDKG;2 são necessários *primers* que anelem apenas com o cDNA da quinase em questão. Para tanto, foram desenhados *primers* cujo produto corresponde à amplificação de uma sequência que não contém domínios conservados conhecidos em quinases. Foram investigados domínios conservados em quinases nos programas *Motif Scan* e *Conserved domains* do NCBI. Para maior detalhamento da análise, ver item 4.3 de Resultados e Discussão.

O desenho dos *primers* utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real foi feito no programa *PrimerQuest* (http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/) da *Integrated DNA Technologies*. No desenho dos *primers*, levou-se em consideração a temperatura de *melting* (em torno de 60°C), a porcentagem das bases guanina e citosina (50%), a formação de dímeros e *hairpin* (busca-se por *primers* que, preferencialmente, não estabeleçam estruturas secundárias). Foram selecionados os pares de *primers* que melhor atenderam aos quesitos anteriores. A região para a qual foram desenhados *primers* a fim de avaliar o nível expressão do gene compreende os primeiros 900 pb da sequência gênica de NtCDKG;2. Os *primers* (tabela 5) se localizam entre as posições 372 (pb) e 515 (pb) do gene, gerando um *amplicon*de 144 pb.

**Tabela 5**: Sequência dos*primers* utilizados para reações de quantificação da expressão de NtCDKG;2 em tempo real (qPCR)

Primer	Sequência (5'→ 3')	Tm (°C) 50 mM
SGN-U423624-FW-qPCR	ACTGGTAGCTGCTAAGGTGCAGAA	60.1
SGN-U423624-RV-qPCR	ACCTCAACAGGAGGCGTCAAAGAT	60.3

## 3.17.2. Coleta do material vegetal para extração de RNA

Para extração de RNA total foram coletados raiz, caule, folha, sépala, pétala, estame, estigma/estilete e ovário de plantas selvagens (SR1) de *N. tabacum*. Foi feito um *pool* de cada órgão em diferentes estádios do desenvolvimento, tanto vegetativo quanto floral. Para os órgãos vegetativos (raiz, caule e folha) foram feitas coletas em três estádios diferentes: plantas com aproximadamente seis semanas após germinação, plantas de aproximadamente três meses após germinação e plantas adultas, já com flores. Para os tecidos florais (sépala, pétala, estame, estigma/estilete e ovário), foi feito um *pool* dos 12 estádios de desenvolvimento floral descritos por Koltunow *et al.* (1990) para cada órgão. Os órgãos coletados foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

Estigmas/estiletes dos 12 estádios de desenvolvimento, tanto de plantas selvagens, quanto de plantas transgênicas, foram coletados e armazenados a -80°C.

# 3.17.3. Extração de RNA de N. Tabacum

A extração foi feita pelo método do TRIzol (*Invitrogen*), seguindo-se o protocolo do fabricante conforme descrito. Os cadinhos e os pistilos utilizados na maceração foram anteriormente tratados a 180°C em estufa de esterilização por, no mínimo, 4 horas. Todo o procedimento foi feito com luvas e máscara adequadas para evitar qualquer contaminação do material durante a extração.

Para análises de comparação da expressão em diferentes tecidos, foram macerados separadamente, 0,5g de folha, sépala, pétala e estames e 1g de raiz, caule, estigma/estilete e ovário de plantas de *N. tabacum*. As quantidades finais dos tecidos folha, sépala, pétala, estames, raiz e caule foram compostas com as respectivas partes de plantas em 3 estádios de desenvolvimento: plantas novas (com até 4 semanas), plantas jovens (com até 2 meses) e plantas maduras (com até 6 meses). Já os tecidos E/E e ovários continham quantidades aproximadas de partes de cada um dos 12 estádios de desenvolvimento descritos por Koltunow et al. (1990). Para as análises de comparação da expressão de NtCDKG;2 nos diferentes estádios de desenvolvimento floral de *N. tabacum*, foram macerados 100 mg de cada estádio.

**Homogeinização:**O tecido macerado foi transferido para um Falcon de 15 ml ao qual foi adicionado 1 ml de TRIzol a cada 100 mg de tecido vegetal O material foi homogeneizado com auxílio de vórtex. Um passo adicional foi feito somente para o macerado de raiz, visando remover o material insolúvel com centrifugação (12000 Xg a 4°C por 10 minutos). O sobrenadante foi transferido a um novo tubo.

Fase de Separação: As amostras homogeneizadas foram incubadas por 5 minutos a T.A. para permitir a completa dissociação de complexos nucleoproteicos. Foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio para cada ml de TRIzol adicionado. Os tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados a T.A. por 2-3 minutos. A seguir, o conteúdo foi centrifugado (12000 Xg por 15 minutos a 4°C). Observou-se a formação de uma solução trifásica no tubo. A primeira fase, incolor, corresponde ao RNA a ser recuperado a um novo tubo. A interfase e a fase inferior correspondente ao fenol/clorofórmio foram devidamente descartadas.

**Precipitação:** À fase aquosa transferida a um novo tubo foi adicionado 0.5 ml de álcool isopropílico/ml TRIzol e o conteúdo foi misturado levemente por inversão. A amostra foi incubada a T.A por 10 minutos e, após, centrifugada a 12000 Xg por 10 minutos a 4°C.

**Lavagem do RNA:** O sobrenadante foi descartado cuidadosamente por inversão. O *pellet* foi lavado adicionando 1 ml de etanol 75%/ ml de TRIzol e misturado, levemente, em vórtex. A seguir, a amostra foi centrifugada a 7500 Xg, 5 minutos a 4°C.

**Ressuspensão do RNA:** O RNA extraído foi ressuspendido com pipeta em água DEPC 0.1% (Dietil Pirocarbonato). Amostras de E/E e ovário foram ressuspendidas em 20 μl e o RNA do restante dos tecidos foi ressuspendido em 50μl. Após, as amostras foram incubadas por 10 minutos de 55-60°C.

As amostras foram quantificadas em NanoDrop e armazenadas a -80°C.

# 3.17.4. Confirmação da integridade do RNA

Para checagem da integridade do RNA feito um gel de agarose. As corridas de eletroforese foram realizadas em gel de agarose 1% de forma semelhante ao item 3.8 Porém, foram utilizados materiais livres de RNAse. A água utilizada para o tampão TBE, para o tampão de carregamento e para a solução estoque de brometo de etídeo foi água destilada tratada

overnight com DEPC (Dietil Pirocarbonato) a 0.1% e, posteriormente, autoclavada. A cuba e os pentes também haviam sido lavados previamente com água DEPC. Além disso, ao gel ainda líquido, foram adicionados 20 μl de isotiocianato de guanidina 1M (agente desnaturante) para cada ml de tampão TBE. Foi aplicado 1 μg de RNA em cada canaleta do gel. O tamanho dos fragmentos foi inferido através da comparação com a migração de fragmentos de marcador de peso molecular (1kb DNA Ladder plus – Invitrogen) também aplicado no gel. Ao final, as eletroforeses foram fotografadas no aparelho Gel Logic 100 (Kodak).

#### 3.17.5. Tratamento com DNase

Para deixar o RNA livre de DNA, submeteu-se 10 μg a um tratamento específico utilizando *Kit DNA-free*<sup>TM</sup> (*Ambion*<sup>®</sup>). Para tanto, em um tubo *Eppendorf* ao RNA foi adicionada água DEPC em q.s. p. 44 μl, 1 μl de *rDNaseI* e 5μl *Buffer* 10X. O conteúdo foi homogeneizado, gentilmente, com auxílio da pipeta e incubado a 37°C por 20-30 minutos. A seguir, foi adicionado 5 μl de *DNase Inactivation Reagent* e incubado por 2 minutos a T.A., mexendo ocasionalmente. O conteúdo foi submetido a uma centrifugação de 14000 rpm por 2 minutos e a fase superior foi recuperada, transferida a um novo tubo e armazenada a -80°C.

## 3.17.6. Detecção de contaminação com DNA genômico

As possíveis contaminações das amostras de RNA com DNA genômico foram checadas através de reações de PCR em tempo real. Para isso, utilizaram-se microplacas de 96 poços. As reações-teste foram feitas adicionando, em cada poço, 1µl de cada *primer* (5• mol/µl), *forward* e *reverse*, de um gene de referência o GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), 5µl do mix *GoTaq*<sup>®</sup> *qPCR Master Mix(Promega)*, 1µl de água deionizada estéril e 2µl de RNA de cada tecido. As condições da termociclagem foram: um passo inicial de 50°C por 2 minutos, passando a 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto

#### 3.17.7. Reação de cDNA com a transcriptase reversa

As amostras foram convertidas a cDNA por tratamento enzimático com a transcriptase reversa (Superscript<sup>TM</sup> III –200U/μl, *Invitrogen*). O volume máximo de RNA permitido para a reação com a transcriptase reversa é de 12μl. Para tanto, as amostras de RNA ressuspendidas em 50μl foram concentradasem *SpeedVac*. Para cada reação, foram utilizados 5 μg de RNA de cada tecido vegetal, seguindo-se o protocolo do fabricante. Aos 5 μg de RNA, foi adicionada água DEPC em q.s.p. 10 μl. A esse volume, foram acrescidos 1 μl de oligo (dTV) e 1 μl de DNTP 10 mM. Essa mistura foi deixada a 65°C por 5 minutos e, após, no gelo por 1 minuto. Após um *spin*, foram acrescentados 4 μl de Buffer 5X, 1 μl de DTT 0.1 M, 1 μl de *RNase OUT Recombinant RNase Inhibitor* e 2 μl de enzima Super Script III. Depois de misturar manualmente, o conteúdo foi deixado a 25°C por 5 minutos, 50°C de 30-60 minutos, 55°C por 20 minutos e, por fim, a 70°C por 15 minutos. Os cDNAs resultantes foram armazenados a -20°C.

## 3.17.8. Análises quantificação dos transcritos

Para análises de expressão (de forma relativa) de cada gene, as reações de qRT-PCR foram feitas como descrito no item 3.17.6, utilizando-se 2µl da diluição de cada cDNA para cada poço. Como referência interna, foram utilizados dois genes, analisados em nosso laboratório, de expressão constitutiva em *N. tabacum*: um gene de uma proteína ribossomal (RPL2 – *ribosomal protein L2*) e o gene GAPDH. Para cada tecido e para cada gene de estudo, foram feitas reações em duplicatas técnicas, permitindo a detecção de possíveis erros. As reações de PCR em tempo real (qRT-PCR) foram feitas em máquinas *7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems*®, gentilmente disponibilizados para uso pelos professores Dra. Zilá Luz Paulino Simões (FFCLRP-USP) e Gustavo Henrique Goldman (FCFRP-USP). Os cálculos das quantificações gênicas foram feitos pelo método Delta-Delta-CT (Pfaffl, 2001). As curvas de dissociação também foram feitas ao término das reações. Foram utilizados controles negativos (NTC= *no template control*), sem a adição de cDNA.

#### 3.17.9. Análise dos resultados

Os resultados de cada placa foram analisados no programa 7500 Software – Version 2.0.4. Este programa permite analisar a qualidade das duplicatas técnicas, bem como o padrão das curvas de dissociação. Além disso, permite manipulações na escolha do valor do cyclethreshold (número de ciclos requeridos para o sinal de fluorescência cruzar o limiar escolhido) e também do número de genes de referência, a serem usados como controle interno. No caso dos valores das duplicatas técnicas apresentarem uma variação maior que 1/2 ciclo, o valor foi omitido e, se necessário, a reação da placa foi repetida para garantir a validade dos resultados. Foram gerados gráficos de expressão relativa para cada gene analisado, comparandose com os genes de referência..

# 3.18. TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS

# 3.18.1. Transformação e seleção dos clones de A. tumefaciens

Os vetores de expressão oriundos de mini-preparação por lisozima (item 3.5.1) foram transferidos para *A. tumefaciens* por eletroporação, de acordo com Brasileiro & Carneiro (1998) (item 3.3.2). Para confirmar a presença dos plasmídeos em células de *A. tumefaciens*, foram feitas reações de PCR após preparações de DNA plasmidial de agrobactérias por lise alcalina (item 3.5.3). Para checagem de cada construção, foi utilizado um *primer* interno (dentro da região do fragmento de interesse) e um *primer* externo, que pareia na sequência do vetor de expressão. As reações de PCR foram feitas utilizando 1µl de DNA plasmidial extraído das colônias de cada construção, 5µl de tampão 10X da reação (*Biotools*), 2µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 1µl de cada *primer* (10 • mol/µl cada), 1µl de dNTPs 10mM, 1 Unidade da enzima *Biotools DNA Polymerase* (temperatura de extensão requerida pela enzima: 72°C) e água deionizada autoclavada q.s.p. 50µl. O conjunto de *primers* utilizados para cada checagem está representado na tabela 6.

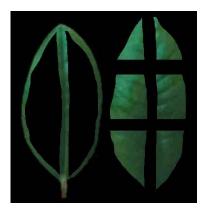
**Tabela 6**: *Primers* utilizados nas reações de PCR de *Agrobacterium* para checagem da transformação. Fw: *primer forward*; Rv: *primer* reverso

Construção	Primers	Sequência	Tm (°C) 50 mM
NtCDKG;2_Ove	Fw: Promotor 35S	ATGACGCACAATCCCACTATCC	57.1
	Rv: SGN-U423624-RV-qPCR	ACCTCAACAGGAGGCGTCAAAGAT	60.3
NtCDKG;2_GFP	Fw: Promotor 35S	Vide acima descrito	57.1
	Rv: SGN-U423624-RV-qPCR	Vide acima descrito	60.3
NtCDKG;2_RNAi	Fw: Promotor 35S	Vide acima descrito	57.1
	Rv: GL-KIN–RNAi–attB2-Rv	GAAAGCTGGGTCGTGAAATTGTAC	56.4

O programa utilizado no termociclador foi: um passo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, após seguiram-se 34 ciclos de 94°C por 30 segundos, 30 segundos para anelamento em temperatura que variou para cada par de *primers* e 72°C de 60-70 segundos (extensão). Após os ciclos, a reação teve a temperatura fixada 10 minutos em 72°C para a polimerase terminar a síntese, e, após, mantida a 10°C até sua utilização. As temperaturas de anelamento dos utilizadas para checagem das construções foram: 57°C para NtCDKG;2\_Ove e para NtCDKG;2\_GFP, e 56°C para NtCDKG;2\_RNAi.

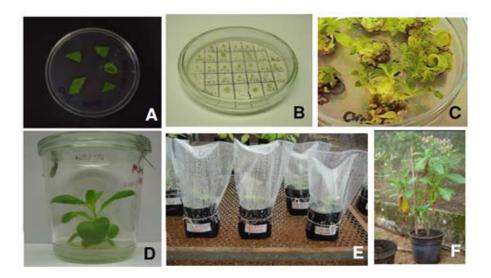
## 3.18.2. Infecção de discos foliares e obtenção de transgênicos estáveis

As plantas de *N. tabacum* crescidas em condições estéreis (item 3.1) ao atingirem em torno de 6 semanas, tiveram duas folhas excisadas. Foram utilizados discos foliares retirados da parte interna da lâmina foliar para obtenção das plantas transgênicas estáveis (superexpressão e RNAi) (Figura 11).



**Figura 11:** Todo o perímetro do segmento foliar foi ferido, durante o próprio processo de corte, para haver a liberação de moléculas sinalizadoras (acetoceringonas) reconhecidas por *A. tumefaciens*, induzindo a transferência do T-DNA dessas bactériaspara o genoma vegetal (Stachel et al., 1985).

Esses discos foram colocados em uma placa de Petri com a face abaxial para cima e em contato com uma solução de 20 ml de MS sólido e 200 µl de suspensão de A. tumefaciens contendo a construção de interesse (Figura 12-A). Após incubação (não ultrapassando temperatura de 28 °C) por dois dias, na ausência de luz, os discos foram lavados com água destilada estéril e transferidos para placas de Petri contendo meio MS 300 (item 3.21.5), para que haja indução de calos (Figura 12-B). Com duas a quatro semanas, após atingirem em torno de 1 cm de diâmetro, os mesmos calos foram transferidos para novas placas de Petri contendo meio M250 (item 3.21.6) de indução da parte aérea (Figura 12–C). Após crescerem as partes aéreas, elas foram excisadas (com um bisturi esterilizado) e transferidas para meio (MS + 200 µg/ml de canamicina) de indução de raízes (figura X-D). Todas as placas de cultura de tecidos ficaram armazenadas em câmara de germinação sob condições controladas (16 horas de luz/ 8 horas de escuro, a 27°C). Essa metodologia foi seguida para a construção ambos os tipos de plantas transgênicas: com superexpressão e com silenciamento de NtCDKG;2. Assim que as plantas transgênicas enraizaram, atingindo em torno de 10 cm de tamanho, foram transferidas para sacos com pequenos furos com substrato apropriado (Tropstrato HT - Vida Verde) e irrigação diária (Figura 12-E). Foram tratadas, a partir de então da mesma forma que as plantas selvagens (vide item 3.1). Permaneceram com os mesmos cuidados e também foram levadas à casa de vegetação (Figura 12-F).



**Figura 12.** Passo-a-passo para obtenção das plantas transgênicas. **A)** Discos foliares estéreis de *N. tabacum* selvagem foram infectados com *Agrobacterium* contendo a construção de interesse. **B)** Calos originados das bordas dos discos foliares. **C)** Partes aéreas originadas a partir dos calos; 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 aclimatação. **F)** Planta transgênica adulta, em vaso contendo substrato, terra e adubo, mantida em casa de vegetação com irrigação controlada.

## 3.18.3. Extração de DNA genômico de N. tabacum

Todas as plantas tiveram a confirmação de que realmente eram plantas transgênicas. Para tanto, extraiu-se DNA genômico e uma PCR foi feita utilizando-o como molde.O DNA genômico das plantas transgênicas e selvagens foi extraído seguindo o protocolo de Edwards *et al.* (1991). Para a extração, um pedaço de folha foi pressionado entre a tampa e o corpo de um tubo *Eppendorf*. Com isso, forma-se um disco foliar com tamanho uniforme para todas as extrações das diferentes plantas. O tecido foi macerado dentro do mesmo tubo, utilizando-se pistilos de maceração estéreis, durante 15 segundos. Foram adicionados 400 μl do tampão de extração (200 mM Tris HCl pH 7.5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0.5% SDS). Após agitadas em vórtex por 5 segundos, as amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 1 hora. Passado esse período, os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 1 minuto e 300 μl do sobrenadante foram transferidos para novo tubo. Foram adicionados 300 μl de isopropanol e as

amostras foram deixadas por 2 minutos a T.A. Centrifugou-se a 13000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente, sendo posteriormente ressuspendido em 100 μl de água deionizada autoclavada. As reações de PCR foram feitas utilizando-se 2,5 μl do DNA extraído de cada amostra. Depois de utilizadas, as amostras extraídas foram armazenadas na geladeira, a 4°C.

# 3.18.4. PCR para checagem dos transgênicos

Para confirmar que o T-DNA estava presente nas plantas e elas eram, portanto, transgênicas, foram feitas reações de PCR com DNA genômico extraído de cada construção (NtCDKG;2\_Ove e NtCDKG;2\_RNAi) e de *N. tabacum* selvagem (como controle negativo). Os *primers* foram selecionados visando amplificar um produto que só pode ser encontrado se a planta for transgênica.. Para ambas construções, foi utilizado um *primer* interno (anela dentro do gene de NtCDKG;2) e um *primer* externo, o qual reconhece uma sequência pertencente à região do T-DNA, porém, não pertencente ao gene. Os *primers* utilizados para amplificação de cada construção estão representados na tabela 7.

**Tabela 7**: *Primers* utilizados para amplificação a partir de DNA genômico das plantas transgênicas e checagem das construções

Construção	Par de primers	Sequência (5'→ 3')	Tm (°C) 50 mM
NtCDKG;2_Ove	Promotor 35S	ATGACGCACAATCCCACTATCC	57.1
	SGN-U423624-Rv-qPCR	ACCTCAACAGGAGGCGTCAAAGAT	60.1
NtCDKG;2_RNAi	SGN-U423624-FW-qPCR	ACTGGTAGCTGCTAAGGTGCAGAA	60.1
	ÍNTRON	CCACTAAGCGTGACCAGATAAAC	55.1

## 3.18.5. Expressão transiente de NtCDKG;2\_GFP em folhas de N. tabacum

A localização subcelular da proteína NtCDKG;2 foi determinada por expressão transitória da proteína fusionada à proteína repórter GFP (*Green Fluorescent Protein*). Para isso, células competentes de *A. tumefaciens* foram eletroporadas com a construção NtCDKG;2\_GFP e utilizadas para infiltração de folhas jovens de *N. tabacum*. A preparação e infiltração da cultura de *A. tumefaciens* foram feitas segundo Sawers *et al.* (2006). Uma colônia de *Agrobacterium* 

contendo a construção NtCDKG;2\_GFP, já checada por PCR foi inoculada em 5ml de meio LB líquido com os antibióticos adequados ( item 3.22), deixando-se os inóculos a 28°C com agitação de 200 rpm. Após 24 horas, cada cultura foi centrifugada em um tubo Eppendorf, a 8000 rpm por 2 minutos. O precipitado de células foi ressuspendido 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. A D.O. foi ajustada para tais valores, acrescentando-se meio de infiltração. Após ajustes, foi adicionado acetoseringona 100 µM ao meioCada suspensão foi utilizada para infiltrar folhas de N. tabacum, com auxílio de uma seringa. Após leve ferimento com a seringa na superfície abaxial das folhas, uma pequena pressão foi exercida permitindo a entrada do meio de infiltração, contendo as agrobactérias transformadas, dentro dos tecidos foliares. Após infiltração, as plantas foram mantidas a temperatura ambiente por 4-5 dias. Cortes das folhas infiltradas foram colocados em lâminas cobertas por lamínulas e analisados em microscópio de fluorescência, em um comprimento de excitação de 488 nm e de emissão 510-590 nm. Para controle negativo de infiltração e marcação por GFP, foram utilizadas folhas não infiltradas de plantas selvagens de N. tabacum.

