UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

ELAINE CRISTINA FAVARO

ESTUDO DA FUNÇÃO DOS GENES *PUMILIO* DE
***Arabidopsis* DURANTE O DESENVOLVIMENTO**
VEGETAL

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
01/03/2007

ELAINE CRISTINA FAVARO

ESTUDO DA FUNÇÃO DOS GENES *PUMILIO* DE
Arabidopsis DURANTE O DESENVOLVIMENTO
VEGETAL

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
(Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Bento Quaggio

São Paulo
2007

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Favaro, Elaine Cristina
F257e Estudo da função dos genes *pumilio* de *Arabidopsis* durante
o desenvolvimento vegetal / Elaine Cristina Favaro. -- São
Paulo, 2007.
111p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Quaggio, Ronaldo Bento

1. Biologia molecular 2. Biologia molecular : Botânica
I. T. II. Quaggio, Ronaldo Bento. orientador

574.88 CDD

“Estudo da função dos genes Pumilio de Arabidopsis durante o desenvolvimento vegetal

ELAINE CRISTINA FAVARO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado(a) por:

Prof. Dr. RONALDO BÊNTO QUAGGIO
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. PIO COLEPICOLO NETO
IQ – USP

Profa. Dra. CARLA COLUMBANO DE OLIVEIRA
IQ – USP

Profa. Dra. MARIE-ANNE VAN SLUYS
IB – USP

Profa. Dra. GLADYS FLÁVIA DE ALBUQUERQUE MELO DE PINNA
IB – USP

SÃO PAULO
16 DE ABRIL 2007

AGRADECIMENTO(S)

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, deram irrestrito apoio ao meu trabalho, especialmente ao Prof. Dr. Ronaldo Bento Quaggio, Prof. Dr. Shaker Chuck Farah e Profa. Dra. Maria Julia Alves Manso (todos IQ-USP) e respectivos membros de laboratório, Prof. Dr. Bayardo Baptista Torres (IQ-USP), Profa. Dra. Gladys Flávia de Albuquerque Melo de Pinna (IB-USP) e ao aluno de doutorado Carlos Willian Francischini.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa concedida.

“Quando tratares de um assunto, não deves esgotá-lo.
Basta fazer pensar.”

(Montesquieu)

RESUMO

Favaro, E.C. **Estudo da função dos genes *PUMILIO* de *Arabidopsis* durante o desenvolvimento vegetal**. 2007. 111p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A família PUF é um conjunto de proteínas que se ligam a mRNA regulando sua estabilidade e tradução em processos chave do desenvolvimento. Entre as 25 proteínas de *Arabidopsis* contendo as repetições PUF, três delas, APUM-1, APUM-2 e APUM-3, apresentam ~90% de identidade e colocalizam temporal e espacialmente nos meristemas apical e axilares de caule, zona de elongação da raiz e no periciclo durante a formação de calos e de raízes laterais, além de estames e polens. Ensaios de RT-PCR mostraram que a relação de expressão entre eles é a mesma em todos os órgãos analisados. Além disso, plantas nocautes *apum-1*⁻ e *apum-2*⁻ não apresentam fenótipo alterado, sugerindo redundância funcional. Plantas com a expressão dessas proteínas afetadas por RNA antisense apresentaram folhas cloróticas e reduzidas, raízes mais curtas e menos ramificadas e baixa fertilidade, fenótipo semelhante ao de plantas que superexpressam KRP-2, um inibidor de CDK. O transcrito *KRP-2* apresenta um elemento de ligação AraPum no 3'-UTR sugerindo ser um possível alvo para APUM. Em adição, plantas antisense têm aumento de transcritos *KRP-2* em relação a selvagens. Assim, foi proposto que essas proteínas agem coordenando a formação de folhas e raízes pela influência na tradução de *KRP-2*. A função ancestral das proteínas PUF de manter o ciclo celular em detrimento da diferenciação, parece ser conservada em plantas.

Palavras-chave: *Arabidopsis thaliana*, controle traducional, proteínas PUF, desenvolvimento vegetal, meristemas.