# 3.19. EXPRESSÃO HETERÓLOGA

Após a obtenção do plasmídeo pENTRY-NtCDKG;2\_cs, o mesmo foi transferido para os vetores de expressão de proteínas pDEST15 e pDEST17 via reação LR de recombinação conforme descrito no item 3.16.4. Os plasmídeos resultantes, agora denominados **pEXP15-NtCDKG**;2(plasmídeo de <u>Expressão</u> de NtCDKG;2 com cauda de GST) e **pEXP17-NtCDKG**;2(plasmídeo de <u>Expressão</u> de NtCDKG;2 com cauda de histidina), foram utilizados para transformar células de *E. coliDH10B* por eletroporação. Após confirmação por digestão e sequenciamento, estes vetores foram utilizados para transformação de 3 linhagens de *E. coli*: BL21(DE3)*CodonPlus*RP, BL21(DE3)*Rosetta e Arctic Express*<sup>TM</sup>(DE3)RIL apropriadas para a expressão de proteínas heterólogas.

Na tabela 8, estão dispostas algumas características descritas paras as cepas utilizadas nesse trabalho.

Tabela 8: Linhagens de expressão utilizadas e um resumo de suas características
✓ : Positiva para o aspecto em questão; X: negativa para o aspecto em questão; PH: Proteína heteróloga;

Linhagem bacteriana	tRNAs para os seguintes códons raros em <i>E. coli</i>	Promotor que controla expressão da PH	Indutor	Deficiência em EndA1	Chaperonas
BL21(DE3) Codon plus RP	Arginina (AGA e AGG) e Prolina (CCC)	T7 viral	IPTG	<b>√</b>	X
BL21(DE3)Rosetta	Arginina (AGG e AGA), Glicina (GGA), Isoleucina (AUA), Leucina (CUA) e Prolina (CCC)	Idem acima	IPTG	<b>√</b>	X
Arctic Express <sup>TM</sup> (DE3)RIL	Arginina (AGA, AGG), Isoleucina (AUA) e Leucina (CUA)	Idem acima	IPTG	<b>√</b>	Cpn60 e Cpn10

# 3.19.1. Indução da expressão da proteína NtCDKG;2

Cada uma das cepas foi eletroporada com cada uma das duas construções (pEXP15-NtCDKG;2 e pEXP17-NtCDKG;2) separadamente. Devido às diferenças existentes nas cepas, algumas distinções como quantidade de IPTG adicionado e tempo de indução foram respeitadas para cada cepa. Além disso, visando otimizar a expressão, ambas as cepas BL21(DE3)*CodonPlus*RP e BL21(DE3)Rosetta foram submetidas a duas temperaturas de indução, 37 °C e 28°C. No total, foram feitas 10 expressões separadamente. Para facilitar a visualização dos experimentos, os dados foram dispostos na tabela 9.

Tabela 9: Diferenças na expressão em cada cepa

Plasmídeo de	Сера	Antibióticos (cepa e	T (°C) de	Indutor -	T (°C) de	Tempo de
expressão		plasmídeo)	incubação e	concentração	indução	indução
			rpm			
pEXP15-	BL21(DE3)	Cloranfenicol -50 µg/ml	28 – 150 rpm	IPTG - 0.5 mM	28	4 horas
NtCDKG;2	CodonPlusRP	Ampicilina 50 μg/ml	37 – 220 rpm		37	
pEXP15-	BL21(DE3)	Cloranfenicol - 34 µg/ml	28 – 150 rpm	IPTG - 0.1 mM	28	3 horas
NtCDKG;2	Rosetta	Ampicilina 50 μg/ml	37 – 220 rpm		37	
Idem acima	Arctic Express <sup>TM</sup> (DE3)RIL	Gentamicina - 20 μg/ml Estreptomicina - 75 μg/ml Ampicilina 50 μg/ml	30 – 230 rpm	IPTG - 1mM	11	24 horas
pEXP17-	BL21(DE3)	Cloranfenicol -50 µg/ml	28 – 150 rpm	IPTG - 0.5 mM	28	4 horas
NtCDKG;2	Codon plus RP	Ampicilina 50 μg/ml	37 – 220 rpm		37	
Idem acima	BL21(DE3)	Cloranfenicol - 34 µg/ml	28 – 150 rpm	IPTG - 0.1 mM	28	3 horas
	Rosetta	Ampicilina 50 μg/ml	37 – 220 rpm		37	
Idem acima	Arctic Express <sup>TM</sup> (DE3)RIL	Gentamicina - 20 μg/ml Estreptomicina - 75 μg/ml Ampicilina 50 μg/ml	30 – 230 rpm	IPTG - 1mM	11	24 horas

Após serem transformadas com as construções pEXP15-NtCDKG;2 e pEXP17-NtCDKG;2, as células das linhagens BL21(DE3) *CodonPlus*RP, BL21(DE3)Rosetta e *Arctic Express*<sup>TM</sup> (DE3)RIL foram submetidas à indução de expressão das proteínas recombinantes, conforme descrito a seguir. Da placa contendo células de *E. coli* transformadas com os plasmídeos de expressão, uma colônia isolada foi recuperada, e um inóculo foi preparado com 5 mL de meio LB suplementado com os antibióticos adequados, nas concentrações apropriadas. Após crescimento (16-20 horas), a 37°C, sob agitação (200 rpm), em um *Erlenmeyer*, contendo 50 mL de meio LB suplementado com os antibióticos apropriados, foram adicionadas quantidades diferentes dos pré-inóculos: das células Codon Plus e Rosetta, colocou-se 1 ml de cultura; das células ArcticExpress, foram colocados 60 μl de cultura. A seguir, esses novos inóculos foram incubados (até o momento da indução) em temperaturas e agitações também distintas (ver tabela 9). Após as culturas atingirem D.O. 600nm ~ 0,4 – 0,6, foi retirada uma alíquota de 1mL, que foi utilizada como tempo zero (pré-indução), e adicionou-se IPTG (para todas as construções), para início de indução da expressão. As quantidades de IPTG adicionadas variaram entre 0.1 mM e 1mM, as temperaturas de indução variaram de 11°C a 37°C, enquanto

os tempos de indução variaram de 3h a 24h, para as duas proteínas recombinantes, nas três cepas diferentes. Para maiores detalhes, consultar a tabela 9. Ao término das induções, as culturas foram centrifugadas a 4°C, por 10 minutos, a 5000 rpm, para a obtenção dos precipitados celulares. Ao final das centrifugações, o sobrenadante foi descartado, e as células precipitadas foram estocadas em freezer -20°C, para posterior lise celular, e análise dos extratos proteicos em SDS-PAGE.

# 3.19.2. Lise bacteriana para liberação das proteínas

Após as culturas terem sido induzidas e peletizadas, os precipitados bacterianos foram ressuspensos em 5 ml de tampão de lise [Fosfato de potássio 1M (2 ml), acrescido do inibidor de proteases (500μl), lisozima (5 ml), glicerol (1 ml) e água deionizada autoclavada (em q. s. p. 100 ml)]. Após estes precipitados serem incubados em gelo, nestas soluções de lise, por 30 minutos, deu-se início ao processo de sonicação, para a lise celular. Todas as amostras foram sonicadas, empregando-se 6 pulsos de 30 segundos cada (Vibracell <sup>TM</sup> - Sonic & Materials Inc, Dunbury, CT, USA) a 60W de potência, com intervalos de 1 minuto mantidos no gelo. Ao final, a suspensão celular resultante foi centrifugada por 40 minutos, a 12000g e 4°C, em centrífuga *Eppendorf* (modelo 5810R), o sobrenadante transferido para um novo tubo, e o precipitado foi, então, ressuspenso com 5 ml do mesmo tampão de lise. Após o preparo, os extratos proteicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

#### 3.19.3. SDS-PAGE

Tanto os géis que foram corados com Comassie Blue quanto os géis cujas proteínas foram transferidas por Wester foram preparados e corridos conforme descrito a seguir. O tempo de corrida foi de aproximadamente 30 minutos até o empacotamento das amostras (60 V) acrescidos a 2 horas (corrida a 100 V).

Os géis de separação foram feitos na concentração de 12.4%. Para fazer 2 géis, mistura-se 2 ml de BisAcrilamida, 1.25 ml de Tris (1.5M e pH 8.8), 50 µl de SDS (10%), 25 µl de persulfato de amonônio (10%) (*PlusOne*), 2.5 µl de TEMED (Sigma) e 1.35 ml de água

deionizada autoclavada. Os géis de empacotamento diferem dos géis de separação na porcentagem de acrilamida. No caso, fez-se dois géis a 3% misturando 175 µl de BisAcrilamida, 190 µl de Tris (1 M e pH 6.8), 15 µl de SDS (10%), 15 µl de persulfato de amônio (10%), 1.5 µl de TEMED e 1.3 ml água deionizada autoclavada.

O marcador de peso molecular utilizado nos géis corados com comassie foi o LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare). Já o marcador de peso molecular utilizado no gel para transferência foi o Spectra<sup>TM</sup> Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific).

# 3.20. TRANSFERÊNCIA PARA MEMBRANA E WESTERN BLOT

Depois de submetidas à eletroforese em gel de acrilamida, as amostras foram transferidas a uma membrana para detecção de proteínas com anticorpos. A membrana e o gel são dispostos lado-a-lado e submetidos a uma corrente de forma que as proteínas possam ser movidas do gel para a membrana e, então, reconhecidas pelos anticorpos específicos.

Inicialmente, cortou-se o material a ser utilizado: membrana de transferência Hyband-C extra, papel filtro (4 por gel), fibra (2 por gel). Esse material foi deixado por 30 minutos no tampão de transferência. A seguir, preparou-se o aparato de transferência na seguinte ordem: fibra, 2 papéis-filtro, membrana, gel a ser transferido, 2 papéis-filtro e fibra. Tudo isso foi colocado em um cassete, dentro da cuba com tampão e gelo. O aparato foi submetido a uma corrente de 100 V por 1 hora. Após a corrida, a membrana foi corada com solução de Ponceau por 3 minutos, agitando manualmente. Os poços e o marcador foram delineados a lápis. A seguir, foi acrescida a solução bloqueadora (1 g de leite em pó diluído em 20 ml de TBS) deixando *overnight* a 4°C. No dia seguinte, a membrana é lavada 3 vezes (10 minutos cada lavagem) com TBS. A seguir, ela é incubada com o anticorpo primário (ver tabela 10) por 2 horas. Após esse período, ela é lavada com TBS por mais 3 vezes de 10 minutos cada e incubada com o anticorpo secundário (*Anti-mouse* IgG conjugado à peroxidase— A4416/Sigma) por 1 horas. Após a marcação do anticorpo secundário, a membrana foi lavada 3 vezes (10 minutos cada) com TBS e revelada.

**Tabela 10**: anticorpos utilizados para marcação

Plasmídeo	Tag	Anticorpo primário	Produzido em	Diluição utilizada
pDEST15	GST	Anti-GST	Rato	1:2000
pDEST17	HIS	Anti-His	Rato	1:4000

## 3.20.1. Revelação do Western por ECL (Enhanced Chemiluminescent)

Esse protocolo de revelação foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Luis Lamberti Pinto da Silva. Após a lavagem final, a membrana é lavada com PBS para retirar o Tween e não comprometer a detecção. Em sala escura, foram misturadas as soluções 1 e 2 (itens 3.23.4 e 3.23.5), deixando-as em contato com a membrana a ser marcada por 2 minutos. A membrana foi colocada dentro de um plástico, em um cassete de autoradiografia. O filme foi colocado em contato com a membrana. A incubação inicial foi feita por 3 minutos. A seguir, um novo filme foi colocado em contato por 30 minutos. Após a revelação do filme a marcação foi muito forte. Por isso, a membrana foi colocada em contato com um novo filme, por 1 minuto.

# 3.21. MEIOS DE CULTURA

Meios de culturas foram preparados dissolvendo os componentes abaixo em água destilada ou água deionizada. A esterilização foi feita autoclavando os meios por 20 min a 1 atm (autoclave vertical 415-Fanem) ou, quando necessário, por filtração.

#### 3.21.1. Meio LB (Luria-Bertani)

Adicionar 10g/L triptona, 5g/L extrato de levedura e 10g/L NaCl em q. s. p. 1 litro de água destilada. Para obtenção do meio sólido foram acrescentados 1g de ágar por cada 100ml de meio líquido. Depois de preparado, o meio foi autoclavado.

# 3.21.2. Meio MAS para Agrobacterium (Mininum A sucrose)

Foram adicionados 50 ml de meio 5X A , 2,5 ml de sacarose 20%, 0,5 ml de MgSO4 20%, 0,125 ml de tiamina (10 mg/ml) em q.s.p. 245 ml de água destilada contendo ágar (192ml de água destilada + 3g de bacto Ágar) previamente autoclavada. Os componentes desse meio devem ser preparados separadamente e esterilizados de forma adequada.

Sacarose 20%

Este componente deve ser esterilizado em filtro de 0,22 µm e armazenado a 4°C.

MgSO<sub>4</sub> 20%

Autoclavado e armazenado a 4°C.

*Tiamina* (10mg/ml) - Esse componente deve ser esterilizado em filtro de  $0,22\mu$ m e armazenado a -20°C.

#### 3.21.3. Meio 5X A

Foram misturados 13,8 g de K2HPO4, 4,5 g de KH2PO4, 1,0 g de (NH4)2SO4, 0,5 g de citrato de sódio em q.s.p. 200 ml de água destilada. O meio foi autoclavado e armazenado a 4°C.

## 3.21.4. Meio MS para plantas (Murashige e Skoog, 1962)

Foram adicionados 4,4g de sais MS, 30g de sacarose, 0,5 g de MES em q.s.p. 1 litro de água destilada. O pH do meio foi ajustado para 5,8 com KOH 4N. Para obtenção do meio sólido foram acrescentados 1,75g de ágar (DIFCO) para cada 250ml de meio líquido.

## 3.21.5. Meio MS 300 – Indução de calos

A 40 ml de MS sólido foram adicionados 0,8  $\mu$ l de NAA (estoque - 5 mg/ml), 40  $\mu$ l de BAP (estoque - 1 mg/ml), 80  $\mu$ l de cefotaxina (estoque - 250 mg/ml) e 160  $\mu$ l de canamicina (estoque - 50 mg/ml).

### 3.21.6. Meio MS 250 – Indução de parte aérea

Para 40 ml de MS sólido foram acrescentados 40  $\mu$ l de BAP (estoque - 1 mg/ml), 40  $\mu$ l de cefotaxina (estoque - 250 mg/ml) e 160  $\mu$ l de canamicina (estoque - 50 mg/ml).

### 3.21.7. MES (100mM) - 25 ml

Foram adicionados 0,5331 g de MES em 20 ml de água destilada. O pH foi ajustado para 5,6 com KOH e o conteúdo foi completado em q.s.p. 25 ml com água deionizada. Filtrar com seringa com filtro 0,45 µM e estocar a 4°C.

### 3.22.ANTIBIÓTICOS

Quantidades apropriadas de cada antibiótico foram pesadas e dissolvidas em água deionizada. Em seguida, a solução foi esterilizada em filtro de 0,22 µm. Foram feitas alíquotas que permaneceram estocadas a -20°C. A concentração final dos antibióticos em meios de cultura está descrita na tabela 11 para *E. coli* e *A. tumefaciens*.

**Tabela 11**: Concentração final dos antibióticos utilizados nos meios de cultura, para seleção de bactérias

PLASMÍDEO	CONSTRUÇÃO	Antibiótico	Concentração indicada para	
			E. coli	A. tumefaciens
TOPO_TA PCR 2.1	Clonagem	Canamicina	50 μg/ml	=
pDONR221	Entrada no sistema Gateway			
pK7WG2	Superexpressão	Estreptomicina	12,5 μg/ml	300 μg/ml
pK7FWG2	Fusão com GFP	Espectinomicina	50 μg/ml	100 μg/ml
pK7GWIWG2(I)	RNAi			
pDEST15	Expressão em E. coli - tag GST	Ampicilina	100μg/ml	=
pDEST17	Expressão em <i>E. coli</i> – tag HIS			

A fim de eliminar resquícios de Agrobactérias após a infecção dos discos foliares, foi utilizado o antibiótico cefotaxima sódica. A canamicina também foi acrescentada ao meio de cultura de plantas visando selecionar apenas as células transformadas que possuem o vetor de

expressão de interesse. Ambos antibióticos foram colocados nas concentrações designadas nos itens 3.21.5 e 3.21.6.

## 3.23. TAMPÕES E SOLUÇÕES

### 3.23.1. Tampão de transferência

Esse tampão é preparado adicionando 3.03 g de Tris, 14.4 g de glicina e 200 ml de metanol a q.s.p. 1 litro de água deionizada. O tampão foi colocado a -20°C para refrigerar.

### 3.23.2. Solução corante de Ponceau

Dissolveu-se 0,5 g de Ponceau e 2,5 ml de ácido acético em 250 ml de água destilada. Após solubilizado, filtrar em papel filtro e estocar em vidro âmbar.

#### 3.23.3. TBS

Misturou-se 1.21 g de Tris, 4.38 g de NaCl e 250 µl de Tween 20 a q. s. p 500 ml de água deionizada.

### **3.23.4.** ECL-Solução 1

Misturou-se 1ml de Tris/HCl 1M pH 8.5, 100  $\mu$ l de Luminol 250 mM, 44  $\mu$ l de p-coumaric acid 90 mM e 8.85 ml de água deionizada.

Lumilol = 3-aminophthalhydrazide (Fluka): 0.44 g em 10 ml de DMSO (Dimetilsulfóxido – Sigma).

*p-coumaric acid (Sigma):* 0.15 g em 10 ml de DMSO.

## **3.23.5.** ECL-Solução **2**

Misturou-se 6  $\mu$ l de  $H_2O_2$  30%, 1 ml de Tris/Hcl 1M pH 8.5 e 9 ml de água deionizada.

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1. ANÁLISES *IN SILICO* EM BUSCA DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA COMPLETA DA CDK DE *N. TABACUM*

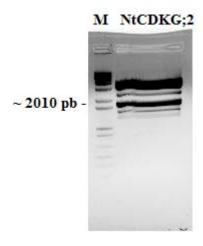
SCIIé um inibidor do ciclo celular tecido-específico, capaz de regular a proliferação e a diferenciação celular na zona secretória do estigma e no tecido transmissor do estilete (DePaoli *et al.*, 2011). A fim de auxiliar na compreensão do mecanismo de ação da proteína SCII no ciclo celular, o aluno Edward José Strini (atual Doutorando da PG-Genética, FMRP) realizou um ensaio de *pull-down* utilizando a proteína recombinante SCII-GST como isca e um extrato proteico de estigmas/estiletes, enriquecido com proteínas nucleares, como presas para detectar as proteínas que interagem com SCII. Dentre as proteínas identificadas, havia a CDK10/11 de *R. communis*, cuja sequência de aminoácidos está disponível no Anexo I.

A sequência correspondente à CDK10/11 de R. communis foi buscada para a espécie N. tabacum em bancos de dados online públicos, como SOL (Solanaceae Genomics Network http://solgenomics.net/) e DFCI (Tobacco Gene Index - http://compbio.dfci.harvard.edu/cgibin/tgi/gimain.pl?gudb=tobacco). O banco de dados DFCI contém as sequências de ESTs de estigmas/estiletes de N. tabacum pertencentes ao banco de dados TOBEST (<u>Tobacco Expressed</u> Sequence Tags; Quiapim 2009). Utilizando a sequência de aminoácidos da CDK10/11 de R. communis como query no DFCI, as buscas por tBLASTn resultaram na sequência TC113039 de N. tabacum. O alinhamento entre as sequências de aminoácidos de R. communis e de TC113039 está disposto no Anexo II. A seguir, a sequência de nucleotídeos de TC113039 foi utilizada para análises no banco de dados SOL, encontrando a sequência unigeneSGN-U423624 de N. tabacum. Após alinhamento entre essas sequências, constatou-se que a sequência proveniente do DFCI era incompleta e correspondia à porção final (3') da sequência codificadora de interesse. O alinhamento entre as sequências recuperadas nos bancos de dados DFCI e SOL são apresentadas no Anexo III. Uma busca no banco de dados TAIR (The Arabidopsis Information Resource www.arabidopsis.org), utilizando a ferramenta tBLASTx e fornecendo a sequência SGN-U423624 como query, recuperou o gene At1g67580.1 de A. thaliana, o qual corresponde à uma quinase da classe G e tipo 2 - CDKG;2. O alinhamento entre os aminoácidos dessas sequências

(Anexo IV) sugere que SGN-U423624 contém a sequência codificadora da CDK de *N. tabacum* completa. A quinase pertencente à classe G das CDKs de *A. thaliana* ainda não havia sido descrita até o início do presente trabalho. Para cloná-la e estudar sua função em *N. tabacum*, os *primers* foram desenhados baseando-se na sequência codificadora de SGN-U423624 disponível no SOL.

### 4.2. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DE NtCDKG;2

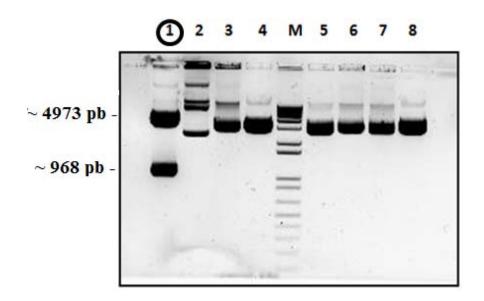
A partir da sequência obtida no banco de dados SOL, SGN-U423624, foramdesenhados *primers* flanqueando a sequência codificadora do gene (item 3.14). A amplificação por PCR da região codificadora da CDKG;2 de *N. tabacum* foi feita a partir de cDNAs de estigma e estilete de *N. tabacum*. O produto da PCR foi aplicado em gel de agarose e submetido a uma corrida de eletroforese, sendopossível a visualização da banda de tamanho esperado, aproximadamente 2010 pb (Figura 13).



**Figura 13:** Análise por eletroforese, em gel de agarose 1%, do produto da PCR para amplificação da sequência codificadora completa do gene NtCDKG;2. **M:** Marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder - Invitrogen); A banda de **~2010pb** corresponde à região codificadora do gene NtCDKG;2.

A banda, de aproximadamente 2010pb, foi excisada do gel e purificada pelo método fenol/clorofórmio. O produto foi clonado no vetor pCR®2.1-TOPO® e transferido a bactérias

competentes. O tamanho do plasmídeo gerado é de 5941 pb. Após a clonagem, foram feitas mini-preparações de DNA plasmidial, pelo método da lisozima, de 8 colônias isoladas. A seguir, esses DNAs foram digeridos com a enzima HindIII, a qual possui um sítio de clivagem na sequência do vetor pCR®2.1-TOPO® e outro sítio a 910 nucleotídeos do início da sequência codificadora. Após a clivagem com a enzima de restrição, os padrões de bandas esperados dos fragmentos inseridos eram de 4973 pb e 968pb. Caso a clonagem tenha ocorrido na orientação inversa, o plasmídeo seria linearizado e constituiria um fragmento de 5941 pb. Os resultados podem ser visualizados no gel de agarose da Figura 14.



**Figura 14:** Checagem da clonagem da sequência codificadora de NtCDKG;2 no vetor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>. Os DNAs das mini-preparações foram digeridos com a enzima HindIII e submetidos a uma eletroforese. **M:** Marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder - Invitrogen); 1 a 8: amostras de DNA plasmidial digeridas com a enzima de restrição. A amostra 1 possui o padrão de bandas esperado,**4973pb** e **968pb**.

O DNA relativo à amostra 1 apresentou o padrão de fragmentos desejados após a clivagem com HindIII. A amostra foi, então, tratada com RNase, limpa pelo método fenol/clorofórmio, quantificada (1,1 μg/μl) e denominada NtCDKG;2\_TOPO. Após o sequenciamento do clone, o gene foi denominado **NtCDKG;2** (CDKG;2 de *N. tabacum*), como uma inferência ao seu ortólogo em *A. thaliana*, CDKG;2. A sequência NtCDKG;2 possui 2010 pb, codificando uma proteína de 669 aminoácidos, incluindo a metionina inicial. A sequência

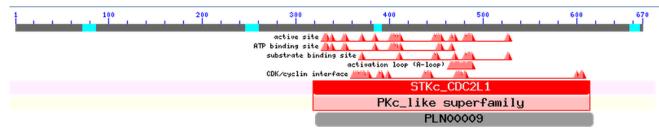
completa da codificadora de NtCDKG;2 é apresentada no Anexo V. Após o sequenciamento completo de NtCDKG;2, foi possível realizar análises *in silico* com o objetivo de encontrar domínios conservados em quinases e CDKs.

## 4.3. ANÁLISES IN SILICO DA SEQUÊNCIA NtCDKG;2

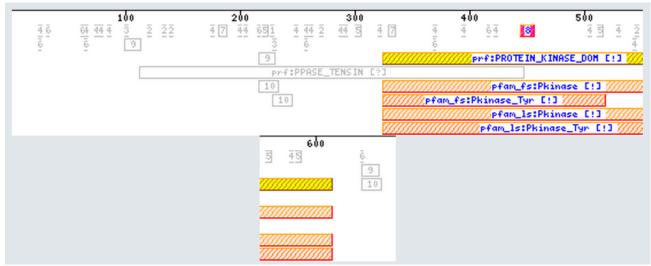
O alinhamento entre a sequência NtCDKG;2 e a sequência SGN-U423624 resulta em 99% de identidade e é apresentado no Anexo VI.A fim de descobrir regiões que possuam domínios conservados para quinases, foram feitas análises com a sequência de aminoácidos de NtCDKG;2 nos programas *Conserved domains* do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) e *Motif Scan* (http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN).

A análise da sequência de aminoácidos de NtCDKG;2 no NCBI mostrou que os domínios conservados em quinases cobrem grande parte da região C-terminal da proteína (Figura 15). Podem ser visualizados os domínios: STKc\_CDC2L1 [Serine/Threonine Kinases (STKs) subfamília Cell Division Cycle 2-like 1 (CDC2L1); E-value 0e+00] entre os aminoácidos 318 a 614; e PLN0009 (domínio típico de CDKs; E-value 1,8e-100) entre os aminoácidos 321 a 617. Entre os aminoácidos 320 e 620 foram encontrados também os sítios de ativação, ligação a ATP, ligação a substrato, loop de ativação e a interface CDK/ciclina.

Os resultados das análises no NCBI(Figura 15) indicam que os principais domínios conservados em quinases encontram-se na porção C-terminal da proteína NtCDKG;2, assim comonos resultados obtidos atravésdas análises realizadas no*Motif Scan* (Figura 16). Além disso, foram encontrados putativos domínios de sinalização para localização nuclear. Todos os domínios encontrados através dessas análises estão indicados no Anexo V.



**Figura 15**:Resultado da análise de domínios conservados na NtCDKG;2 feita pelo *software Conserved Domains* (NCBI).



**Figura 16:** Análises *in silico* realizadas no *software Motif Scan* em busca de domínios conservados na sequência de aminoácidos de NtCDKG;2. Os domínios característicos de quinases e CDKs estão situados na porção C-terminal da sequência de aminoácidos de NtCDKG;2.

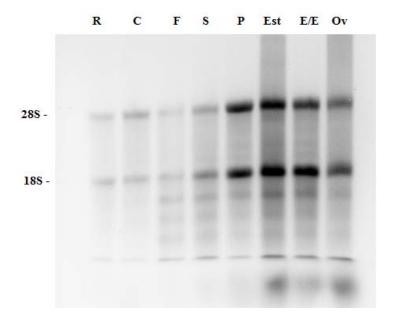
Foram feitas análises da sequência genômica do ortólogo de NtCDKG;2 em *A. thaliana*(At1g67580) no banco de dados TAIR, já que esse organismo possui o genoma sequenciado. A sequência genômica de *A. thaliana* possui 6 éxons, sendo que o primeiro e maior deles, possui 1716 nucleotídeos.

## 4.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE NtCDKG;2 EM PLANTAS SELVAGENS

A partir da sequência de NtCDKG;2, foram desenhados *primers* para estudar os níveis de expressão do gene nos estigmas/estiletes em diferentes estádios de desenvolvimento floral e nos diversos órgãos de *N. tabacum*. A quantificação dos transcritos foi realizada por qRT-PCR e os *primers* foram desenhados em uma região não conservada do gene, entre as bases 372 e 515, a fim de não mensurar equivocadamente transcritos de outras CDKs. Para a análise de expressão, os diferentes órgãos (raiz, caule, folha, sépala, pétala, estame, estigma/estilete e ovário) de plantas selvagens (SR1) foram coletados e tiveram seu RNA extraído. Esses RNAs serviram como moldes para a síntese de cDNAs pela transcriptase reversa. Para normalização das expressões, foram utilizados os genes de referência GAPDH (*glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase*) e RPL2 (*ribosomal protein L2*). Ambos os genes possuem expressão constitutiva nos diferentes órgãos de *N. tabacum*.

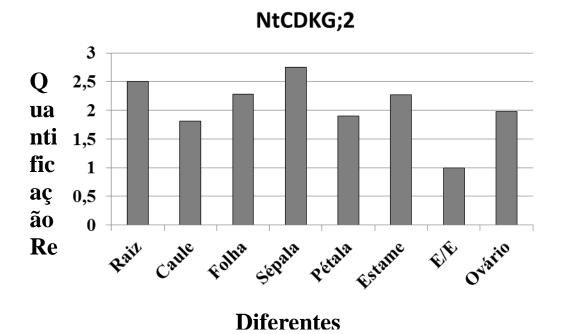
### 4.4.1. NtCDKG;2 é expressa nos diferentes órgãos de N. tabacum

A fim de mensurar o nível de expressão de NtCDKG;2 nos diferentes órgãos de *N. tabacum*, foi extraído RNA total de duas amostras biológicas, conforme descrito no item 3.17.3. Após extração do RNA, o mesmo teve sua integridade analisada por corrida em gel de eletroforese. No gel (Figura 17) observam-se os de RNA totais extraídos, além de bandas mais demarcadas, as quais correspondem às subunidades ribossomais 18S e 28S, indicando a integridade do RNA extraído.



**Figura 17:**Gel de RNAs extraídos dos diferentes órgãos de *N. tabacum*. **R**: raiz; **C**: caule; **F**: folha; **S**: sépala; **P**: pétala; **Est**: estame; **E/E**: estigma/estilete e **Ov**: ovário. Pode ser visualizado um rastro de RNA, bem como duas bandas mais definidasem todas as amostras. Essas bandas correspondem às subunidades **18S** e **28S**, evidenciando a integridade do RNA extraído.

Após extraído, foi avaliado se o RNA apresentava contaminação com DNA genômico. Essa análise foi realizada através de teste de amplificação por qRT-PCR com *primers* do gene de referência GAPDH.Não houve amplificação em nenhuma amostra, portanto, o RNA foi considerado livre de DNA. Assim, os RNAsdos oito órgãos selecionados para análise da expressão foramutilizados como molde para a síntese de cDNA. As reações de qRT-PCR foram feitas pelo método relativo com base nos genes de referência GAPDH e RPL2. Os gráficos de expressão relativa foram gerados após análises pelo método delta-delta Ct (Pfaffl, 2001), comparando-se as médias dos valores obtidos para o gene NtCDKG;2 com as médias dos genes de referência. As médias de expressão das duplicatas biológicas e o desvio padrão apresentado entre elas são mostrados na Figura 18.

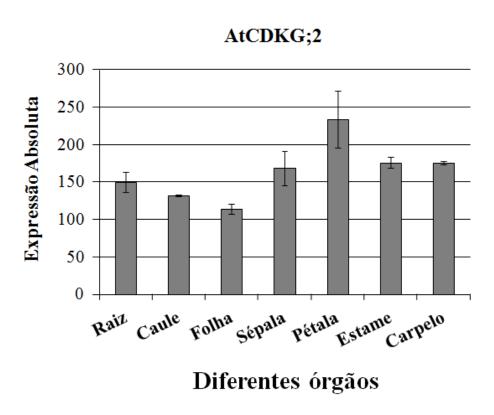


**Figura 18**: Análise da expressão relativa de NtCDKG;2 nos órgãos de *N. tabacum*. O nível de expressão de NtCDKG;2 no estigma/estilete (E/E) é igual a 1 u.a (unidade arbitrária). A expressão de NtCDKG;2 nos demais órgãos foi analisada em relação ao resultado obtido para estigma/estilete utilizando os genes de referência GAPDH e RPL2. As barras indicam os valores médios da expressão de NtCDKG;2 apresentados para as duplicatas biológicas de órgãos analisados.

Pode ser observado que o gene NtCDKG;2 possui expressão ubíqua em todos os órgãos de *N. tabacum*. O gene possui o menor nível de expressão no estigma/estilete, seguido por uma expressão em torno de 1,8 vezes maior em caule e 1,9 vezes maior em pétala e ovário. Estames e folhas expressam o gene NtCDKG;2 em torno de 2,2 vezes maisque estigma/estilete. A seguir, os órgãos com maiores níveis de expressão são raiz (2,5 vezes mais expresso) e sépala, sendo que, nas sépalas, NtCDKG;2 é 2,7 vezes mais expresso quando comparado aos níveis de expressão no estigma/estilete.

Com a finalidade de analisar se esse padrão de expressão ubíquo da CDKG;2 também é observado em outras espécies, fez-se uma análise *in silico* da expressão no ortólogo de CDKG;2 em *A. thaliana*, o gene At1g67580 (AtCDKG;2), no *software Arabidopsis eFBrowser* do banco de dados *The Bio-array Resource for Plant Biology*(http://bar.utoronto.ca/welcome.htm). Para fins de comparação com as estruturas analisadas em *N. tabacum*, foram utilizados dados de

expressão absoluta dos seguintes órgãos de *A. thaliana*: raiz, caule (do segundo internó), folha em roseta (estádio 12), sépala, pétala, estame e carpelo (esses quatro últimos provenientes de botões florais no estádio 15). As folhas do caule e as outras estruturas nos demais estádios foram desconsideradas. As quantidades absolutas de transcritos AtCDKG;2 presentes nas diferentes estruturas são encontradas na Figura 19.



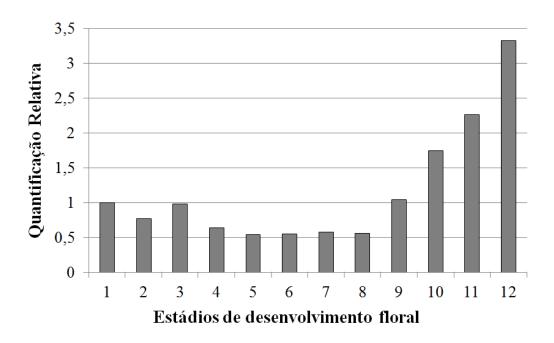
(*The Bio-array Resource for Plant Biology*; http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/output/efp-vz6aoA.html) **Figura 19**: Análise da expressão absoluta do gene AtCDKG;2(acesso At1g67580) nos diferentes órgãos de *A. thaliana*. A expressão absoluta considerada é baseada em experimentos de microarranjo e as unidades são arbitrárias.

Pode-se observar que, de modo semelhante ao que acontece em *N. tabacum*, esse gene é expresso em todos os órgãos analisados. Entretanto, em *A. thaliana*, os menores níveis de expressão são encontrados na folha em roseta, seguido do caule e da raiz. A seguir, sépala, estame e carpelo possuem índices de expressão absoluta menores que os anteriormente citados, porém, semelhantes entre si. Em *A. thaliana*, o órgão que possui níveis mais elevados de transcritos de CDKG;2 é a pétala.

Experimentos de microarranjo, qRT-PCR e MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing) foram realizados por Menges et al (2005) a fim de estudar os padrões de expressão absoluta de genes reguladores de ciclo celular em duas linhagens celulares de A. thaliana. O estudo expôs dados de experimentos contendo análises dos níveis absolutos de transcritos de CDKs, inibidores de ciclo celular e ciclinas. As expressões foram categorizadas em três níveis: alta, média e baixa. Os tecidos analisados foram agrupados em: mudas inteiras, plantas inteiras, tecidos aéreos, folhas em roseta, folhas do caule, raiz, flores, pólen, pecíolo, tumor de caule e calos celulares. Em A. thaliana, as CDKs são expressas, em menor ou maior grau, em todos os tecidos analisados. De acordo com os autores, as CKLs são as quinases que apresentam maior tecido-especificidade se comparadas às outras CDKs. A CDKA;1 é a única entre das CDKs que possui altos índices de transcritos em todos grupos de tecidos. A CDKG;1 apenas não possui alta expressão em pólen e calos, porém, nesses tecidos sua expressão é média. As maiores diferenças em níveis absolutos de expressão são encontradas em CDKB2;2. Esse gene possui altas taxas de transcritos em flores e pólen, taxas médias em mudas, tumor de caule e calos e baixos níveis em plantas inteiras, tecidos aéreos, raiz e flores. Nessas análises, o gene CDKG;2 de A. thaliana teve sua expressão analisada somente por microarranjo e MPSS. De acordo com esses experimentos, o gene CDKG;2 apresentou transcrição em todos tecidos analisados, com altos níveis de expressão em mudas e calos e a menor expressão foi verificada em pólen.Dessa forma, as análises de expressão de CDKG;2 realizadas em A. thaliana, tanto in silico quanto por Menges et al. (2005), indicam que a expressão desse gene ocorre em todos tecidos. Esses resultados são semelhantes aos encontrados para o estudo de expressão de NtCDKG;2 nos diversos órgãos de N. tabacum.

## 4.4.2. A expressão de NtCDKG;2 é regulada ao longo do desenvolvimento do estigma/estilete

Para compreender a função de NtCDKG;2 no desenvolvimento do pistilo, o seu nível de expressão foi avaliado em cada um dos 12 estádios de desenvolvimento floral de *N. tabacum* (Koltunow *et al.*, 1990),através deqRT-PCR. O padrão de expressão de NtCDKG;2 nos estigmas/estiletes nos diferentes estádios de desenvolvimento floral foi comparado aos genes de referência, GAPDH e RPL2 e é mostrado na Figura 20.



**Figura 20**: Padrão de expressão do gene NtCDKG;2 nos diferentes estádios de desenvolvimento floral de *N. tabacum*. O gráfico mostra a quantificação relativa dos transcritos de NtCDKG;2 normalizada em relação à expressão dos genes de referência GAPDH e RPL2.

Pode-se observar que os níveis de expressão de NtCDKG;2 ao longo dos diferentes estádios de desenvolvimento floral são bem diferenciados. Durante os estádios iniciais de desenvolvimento floral, estádios 1, 2 e 3, os níveis de expressão desse gene encontram-se entre 0,77 (estádio 2) e 1 (estádio 1). A seguir, o gene possui uma expressão diminuída nos estádios 4 a 8, oscilando entre 0,54 (estádio 5) e 0,63 (estádio 4). Durante o estádio 9, observa-se que NtCDKG;2 possui expressão equivalente ao estádio inicial. Entretanto, nos estádios imediatamente anteriores à antese (10 e 11), os níveis aumentam consideravelmente. O estádio 10 possui uma expressão 1,7 vezes maior e o estádio 11 possui 2,6 vezes mais transcritos de NtCDKG;2 quando comparados ao primeiro estádio. Em estigmas/estiletes do estádio 12a expressão do gene NtCDKG;2 é aumentada mais de 3 vezes se comparada com o primeiro estádio. Esses resultados sugerem que o gene NtCDKG;2 é regulado transcricionalmente ao longo do desenvolvimento floral, apresentando baixos níveis de expressão no início do desenvolvimento, com aumento nos estádios anteriores à antese e maior índice de expressão durante a antese. Estes resultados sugerem que esse gene seja importante para o

desenvolvimento dos tecidos dos estigmas/estiletes, principalmente nos estádios tardios, quando o pistilo está aumentando em tamanho e se preparando para receber os grãos de pólen.

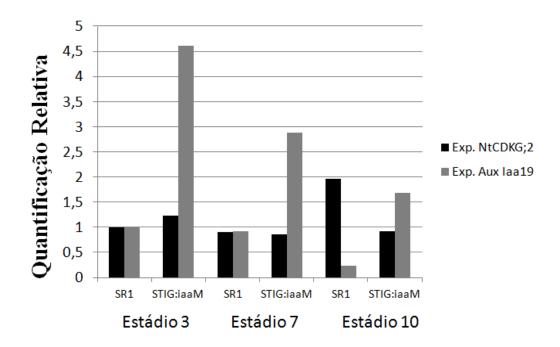
Análises da expressão do inibidor de ciclo celular SCI1, parceiro de interação com NtCDKG;2, mostram que seus transcritos são produzidos em maior quantidade nos estádios iniciais de desenvolvimento floral (De Paoli et al., 2011), estádios em que são mensuradas as menores quantidades dos transcritos de NtCDKG;2. Por outro lado, os menores níveis de transcritos SCI1 são encontrados nos estádios tardios de desenvolvimento, quando o gene NtCDKG;2 é mais expresso. Considerando que as quantidades dos transcritos de SCI1 e NtCDKG;2 equivalem às quantidades finais de proteínas produzidas e ressaltando a hipótese de que SCI1 possa ser um inibidor de CDKG;2, é possível sugerir que, nos estádios tardios de desenvolvimento dos estigmas/estiletes, a atividade de NtCDKG;2 deve estar sendo pouco inibida, já que as quantidades de SCI1 são menores, resultando em maior proliferação celular e crescimento acelerado. Por outro lado, nos estádios iniciais do desenvolvimento, um controle mais refinado da proliferação celular deve ser necessário, o qual ocorreria com uma menor quantidade de NtCDKG;2 e a presença de maior quantidade do inibidor SCI1. Estes resultados sugerem que a quantidade de transcritos e, provavelmente proteínas, de NtCDKG;2 e SCI1 esteja sendo coordenadamente regulada para garantir o desenvolvimento adequado do pistilo.

## 4.5.NtCDKG;2 É REGULADO, A NÍVEL TRANSCRICIONAL, POR AUXINA

Estudos apontam que diversos genes exibem expressão regulada por uma série de hormônios e a auxina (AIA) desempenha um papel importante regulando transcricionalmente muitos genes envolvidos com o ciclo celular (Dudits *et al.*, 2011). Por exemplo, em alfafa, a CycA2;2 tem sua expressão induzida por auxina nos eventos de iniciação e alongamento da raiz lateral (Roudier *et al.*, 2003). Tratamentos com auxina e citocinina em plantas jovens de *A. thaliana* aumentam a transcrição de CDKA;1, CycD1;1 e CycD1;2, enquanto diminuem os níveis de transcritos do inibidor KRP4 (Cho *et al.*, 2010). DePaoli *et al.* (2012) sugeriram que SCI1 participa da via de sinalização de auxina durante o desenvolvimento do pistilo e sua transcrição é ligeiramente reduzida em resposta a níveis aumentados de auxina no pistilo

(Toledo-Filho, 2012). Visto que SCI1 é parceiro de interação de NtCDKG;2, é oportuno analisar se NtCDKG;2 é reguladotranscricionalmente pelo hormônio auxina.