ABSTRACT

Favaro, E.C. **Study of *PUMILIO* genes function of *Arabidopsis* during plant development.** 2007. 111p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The PUF family is a group of conserved proteins that bind to mRNAs regulating its stability and translation in key developmental processes. Among the twenty five *Arabidopsis* proteins with PUF repeats, we found that three highly similar members, APUM-1, APUM-2 and APUM-3 (~90% identity) and co-localize spatially and temporally in the shoot apical and axillaries meristems, root elongation zone and pericycle during callus and lateral root formation, as well as stamens and pollens. RT-PCR assays showed that these proteins have similar expression profiles in all organs analyzed. Moreover, plant *apum-1*⁻ and *apum-2*⁻ knockouts have no detectably altered phenotype, suggesting a functional redundancy between them. Plants in which APUM-1, APUM-2 and APUM-3 expression were reduced through antisense RNA, showed chlorotic and reduced leaves, shorter and less ramificated roots and low fertility. This phenotype is similar to that of plants over-expressing the *KRP-2* gene, a CDK inhibitor. An AraPum binding element at 3'-UTR of the *KRP-2* transcript suggests that it may be a possible target for APUM. In addition, in comparison to wild-type plants, antisense plants have increased *KRP-2* transcripts levels. We proposed that APUM proteins act by coordinating leaf and root formation by way of influencing *KRP-2* translation. The ancestral function of PUF proteins in the maintenance of the cell cycle, to detriment of differentiation, seems to be conserved in plants.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, translational control, PUF proteins, plant development, meristems.

Lista de Figuras:

Figura 1: Domínios de homologia a PUMILIO (PUM-HD) de *Drosophila*.

Figura 2: Dendrograma filogenético de algumas proteínas PUF.

Figura 3: Desenvolvimento vegetal.

Figura 4: Organização do meristema de caule e de raiz.

Figura 5: Árvore filogenética das proteínas PUF de *Arabidopsis*.

Figura 6: Mapa dos vetores utilizados na construção dos repórteres.

Figura 7: Mapa do vetor induzível pTA210.

Figura 8: Quantificação dos anticorpos contra o N-terminal de APUM-2 por Western Blot.

Figura 9: Alinhamento das seqüências de aminoácidos de APUM-1, APUM-2 e APUM-3.

Figura 10: Northern Blot de RNA total de órgãos de plantas selvagens.

Figura 11: Análise de expressão dos genes *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3* por RT-PCR de amostras de vários tecidos vegetais.

Figura 12: Southern Blot de plantas transformadas transformadas com as construções repórteres.

Figura 13: Expressão de GUS em plantas contendo a construção *APUM-1::GUS::NOS*.

Figura 14: Expressão de GUS em flores de plantas contendo a construção *APUM-1::GUS::NOS*.

Figura 15: Expressão de GUS no meristema apical e axilares de plantas contendo a construção *APUM-3::GUS::NOS*.

Figura 16: Expressão de GUS em plantas contendo a construção *APUM-3::GUS::NOS*.

Figura 17: Meristema apical de caule de plantas *APUM::GUS::NOS* de duas semanas.

Figura 18: Detalhes da expressão dos repórteres *APUM::GUS::NOS* em raiz.

Figura 19: Cortes longitudinal de flores expressando os repórteres *APUM::GUS::NOS*.

Figura 20: Imunolocalização em cortes histológicos do meristema apical de caule de plantas selvagens.

Figura 21: Imunolocalização de cortes histológicos de flores de plantas selvagens imunizados com 1:5000 de anti-soro de coelho.

Figura 22: Comportamento do repórter *APUM-1::GUS* após 24, 48 e 72 horas de exposição ao meio CIM (Callus-induced medium) e aos meios contendo os hormônios 2,4-D e Ki (cada um dos componentes do meio CIM).

Figura 23: Comportamento do repórter *APUM-2::GUS* após 24, 48 e 72 horas de exposição ao meio CIM (Callus-induced medium) e aos meios contendo os hormônios 2,4-D e Ki (cada um dos componentes do meio CIM).

Figura 24: Comportamento do repórter *APUM-3::GUS* após 24, 48 e 72 horas de exposição ao meio CIM (Callus-induced medium) e aos meios contendo os hormônios 2,4-D e Ki (cada um dos componentes do meio CIM).

Figura 25: Comportamento do repórter *CYCB-1::GUS* após 24, 48 e 72 horas de exposição ao meio CIM (Callus-induced medium) e aos meios contendo os hormônios 2,4-D e Ki (cada um dos componentes do meio CIM).

Figura 26: Calos de plantas repórteres.

Figura 27: Análise molecular de calos e plantas por Northern Blot e por Western Blot.

Figura 28: Estudo da expressão dos genes *APUM* em plantas repórteres durante a formação das raízes laterais.

Figura 29: Influência da sacarose na expressão dos repórteres.

Figura 30: Southern Blot de vários indivíduos de cada linhagem nocaute fornecida pelo SALK Institute.

Figura 31: Southern Blot de plantas nocaute #10 e #82 após quatro cruzamentos com plantas selvagens.

Figura 32: Southern Blot de plantas transformadas com as construções induzíveis antisense (9, 31, 36 e 14) e constitutiva para *APUM-2* (CD2-2 e CD2-9).