Durante seu trabalho de Mestrado, Toledo-Filho (2012) produziu plantas transgênicas de N. tabacum com níveis de auxina aumentados no pistilo. Para tanto, ele fusionou o promotor específico de estigma, STIG1 (Goldman et al., 1994) com o gene iaaM, o qual codifica uma das enzimas da via de biossíntese da auxina a partir do triptofano(Zhao, 2010). Nos estigmas/estiletes de plantas transgênicas com maior produção de auxina no pistilo (plantas STIG1<sub>prom</sub>::iaaM)foram quantificadas as expressões dos genes NtCDKG;2 e Aux/IAA19. A auxina causa diminuição nos níveis de proteínas Aux/IAA. No entanto, os níveis de transcrição de genes Aux/IAA aumentam em resposta a auxina, demonstrando-se a existência de um mecanismo de compensação. Assim, ao medirmos os níveis de transcritos de Aux/IAA19, avaliamos, indiretamente, se houve um aumento nos níveis de auxina nas amostras analisadas. Foram coletados estigmas/estiletes nos estádios 3, 7 e 10 de desenvolvimento floral, de três plantas transgênicas independentes. Cada uma das três plantas transgênicas foi considerada uma réplica biológica, assim, seus resultados de expressão em cada estádio de desenvolvimento foram somados e foi considerada a média aritmética resultante. As análises foram realizadas também em estigmas/estiletes de plantas selvagens. O gene de referência utilizado foi GAPDH e os dados de expressão são apresentados na Figura 21.



**Figura 21**:Expressão relativa dos genes NtCDKG;2 (barras pretas) e Aux/IAA19 (barras cinza) em plantas selvagens (SR1) e transgênicas STIG1<sub>prom</sub>::iaaM. As análises foram feitas com cDNA de estigmas/estiletes, nos estádios 3, 7 e 10, coletados das três plantas transgênicas. As expressões foram quantificadas em relação à expressão dos genes em planta selvagem SR1, no estádio 3. As expressões foram normalizadas usando o como referência a expressão do gene GAPDH.

Análises dos resultados permitem observar que a expressão de NtCDKG;2 no estádio 3 das plantas transgênicas STIG1<sub>prom</sub>::iaaM é um pouco superior que em SR1. Essa expressão diminui levemente nas plantas transgênicas no estádio 7 e, por fim, diminui consideravelmente nas plantas transgênicas no estádio 10. As medições de expressão de Aux/IAA19 foram equivalentes às relatadas por Toledo-Filho (2012) e servem para confirmar o efeito do aumento de auxina nas amostras biológicas usadas na análise. Os resultados obtidos com a análise da expressão de NtCDKG;2,nas plantas transgênicas com maior produção de auxina no pistilo, sugerem que o hormônio auxina regula transcricionalmente a expressão desse gene nas células do estigma e do estilete.

Estudos realizados com genes de ciclo celular de *Oryza sativa* (arroz) analisaram a expressão de *Oryza*; CDKG; 2 após submeter raízes de plantas jovens (plantas com 2 semanas) a tratamentos hormonais (Guo *et al.*, 2007). Após a imersão das raízes em 10 µM de AIA (auxina), observou-se que o gene *Oryza*; CDKG; 2 possui o nível de expressão inalterado. Entretanto,

depois de imergir as raízes de arroz em 5 µM de 6-BA (citocinina), esse mesmo gene teve seu nível de transcritos reduzido. Esses dados indicam que, nas células de raízes de arroz, a expressão de CDKG;2 é regulada pelo hormônio citocininae não por auxina. No entanto, a ação dos hormônios vegetais pode ser diferente nos diversos órgãos da planta. Até o momento, não há estudos sobre a regulação hormonal de CDKG;2 nos órgãos reprodutivos de arroz, apenas na raiz. Também não há estudos da regulação dessa quinase por hormônios em outras plantas.

## 4.6. CONSTRUÇÕES DE VETORES DE EXPRESSÃO EMPLANTAS

Para estudar a função de genes, a construção de plantas transgênicas, com aumento ou diminuição na expressão de determinado gene, é uma ferramenta bastante utilizada. Com esse intuito, foram desenvolvidas plantas transgênicas com modificação na expressão de transcritos através da superexpressão e silenciamento por RNAi do gene NtCDKG;2 em *N. tabacum*.

As sequências de interesse do gene foram inseridas no sistema de clonagem por recombinação sítio-específica (*Gateway*) e introduzidas em discos foliares por transformação mediada por *A. tumefaciens*. Para incorporação de determinada sequência de DNA no sistema *Gateway* é necessária a inserção, através de PCR, de sequências para o reconhecimento (attB) na reação de recombinação. O primeiro passo das clonagens foi acrescentar os sítios attB1 e attB2 no fragmento desejado, para permitir a realização da reação BP. Para isso, foram feitas 2 reações de PCR consecutivas: a PCR1 (item 3.16.1), onde os *primers* possuíam complementaridade à parte da sequência codificadora da NtCDKG;2 e parte da sequência dos sítios attB1 e attB2, e a PCR2 (item 3.16.2), utilizando-se *primers* quetornam completas as sequências dos sítios attB1 e attB2.O DNA NtCDKG;2\_TOPO, referente à amostra 1 (Figura 14), foi utilizado como molde para as primeiras reações de PCR de cada construção, como descrito abaixo.

### 4.6.1. Obtenção das construções de superexpressão, RNAi e fusão com GFP

Superexpressão

Para a construção de superexpressão da proteína NtCDKG;2, foram utilizados *primers* conforme descrito no item 3.16, gerando um *amplicon* de 2050 pb (Figura 22, canaleta 2). O

resultado dessa amplificação serviu de molde para a segunda reação de PCR, a qual completou os sítios attB1 e attB2, utilizando os *primers* BP1 e BP2, e gerou um produto de 2078 pb (Figura 22, canaleta 3).

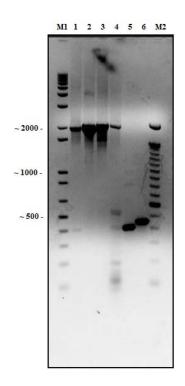
#### Fusão com GFP

A única diferença existente entre a construção de superexpressão e a construção que visa a fusão com a proteína verde fluorescente (GFP) está na ausência do*stop codon*no *primer* reverso para amplificação da sequência codificadora de NtCDKG;2. Portanto, os fragmentos esperados para as PCR1 e PCR2 eram, respectivamente, iguais a 2047 pb e 2075 pb (Figura 22, canaleta 4).

### Silenciamento por RNAi

Para a construção de RNAi, os *primers* foram desenhados com base em análise de domínios conservados em quinases. Essa medida foi necessária a fim de evitar que a sequência amplificada, depois de inserida no vetor de expressão, formasse um grampo que silenciasse também outras quinases ou CDKs. Com base nas análises realizadas no NCBI e no *Motif Scan* (Item 4.3), a região 5' da sequência codificadora foi escolhida para silenciamento e a sequência compreende os nucleotídeos 1 a373. Após a primeira reação de PCR, foi amplificado um fragmento de tamanho esperado de 410 pb (Figura 22, canaleta 5). A seguir, de modo similar ao realizado para construção de superexpressão, os sítios attB1 e attB2 ficaram completos após nova reação de PCR, a qual gerou um *amplicon* de 438 pb (Figura 22, canaleta 6).

Os fragmentos com os tamanhos esperados para cada uma das construções podem ser visualizados na Figura 22.

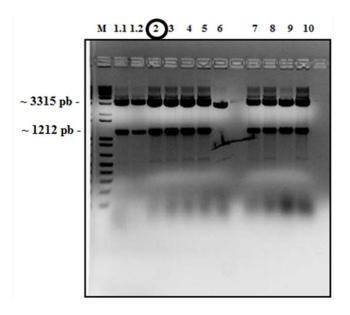


**Figura 22:** Análise por eletroforese, em gel de agarose 1%, dos produtos de cada uma das amplificações da sequência codificadorade NtCDKG;2. **M1**: Marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder - Invitrogen); **1**: sequência codificadora de NtCDKG;2 (sem *primers* attB); **2**: PCR1 de NtCDKG;2 com *stop codon*; **4**: PCR2 de NtCDKG;2 sem *stop codon*; **5**: PCR1 de NtCDKG;2 para RNAi; **6**: PCR2 de NtCDKG;2 para RNAi; **M2**: Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen).

### 4.6.2. Recombinação dos fragmentos de interesse com o vetor de entradapDONR221

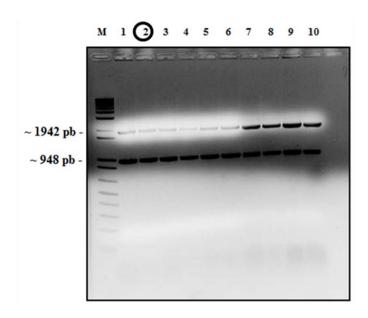
Após sua obtenção, as construções NtCDKG;2 com e sem *stop códon* eNtCDKG;2 para RNAi foram transferidas para o vetor de entrada do sistema *Gateway*, pDONR221,através de recombinação entre os sítios attB1/attP1 e attB2/attP2. Após a recombinação, o conteúdo foi eletroporado em *E. coli* linhagem DH10B. A seguir, foram feitas mini-preparações de DNA pelo método de lisozima. Para checar a presença dos fragmentos desejados novetor pDONR221, os DNAs originários das mini-preparações foram clivados com enzimas de restrição. Para a confirmação da clonagem do fragmento NtCDKG;2 com *stop codon* no pDONR221, o DNA foi digerido com a enzima de restrição DraI, com tamanhos de fragmentos esperados de 3315 pb e 1212 pb, conforme apresentado na Figura 23. O DNA correspondente a amostra 2 foi

selecionado para continuar os experimentos e a construção foi denominada **pENTRY-NtCDKG;2\_cs** (plasmídeo de <u>entr</u>ada contendo <u>NtCDKG;2c</u>om <u>stop codon</u>).



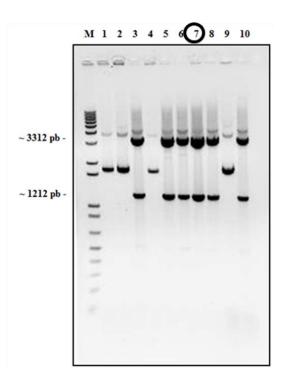
**Figura 23**:Análise por eletroforese, em gel de agarose 1%, das mini-preparações de DNA, provenientes da clonagem do fragmento NtCDKG;2 com *stop codon*no vetor de entrada do sistema *Gateway* de clonagem,pDONR221, digeridas com a enzima de restrição DraI. As bandas possuem tamanhos de, aproximadamente,**3315 pb** e **1212 pb**, conforme esperado para essa digestão. **M**: marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder - Invitrogen); **1.1 a 10**: amostras de DNA plasmidial digeridas com enzima de restrição, sendo que 1.1 e 1.2 correspondem ao DNA proveniente de mini-preparação a partir da mesma colônia.

A checagem da clonagem do fragmento NtCDKG;2 para RNAi, no vetor pDONR221, foi realizada através da digestão do DNA com a enzima de restrição PvuI. Fragmentos de tamanhos aproximados aos esperados (1942 pb e 948 pb) podem ser visualizados na Figura 24.0 DNA correspondente a amostra 2 foi selecionado para dar continuidade aos experimentos e a construção foi denominada **pENTRY–NtCDKG;2\_373**(plasmídeo de entrada contendo os primeiros 373 nucleotídeos da sequência codificadora de NtCDKG;2).



**Figura 24**: Análise por eletroforese, em gel de agarose 1%, das mini-preparações de DNA, provenientes da clonagem do fragmento NtCDKG;2 para RNAi no vetor pDONR221, digeridas com a enzima de restrição PvuI. As bandas possuem tamanhos de, aproximadamente,**1942 pb** e **948 pb**. **M**: marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder - Invitrogen); **1 a 10**: amostras de DNA plasmidial digeridas com enzima de restrição.

A confirmação da inserção do fragmento NtCDKG;2 sem *stop codon* no vetor pDONR221 foi feita com digestão do DNA pela enzima de restrição DraI. Os fragmentos de tamanhos esperados (3312 pb e 1212 pb)são apresentados na Figura 25. Entre as 10 amostras digeridas com a enzima DraI, o DNA da amostra 7 foi selecionado para dar seguimento aos experimentos e a construção foi denominada **pENTRY–NtCDKG;2\_ss** (plasmídeo de <u>entr</u>ada contendo <u>NtCDKG;2sem *stop codon*</u>).



**Figura 25**:Análise por eletroforese, em gel de agarose 1%, das mini-preparações de DNA, provenientes da clonagem do fragmento NtCDKG;2 sem *stop codon* no vetor pDONR221, digeridas com a enzima de restrição DraI. As bandas esperadas possuem tamanhos de, aproximadamente,**3312 pb** e **1212 pb** e podem ser visualizadas nas amostras 3, 5, 6, 7, 8 e 10. **M**: marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder - Invitrogen); **1 a 10**: amostras digeridas com enzima de restrição.

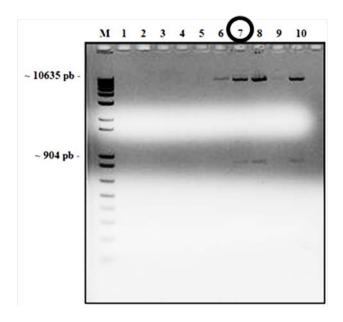
#### 4.6.3. Reações de recombinação entre as construções pENTRY e vetores deexpressão

Depois de obtidas, as construções pENTRY puderam ser destinadas à recombinação com outros vetores do sistema *gateway* de clonagem, denominados vetores de destino.

Construção de plasmídeo para superexpressão de NtCDKG;2 em plantas

A fim de estudar o efeito da superexpressão do gene NtCDKG;2, em plantas transgênicas de *N. tabacum*, foi feita uma reação de recombinação entre pENTRY–NtCDKG;2\_cs e o plasmídeo pK7WG2. O produto da recombinação foi introduzido em células de *E. coli* linhagem DH10B por eletroporação. As mini-preparações de DNA plasmidial foram digeridas com a enzima SpeI e submetidas a uma corrida eletroforética. Conforme apresentado na Figura

26, foram produzidos os fragmentos de tamanho esperado (10635 pb e 904 pb). Após a confirmação da clonagem do fragmento NtCDKG;2\_cs no vetor pK7WG2, o DNA correspondente à amostra 7 foi tratado com RNase, limpo pelo método fenol/clorofórmio e quantificado (12,7 ng/μl). Ele foi sequenciado e o clone foi denominado **pEXP-NtCDKG;2\_Ove** (plasmídeo de superexpressão – overexpression - de NtCDKG;2 em células vegetais).

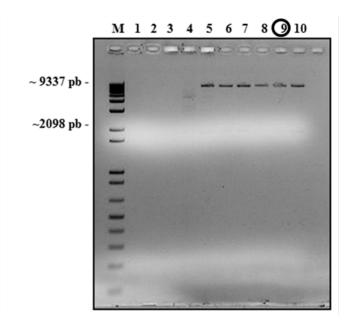


**Figura 26**:Análise por eletroforese, em gel de agarose 1%, das mini-preparações de DNA, provenientes da clonagem do fragmento NtCDKG;2\_cs no vetor pK7WG2, digeridas com a enzima de restrição SpeI. Os fragmentos esperados, de 10635 pb e 904 pb, podem ser visualizados nas amostras 6,7, 8, 9 e 10. **M**: marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder - Invitrogen); **1 a 10**: amostras digeridas com enzima de restrição.

### Construção de plasmídeo para silenciamento de NtCDKG;2 em plantas

Para a construção de silenciamento por RNAi, foi feita a reação de recombinação entre os vetores pENTRY–NtCDKG;2\_373 e pK7GWIWG2(I). Após a eletroporação da reação de recombinação em células de *E. coli* DH10B, foram feitas mini-preparações de DNA. Essas amostras foram digeridas com a enzima de restrição HindIII (com fragmentos de tamanhos esperados de 9337 pb e 2098 pb) e submetidas a uma corrida eletroforética (Figura 27). Após confirmação da clonagem por digestão, o DNA correspondente à amostra 9 foi tratado com RNase, limpo com fenol/clorofórmio e quantificado (22,5ng/µl). O DNA foi sequenciado

parcialmente e analisado no *softwarePhred/Phrap*, a fim de confirmar sua identidade, e o clone foi denominado **pEXP-NtCDKG;2\_RNAi** (<u>p</u>lasmídeo de <u>exp</u>ressão de parte da sequência codificadora de <u>NtCDKG;2</u> para silenciamento por <u>RNAi</u> em células vegetais).

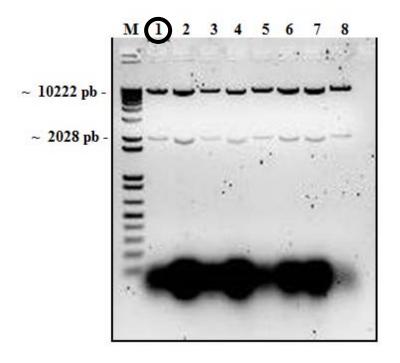


**Figura 27**: Análise por eletroforese, em gel de agarose 1%, das mini-preparações de DNA, referentes à clonagem do fragmento NtCDKG;2\_373 no vetor pK7GWIWG2(I), digeridas com a enzima HindIII. As amostras 5 a 10 geraram bandas de aproximadamente **9337 pbe 2098 pb**, conforme esperado para essa digestão. **M**: marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder - Invitrogen); **1 a 10**: amostras digeridas com enzima de restrição.

### Construção de plasmídeo para produção da proteína NtCDKG;2 fusionada a GFP

O vetor de expressão pK7FWG2 foi utilizado com o objetivo de obter a proteína GFP fusionada à porção C-terminal da proteína NtCDKG;2 para análises posteriores de localização subcelular da proteína. A reação LR foi preparada com o plasmídeo pENTRY–NtCDKG;2\_ss e o vetor pK7FWG2. Após eletroporadas, foram feitas mini-preparações de DNA plasmidial das bactérias. As amostras de mini-preparação foram digeridas com a enzima HindIII (com produção de fragmentos de tamanhos esperados de 10222 pb e 2028 pb) e submetidas a corrida de eletroforese conforme mostrado na Figura 28.A amostra 1 foi tratada com RNase, limpa com fenol/clorofórmio, quantificada (241ng/µl) e parcialmente sequenciada. Após confirmação, o

clone foi denominado **pEXP-NtCDKG**;2\_**GFP** (<u>p</u>lasmídeo de <u>exp</u>ressão de <u>NtCDKG</u>;2 com fusão C-terminal a GFP).

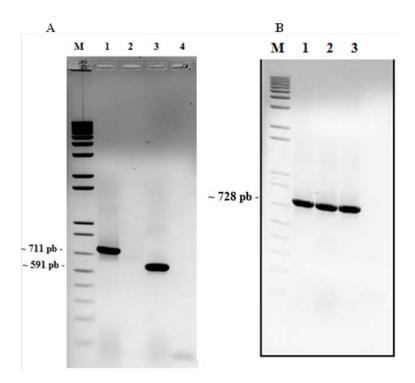


**Figura 28**: Análise por eletroforese, em gel de agarose 1%, das mini-preparações de DNA referentes à clonagem de NtCDKG;2\_ss no vetor pK7FWG2, digeridas com a enzima HindIII. Todas as amostras geraram bandas de, aproximadamente,**10222 pb** e **2028 pb**, conforme esperado para essa digestão. **M**: marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder - Invitrogen); **1 a 8**: amostras digeridas com enzima de restrição. O rastro escuro situado na porção inferior do gel corresponde à alta concentração de RNA extraído juntamente ao DNA plasmidial.

# 4.7. OBTENÇÃO DE COLÔNIAS DE *AGROBACTERIUM* CONTENDO OSPLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO EM PLANTA

As construções contendo NtCDKG;2 nos plasmídeos de expressão, pEXP-NtCDKG;2\_Ove, pEXP-NtCDKG;2\_RNAi e pEXP-NtCDKG;2\_GFP, foram eletroporadas em *A. tumefaciens*. Para checar a presença dos plasmídeos nos transformantes, foram feitas mini-

preparações de DNA plasmidial através do método de lise alcalina. A seguir, foram feitas PCRs de confirmação usando as amostras de DNA como *templates*, cujos resultados podem ser vistos na Figura 29. Foram obtidos todos os*amplicons* esperados(711 pb para superexpressão,591 pb para silenciamento por RNAi e 728 pb para fusão com GFP) e, assim, comprovou-se que as agrobactérias foram devidamente transformadas.

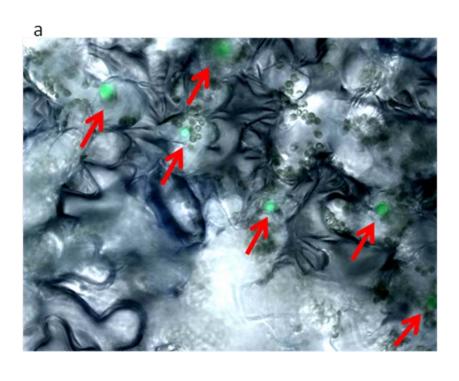


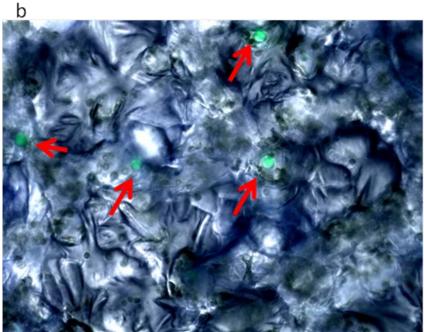
**Figura 29**: Confirmação por PCR da presença dos plasmídeos pEXP-NtCDKG;2\_Ove, pEXP-NtCDKG;2\_RNAi e pEXP-NtCDKG;2\_GFP em colônias de *A. tumefaciens*. **M**: marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder - Invitrogen). **A:** amostras amplificadas de: **1**–pEXP-NtCDKG;2\_Ove. Fragmento esperado com **711 pb**; **2** – Respectivo controle negativo de amplificação; **3**–pEXP-NtCDKG;2\_RNAi. Fragmento esperado contendo **591 pb** ; **4** – Respectivo controle negativo de amplificação. **B:** Amostras amplificadas de: **1 a 3:** de pEXP-NtCDKG;2\_GFP. As bandas correspondem, aproximadamente, a um fragmento de **728 pb**.

A seguir, as agrobactérias transformadas com o plasmídeo de expressão de NtCDKG;2 fusionada a GFP (pEXP-NtCDKG;2\_GFP) foram utilizadas para ensaios de expressão transiente, mediante infecção foliar de *N. tabacum*. Já as agrobactérias contendo os plasmídeos de superexpressão e RNAi de NtCDKG;2 (pEXP-NtCDKG;2\_Ove e pEXP-NtCDKG;2\_RNAi, respectivamente) foram empregadas na infecção de discos foliares de *N. tabacum* e geração de plantas transgênicas.

# 4.8. LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA PROTEÍNA NtCDKG;2 EM CÉLULAS EPITELIAIS DEN. TABACUM

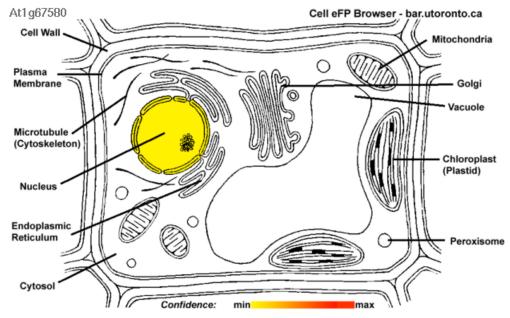
A proteína verde fluorescente é amplamente utilizada como proteína repórter, inclusive fusionada a uma proteína de interesse. Neste último caso, ela fornece uma marcação fluorescente, a qual permite monitorar atividades subcelulares, dentre elas, localização subcelular. A fim de estudar a localização subcelular de NtCDKG;2, as agrobactérias transformadas com o plamídeo pEXP-NtCDKG;2\_GFP foram utilizadas para infiltração das folhas de *N. tabacum*. Após 4-5 dias decorridos do processo de infiltração, observações da proteína de fusão NtCDKG;2-GFP, realizadas em microscópio de fluorescência, apontam que a localização de NtCDKG;2 é nuclear. Este resultado pode ser visualizado nas Figuras 30a e 30b.





**Figuras 30a e 30b**: Folhas de *N. tabacum* em ensaios de localização subcelular de pEXP-NtCDKG;2\_GFP, visualizadas por microscopia de fluorescência. As setas vermelhas apontam para estruturas nucleares onde pode ser visualizada a proteína repórter GFP.

Complementarmente, foram realizadas análises *in silico* no *software Cell eFP Browser* do banco de dados *The bio-array resource for plant functional genomics*para avaliar qual a localização subcelular da proteína ortóloga de NtCDKG;2 em *A. thaliana*. Os resultados *in silico* indicam que a proteína codificada pelo seu ortólogo em *A. thaliana* também possui localização exclusivamente nuclear (Figura 31), como encontrado para NtCDKG;2.



Drawn by T. Ampofo. Data from SUBA (Heazlewood et al, 2007).

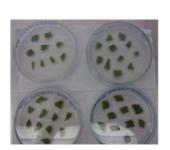
**Figura 31**: Análise *in silico* para identificar a localização subcelular da proteína At1g67580, ortóloga a NtCDKG;2 em *A. thaliana*.Os níveis de confiabilidade oscilam de amarelo (mínima) a vermelho (alta).

Análises de localização subcelular de proteínas de ciclo celular de *Arabidopsis* foram realizadas em células *Bright Yellow 2* (BY2) de *N. tabacum*,por Boruc *et al.* (2010b). Essas células foram sincronizadas para estarem todas em interfase. Nesse estudo, a maior parte das proteínas de ciclo celular foi encontrada somente no núcleo (CycA1;1, CycB2;1, KRP1, CDKD;1, CDKD;3), ou no núcleo e no citoplasma (CycD4;1, CDKA;1; CDKB2;1,CDKB2;2, CDKF;1, KRP4, KRP7) das células BY2. Dentre as proteínas analisadas por Boruc*et al.* (2010b), é importante destacar que a ortóloga de NtCDKG;2 em *A. thaliana* também possui localização nuclear nas células BY2 interfásicas. Sendo as CDKs importantes na regulação e progresso do ciclo celular, é plausível encontrá-las no núcleo celular.

# 4.9. OBTENÇÃO DAS PLANTAS TRANSGÊNICAS ESTÁVEIS: SILENCIAMENTO ESUPEREXPRESSÃO DE NtCDKG;2

Para obtenção das plantas transgênicas com NtCDKG;2 silenciada por RNAi e com NtCDKG;2 superexpressa, foram utilizadas as respectivas colônias de *A. tumefaciens*, confirmadas por PCR. Discos foliares, depois de infectados, apresentaram crescimento de calos. No total, foram transferidos 161 calos de RNAi e 56 calos de superexpressão para os meios de crescimento e indução de calos (M300) e, após, 50 calos de RNAi e 50 calos de superexpressão foram transferidos para meio de indução de parte vegetativa (M250). As partes aéreas, geradas nestes calos, foram transferidas para o meio MS sem hormônios para enraizarem. Após enraizamento, as plântulas foram transferidas para sacos com substrato e levadas à casa de vegetação: 20 plântulas de RNAi (provenientes de 18 transformações genéticas independentes) e 30 plântulas de superexpressão (19 transformações independentes). Algumas plantas morreram prematuramente, devido à ação de um herbicida utilizado nas proximidades da casa de vegetação, impossibilitando coletas de material para análise. Ao final, 13 plantas transgênicas de cada uma das construções, todas advindas de transformações genéticas distintas, foram usadas para a coleta de material e análises. A Figura 32 apresenta a obtenção das plantas transgênicas estáveis.

A B





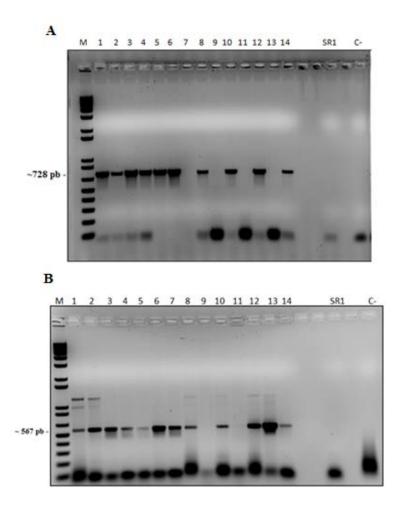
**Figura 32**: Discos foliares infectados com *A. tumefaciens* (A) e plantas transgênicas adultas mantidas em casa de vegetação (B). As plantas transgênicas estão em diferentes fases de desenvolvimento, já que os calos cresceram em tempos diferentes.

Todas as plantas transgênicas com silenciamento ou superexpressão de NtCDKG;2 tiveram suas estruturas florais e vegetativas cuidadosamente observadas a nível macroscópico. A análise dos fenótipos das plantas transgênicas se baseou em caracteres morfológicos e reprodutivos. As comparações foram feitas com plantas selvagens. Todas as plantas transgênicas apresentaram um desenvolvimento semelhante às plantas selvagens, além de formação e disposição de estruturas reprodutivas de forma correta, não tendo apresentado, portanto, diferenças fenotípicas evidentes a nível macroscópico.

Foram feitas polinizações controladas em flores das plantas transgênicas e selvagens, a fim de analisar a existência de possíveis problemas de formação de frutos no pistilo, nas anteras, ou mesmo problemas resultantes de autopolinização nas plantas transgênicas. As polinizações foram feitas entre plantas transgênicas e selvagens da seguinte forma: 1) pólen de planta selvagem no pistilo de flores de cada planta transgênica; 2) pólen de cada planta transgênica em pistilos de planta selvagem; 3) autopolinizações em flores transgênicas e 4) autopolinizações em flores selvagens. Não foram observadas alterações evidentes em tamanho de frutos e produção de sementes.

#### Confirmação do transgene em plantas de RNAi e Superexpressão

A confirmação da transgenia das plantas foi feita por PCR, por amplificação de parte da sequência de T-DNA que fora efetivamente inseridano genoma de cada uma das plantas. Um dos*primer* era complementar ao gene (NtCDKG;2) e, o outro, complementara uma região externa ao gene, porém localizada no T-DNA. Portanto, a presença do *amplicon*constata a presença do transgene nas plantas obtidas. Como molde para as amplificações, foi utilizado DNA genômico extraído de folhas de cada uma das plantas. As amostras, que não amplificaram na primeira reação de PCR, foram submetidas a novas reações. Para a amplificação e confirmação da presença do T-DNA em plantas de superexpressão, o *amplicon* esperado era de 728 pb. Já o *amplicon* esperado nas amplificações para confirmação do transgene em plantas silenciadas era de 567 pb.Ao final, todas as plantas tiveram a transgenia confirmada, necessitando ou não de amplificações posteriores (Figura 33). Ao total, foram confirmadas 13 plantas transgênicas de superexpressão e 13 plantas transgênicas de silenciamento por RNAi.

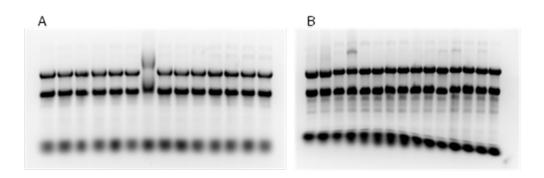


**Figura 33**: Análise por eletroforese para confirmação da presença do transgene em plantas de superexpressão e silenciamento de NtCDKG;2. As amplificações esperadas resultaram em bandas de ~728 pb para plantas de superexpressão (A) e de ~567 pb para plantas de silenciamento (B). M: Marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder - Invitrogen); 1 a 14: amostras de DNA extraído de plantas transgênicas; **SR1**: amostra de DNA extraído de planta selvagem SR1 – controle negativo de amplificação; **C-**: mix de PCR sem amostra de DNA – controle negativo de amplificação.

# 4.10. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE NtCDKG;2 NASPLANTAS TRANSGÊNICAS DE SUPEREXPRESSÃO E SILENCIAMENTO

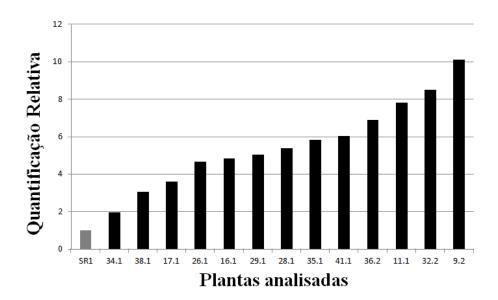
Após a transgenia ter sido confirmada nas plantas de superexpressão e silenciamento por RNAi, foi necessário analisar se havia realmente alteração nos níveis dos transcritos de NtCDKG;2 produzidos. Para esse estudo, foram coletados estigmas/estiletes das plantas

transgênicas de superexpressão e RNAi e das plantas selvagens para a extração de RNA. O estádio 11 de estigma/estilete foi utilizado para comparar a expressão de NtCDKG;2 em plantas transgênicas e selvagens, devido à facilidade em identificá-lo e também pelo fato das anteras ainda não terem liberado os gametófitos masculinos, o que poderia influenciar no resultado, caso fossem coletados estigmas/estiletes já polinizados. AFigura 34 apresenta os géis que comprovam a integridade do RNA extraído das plantas.

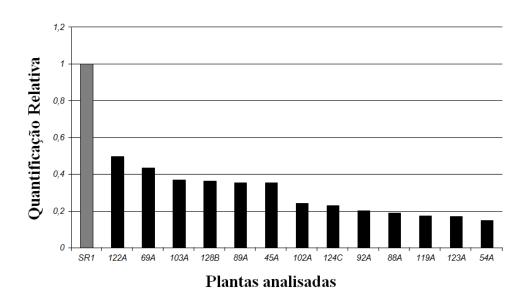


**Figura 34**:Gel de RNA extraído de estigmas/estiletes no estádio 11 de 14 plantas transgênicas com superexpressão de NtCDKG;2(A) e de 15 plantas com silenciamento de NtCDKG;2 por RNAi (B). Foi aplicado 1 µg de cada amostra de RNA extraído. Géis de agarose 1% contendo isotiocianato de guanidina e corado com brometo de etídeo (item 3.17.4).

Os RNAs extraídos de estigmas/estiletes das plantas transgênicas de superexpressão e silenciamento por RNAi foram convertidos em cDNAs e a quantificação da expressão de NtCDKG;2 nas plantas foi feita através de análises de qRT-PCR, conforme descrito no item 3.17.9. Os genes de referência utilizados foram GAPDH e RPL2. Os resultados das análises de quantificação dos transcritos de NtCDKG;2 em plantas transgênicas de superexpressão podem ser observados no gráfico apresentado na Figura 35. Houve um aumento na expressão de NtCDKG;2 em todas as plantas de superexpressão desse gene. Em 12 plantas transgênicas analisadas, esses níveis estão mais que triplicados quando comparados à planta selvagem SR1, chegando a um aumento de 10 vezes na planta 9.2. Em todas as plantas transgênicas de silenciamento por RNAi houve diminuição na expressão de NtCDKG;2 (Figura 36).A expressão do gene foi reduzida, no mínimo, pela metade, chegando a reduções de quase 10 vezes na planta 54A.



**Figura 35**: Expressão de NtCDKG;2 nos estigmas/estiletes (estádio 11) de 13 plantas de superexpressão comparadas à selvagem SR1. **Barra cinza**: planta selvagem de *N. tabacum* - SR1. **Barras pretas**: plantas transgênicas de superexpressão indicadas na parte inferior de cada barra.



**Figura 36**: Expressão de NtCDKG;2 nos estigmas/estiletes (estádio 11) de13 plantas transgênicas de silenciamento para gene, comparadas à selvagem SR1. **Barra cinza**: planta selvagem de *N. tabacum*– SR1. **Barras pretas**: plantas transgênicas de silenciamento indicadas na parte inferior de cada barra.

Apesar da obtenção efetiva de plantas transgênicas com altas taxas de expressão do gene NtCDKG;2 (plantas de superexpressão) e plantas transgênicas com grande silenciamento do gene NtCDKG;2, (plantas de silenciamento por RNAi), não foi observada nenhuma modificação fenotípica evidente nessas plantas em relação a plantas selvagens. Sabendo-se que as quinases só desempenham sua função quando complexadas às ciclinas, a alta expressão somente de NtCDKG;2, sem aumento de expressão da ciclina correspondente, talvez não tenha sido suficiente para afetar os níveis de atividade dessas enzimas e provocar possíveis alterações fenotípicas nas plantas de superexpressão.

A ausência de fenótipo diferencial nas plantas transgênicas de silenciamento pode ser devido a alguma outra proteína quinase que esteja exercendo o mesmo papel de NtCDKG;2 nas plantas. A ausência de estudos publicados sobre alterações em fenótipos de plantas transgênicas desenvolvidas com superexpressão e silenciamento de outras CDKs também limita comparações e o estabelecimento de parâmetros de discussão.

# 4.11. EXPRESSÃO HETERÓLOGADA PROTEÍNA NtCDKG;2 EM *E. COLI*

A produção de proteínas em outros organismos que não seja o nativo, isto é, de forma heteróloga, é um dos métodos utilizados quando se deseja obter uma grande quantidade da proteína de interesse. Diversos hospedeiros podem ser utilizados para a expressão de proteínas, como bactérias, fungos, mamíferos e plantas. Porém, o sistema para expressão heteróloga mais utilizado é a *E. coli*. Essa bactéria foi o primeiro hospedeiro a ser utilizado e, até hoje, aproximadamente 60% das proteínas recombinantes foram expressas em *E. coli* (Cohen *et al.*, 1973; Sorensen, 2010). Portanto, optou-se pela expressão de NtCDKG;2 em células de *E. coli*, devido ao baixo custo para produção e familiaridade com seu manuseio.

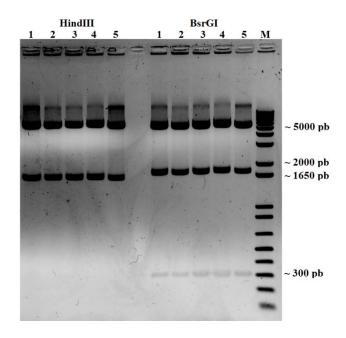
Foram realizadas análises da sequência nucleotídica codificadora de NtCDKG;2 em busca da presença dos códons raros para leucina, arginina, glicina, prolina e isoleucina. A presença de códons raros na sequência de interesse deve ser considerada para a escolha da cepa de *E. coli* que será utilizada para expressão de NtCDKG;2 recombinante. No total, foram localizadas 16 códons raros que codificam arginina, 10 para glicina, 9 para isoleucina, 9 para leucina e 6 para prolina. Dessa forma, a escolha das cepas a serem utilizadas foi feita com base na

presença de genes para tRNAs que reconhecem tais códons raros e, também, baseada na presença do promotor T7, induzível por IPTG. As três cepas distintas de *E. coli* escolhidas foram: *BL21(DE3)CodonPlusRP*, *BL21(DE3)Rosetta* e *Arctic Express*<sup>TM</sup> (*DE3)RIL*. Os códons raros codificados, bem como algumas características principais destas cepas estão destacados na tabela 8 (Materiais e Métodos).

A proteína NtCDKG;2 foi expressa em fusão com as caudasde GST ou Histidina,as quais facilitam a posterior purificação dessas proteínas. Para expressão das proteínas recombinantes, com as respectivas caudas, foi necessário inserir a sequência de NtCDKG;2 nos plasmídeos pDEST15 e pDEST17,os quais permitem a fusão N-terminal da proteína de interesse com as caudas GST e histidina, respectivamente. As características principaisde ambos os plasmídeos são apontadas no item 3.12.2.

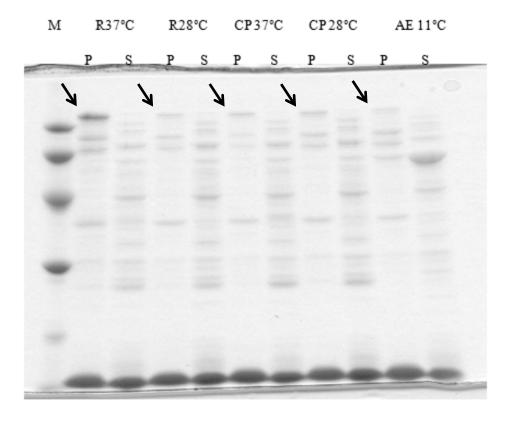
# 4.11.1. Produção heteróloga da proteína recombinante NtCDKG;2-GST

O plasmídeo contendo a sequência codificadorade NtCDKG;2 e a cauda GST em fusão N-terminal, após recombinação, foi transformado por eletroporação na cepa de *E. coli* DH10B. Após crescimento, foram feitas 5 mini-preparações de DNA plasmidial por lisozima. O DNA foi, então, submetido a duas digestões pelas enzimas de restrição HindIII e BsrGI (Figura 37).O padrão esperado para digestão com HindIII era de ~ 5861 pb e 1718 pb, sendo que a enzima cliva 1 vez dentro do inserto NtCDKG;2. Já o padrão esperado para a digestão com a enzima BsrGI era de ~ 5328 pb, 1840 pb e 411 pb.



**Figura 37:** Eletroforese em gel de agarose das mini-preparações de DNA plasmidial digeridas pelas enzimas de restrição HindIII e BsrGI. Os padrões esperados de tamanho de inserto após clivagempara digestão com HindIII eram de ~5861 pb e 1718 pbe com BsrGI era de ~ 5328 pb, 1840 pb e 411 pb. M: Marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder - Invitrogen);1 a 5: amostras de DNA plasmidial digeridas com as respectivas enzimas de restrição.

A amostra 1 foi tratada com RNase, limpa (fenol/clorofórmio) e quantificada (993 ng/μl). A amostra recebeu o nome da construção pEXP15–NtCDKG;2 (plasmídeo de expressão de NtCDKG;2 com cauda de GST). A seguir, a amostra foi eletroporada nas 3 cepas de *E. coli* [BL21(DE3)CodonPlusRP, BL21(DE3)Rosetta e Arctic Express<sup>TM</sup> (DE3)RIL] escolhidas para expressão heteróloga da proteína recombinante. Depois de transformadas, a expressão nas cepas foi induzida com IPTG, conforme descrito no item 3.19.1. Baixas temperaturas durante o período de indução são utilizadas a fim de reduzirem o metabolismo das bactérias e, consequentemente, melhorar o dobramento das proteínas que estão sendo produzidas. Devido a isso, após a adição do indutor IPTG, as linhagens BL21(DE3)CodonPlusRP e BL21(DE3)Rosetta foram submetidas a duas temperaturas distintas (28°C e 37°C) e a linhagem Arctic Express<sup>TM</sup> (DE3)RILfoi mantida a 11°C. O lisado celular das cepas de expressão foi analisadopor SDS-PAGE (Figura 38).



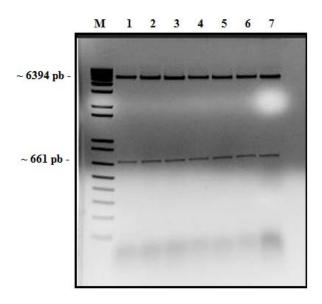
**Figura 38**:Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas totais obtidas após lise celular. As cepas foram induzidas com IPTG a fim de expressar NtCDKG;2\_GST. **R**: expressão na cepa *BL21(DE3)Rosetta* nas respectivas temperaturas de indução de 37°C e 28°C; **CP**: expressão na cepa *BL21(DE3)CodonPlusRP* nas temperaturas de indução 37°C e 28°C; **AE**: lisado proteico relativo à expressão na cepa *Arctic Express* (*DE3)RIL* à temperatura de indução de 11°C; **P**: Precipitado - corresponde à fração das proteínas não solúveis; **S**: Sobrenadante - corresponde à fração solúvel. **M**: Marcador de peso molecular LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare). A proteína recombinante NtCDKG; 2 com cauda de GST possui um tamanho esperado de, aproximadamente, 102 kDa. As setas indicam a possível expressão da proteína recombinante.