Figura 33: Southern Blot de plantas transformadas com a construção induzível constitutiva para *APUM-2* e *APUM-3*.

Figura 34: Análise de fenótipo em gradiente de concentração de dexametasona.

Figura 35: Aspecto do fenótipo das várias linhagens sense e antisense com três semanas de vida.

Figura 36: Northern Blot de RNA total de plantas selvagem, sense e antisense.

Figura 37: Relação obtida por RT-PCR semiquantitativo entre a expressão dos genes *APUM* das linhagens 31 antisense e CD2-2, crescidas em 0 e 10 μ M de indutor, e plantas selvagens, crescidas em 10 μ M.

Figura 38: Análise de extrato de proteínas das linhagens 31 e CD2-2.

Figura 39: Análise de extrato de proteínas de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias em comparação com plantas antisense que têm seu desenvolvimento interrompido (P).

Figura 40: Comparação entre folhas P1 selvagens (S) e transformantes da linhagem 31 (AS) de vários indivíduos.

Figura 41: Tecidos internos de folha P1 selvagem e da antisense 31 (AS31).

Figura 42: Esquema do experimento para a análise das raízes laterais e principal.

Figura 43: Influência da auxina na formação das raízes laterais de plantas com baixa expressão de proteínas *APUM*.

Figura 44: Relação obtida por RT-PCR semiquantitativo da expressão do gene *KRP-2* entre as linhagens 31 antisense e CD2-2, crescidas em 0 e 10 μ M de indutor em relação à expressão de plantas selvagens crescidas em 10 μ M.

Figura 45: Expressão de *APUM::GUS::NOS* nos vasos condutores de folhas.

Figura 46: Fenótipos observados com plantas sense induzível e com plantas constitutivas para *APUM-2* (35S::*APUM-2::NOS*).

Lista de Tabelas:

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para as construções repórteres.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento das construções repórteres.

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para produzir as construções induzíveis.

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento das construções obtidas.

Tabela 5: Oligonucleotídeos utilizados para a obtenção de sondas para a análise por Southern Blot.

Tabela 6: Oligonucleotídeos utilizados para a quantificação dos transcritos de *APUM-1*, *APUM-2*, *APUM-3*, *KRP-2* e *TUBULINA*.

Tabela 7: Dados dos genes *APUM* disponíveis no GenBank.

Tabela 8: Linhagens fornecidas pelo SALK Institute para análise de nocautes dos genes *APUM*.

Tabela 9: Comprimento da raiz principal e número de raízes laterais produzidas por plantas selvagens e pela linhagem 31 na presença e ausência de indução.

SUMÁRIO:

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 DESENVOLVIMENTO VEGETAL:.....	20
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 ESTERILIZAÇÃO E SEMEADURA DE ARABIDOPSIS THALIANA EM PLACAS DE PETRI:	28
3.2 OBTENÇÃO DAS CONSTRUÇÕES REPÓRTERES:	28
3.3 OBTENÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DE EXPRESSÃO CONSTITUTIVA E DE ANTISENSE INDUZÍVEIS:.....	31
3.4 OBTENÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS:	36
3.5 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO VEGETAL E SOUTHERN BLOT:	36
3.6 PCR DE DNA GENÔMICO PARA A CONFIRMAÇÃO DOS NOCAUTES:.....	38
3.7 ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENZIMA β -GLICURONIDASE (GUS) E CLARIFICAÇÃO DOS TECIDOS PARA MICROSCOPIA:.....	39
3.8 OBTENÇÃO DO ANTICORPO CONTRA A REGIÃO N-TERMINAL DE APUM-2:	39
3.9 CORTES HISTOLÓGICOS E IMUNOLocalIZAÇÃO:.....	40
3.10 CORTES HISTOLÓGICOS INCLuíDOS EM HISTORESINA:	42
3.11 EXTRAÇÃO DE RNA E NORTHERN BLOT:.....	42
3.12 REAÇÕES DE RT-PCR SEMI-QUANTITATIVO:	43
3.13 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E ANÁLISE POR WESTERN BLOT:	44
4. RESULTADOS.....	46
4.1 ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS GENES APUM.....	46
4.1.1 <i>Análise das seqüências dos genes APUM:</i>	46
4.1.2 <i>Expressão dos genes APUM nos vários tecidos vegetais:</i>	48
4.1.3 <i>Localização da Expressão dos genes APUM:</i>	50
4.1.4 <i>Análise dos tecidos que expressam os genes APUM e comprovação por imunolocalização:</i>	55
4.1.5 <i>Comportamento dos genes APUM na presença dos hormônios auxinas e citocininas e de sacarose:</i>	60
4.2 ESTUDO DE PLANTAS NOCAUTE DOS GENES APUM.....	69
4.2.1 <i>Análise de plantas nocaute apum:</i>	69
4.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE SISTEMAS INDÚZÍVEIS DE SENSE E ANTISENSE.....	72
4.3.1 <i>Obtenção das plantas induzíveis:</i>	72
4.3.2 <i>Ensaio de indução e identificação dos fenótipos relacionados com expressão reduzida e expressão ectópica dos genes APUM:</i>	76
4.3.3 <i>Análise do fenótipo:</i>	83
4.3.4 <i>Relação entre APUM e KRP-2:</i>	88
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	91
5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS:	98
6. CONCLUSÕES.....	101
7. BIBLIOGRAFIA.....	102

1. INTRODUÇÃO

A regulação da expressão gênica é feita nos diversos passos ocorridos desde a transcrição até o processamento da proteína funcional, garantindo que o produto gênico esteja no lugar e tempo corretos e na concentração adequada para exercer seu papel. No desenvolvimento, um mecanismo muito importante para se obter altas concentrações locais de proteínas é a localização de mensageiros pois, a partir de um único mRNA pode-se obter várias moléculas de proteína (Hazelrigg, 1998).

Durante o desenvolvimento e a diferenciação, a divisão celular assimétrica é uma maneira de produzir diversidade de células presentes nos organismos. É mediada em parte pela segregação diferencial dos destinos celulares determinando dois tipos de células filha e também através da manutenção das células tronco somáticas. Apesar da regulação da divisão celular assimétrica acontecer principalmente no nível transcricional, a repressão traducional está emergindo como um importante componente regulatório desse processo (Spasov & Jurecic, 2003). Dessa forma, a regulação pós-transcricional desempenha uma função crítica durante o desenvolvimento e é geralmente mediada por fatores cis, seqüências específicas na região 3' não traduzida (3'-UTR) de mensageiros alvos, e por fatores trans, proteínas que se ligam nessas regiões do mRNA. Esses fatores trans são responsáveis pela localização, estabilidade e tradução do mensageiro, podendo bloquear a maquinaria de tradução ou simplesmente eliminar as estruturas sinalizadoras importantes para que a síntese ocorra (Decker & Parker, 1995; Richter & Theurkauf, 2001).

Um conjunto de proteínas altamente conservadas que se ligam a mensageiros regulando o seu destino é a família PUF. Essas proteínas estão presentes em todos os eucariotos (de leveduras a mamíferos e plantas) e são um dos mais interessantes modelos de reguladores traducionais durante o desenvolvimento do embrião e especificação do destino celular e diferenciação. O nome PUF é proveniente dos dois primeiros membros a serem estudados: o PUMILIO de *Drosophila* e o FBF de *C. elegans*.

Várias espécies como *Saccharomyces cerevisiae*, *C. elegans* e *Arabidopsis* contêm múltiplos genes *PUF* ao passo que insetos (*Drosophila* e *Anopheles*) apresentam apenas um representante no genoma. Os vertebrados zebrafish, *Xenopus*, camundongos e

humanos têm um número pequeno de cópias, apenas dois genes. Em adição, nenhum gene *PUF* foi detectado em eubactéria ou *Archaea* (Spassov & Jurecic, 2003).

A primeira função do PUMILIO de *Drosophila* descoberta foi a de determinar o eixo cabeça-cauda do embrião. Nos primórdios da embriogênese da *Drosophila*, a formação dos eixos de simetria do embrião é promovida por mensageiros de origem materna, chamados de morfóticos, que regulam uma cascata de ativação de outros genes responsáveis pelo desenvolvimento. O morfótico HUNCHBACK (HB), fator de transcrição repressor de estruturas abdominais (Curtis et al., 1995), conduz a formação do eixo anterior-posterior do inseto. Seu mensageiro é uniformemente distribuído ao longo do embrião e sua repressão é resultado da interação das proteínas PUMILIO, NANOS e BRAT com a região 3'-UTR. Como PUMILIO e BRAT têm presença uniforme no embrião, quem limita a tradução de *HUNCHBACK* é NANOS, que se encontra distribuído num gradiente de concentração, onde o lado mais concentrado reside no pólo posterior. Desta maneira, o complexo de repressão do mensageiro está em maior quantidade no pólo posterior, fazendo com que a tradução ocorra somente naquele local e tendo como consequência a formação dos oito segmentos abdominais. (Parisi & Lin, 1999 e 2000; Sonoda & Wharton, 1999, Zamore et al., 1999). Apesar de NANOS promover o gradiente, o PUMILIO é quem reconhece o mensageiro, especificando a ligação do complexo protéico. Assim, a ausência de PUMILIO, faz com que *HUNCHBACK* seja traduzido de maneira uniforme não ocorrendo assim a segmentação abdominal (Murata & Wharton, 1995).