A banda esperada, correspondente à proteína recombinante NtCDKG;2 com caudade GST, tem, aproximadamente, 102 kDa. Uma banda situada acima da banda de 94 kDa do marcador de peso molecular pode ser visualizada nas frações do precipitado de todas as cepas e temperaturas de expressão, conforme as indicações das setas. Para confirmação de que essa banda corresponde à proteína recombinante foi feito um *Western blot*. Neste experimento foi usado o anticorpo primário anti-GST, o qual produziu muitas marcações inespecíficas. Portanto, os resultados foram inconclusivos e necessitam de ajustes na quantidade do anticorpo primário e,

até mesmo, testes em sua efetividade de reconhecimento através de novos ensaios de expressão com outras proteínas recombinantes.

## 4.11.2. Produção da proteína recombinante NtCDKG;2-HIS

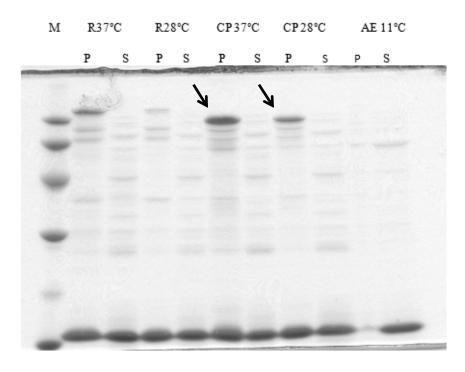
A construção NtCDKG;2 contida no vetor de entrada do sistema *Gateway*também foi recombinada com o plasmídeo pDEST17, o qual permitea expressãoda proteína de interesse em fusão N-terminal com seis resíduos de Histidina. Após o plasmídeo de expressão ser eletroporado em células de *E. coli* da cepa DH10B, foram feitas mini-preparações de DNA plasmidial das bactérias, as quais foram submetidas à digestão com a enzima EcoRI (Figura 39) e eram esperados fragmentos de 6394 pb e 661 pb.



**Figura 39**: Eletroforese em gel de agarose das mini-preparações de DNA plasmidial digeridas pela enzima de restrição EcoRI. Foram obtidos padrões de bandas de, aproximadamente,6394 **pbe 661 pb**, conforme esperado. **M**: Marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder - Invitrogen); **1 a 7**: amostras de DNA plasmidial digerido com enzima de restrição.

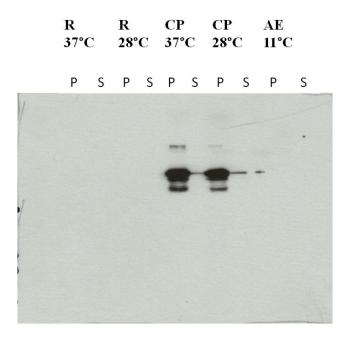
Após as confirmação por digestão, a amostra 1 foi tratada com RNase, limpa com fenol/clorofórmio e quantificada (310 ng/μl) e recebeu o nome de pEXP17–NtCDKG;2 (plasmídeo de expressão de NtCDKG;2 com cauda de histidina). A seguir, o DNA da amostra

foi eletroporado em células de *E. coli* das 3 linhagens selecionadas para expressão[*BL21(DE3)CodonPlusRP*, *BL21(DE3)Rosetta e Arctic Express*<sup>TM</sup> (*DE3)RIL*]. Depois de transformadas, induziu-se a expressão da proteína recombinante NtCDKG;2, com cauda de histidina,pela adição de IPTG, conforme descrito no item 3.19.1. A Figura 40 apresenta o padrão de proteínas obtido após SDS-PAGE de lisado celular.



**Figura 40**:Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas totais dos lisados celulares. As cepas foram induzidas a fim de expressar NtCDKG;2\_His. **R**: expressão na cepa *BL21(DE3)Rosetta*,nas respectivas temperaturas de indução de 37°C e 28°C; **CP**: expressão na cepa *BL21(DE3)CodonPlusRP*,nas temperaturas de indução 37°C e 28°C; **AE**: lisado proteico relativo à expressão na cepa *Arctic Express*<sup>TM</sup> (*DE3)RIL* à temperatura de indução de 11°C; **P**: Precipitado - corresponde à fração das proteínas não solúveis; **S**: Sobrenadante - corresponde à fração solúvel. **M**: Marcador de peso molecular LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare). A proteína recombinante NtCDKG;2 com cauda de histidina possui um tamanho esperado de, aproximadamente, 79,3 kDa. As setas indicam a possível expressão da proteína recombinante.

A banda esperada, correspondente à proteína recombinante NtCDKG;2 com cauda de histidina (NtCDKG;2-His), tem, aproximadamente,79,3 kDa.Bandasmais proeminentes (indicadas pelas setas) podem ser visualizadas entre as bandas 66kDa e 94 kDa do marcador de peso molecular, nas canaletas correspondentes ao precipitado do lisado celular de *BL21(DE3)CodonPlusRP*, nas duas temperaturas de indução. O *Western blot* (Figura 41), utilizando o anticorpo anti-His, confirma que estas bandas correspondem à proteína recombinante NtCDKG;2-His.Houve reconhecimento da proteína heteróloga, com o tamanho esperado, no precipitadoe na fração solúveldo lisado celular de *BL21(DE3)CodonPlusRP*, com expressão induzida nas duas temperaturas (28°C e 37°C). Analisando os padrões de migração do marcador,pode ser observado que a proteína reconhecida pelo anticorpo anti-His possui um tamanho entre 70 e 100 kDa, correspondente ao tamanho da proteína recombinante NtCDKG;2\_His, a qual deve possuir, aproximadamente, 79,3 kDa.



**Figura 41**: *Western Blot* de proteínas expressas nas diferentes cepas bacterianas. As cepas foram induzidas a fim de expressar NtCDKG;2\_His. **R**: expressão na cepa *BL21(DE3)Rosetta* nas respectivas temperaturas de indução de 37°C e 28°C; **CP**: expressão na cepa *BL21(DE3)CodonPlusRP* nas temperaturas de indução 37°C e 28°C; **AE**: lisado proteico relativo à expressão na cepa *Arctic Express* (*DE3)RIL* à temperatura de indução de 11°C; **P**: Precipitado- corresponde à fração das proteínas não solúveis; **S**: Sobrenadante - corresponde à fração solúvel.

A expressão da proteínaNtCDKG;2 ocorreu com maior eficiência na cepa *BL21(DE3)CodonPlusRP*, a qual possui tRNAs para os códons raros dos aminoácidos arginina e prolina. A obtenção da proteína NtCDKG;2 com cauda de histidina solúvel fornece uma importante ferramenta para estudos posteriores. Essa proteína recombinante poderá ser expressa em maior escala e utilizada para fazer ensaios de interação com outras proteínas, como *pull down*. Além disso, anticorpos podem ser desenvolvidos a partir da proteína purificada para serem utilizados em ensaios como a imunoprecipitação. Esses ensaios permitirão uma melhor caracterização da proteína NtCDKG;2, bem como um possível estabelecimento de sua função no ciclo celular de *N. tabacum*.

# 4.12. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É relatado que CDKs como CDKA, CDKB2;1, as CDKCs, CDKD;2, CDKD;3, CDKE, CDKF, além das CDKGs possuem expressão em todos os tecidos analisados de A. thaliana (Menges et al., 2005). Devido a NtCDKG;2 possuir uma expressão em todos órgãos analisados de N. tabacum, acredita-se que ela esteja envolvida na regulação do ciclo celular na planta inteira. Entretanto, os estudos realizados no presente trabalho tiveram como foco o estudo do desenvolvimento do pistilo de N. tabacum, em especial das estruturas estigma e estilete, e o envolvimento da NtCDKG; 2 no desenvolvimento desse importante órgão floral. Para tanto, as análises de quantificação dos transcritos e caracterização da expressão de NtCDKG;2 mostram que esse gene possui aumento de seu nível de expressão, em estigmas/estiletes, nos estádios imediatamente anteriores à antese (10 e 11). Os resultados sugerem que, apesar de NtCDKG;2 possuir expressão ubíqua nos diferentes órgãos, sua proteína pode possuir considerável importância no desenvolvimento dos estigmas/estiletes, especialmente nos estádios mais tardios de desenvolvimento floral emN. tabacum. Somando-se às análises de expressão, foram feitos estudos de localização subcelular da proteína NtCDKG;2 fusionada à proteína repórter GFP, em células epiteliais foliares de N. tabacum. Enquanto algumas CDKs possuem padrão de localização nuclear e citoplasmático, como CDKA;1, CDKB1;1, CDKB1;2, CDKB2;1, CDKB2;2, CDKF;1, outras possuem localização exclusivamente nuclear, como CDKC2, CDKD;1, CDKD;2, CDKD;3, CDKE;1 (Kitsios et al., 2008; Boruc et al., 2010b). Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a proteína NtCDKG;2 é localizada, exclusivamente, no

núcleo das células epiteliais. Adicionalmente, cabe lembrar que SCI1, parceiro de interação e putativo inibidor da NtCDKG;2, possui tecido-especificidade, com transcrição altamente preferencial nos estigmas/estiletes, em especial na zona secretória do estigma e no tecido transmissor do estilete. Além disso, assim como NtCDKG;2, SCI1 possui localização nuclear em células de *N. tabacum* (DePaoli *et al.*, 2011).

Estudos de expressão de CDKG;2, realizados por Menges et al.(2005), em culturas de células de A. thaliana, mostraram que esse gene atinge um pico máximo de expressão durante osgap0/gap1. No entanto, sua expressão não varia muito entre as diferentes fases do ciclo celular quando comparada à expressão de outras proteínas de ciclo celular avaliadas. Essas análises demonstram que as CDKGs são reguladas transcricionalmente, porém, possuem um nível basal de expressão durante o ciclo celular, sugerindo que CDKG;2 seja importante, principalmente, antes da síntese do DNA. Dados recentemente publicados de interações proteicas em A. thaliana mostram a interação entre a CDKG;2 e a CDKF;1 (Van Leene et al., 2010). É reportado, também pela literatura, que CDKF;1, além de fosforilar outras quinasescomo a CDKD (Shimotohno et al., 2004), fosforila o domínio CTD da RNA polimerase II (Hajheidari et al., 2012) e, portanto, afeta a interação do complexo de transcrição com enzimas implicadas no processamento do mRNA. O domínio CTD constitui-se na repetição de uma sequência heptapeptídica (YSPTSPS) (Morin & Storey, 2006). Através das sequenciais fosforilação/defosforilação nos resíduos de aminoácidos desse domínio, as modificações resultantes na arquitetura da proteína permitem o reconhecimento e ligação por diferentes fatores de transcrição durante as fases da transcrição e processamento simultâneo do mRNA (Zorio & Bentley, 2004).

Em síntese, somando-se os dados apresentados neste trabalho aos experimentos reportados pela literatura, sugere-se que NtCDKG;2 possa estar envolvida na regulação do ciclo celular dos tecidos especializados dos estigmas/estiletes de *N. tabacum*. Esta regulação poderia acontecer de duas formas hipotéticas:

1- A primeira possibilidade seria a CDKF fosforilar a NtCDKG;2 do complexo CDK/ciclina, tornando-a funcional e capaz de fosforilar e ativar uma proteína-chave que acionaria o ciclo celular. Da mesma forma, nas células especializadas do pistilo, SCI1 inibiria a divisão celular ao inibir NtCDKG;2.

2- Na segunda hipótese, a quinase NtCDKG;2 seria uma CDK ativadora de quinases (CAK) e, ao se complexar com uma ciclina, fosforilaria a CDKF que, por sua vez, torna-se-ia ativa e fosforilaria o domínio CTD da RNA polimerase II, tornando a RNA polimerase funcional e desencadeando os processos de transcrição e processamento simultâneo de mRNAs cujas proteínas, por eles codificadas (ou até mesmo os próprios mRNAs), seriam responsáveis por regular e permitir a síntese de DNA e, consequente, entrada no ciclo celular nesses tecidos. Em estigmas/estiletes, SCI1 inibiria o processo de divisão celular ao interagir com NtCDKG;2, inibindo sua ação.

Para testar estas hipóteses, são necessários experimentos para detectar as proteínas parceiras de interação com NtCDKG;2, como *yeast two hybrid*, por exemplo. A partir disso, se for confirmada a interação entre NtCDKG;2 e a putativa CDKF de *N. tabacum*, serão necessários ensaios de fosforilação entre ambas.

Com base na formação de complexos entre a CDKG e o *SR-like splicing domain* da CYCL1 de Arabidopsis, Van Leene *et al.* (2010) sugeriram que esta proteína tenha uma função na transcrição e processamento de transcritos. As plantas transgênicas de *N. tabacum*, desenvolvidas com superexpressão de NtCDKG;2 e silenciamento por RNAi, poderão ser utilizadas para testar esta hipótese e verificar se a transcrição e processamento de transcritos estão alterados nestas plantas, em comparação com as plantas selvagens.

Adicionalmente, análises de microscopia do pistilo com avaliação do número de células e tamanho das células também poderão ser realizadas a fim de verificar se há diferença (não detectada a nível macroscópico) entre as plantas selvagens e transgênicas. Além disso, as sementes geradas a partir das polinizações controladas podem ser utilizadas para o cultivo de uma geração F2 homozigota para a transgenia, análise de fenótipo e avaliação dos níveis de transcritos de genes importantes para a regulação do ciclo celular e parceiros de interação de NtCDKG;2.

# 5. CONCLUSÕES

Durante o presente trabalho, o gene *N. tabacum* CDKG;2 (NtCDKG;2) e sua respectiva proteína, que interage com SCI1, foram caracterizados. Os experimentos realizados permitiram alcançar as seguintes conclusões:

- 1 A sequência codificadora de NtCDKG;2 foi amplificada a partir de cDNAs de estigma/estilete de *N. tabacum* e clonada, com sucesso, em plasmídeos intermediários e de expressão.
- 2 Foi realizado o sequenciamento completo da região codificadora de NtCDKG;2, confirmando a identidade com a CDKG;2 de *A. thaliana*.
- 3 A expressão do geneNtCDKG;2 foi avaliada, por qRT-PCR, em diferentes órgãos de *N. tabacum*. Os resultados obtidos permitem afirmar que o gene NtCDKG;2 é expresso em todos órgãos vegetativos e reprodutivos analisados.
- 4 A expressão do gene NtCDKG;2 foi avaliada, por qRT-PCR, em estigmas/estiletes de diferentes estádios do desenvolvimento floral de *N. tabacum*. Foi verificado que o gene NtCDKG;2 é expresso em todos os 12 estádios de desenvolvimento floral, porém é regulado durante o desenvolvimento, com um aumento significativo da expressão em estádios tardios e anteriores à antese.
- 5 A expressão do gene NtCDKG;2 também foi analisada em estigmas/estiletes de 3 plantas transgênicas STIG1<sub>prom</sub>::iaaM, com aumento dos níveis de auxina no pistilo. Os resultados obtidos sugerem que o hormônio auxina regula, em nível de transcrição, a expressão deNtCDKG;2 nas células do estigma/estilete.
- 6 Através de análises de microscopia de fluorescência da proteína NtCDKG;2 em fusão com a proteína repórter GFP, pode-se verificar a localização dessa quinase no núcleo das células de *N.tabacum*.
- 7 Foram geradas, com sucesso, plantas transgênicas com superexpressão de NtCDKG;2 e, também, plantas transgênicas com silenciamento de NtCDKG;2, mediado por RNAi. Todas as 13 plantas de superexpressão analisadas apresentaram níveis aumentados de transcritos do gene NtCDKG;2, sendo que 12 plantas possuíam até três vezes mais transcritos quando comparados às plantas selvagens. Foi verificado um aumento de dez vezes no número de transcritos de NtCDKG;2 na planta 9.2.

- 8 Foram geradas, com sucesso, plantas transgênicas com silenciamento de NtCDKG;2, mediado por RNAi. As 13 plantas de RNAi, que tiveram os níveis de transcritos do gene NtCDKG;2 mensurados, possuíam, no máximo, 50% desses transcritos, quando comparados à planta selvagem. Foi verificado que a planta 54A possui apenas 14% dos transcritos NtCDKG;2 comparada à selvagem.
- 9 Não foram evidenciadas alterações fenotípicas morfológicas nas plantas transgênicas de superexpressão ou silenciamento, quando comparadas a plantas selvagens de *N. tabacum*.
- 10 A proteína recombinante NtCDKG;2 com *tag* de histidina foi produzida, com sucesso, na cepa *BL21(DE3)CodonPlusRP* de *E. coli*.

Todos os objetivos propostos nesse trabalho foram alcançados e alguns experimentos adicionais foram realizados, no intuito de compreender o papel de NtCDKG;2 no desenvolvimento do pistilo.

# 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, S. U., BUECHEL, S., ZHAO,Z.; LJUNG, K., NOVÁK, O., BUSCH, W., SCHUSTER, C., LOHMANNA, J. U. (2008) Requirement of B2-type cyclin-dependent kinases for meristem integrity in *Arabidopsis thaliana*. *PlantCell* 20: 88–100.
- BANERJEE, T., CHAKRAVARTI, D. (2011). **A Peek into the Complex Realm of Histone Phosphorylation.** *Molecular and Cellular Biology* 31: 4858–4873.
- BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (1998). **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Editora Embrapa Produção de Informação. Brasília.
- BECRAFT, P. W. (2002). **Receptor kinase signaling in plant development**. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18: 163–92.
- BORUC, J., VAN DEN DAELE, H., HOLLUNDER, J., ROMBAUTS, S., MYLLE, E., HILSON, P., INZÉ, D., DE VEYLDER, L., RUSSINOVA, E. (2010a). Functional Modules in the Arabidopsis Core Cell Cycle Binary Protein–Protein Interaction Network. *Plant Cell* 22: 1264–1280.
- BORUC, J.; MYLLE, E.; DUDA, M.; DE CLARCQ, R.; ROMBAUTS, S.; GEELEN, D.; HILSON, P.; INZÉ, D.; VAN DAMME, D.; RUSSINOVA, E. (2010b). Systematic localization of the Arabidopsis core cell cycle proteins reveals novel cell division complexes. *Plant Physiology* 152: 553-565.
- BOUDOLF, V., BARRÔCO, R., ENGLER, J. A., VERKEST, A., BEECKMAN, T., NAUDT, M., INZÉ, D., DE VEYLDER, L. (2004). **B1-type cyclin-dependent kinases are essential for the formation of stomatal complexes in** *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16: 945–955.
- CHAMPION, A. KREIS, M. MOCKAITIS, K. PICAUD, A. HENRY, Y. (2004). **Arabidopsis kinome: after the casting**. *Functional & Integrative genomics* 4: 163–187.
- 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.
- CHO, H. J., KWON, H. K., WANG, M. H. (2010). Expression of Kip-related protein 4 gene (KRP4) in response to auxin and cytokinin during growth of Arabidopsis thaliana. BMB Rep 43:273-278.

- COHEN, S. N., CHANG, A. C., BOYER, H.W., HELLING, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci* 70: 3240–3244.
- DARDICK C, CHEN J, RICHTER T, OUYANG S, RONALD P. (2007). The rice kinase database. A phylogenomic database for the rice kinome. *Plant Physiology* 143: 579–586.
- 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. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 104p.
- DEPAOLI, H. C. (2010). **SCI1, um novo inibidor tecido-específico da proliferação celular relacionado à sinalização por auxina.** Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 108p.
- 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. *The New phytologist*, 190(4): 82-95.
- DEPAOLI, H. C., GOLDMAN, G. H, GOLDMAN, M. H S. (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* 7:1–6.
- DE VEYLDER L., BEECKMAN T., INZÉ D. (2007). **The ins and outs of the plant cell cycle**. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:655-665.
- DEWITTE, W., MURRAY, J. A. (2003). The plant cell cycle. Annu Rev Plant Biol. 54:235-64.
- DISSMEYER, N., NOWACK, M. K., PUSCH, S., STALS, H., INZÉ, D., GRINI, P. E., SCHNITTGER, A. (2007). **T-loop phosphorylation of Arabidopsis CDKA;1** is required for its function and can be partially substituted by an aspartate residue. *Plant Cell* 19: 972–985.
- DOONAN, J. H., KITSIOS, G. (2009). **Functional Evolution of Cyclin-Dependent Kinases**. *Mol Biotechnol*. 42: 14–29.
- DUDITS, D., ÁBRAHÁM, E., MISKOLCZI, P., AYAYDIN, F., BILGIN, M., HORVÁTH, G. V. (2011) Cell-cycle control as a target for calcium, hormonal and developmental

- signals: the role of phosphorylation in the retinoblastoma-centred pathway. *Annals of Botany* 107: 1193–1202.
- 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.
- ESAU, K. (1997). **Anatomia das Plantas com Sementes**. *Editora Edgard Blucher Ltda*. 13<sup>a</sup> reimpressão. São Paulo.
- FÜLÖP, K., PETTKÓ-SZANDTNER, A., MAGYAR, Z., MISKOLCZI, P., KONDOROSI, E., DUDITS, D., BAKÓ, L. (2005). The Medicago CDKC;1–CYCLINT;1 kinase complex phosphorylates the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and promotes transcription. *Plant J.* 42: 810–820.
- GOLDMAN, M.H.S; GOLDMAN, R.B.; MARIANI, C. (1994). Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. *EMBO Journal* 13: 2976 –2984.
- GUILFOYLE, T. J. & HAGEN, G. (2007). Auxin response factors. Curr. Opin. Plant Biol 10:453–460
- GUO, J., SONG, J., WANG, F., ZHANG, X. S. (2007). **Genome-wide identification and expression analysis of rice cell cycle genes**. *Plant Mol Biol* 64(4): 349-60.
- HAJHEIDARI, M., FARRONA S., HUETTEL B., KONCZ Z., KONCZ C. (2012). CDKF;1 and CDKD protein kinases regulate phosphorylation of serine residues in the Cterminal domain of Arabidopsis RNA polymerase II. *Plant Cell* 24: 1626-42.
- HAMILTON, A., VOINNET, O., CHAPPEL, L., BAULCOMBE, D., 2002. **Two Classes of short interfering RNA in RNA silencing**. The EMBO Journal 21: 4671-4679.
- HARASHIMA, H., SHINMYO, A., SEKINE, M. (2007) Phosphorylation of threonine 161 in plant cyclin-dependent kinase A is required for cell division by activation of its associated kinase. *Plant J.* 52: 435–448.
- HARTWELL, L. H., CULOTTI, J., PRINGLE, J. R., REID, B. J. (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science*, 183: 46–51.
- HELLIWELL, C.; WATERHOUSE, P. (2003). Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods* 30: 289–295.
- HEMERLY, A., DE ALMEIDA ENGLER, J., BERGOUNIOUX, C., VAN MONTAGU, M., ENGLER, G., INZÉ, D., FERREIRA, P. (1995). **Dominant negative mutants of the**

- CDC2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *EMBOJ*. 14: 3925-3936.
- HINDLEY, J., PHEAR, G. A. (1984). Sequence of the cell division gene CDC2 from *Schizosaccharomyces pombe*; patterns of splicing and homology to protein kinases. *Gene* 31: 129–134.
- HU, D., MAYEDA, A., TREMBLEY, J. H., LAHTI, J. M., & KIDD, V. J. (2003). **CDK11** complexes promote pre-mRNA splicing. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 8623–8629.
- HUANG, B. Q., RUSSEL, S. D. (1992). Synergid degeneration in Nicotiana: a quantitative, fluorochromatic and chlorotetracycline study. Sex. Plant Reprod. 5: 151-155.
- HUNTER, T. (1998). The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 353:583-605.
- INZÉ, D., DE VEYLDER, L. (2006). **Cell Cycle Regulation in Plant Development**. *Annu. Rev. Genet*. 40: 77-105.
- INZÉ, D. (2007). **The cell cycle control and plant development**. Oxford, UK; Ames, Iowa: Blackwell Pub. XV, 364 p.
- JEFFREY, P. D., RUSSO, A.A., POLYAK, K., GIBBS, E. HURWITZ, J., MASSAGUÉ, J., PAVLETICH, N. P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376: 313-20.
- JOUBÈS, J., CHEVALIER, C., DUDITS, D., HEBERLE-BORS, E., INZÉ, D., UMEDA, M., RENAUDIN, J.P. (2000). **CDK-related protein kinases in plants**. *Plant Mol Biol*. 43:607-20.
- KITSIOS, G., ALEXIOU, K. G., BUSH, M., SHAW, P., DOONAN, J. H. (2008). A cyclin-dependent protein kinase, CDKC2, colocalizes with and modulates the distribution of spliceosomal components in Arabidopsis. *Plant J.* 54: 220–235.
- 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. *Plant Cell* 2: 1201-1224.
- LORD, E. M. (2003). Adhesion and guidance in compatible pollination. *Journal of Experimental Botany* 54: 47-54.