A principal característica das proteínas PUF é a presença de oito repetições imperfeitas, os domínios PUF (ou domínio de homologia ao PUMILIO - PUM-HD), cada um com aproximadamente quarenta resíduos de aminoácidos enovelados em três α -hélices (Edwards et al., 2000 e 2001; Wang et al., 2001), mostrados na Figura 1. As oito repetições são requeridas para a interação com o RNA e juntas apresentam a conformação de um arco, onde os aminoácidos da parte côncava, de maioria básicos e aromáticos, interagem com os nucleotídeos. A parte convexa interage com outras proteínas, principalmente na região das repetições 7 e 8, onde mutações perturbam a ligação de NANOS em *Drosophila* (Sonoda & Wharton, 1999; Sonoda, 2001). Outras

proteínas PUF podem apresentar diferentes motivos na superfície externa, que colaboram com a ancoragem de proteínas, além de espaçadores entre as repetições.

Figura 1: Domínios de Homologia a PUMILIO (PUM-HD) de *Drosophila*. Geralmente, as proteínas PUF apresentam oito PUM-HD, esquematizadas em (a). Em (b), representação de cada domínio enovelado em três α -hélices, H1, H2 e H3; e cada uma delas apresentam seus aminoácidos conservados. Em (c), estrutura das oito repetições PUF, coloridos de acordo com a parte (a). O asterico (*), indica a região que interage com a proteína NANOS. Em (d), H2 apresenta vários resíduos de aminoácidos de natureza aromática (em verde) e básicas (azul), que ficam voltados para a parte côncava da estrutura para a interação com o RNA (Edwards et al., 2001). Finalmente em (e), interação das repetições PUF com a sequência NRE de *HUNCHBACK* (Spassov & Jurecic, 2003).

Os domínios PUF identificam sequências específicas presentes no 3'-UTR, sendo que, cada uma das oito repetições reconhece um nucleotídeo específico do mensageiro alvo (Figura 1e). No mensageiro *HUNCHBACK* esta sequência é chamada de NRE (elemento de resposta a NANOS), sendo a ligação feita através do reconhecimento de um motivo UGUACAUA (Box B) presente nessa sequência. Homólogos de outros organismos também mostraram reconhecer regiões próximas àquela do Box B. Mais especificamente, os nucleotídeos UGUR, que interagem com a quinta, sexta, sétima e oitava repetições, são conservados em todos os alvos já identificados. Em adição, a primeira, segunda e terceira repetições parecem aceitar certa variação no trinucleotídeo AUA e é bastante variável quando comparadas as de vários organismos. Apenas os nucleotídeos UGU; que interagem com a sexta, sétima e oitava repetições; são conservados. Em adição, sequências nucleotídicas adicionais podem ser requeridas para a ligação de outras proteínas e também para conferir maior especificidade ao mRNA (Sonoda & Wharton, 1999). O reconhecimento parece requerer as oito repetições, sendo

que, proteínas PUF com número menor de domínios podem identificar os mensageiros por outros mecanismos, como através de elementos estruturais, ao invés da ligação em determinadas seqüências nucleotídicas. É o caso de PUF-1 e PUF-2 de *S. cerevisiae*, que contém seis domínios e nenhuma seqüência consenso foi identificada entre seus prováveis alvos (Gerber et al., 2004). Além disso, seqüências nucleotídicas adicionais podem ser requeridas para a ligação de outras proteínas e também para conferir maior especificidade ao mRNA (Sonoda & Wharton, 1999).

Embora o reconhecimento do mensageiro pelo PUMILIO seja necessária para que ocorra a regulação, tem sido mostrado que os parceiros também podem contribuir para o reconhecimento dos alvos. Isto é observado em *Drosophila*, onde além de *HUNCHBACK*, PUMILIO interage com o mensageiro *CICLINABI* no embrião ao mesmo tempo. PUMILIO e NANOS inibem a tradução de *CICLINABI* nas células do pólo (células que originarão os gametas), prendendo o ciclo celular em G₂, durante sua migração para as gônadas, e por consequência sua proliferação precoce. Apesar disso, não ocorre nenhum efeito na proliferação das células somáticas do pólo posterior do embrião, sugerindo que deve haver um terceiro fator não identificado que contribui para o reconhecimento específico do mensageiro naquela região do embrião (Richter & Theurkauf, 2001). Como mencionado anteriormente, *HUNCHBACK* requer a proteína BRAT além de NANOS para determinar um dos eixos de simetria do embrião, ao passo que no complexo de *CICLINABI*, somente a proteína NANOS foi detectada como parceiro até o momento (Asaoka-Taguchi et al., 1999). Portanto, mais importante do que saber sobre a regulação da expressão das proteínas PUF, é necessário compreender sobre os parceiros que agem juntamente com elas, uma vez que eles são os responsáveis pela regulação da função enquanto as proteínas PUF sempre estão presentes em abundância nos sítios de atuação.