- LORKOVIC, Z. J., BARTA, A. (2004). Compartmentalization of the splicing machinery in plant cell nuclei. *Trends Plant Sci.* 9: 565-568.
- LOYER, P., TREMBLEY, J. H., LAHTI, J. M., & KIDD, V. J. (1998). The RNP protein, RNPS1, associates with specific isoforms of the p34cdc2-related PITSLRE protein kinase in vivo. *Journal of Cell Science*, 111:1495–1506.
- 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*, 283:7721–7732.
- MAUSETH, J. D. (2009). **Botany: An Introduction to Plant Biology**. 4 ed. *University of Texas*, Austin, Texas.
- MENGES, M., JAGER, S. M., GRUISSEM, W., MURRAY, J. 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.
- MEWS, M., SEK, F.J., VOLKMANN, D., JOHN, P.C.L. (2000). Immunodetection of four mitotic cyclins and the Cdc2a protein kinase in the maize root: their distribution in cell development and dedifferentiation. *Protoplasma*212: 236- 249. BAIXAR REF!
- MORGAN, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors.

  Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 13: 261–291.
- MORIN, P. J.; STOREY, K. B. (2006). Evidence for a reduced transcriptional state during hibernation in ground squirrels. *Cryobiology* 53: 310–318.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- NASMYTH, K. A., REED, S. I. (1980). Isolation of genes by complementation in yeast:

  Molecular cloning of a cell-cycle gene. Proceedings of the National Academy of
  Sciences of the United States of America. 77: 2119–2123.
- NURSE, P., THURIAUX, P. (1980). Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 96: 627–637.
- PFAFFL, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*29(9): 45.

- PORCEDDU, A., STALS, H., REICHHELD, J., SEGERS, G., DE VEYLDER, L., BARRÔCO, R.D., CASTEELS, P., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D., MIRONOV, V. (2001). A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G2/M progression in plants. *J. Biol. Chem.* 276: 36354-36360.
- ROSSIGNOL, M., KOLB-CHEYNEL, I., AND EGLY, J. M. (1997) Substrate specificity of the cdk-activating kinase (CAK) is altered upon association with TFIIH. *EMBO J* 16: 1628 –1637.
- ROUDIER, F., FEDOROVA, E., LEBRIS, M., LECOMTE, P., GYORGYEY, J., VAUBERT, D., HORVATH, G., ABAD, P., KONDOROSI, A., KONDOROSI, E. (2003). The Medicago species A2-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for endoreduplication-associated developmental programs. *Plant Physiol* 131:1091–1103.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989). **Molecular Clonning**. 2<sup>a</sup>. Edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Estados Unidos.
- SANCHEZ, A. M.; BOSCH, M.; BOTS, M.; NIEUWLAND, J.; FERON, R.; MARIANI, C. (2004). **Pistil Factors Controlling Pollination**. *The Plant Cell* 16: 98–106.
- 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. *PlantMethods*. 2: 15
- SHIMOTOHNO,A., UMEDA-HARA, C., BISOVA,K., UCHIMIYA, K., UMEDA, M. (2004). The plant specific kinase CDKF;1 is involved in activating phosphorylation in cyclin-dependent kinase activating kinases in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 2954–2966.
- SHIMOTOHNO, A., OHNO,R., BISOVA, K., SAKAGUCHI, N., HUANG, J., KONCZ, C., UCHIMIYA, H., UMEDA, M. (2006). **Diverse phosphoregulatory mechanisms controlling cyclin-dependent kinase-activating kinases in Arabidopsis**. *Plant J.* 47: 701–710.
- SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J. (2008). **Fundamentos de Genética**. 4ª edição, Capítulo 12. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro RJ.
- SORENSEN, H. P. (2010). Towards universal systems for recombinant gene expression.

  Microb. Cell Fact 9: 27.

- STACHEL, S.E.; MESSENS, E.; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSKI, P. (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate TDNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318: 624–629.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. (2010). Fisiologia Vegetal. 5 ed., Artmed. Porto Alegre.
- TANK, J. G., THAKER V. S. (2011). Cyclin dependent kinases and their role in regulation of plant cell cycle. Biologia Plantarum 55: 201-212.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. 260/280 and 260/230 Ratios. T009 **TECHNICAL BULLETIN.** NanoDrop 1000 & 8000. URL: http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf. Último acesso em 11/05/2012.
- TILLEMANS, V., DISPA, L., REMACLE, C., COLLINGE, M., MOTTE, P. (2005). Functional distribution and dynamics of Arabidopsis SR splicing factors in living plant cells. *Plant J.* 41: 567–582.
- TREMBLEY, J. H., LOYER, P., HU, D., LI, T., GRENET, J., LAHTI, J. M., KIDD, V. J. (2004). Cyclin dependent kinase 11 in RNAtranscription and splicing. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 77: 263–288.
- TOLEDO-FILHO, L. A. A. (2012). Expressão do gene iaaM de Agrobacterium tumefaciens no estigma de Nicotiana tabacum: efeitos de níveis aumentados de auxina no desenvolvimento do pistilo. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 115p.
- UMEDA, M., SHIMOTOHNO, A., YAMAGUCHI, M. (2005). Control of Cell Division and Transcription by Cyclin-dependent Kinase activating Kinases in Plants. *Plant Cell Physiol*. 46(9): 1437–1442.
- VAN LEENE, J., STALS, H., EECKHOUT, D., PERSIAU, G., VAN DE SLIJKE, E., VAN ISTERDAEL, G., DE CLERCQ, A., BONNET, E., LAUKENS, K., REMMERIE, N., HENDERICKX, K., DE VIJLDER, T., ABDELKRIM, A., PHARAZYN, A., VAN ONCKELEN, H., INZÉ, D., WITTERS, E., DE JAEGER, G. (2007). A tandem affinity purification-based technology platform to study the cell cycle interactome in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Proteomics* 6: 1226–1238.
- VAN LEENE, J., HOLLUNDER, J., EECKHOUT, D., PERSIAU, G., VAN DE SLIJKE, E., STALS, H., VAN ISTERDAEL, G., VERKEST, A., NEIRYNCK, S., BUFFEL, Y., DE

- 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., 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*. *Mol Systems Biol* 6: 397.
- VANDEPOELE K., RAES J., VEYLDER, L., ROUZÉ, P., ROMBAUTS, S., INZÉ, D. (2002). Genome-Wide Analysis of Core Cell Cycle Genes in Arabidopsis. *The Plant Cell* 14: 903–916.
- WANG, W., CHEN, X. (2004). **HUA ENHANCER3 reveals a role for a cyclin-dependent** protein kinase in the specification of floral organ identity in Arabidopsis.

  \*Development 131: 3147–3156.
- WOLTERS-ARTS, M., LUSH, W.M., MARIANI, C. (1998). Lipids are required for directional pollen-tube growth. *Nature* 392: 818–821.
- ZHAO Y (2010) AuxinBiosynthesis and its Role in Plant Development. Annu. Rev. Plant Biol 61:49–64.
- ZORIO, D. A. R; BENTLEY, D. L. (2004). The link between mRNA processing and transcription: communication works both ways. Experimental Cell Research 296: 91–97.

### **ANEXOS**

## **ANEXO I**

Sequência de aminoácidos da CDK10/11 de *Ricinus communis* identificada pelo *Mascot*. Em <u>negrito e sublinhado</u> estão identificados os aminoácidos reconhecidos pelo espectrômetro de massa.

MAAGGIDVSRRRSNNCYSNNHLDRYKNGTHHLVYNKNGHHYCSSSRSFSFKRDGISCRDEEKEL
GEIEAGYGLDRLEDGEIPVCEDGIK
LHLERKRKFSPIIWDVEDNLSLKKKALSNFSKLSPPGAC
GHGLNNVTDAVVAKDTVPAGLEHTADKASGTGGSLGASGSESKSPVIASPSCQEKNGNDDQEKG
QREEEEGFPEARNISMSRWASDSDSPRDASFSDDEGSPGETVYRKDSSTRILGGNRLTPTGSIG
RDCSAGSSRGDEDFGNQSENGDLMDVDQTRDVIHDVNQMDDSCCQAEEPIAATQRSVDMLEGCR
SVYEFERLHEINEGTYGKVYKALDKKTGKPVALKKVKMDVGRDRNLEEYGFPITSLREINILLS
FHHPSIVNVREVVVGGLDSVFMVMEYMEHDLKGFMQVRKQPFSTSEVKCLMLQLLEGVKYLHDN
WVLHRDLKTSNLLLNNEGDLKICDFGMSRQYGSPLKSYTSLVVTLWYRAPELLLGAKQYSTAID
MWSVGCIMAELLSKEPLFKGKSEIDQLAKIFGVLGTPSEKIWPGFSNLPGAKANFVKQPYNLLR
KKFPATFFTGSPVLSDLGLDLLNKLLTYDPEKRLTAEDALNHAWFREVPLPTSKEFMPTLPPQY
AKNR

### **ANEXO II**

Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da CDK10/11 e de TC113039 (identificada por análise de similaridade no DFCI) de N. tabacum. As sequênciasapresentaram 74% de identidade e 81% de similaridade.

```
>tobacco | TC113039 similar to UniRef100_A7QBS4 Cluster: Chromosome chr1
scaffold_75, whole genome shotgun sequence; n=1; Vitis
            vinifera | Rep: Chromosome chr1 scaffold_75, whole genome shotgun
sequence - Vitis vinifera (Grape), partial (35%)
        Length = 1197
Score = 941 (336.3 bits), Expect = 1.5e-94, P = 1.5e-94
Identities = 177/239 (74%), Positives = 195/239 (81%), Frame = +1
         406 MVMEYMEHDLKGFMQVRKQPFSTSEVKCLMLQLLEGVKYLHDNWVLHRDLKTSNLLLNNE 465
             MVMEYMEHDLK M+ KQ F+ SEVKCLMLQLLEGVKYLHDNWVLHRDLKTSNLLLNN+
           1 MVMEYMEHDLKALMETMKQRFTQSEVKCLMLQLLEGVKYLHDNWVLHRDLKTSNLLLNNQ 180
Sbjct:
         466 GDLKICDFGMSRQYGSPLKSYTSLVVTLWYRAPELLLGAKQYSTAIDMWSVGCIMAELLS 525
Query:
             G+LKICDFG++ROYGSPLK+YT LVVTLWYR PELLLGAKOYSTAIDMWS+GCIMAELL
Sbjct:
         181 GELKICDFGLARQYGSPLKTYTQLVVTLWYRTPELLLGAKQYSTAIDMWSLGCIMAELLR 360
Query:
         526 KEPLFKGKSEIDQLAKIFGVLGTPSEKIWPGFSNLPGAKANFVKQPYNLLRKKFPATFFT 585
             KEPLF GKSE+DQL KIF +LGTP+E IWPGFS LPG K NFVK YNLLRK+FPAT F
         361 \ \textbf{K} \texttt{EPLFNGKSEVDQLNKIFRILGTPNETIWPGFSKLPGVKVNFVKHKYNLLRKEFPATSFM} \ 540
Sbjct:
Query:
         586 GSPVXXXXXXXXXXXXXXPEKRLTAEDALNHAWFREVPLPTSKEFMPTLPPQYAKNR 644
                                 P++R+TAE ALNH WFREVPLP SKEFMPT P O+A++R
Sbjct:
         541 -EPGLSDAGFDLLNKLLTYDPDORITAEAALNHEWFREVPLPKSKEFMPTFPAQHAQDR 714
```

# **ANEXO III**

Alinhamento entre as sequências TC113039 (query - DFCI) e SGN-U423624 (subject - identificada pelo SOL)de N. tabacum. Pode ser observado que a sequência TC113039 possui 99% de identidade com a porção 3' da sequência SGN-U423624.

```
>1c1|14769
Length=2597
Score = 2204 \text{ bits } (1193), Expect = 0.0
Identities = 1196/1197 (99\%), Gaps = 1/1197 (0\%)
Strand=Plus/Plus
Ouery 1
         ATGGTGATGGAATACATGGAGCATGACCTGAAGGCGTTAATGGAGACAATGAAACAACGA
          1402
         ATGGTGATGGAATACATGGAGCATGACCTGAAGGCGTTAATGGAGACAATGAAACAACGA
                                                        1461
Sbjct
         TTTACCCAAAGTGAAGTCAAATGCCTTATGCTCCAGCTTTTGGAGGGTGTCAAGTATCTT
                                                        120
Query
     61
         Sbjct
     1462
         TTTACCCAAAGTGAAGTCAAATGCCTTATGCTCCAGCTTTTTGGAGGGTGTCAAGTATCTT
                                                        1521
Ouerv
     121
         CATGATAACTGGGTGCTTCACCGAGATCTGAAGACTTCAAATTTACTTTTAAATAACCAA
          Sbjct
     1522
         CATGATAACTGGGTGCTTCACCGAGATCTGAAGACTTCAAATTTACTTTTAAATAACCAA
                                                        1581
         GGTGAGTTGAAGATTTGTGACTTTGGATTGGCTCGTCAATATGGGAGCCCCCTGAAAACG
     181
                                                        240
Query
         Sbjct
     1582
         GGTGAGTTGAAGATTTGTGACTTTGGATTGGCTCGTCAATATGGGAGCCCCCTGAAAACG
                                                        1641
     241
         TATACTCAATTGGTGGTTACTTTGTGGTACAGGACACCTGAACTTCTTTTGGGAGCGAAA
                                                        300
Query
         1642
                                                        1701
Sbjct
         TATACTCAATTGGTGGTTACTTTGTGGTACAGGACACCTGAACTTCTTTTGGGAGCGAAA
     301
         CAATATTCCACTGCTATTGACATGTGGTCATTGGGTTGTATCATGGCTGAATTGCTGAGG
                                                        360
Ouery
         Sbjct
     1702
         CAATATTCCACTGCTATTGACATGTGGTCATTGGGTTGTATCATGGCTGAATTGCTGAGG
                                                        1761
     361
         AAAGAACCGCTTTTCAATGGGAAATCAGAAGTTGATCAACTTAACAAGATTTTCAGAATC
                                                        420
Query
          1762
         AAAGAACCGCTTTTCAATGGGAAATCAGAAGTTGATCAACTTAACAAGATTTTCAGAATC
                                                        1821
Sbjct
Ouerv
     421
         \tt CTTGGCACCCCAAATGAGACGATATGGCCGGGATTTTCCAAACTCCCTGGGGTGAAAGTC
         1881
         \tt CTTGGCACCCCAAATGAGACGATATGGCCGGGATTTTCCAAACTCCCTGGGGTGAAAGTC
Sbjct
     1822
Ouery
     481
         AACTTTGTAAAGCATAAGTATAACTTGCTAAGAAAGGAATTTCCGGCCACATCCTTCATG
                                                        540
         1941
     1882
         AACTTTGTAAAGCATAAGTATAACTTGCTAAGAAAGGAATTTCCGGCCACATCCTTCATG
Sbict
     541
         GAACCTGGACTATCTGATGCTGGTTTTGACCTGTTGAACAAGCTACTCACTTATGATCCG
Ouerv
          1942
         GAACCTGGACTATCTGATGCTGGTTTTGACCTGTTGAACAAGCTACTCACTTATGATCCG
                                                        2001
Query
     601
         GATCAGAGGATAACTGCTGAAGCTGCGTTGAACCATGAGTGGTTTCGTGAAGTTCCTCTT
                                                        660
          Sbict
     2002
         GATCAGAGGATAACTGCTGAAGCTGCGTTGAACCATGAGTGGTTTCGTGAAGTTCCTCTT
                                                        2061
```

Query	661	CCCAAGTCCAAAGAATTCATGCCTACCTTCCCTGCACAGCATGCGCAAGACAGGCGTACG	720
Sbjct	2062	CCCAAGTCCAAAGAATTCATGCCTACCTTCCCTGCACAGCATGCGCAAGACAGGCGTACG	2121
Query	721	CGAAGAGTAGTGAAGAGTCCAGATCCGCTAGAGGAGCAGCGAAGAAAGGAATTGCAGCAG	780
Sbjct	2122	CGAAGAGTAGTGAAGAGTCCAGATCCGCTAGAGGAGCAGCGAAGAAAGGAATTGCAGCAG	2181
Query	781	GGGGAGTTGGGGACTGGTGGCTTGTTTTGCTAAGATAATTGAATAGCATGCAGTAACTGT	840
Sbjct	2182	GGGGAGTTGGGGCTGGTTTTGCTAAGATAATTGAATAGCATGCAGTAACTGT	2241
Query	841	TGGTGTTTTGTCTAATACTCAGGGTCGATGTGGTTAAGGTTAGAGAGCCATGCGTTGAAA	900
Sbjct	2242	TGGTGTTTTGTCTAATACTCAGGGTCGATGTGGTTAAGGTTAGAGAGCCATGCGTTGAAA	2301
Query	901	GGAAGATGCAAAACTTGTTTTGACGATCACTTGTGTTGTTCTTTTAGCAGGGCACTTTTG	960
Sbjct	2302	GGAAGATGCAAAACTTGTTTTGACGATCACTTGTGTTGTTCTTTTAGCAGGGCACTTTTG	2361
Query	961	ACAGTATATCGCGGAAAAAATGCTTTGACTATTGTACATGTCTCAGATTTTGTTGCAGGT	1020
Sbjct	2362	ACAGTATATCGCGGAAAAAATGCTTTGACTATTGTACATGTCTCAGATTTTGTTGCAGGT	2421
Query	1021	TGACTATCACTGGGCGCTGGAACCTTATCATGTAACTGCTTGCATGGCTGGGTGGCGTAG	1080
Sbjct	2422	TGACTATCACTGGGCGCTGGAACCTTATCATGTAACTGCTTGCATGGCTGGC	2481
Query	1081	TCAGTTTATCTATTAAGGAACTGTTTCCAAGGAAACTCGTGTATGTA	1140
Sbjct	2482	TCAGTTTATCTATTAAGGAACTGTTTCCAAGGAAACTCGTGTATGTA	2541
Query	1141	AAACAATTTTCTCGCAAATTGATTTGGATACCTGAGTATTTTGGATTATATCGTATA 11	97
Sbjct	2542	AAACAATTTTCTCGCAA-TTGATTTGGATACCTGAGTATTTTGGATTATATCGTATA 25	97

# **ANEXO IV**

BLASTp no banco de dados TAIR utilizando a sequência de aminoácidos de SGN-U423624 (SOL) como query resulta no gene At1g67580. O alinhamento entre as sequências de aminoácidos sugere que a sequência do SOLesteja completa (possui desde a metionina inicial até o códon de terminação). As sequências possuem mais aminoácidos conservados na porção C-terminal.

```
>AT1G67580.2 | Symbols: | Protein kinase superfamily protein |
          chr1:25327727-25330965 REVERSE LENGTH=752
         Length = 752
Score = 664 bits (1714), Expect = 0.0, Method: Composition-based stats.
Identities = 403/741 (54%), Positives = 470/741 (63%), Gaps = 89/741 (12%)
Query: 1 MAAGRHGGYRDDEFRGQGLEFEVSRREVGYSKRNYDGFRNG----- 41
MAAGR+ Y D E R Q
                     SRR+ Y+ +Y+ RNG
Sbjct: 1 MAAGRNIRYPDHELRDQESNSRFSRRDSAYANEDYNHVRNGAIDNGKGRVSNLRHGDRDR 60
Query: 42 -----DSGVRLRRMNLKEREMMSN-----SGRS-DREPGELXXXXXXXX 79
                                 RE+ +
                       SG RL + N
                                               S RS DREPGEL
Sbjct: 61 IKSGARQEENKMVSSGFRLSKSNPGSREVFIDLGPKRCGFSARSVDREPGELSSESGSDD 120
Query: 80 XXXXXX------XDNGDQLPVQSKIRKFSPVIWDNKDAKKVNRMSNISTI---- 123
                          +N Q PV+ K RKFSP++WD D ++ N
Sbjct: 121 LIESESLAKVNGVVKEVENRAQSPVEKK-RKFSPIVWDRDDHERSNLSRNEKPVEVTPLP 179
Query: 124 -----SLVAAKVQNYSMTNNNTEQSQLRVKAIPVSHQVTSEFPDHISLTPPV 170
             ++ Q + V VS
                               S
                                   + SL
Sbjct: 180 PPPPLVKRSSQSPSVSCGGNSHYSPAKSDMHQDPVEVGVSAVSMPALSPSVEMSSLCV-V 238
Query: 171 EVRSSNEQE----AKILEHDEYV---HIRASRWVTDVDDFPVDDNKIPRL---KSRKLG 219
E S+ EQ+
             A LE DE + HI +SRW + P D+ +I
Sbjct: 239 EQSSNAEQDDKQEHATHLEEDENMPTRHISSSRWAAG-NSSPTDEVEIVEEVGEKKRRKK 297
Query: 220 SWLTETGGRRKSLTPELGNPKKN---RAQXXXXXXXXXXXXXXYQENNLDKNDSMDVDK 276
                 R S TPE+G + +
                                                   ++E + K+D M++D+
Sbjct: 298 PFPVQGRFRNTSQTPEVGELVREGYRSSDSDERGHHSLPGSRDDFEERDAVKSDKMEIDE 357
Query: 277 DRNYDDTSV-SQSDTEYEHEHDSCGVLEASFPPQRSVNMLQGCRSVDEYERLNKIDEGTY 335
          + + + SV S S+T+ + E+ E + P RS+NMLOGCRSVDE+ERLNKIDEGTY
Sbjct: 358 EEHRRENSVDSLSETDSDDEYVRHETPEPASTPLRSINMLQGCRSVDEFERLNKIDEGTY 417
Ouery: 336 GVVYRARDKKTGEIVALKKVKMEKEREGFPLTSLREINILLSFYHPAXXXXXXXXXXGSKL 395
          GVVYRA+DKKTGEIVALKKVKMEKEREGFPLTSLREINILLSF+HP+
Sbjct: 418 GVVYRAKDKKTGEIVALKKVKMEKEREGFPLTSLREINILLSFHHPSIVDVKEVVVGSSL 477
Query: 396 DNIFMVMEYMEHDLKALMETMKORFTQSEVKCLMLQLLEGVKYLHDNWVLHRDLKTSNLL 455
          D+IFMVMEYMEHDLKALMETMKQRF+QSEVKCLMLQLLEGVKYLHDNWVLHRDLKTSNLL
Sbjct: 478 DSIFMVMEYMEHDLKALMETMKQRFSQSEVKCLMLQLLEGVKYLHDNWVLHRDLKTSNLL 537
```

Query:	456	LNNQGELKICDFGLARQYGSPLKTYTQLVVTLWYRTPELLLGAKQYSTAIDMWSLGCIMA LNN+GELKICDFGLARQYGSPLK YT LVVTLWYR PELLLGAKQYSTAIDMWSLGCIMA	515
Sbjct:	538	LNNRGELKICDFGLARQYGSPLKPYTHLVVTLWYRAPELLLGAKQYSTAIDMWSLGCIMA	597
Query:	516	ELLRKEPLFNGKSEVDQLNKIFRILGTPNETIWPGFSKLPGVKVNFVKHKYNLLRKEFPA ELL K PLFNGK+E DOL+KIFRILGTPNE+IWPGFSKLPGVKVNFVKH+YNLLRK+FPA	575
Sbjct:	598	ELLMKAPLFNGKTEFDQLDKIFRILGTPNESIWPGFSKLPGVKVNFVKHQYNLLRKKFPA	657
Query:	576	TSFM-EPGLSDAGFDLLNKLLTYDPDQRITAEAALNHEWFREVPLPKSKEFMPTFPAQHA TSF P LSDAGFDLLNKLLTYDP++RIT AL H+WFREVPLPKSK+FMPTFPAOHA	634
Sbjct:	658	TSFTGAPVLSDAGFDLLNKLLTYDPERRITVNEALKHDWFREVPLPKSKDFMPTFPAQHA	717
Query:	635	QDRRTRRVVKSPDPLEEQRRK 655 QDRR RR+VKSPDPLEEQRRK	
Sbjct:	718	QDRRGRRMVKSPDPLEEQRRK 738	

## **ANEXO V**

# Sequência codificadora de NtCDKG;2

<mark>atggctgccggaagac<mark>atggt</mark>ggatatagagacgacgaatttaggggccagggtttggaa</mark> A G R H G G YRDDEF R G O G tttgaggtttcaaggagggaagttggttactcaaagagaaattatgatggatttcgtaac V S R R E V G Y S K R Ν Y D G F ggcgatagcggggttaggttaagacgaatgaatttaaaaagagaagatgatgagtaat N L R K R R L R M  $\mathbf{E}$ Ε t cagg tag a agt gaccg tgag cccg gg gaat tat catcg tccag cgag agt gt ttct gatG R S D R E P G E L S S Ε S V S S gaccaggccagcaattcggacaatggagaccagctacctgtacagagcaaaataagaaaa SDNGDOLPVO A S N S K ttttcacccgttatttgggataataaagatgctaagaaagtgaatagaatgtcaaatatt S P V I W D N K D A K K V N R M S agtacaatttcactggtagctgctaaggtgcagaactattctatgactaataataca I S L V A A K V Q N Y S M T N N N T gagcagtcccagcttagggtgaaggctatacctgtttcccaccaagttacttctgaattt SQLRVKAIPVSHQVT cctgaccacatatctttgacgcctcctgttgaggtgcgatcgagcaatgaacaagaagcg I S L T P P V E V R S S N E Q aaaatacttgaacatgatgaatatgtgcatatacgagcgtctcgatgggtgactgatgtt LEHDEYVHIRASRWVTDV gatgattccccagttgacgacaataaaattcctcgattaaagagtaggaaactagggtca D S P V D D N K I P R L K S <mark>R K L G S</mark> tggttgactgaaacaggtgggcgtaggaaatcactgacccctgaacttgggaaccccaag W L T E T G G R R K S L T P E L G N P K aaaaataqqqcqcaqtcctcaqaatctqatqatcatattaqqtcttctaqtaqaqataqt K N R A O S S E S D D H I R S S S R D taccaggaaaataatttagacaagaatgactccatggatgtggataaggaccgtaattat Q E N N L D K N D S M D V D K D R gatgatactagtgttagccaatcagatacagaatacgaacacgagcatgattcttgtggt D D T S V S Q S D T E Y E H E H D S qtactaqaaqcttcqttccctcctcaaaqqaqtqtaaacatqcttcaqqqqqtqtaqaaqc L E A S F P P O R S V N M L O G gtggatgaatacgagaggcttaacaagatagatgaaggtacatatggagttgtttacaga V D E Y E R L N K I D E G T Y G V V Y R gctagagataagaagacaggagaaattgttgctctaaagaaggttaaaatggaaaaggaa cgagaagggtttcctttgacatctctaagggagataaacattctcctcttttctaccat F P L T S L R E cccgcagttgtagatgttaaagaagtagttgtagggagcaaacttgacaacattttcatg gtgatggaatacatggagcatgacctgaaggcgttaatggagacaatgaaacaacgattt

acccaaagtgaagtcaaatgccttatgctccagcttttggagggtgtcaagtatcttcat gataactgggtgcttcaccgagatctgaagacttcaaatttacttttaaataaccaaggt DN WV L H R D L K T S N L L LN N Q G gaggtgaagatttgtgactttggattggctcgtcaatatgggagccccctgaaaacgtat actcaattggtggttactttgtggtacagggcacctgaacttcttttgggagcgaaacaa tattccactgctattgacatgtggtcattgggttgtatcatggctgaattgctgaggaaa gaaccgcttttcaatgggaaatcagaagttgatcaacttaacaagattttcagaatcctt ggcaccccaaatgagacgatatggccgggattttccaaactccctggggtgaaagtcaac tttgtaaagcataagtataacttgctaagaaaggaatttccggccacatccttcatggaa cctggactatctgatgctggttttgacctgttgaacaagctactcacttatgatccggat caqaqqataactqctqaaqctqcqttqaaccatqaqtqqtttcqtqaaqttcctcttccc TAEAALNHEWFREVPL aaqtccaaa<mark>qaattc</mark>atqcctaccttccctqcacaqcatqcqcaaqacaqqcqtacqcqa S K E F M P T F P A Q H A Q D R R T agagtagtgaagagtccagatccgctagaggagcagcgaagaaaggaattgcagcagggg R V V K S P D P L E E Q R R K E L Q Q G gagttggg<mark>gactggtggcttgttttgc</mark>taa ELGTGGLF

#### Legenda:

#### Na sequência de nucleotídeos:

#### Primers paraamplificação de NtCDKG;2:

SGN-U423624-FW: 5'-ATGGCTGCCGGAAGACATGGT- 3' SGN-U423624-RV: 5'-TTAGCAAAACAAGCCACCAGTC- 3'

#### Primers para entrada no sistema gateway (contendo parte dos sítios attB1 e attB2):

Nt-GL-KIN-attB1-Fw: 5´-AGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGCTGCCGGAAGAC – 3´ Nt-GL-KINnew-attB2-Rv: 5´-CAAGAAAGCTGGGTCTTAGCAAAACAAGCCACCAGTCC - 3´ Nt-GL-KIN-ss-attB2-Rv: 5´-GTACCAGAAAGCTGGGTCGCAAAACAAGCCACCAGTCC - 3´

#### **Primers** para silenciamento por RNAi:

GL-KIN–RNAi–attB2-Rv: 5'- GAAAGCTGGGTCGTGAAATTGTAC – 3'

**Observação**: a sequência nucleotídica amplificada e utilizada para formação do *hairpin* e silenciamento por RNAi de NtCDKG;2 está em <u>negrito e sublinhada</u>.

#### **Primers** para REAL TIME – PCR (qPCR):

SGN-U423624-FW-qPCR: 5'-ACTGGTAGCTGCTAAGGTGCAGAA-3'

# SGN-U423624-RV-qPCR: 5'- ACCTCAACAGGAGGCGTCAAAGAT -3'

# Sequências reconhecidas por enzimas de restrição utilizadas neste trabalho:

BsrGI – TGTACA
DraI – TTTAAA
EcoRI - GAATTC
HindIII – AAGCTT
PvuI – CGATCG
SpeI – ACTAGT

#### Na sequência de aminoácidos:

Destacado em PRETO, está marcada a assinatura do Serine/Threonine protein kinases active-site. Em negrito e sublinhado o aminoácido "D" que corresponde ao proton acceptor site. Estes importantes sítios sequência foram determinados por análise da de NtCDKG;2 (http://prosite.expasy.org/scanprosite/). Essa assinatura está contida em dois grandes domínios: o domínio Serine/Threonine Kinases que está destacado em CINZA e o domínio PLN0009, escrito em AZUL. Esses dois domínios se sobrepõem e as análises relativas a eles foram feitas no NCBI. Em azul, estão destacados putativos domínios de localização nuclear (Bipartite nuclear localization signal profile; Evalue 2.1e+04) encontrados nas análises realizadas no Motif Scan. Em azul marinho é apresentado o motivo característico da classe CDKG.

### **ANEXO VI**

O alinhamento entre as sequências nucleotídicas de NtCDKG;2 e SGN-U423624 (SOL) resulta em 99% de identidade.

>lcl|16367 Length=2010 Score = 3696 bits (2001), Expect = 0.0 Identities = 2007/2010 (99%), Gaps = 0/2010 (0%)Strand=Plus/Plus ATGGCTGCCGGAAGACATGGTGGATATAGAGACGACGAATTTAGGGGCCAGGGTTTGGAA Ouerv ATGGCTGCCGGAAGACATGGTGGATATAGAGACGACGAATTTAGGGGCCCAGGGTTTGGAA Sbjct Query 61  ${\tt TTTGAGGTTTCAAGGAGGGAAGTTGGTTACTCAAAGAGAAATTATGATGGATTTCGTAAC}$ 120  ${\tt TTTGAGGTTTCAAGGAGGGAAGTTGGTTACTCAAAGAGAAATTATGATGGATTTCGTAAC}$ 120 Sbict 61 Query 121 GGCGATAGCGGGGTTAGGTTAAGACGAATGAATTTAAAAGAAGAGAGATGATGAGTAAT 180 Sbjct 121 180 Query 181 TCAGGTAGAAGTGACCGTGAGCCCGGGGAATTATCATCGTCCAGCGAGAGTGTTTCTGAT 2.40  ${\tt TCAGGTAGAAGTGACCGTGAGCCCGGGGAATTATCATCGTCCAGCGAGAGTGTTTCTGAT$ 181 240 Sbjct Query 241 GACCAGGCCAGCAATTCGGACAATGGAGACCAGCTACCTGTACAGAGCAAAATAAGAAAA GACCAGGCCAGCAATTCGGACAATGGAGACCAGCTACCTGTACAGAGCAAAATAAGAAAA Sbjct 241 300 Ouerv 301 TTTTCACCCGTTATTTGGGATAATAAAGATGCTAAGAAAGTGAATAGAATGTCAAATATT 360 Sbjct 301 TTTTCACCCGTTATTTGGGATAATAAAGATGCTAAGAAAGTGAATAGAATGTCAAATATT 360 361 AGTACAATTTCACTGGTAGCTGCTAAGGTGCAGAACTATTCTATGACTAATAATAATACA 420 Ouerv Sbjct 361 AGTACAATTTCACTGGTAGCTGCTAAGGTGCAGAACTATTCTATGACTAATAATAATACA 420 GAGCAGTCCCAGCTTAGGGTGAAGGCTATACCTGTTTCCCACCAAGTTACTTCTGAATTT 480 421 Ouery Sbjct 421 GAGCAGTCCCAGCTTAGGGTGAAGGCTATACCTGTTTCCCACCAAGTTACTTCTGAATTT 480 481 CCTGACCACATATCTTTGACGCCTCCTGTTGAGGTGCGATCGAGCAATGAACAAGAAGCG 540 Ouerv 481 CCTGACCACATATCTTTGACGCCTCCTGTTGAGGTGCGATCGAGCAATGAACAAGAAGCG Sbjct 540 AAAATACTTGAACATGATGAATATGTGCATATACGAGCGTCTCGATGGGTGACTGATGTT 600 541 Ouery AAAATACTTGAACATGATGAATATGTGCATATACGAGCGTCTCGATGGGTGACTGATGTT 600 Sbjct 541 GATGATTCCCCAGTTGACGACAATAAAATTCCTCGATTAAAGAGTAGGAAACTAGGGTCA 660 Query 601 601 GATGATTTCCCAGTTGACGACAATAAAATTCCTCGATTAAAGAGTAGGAAACTAGGGTCA 660 Sbict Ouerv 661 TGGTTGACTGAAACAGGTGGGCGTAGGAAATCACTGACCCCTGAACTTGGGAACCCCAAG Sbjct 661 TGGTTGACTGAAACAGGTGGGCGTAGGAAATCACTGACCCCTGAACTTGGGAACCCCAAG 720

Query	721	AAAAATAGGGCGCAGTCCTCAGAATCTGATGATCATATTAGGTCTTCTAGTAGAGATAGT	780
Sbjct	721	AAAAATAGGGCGCAGTCCTCAGAATCTGATGATCATATTAGGTCTTCTAGTAGAGATAGT	780
Query	781	TACCAGGAAAATAATTTAGACAAGAATGACTCCATGGATGTGGATAAGGACCGTAATTAT	840
Sbjct	781	TACCAGGAAAATAATTTAGACAAGAATGACTCCATGGATGTGGATAAGGACCGTAATTAT	840
Query	841	GATGATACTAGTGTTAGCCAATCAGATACAGAATACGAACACGAGCATGATTCTTGTGGT	900
Sbjct	841		900
Query	901	GTACTAGAAGCTTCGTTCCCTCCTCAAAGGAGTGTAAACATGCTTCAGGGGTGTAGAAGC	960
Sbjct	901	GTACTAGAAGCTTCGTTCCCTCAAAGGAGTGTAAACATGCTTCAGGGGTGTAGAAGC	960
Query	961	GTGGATGAATACGAGAGGCTTAACAAGATAGATGAAGGTACATATGGAGTTGTTTACAGA	1020
Sbjct	961	GTGGATGAATACGAGAGGCTTAACAAGATAGATGAAGGTACATATGGAGTTGTTTACAGA	1020
Query	1021	GCTAGAGATAAGAAGACAGGAGAAATTGTTGCTCTAAAGAAGGTTAAAATGGAAAAGGAA	1080
Sbjct	1021	GCTAGAGATAAGAAGACAGGAAAATTGTTGCTCTAAAGAAGGTTAAAATGGAAAAGGAA	1080
Query	1081	CGAGAAGGGTTTCCTTTGACATCTCTAAGGGAGATAAACATTCTCCTCTCTTTCTACCAT	1140
Sbjct	1081	CGAGAAGGGTTTCCTTTGACATCTCTAAGGGAGATAAACATTCTCCTCTCTTTCTACCAT	1140
Query	1141	CCCGCAGTTGTAGATGTTAAAGAAGTAGTTGTAGGGAGCAAACTTGACAACATTTTCATG	1200
Sbjct	1141	CCCGCAGTTGTAGATGTTAAAGAAGTAGTTGTAGGGAGCAAACTTGACAACATTTTCATG	1200
Query	1201	GTGATGGAATACATGGAGCATGACCTGAAGGCGTTAATGGAGACAATGAAACAACGATTT	1260
Sbjct	1201	GTGATGGAATACATGGAGCATGACCTGAAGGCGTTAATGGAGACAATGAAACAACGATTT	1260
Query	1261	ACCCAAAGTGAAGTCAAATGCCTTATGCTCCAGCTTTTGGAGGGTGTCAAGTATCTTCAT	1320
Sbjct	1261	ACCCAAAGTGAAGTCAAATGCCTTATGCTCCAGCTTTTGGAGGGTGTCAAGTATCTTCAT	1320
Query	1321	GATAACTGGGTGCTTCACCGAGATCTGAAGACTTCAAATTTACTTTTAAATAACCAAGGT	1380
Sbjct	1321	GATAACTGGGTGCTTCACCGAGATCTGAAGACTTCAAATTTACTTTTAAATAACCAAGGT	1380
Query	1381	GAGGTGAAGATTTGTGACTTTGGATTGGCTCGTCAATATGGGAGCCCCCTGAAAACGTAT	1440
Sbjct	1381	GAGTTGAAGATTTGTGACTTTGGATTGGCTCGTCAATATGGGAGCCCCCTGAAAACGTAT	1440
Query	1441	ACTCAATTGGTGGTTACTTTGTGGTACAGGGCACCTGAACTTCTTTTGGGAGCGAAACAA	1500
Sbjct	1441	ACTCAATTGGTGGTTACTTTGTGGTACAGGACACCTGAACTTCTTTTGGGAGCGAAACAA	1500
Query	1501	TATTCCACTGCTATTGACATGTGGTCATTGGGTTGTATCATGGCTGAATTGCTGAGGAAA	1560
Sbjct	1501	TATTCCACTGCTATTGACATGTGGTCATTGGGTTGTATCATGGCTGAATTGCTGAGGAAA	1560
Query	1561	GAACCGCTTTTCAATGGGAAATCAGAAGTTGATCAACTTAACAAGATTTTCAGAATCCTT	1620
Sbjct	1561	GAACCGCTTTTCAATGGGAAATCAGAAGTTGATCAACTTAACAAGATTTTCAGAATCCTT	1620

Query	1621	GGCACCCCAAATGAGACGATATGGCCGGGATTTTCCAAACTCCCTGGGGTGAAAGTCAAC	1680
Sbjct	1621	GGCACCCCAAATGAGACGATATGGCCGGGATTTTCCAAACTCCCTGGGGTGAAAGTCAAC	1680
Query	1681	TTTGTAAAGCATAAGTATAACTTGCTAAGAAAGGAATTTCCGGCCACATCCTTCATGGAA	1740
Sbjct	1681	TTTGTAAAGCATAAGTATAACTTGCTAAGAAAGGAATTTCCGGCCACATCCTTCATGGAA	1740
Query	1741	CCTGGACTATCTGATGCTGGTTTTGACCTGTTGAACAAGCTACTCACTTATGATCCGGAT	1800
Sbjct	1741	CCTGGACTATCTGATGCTGGTTTTGACCTGTTGAACAAGCTACTCACTTATGATCCGGAT	1800
Query	1801	CAGAGGATAACTGCTGAAGCTGCGTTGAACCATGAGTGGTTTCGTGAAGTTCCTCTTCCC	1860
Sbjct	1801	CAGAGGATAACTGCTGAAGCTGCGTTGAACCATGAGTGGTTTCGTGAAGTTCCTCTCCC	1860
Query	1861	AAGTCCAAAGAATTCATGCCTACCTTCCCTGCACAGCATGCGCAAGACAGGCGTACGCGA	1920
Sbjct	1861	AAGTCCAAAGAATTCATGCCTACCTTCCCTGCACAGCATGCGCAAGACAGGCGTACGCGA	1920
Query	1921	AGAGTAGTGAAGAGTCCAGATCCGCTAGAGGAGCAGCGAAGAAAGGAATTGCAGCAGGGG	1980
Sbjct	1921	AGAGTAGTGAAGAGTCCAGATCCGCTAGAGGAGCAGCGAAGAAAGGAATTGCAGCAGGGG	1980
Query	1981	GAGTTGGGGACTGGTGTTTTGCTAA 2010	
Sbjct	1981	GAGTTGGGGACTGGTTGTTTTGCTAA 2010	