Outra característica das proteínas PUF é o fato de poder apresentar mais de uma função dentro de um mesmo organismo. No caso de *Drosophila*, que contém apenas uma cópia no genoma, PUMILIO desempenha outras funções além das duas citadas, como por exemplo modulação da excitabilidade neuronal (Schweers, 2002) e longevidade (Landis et al., 2001).

Em *C.elegans*, o FBF-1 e FBF-2, primeiras proteínas PUF estudada juntamente com o PUMILIO de *Drosophila*, atuam redundantemente na diferenciação sexual em resposta ao meio, decidindo se o indivíduo será macho ou hermafrodita ao longo de sua existência (Zhang et al., 1997; Kuwabara, 1999). Desta forma, a ligação de FBF-1, em combinação com um homólogo de NANOS (Kraemer et al., 1999), ao mensageiro de *FEM-3*, um fator de transcrição responsável pela espermatogênese, bloqueia sua tradução e desvia a gametogênese para a produção de oócitos. Além da diferenciação sexual, FBF-1 e FBF-2 também são responsáveis pela manutenção de células tronco germinativas através da interação com o mensageiro *GLD-1*, fator que conduz à meiose, prendendo o ciclo meiótico (Crittenden et al., 2002 e 2003) durante o desenvolvimento do animal. A redundância funcional é um fato comum nos organismos que apresentam várias cópias, como leveduras, por exemplo. Em humanos e camundongos, as duas cópias também parecem ser redundantes na manutenção das células tronco germinativas (Moore et al., 2003) e de células tronco somáticas hematopoiéticas (Spasov et al., 2003). Enfim, a diferenciação sexual e a manutenção de células tronco germinativas são funções correspondentes a duas das onze cópias PUF presentes no genoma de *C.elegans*. Posteriormente, outros homólogos foram estudados e mostraram papéis diferentes, mas sempre relacionados ao desenvolvimento (Wickens et al., 2002).

Proteínas PUF atuam em pontos chave do desenvolvimento, escolhendo entre passos decisivos, prendendo a tradução de mensageiros que desviam as cascatas de regulação para processos biológicos opostos ou para que eventos anteriores se processem por completo. Embora tem sido mostrado que essas proteínas regulam alvos distintos nos diversos organismos já estudados, a regulação de alvos relacionados à manutenção de células tronco parece ser uma ancestralidade desta função (Wickens et al., 2002; Spasov & Jurecic, 2003).

Um outro exemplo é *Xenopus laevis*, onde ortólogos ao PUMILIO e NANOS de *Drosophila*, este último chamado de XCAT-2, interagem com o mRNA da *CICLINA-B1* também para segurar a divisão meiótica durante a maturação de oócitos (Nakahata, 2001). Em organismos unicelulares, como as leveduras, esta função ancestral pode ser vista sob outro aspecto. A proteína de PUF-A de *Dictyostelium discoideum* promove contínuas divisões vegetativas inibindo diferenciação através da repressão do mensageiro

da subunidade catalítica da proteína quinase dependente de cAMP (PKA-C), indispensável para a diferenciação em corpo de frutificação e esporos em resposta à falta de nutrientes no meio. Em mutantes de PUF-A, as células deixam de se dividir e se diferenciam precocemente (Souza et al., 1999). Logo, a proliferação de células únicas pode ser vistas como células tronco que se diferenciam em resposta ao meio (Wickens et al., 2002). Em *S. Cerevisiae*, o envelhecimento em leveduras é medido pela contagem do número de progênies geradas a partir de uma única célula mãe (Mortimer et al., 1959). A perda de PUF-5 (também chamado de MPT5 ou UTH4) faz as células se dividirem menor número de vezes do que as linhagens selvagens, ao passo que sua superexpressão faz com que as leveduras se dividam mais vezes e vivam por mais tempo (Kennedy et al., 1997).

Quanto ao mecanismo bioquímico de atuação, as proteínas PUF podem estar relacionadas com a modulação do comprimento da cauda poli(A). Em *Xenopus*, XPUM2 interage com a CPEB (proteína que se liga ao elemento de poliadenilação citoplasmática), um fator que promove a tradução por extensão da cauda poli(A), impedindo sua ação e conseqüentemente a poliadenilação (Nakahata et al., 2001). Em adição, as mutações em PUMILIO e NANOS aumentam a poliadenilação de *HUNCHBACK* em *Drosophila*. Além disso, um segundo mecanismo que provavelmente interfere com os fatores de iniciação de tradução (Chagnovich & Lehmann, 2001), também tem sido proposto. Nas leveduras, as proteínas PUF-5 e PUF-3 de *Saccharomyces cerevisiae* estão comprometidas com o aumento na taxa de deadenilação e conseqüente degradação de mensageiros específicos, *HO* e *COX17*, controlando a divisão celular e o tipo de reprodução, respectivamente (Tadauchi et al., 2001; Olivas & Parker, 2000). Nos embriões em desenvolvimento e em oócitos, os mensageiros são estáveis e traducionalmente inativos com caudas curtas de poli(A) ou sem elas ao passo que, em leveduras, os mRNAs com pequenas caudas ou sem nenhuma são rapidamente degradados (Richter & Theurkauf, 2001). Portanto, é provável que essas proteínas usem o mesmo mecanismo em ambos os casos, cuja diferença está no balanço particular da célula entre tradução e turnover (Wickens et al., 2002).

Em Spassov e Jurecic (2003), foram comparadas as seqüências de aminoácidos de 38 proteínas PUF de vários organismos estudados, sendo oito de *Arabidopsis*. A análise das seqüências gerou um dendrograma filogenético mostrando a existência de pelo menos

cinco subfamílias de PUFs. PUMILIO de *Drosophila* e FBF de *C. elegans* formam duas classes diferentes enquanto PUF-1 e PUF-6 de levedura são os genes ancestrais, formando outras duas subfamílias que representam os “clusters” mais distantes. A última subfamília consiste exclusivamente de proteínas de plantas, PUF-3 e PUF-4 de levedura e a proteína de *Plasmodium*. As proteínas de mamíferos são muito próximas ao PUMILIO de *Drosophila*, tendo aproximadamente 80% de identidade entre os PUM-HDs. Nesta subfamília também podem ser vistos PUF-A de *Dyctiostelium*, PUF-8 e PUF-9 de *C. elegans* e todas as proteínas PUF de vertebrados. É interessante ressaltar que as proteínas de plantas são mais próximas à subfamília do PUMILIO do que a do FBF. Desta forma, a identificação e clonagem de proteínas PUF provenientes de outros organismos poderão contribuir com o estudo da evolução desta família de proteínas altamente conservadas que se ligam a RNA.

Figura 2: Dendrograma filogenético de algumas proteínas PUF. (Spasov & Jurecic, 2003). As proteínas AraF16P2.43 e AraF16P2.48 correspondem a duas das três proteínas estudadas neste trabalho.

Até o momento, nenhuma função bioquímica ou biológica foi atribuída às proteínas PUF de plantas. Sabe-se apenas que *Arabidopsis thaliana*, o organismo modelo entre os vegetais, apresenta vinte e cinco genes que codificam proteínas contendo repetições PUF (Francischini & Quaggio, artigo submetido). Devido ao fato das plantas

possuírem particularidades nos mecanismos de desenvolvimento em relação aos animais e uma vez que esta família geralmente desempenha seu papel em passos importantes do desenvolvimento, as proteínas PUF de *Arabidopsis* podem ser interessantes para a investigação dos mecanismos que regulam o desenvolvimento em plantas.

1.1 DESENVOLVIMENTO VEGETAL:

Durante a fase embriônica, os animais sofrem um processo de diferenciação e formação de todos os órgãos, produzindo uma miniatura do que será o corpo do indivíduo, restando apenas o crescimento e a manutenção dos tecidos. As plantas, ao contrário, durante a formação do embrião, estabelecem apenas um corpo rudimentar, mantendo em algumas regiões células totipotentes que futuramente produzirão todos órgãos vegetais ao longo da vida de acordo com as condições do meio (Jürgens, 2003). Essas estratégias distintas de desenvolvimento entre plantas e animais mostram diferentes tarefas de suas células tronco. Enquanto a principal função das células tronco animais é reabastecer as células somáticas altamente especializadas com um tempo de vida limitado (pluripotentes), tais como células da pele ou do sangue, as células tronco vegetais provêm material para a formação dos órgãos como um todo (totipotentes), como folhas, flores e raízes (Buchanan et al., 2001).

As regiões que mantêm um reservatório de células totipotentes e são responsáveis pelo desenvolvimento dos órgãos vegetais são chamadas de meristemas e estão ilustrados na Figura 3. O meristema apical do caule (SAM) é capaz de formar toda a parte aérea do vegetal como caule, folhas, ramos e flores enquanto o meristema apical da raiz (RAM) é a fonte produtora de toda a parte subterrânea (Weigel & Jürgens, 2002).

Figura 3: Desenvolvimento vegetal. O meristema apical de caule (SAM) é responsável pela formação de toda a parte aérea enquanto que o meristema apical de raiz (RAM) produz o sistema radicular (Weigel & Jürgens, 2002).

O SAM é formado no estágio globular da embriogênese e após a germinação inicia um programa de divisão celular altamente coordenado que continua ao longo do crescimento vegetativo. Esse meristema pode ser subdividido em três zonas: a periférica e a medular (Figura 4A), compostas por células que se dividem rapidamente e que são determinadas para a diferenciação de folhas e caule; respectivamente; e a zona central, que contém a população de células tronco que se dividem relativamente devagar. Na medida que as células centrais vão se dividindo, as células filhas que ficam na lateral vão sendo empurradas gradualmente da zona central para a medular e para a periférica e as demais mantêm o meristema (Bowman & Eshed, 2000; Nakajima & Benfey, 2002).

Figura 4: Organização do Meristema Apical de Caule (A e B) e Apical de Raiz (C e D). Em (A), organização em zonas e em (B) em camadas (Sharma et al., 2003). Em (C), corte longitudinal de raiz e em (D) corte transversal (Malamy & Benfey, 1997). **Inic. End.:** células iniciadoras de endoderme; **Inic. Col.:** células iniciadoras de columela.

O SAM também pode ser visualizado através de camadas de células que se dividem no mesmo padrão espacial, conforme a Figura 4B. As células da camada L1 se dividem no padrão anticlinal enquanto que as de L2 se dividem anticlinal e periclinalmente dentro dos órgãos e as células de L3 em várias orientações.

A coordenação de SAM envolve uma rede intrincada de genes altamente regulados e a maioria deles foi identificada através de mutações. Plantas que carregam a perda da função da proteína WUSCHEL (WUS), desenvolvem um SAM embrionário normal que não é mantido após a produção de alguns órgãos laterais. Esses órgãos laterais se desenvolvem fora do centro do SAM, indicando que as células tronco não mantêm seu destino correto (Mayer et al., 1998). Desta forma, essas plantas produzem um reduzido

número de folhas e flores em relação às selvagens. Alternativamente, defeitos no gene *SHOOTMERISTEMLESS (STM)* fazem a planta perder as células tronco e não ocorre produção pós-embriônica de órgãos laterais (Lenhard et al., 2002). Contudo, esses genes são requeridos para estabelecer e manter o meristema.

Os genes *CLAVATA (CLV)* promovem diferenciação e quando são interrompidos por mutação, o meristema e os órgãos laterais aumentam em tamanho, devido à falha das células em se diferenciar. *CLV-1* e *CLV-2* codificam os dois domínios de uma proteína quinase com receptor transmembrana que podem funcionar processando sinais intercelulares. *CLV-3* codifica um pequeno polipeptídeo provável ligante do domínio receptor de *CLV-1/CLV-2*.

O meristema apical da raiz (RAM), quando comparado com SAM, tem menor número de células e uma estrutura mais simples. A raiz madura é composta de camadas de células organizadas concêntricamente que, vistas de dentro para fora, podem ser identificadas como feixe vascular, periciclo, endoderme, córtex e epiderme (Figuras 4C e D). As células de cada camada têm origem na ponta da raiz, a partir do centro quiescente (QC) composto de células totipotentes com baixa taxa de divisão celular. Após a divisão de uma célula iniciadora, a célula filha da periferia sofre diferenciação, ao passo que a outra continua pertencendo ao QC (Benfey & Scheres, 2000). Algumas camadas têm a mesma origem clonal: a epiderme e a columela e, a endoderme e o córtex originam-se da mesma célula iniciadora.

Como importantes reguladores do RAM, os genes *SCARECROW (SCR)* e *SHORT-ROOT (SHR)*, dois fatores de transcrição, são necessários, respectivamente, para a correta divisão celular da iniciadora endoderme/córtex e para a especificação do destino da célula iniciadora em tecido endodérmico (Di Laurenzio et al., 1996; Helariutta et al., 2000). O padrão estrutural da raiz é também mantido por uma forte comunicação célula-célula e o centro quiescente mantém a identidade das iniciadoras pela inibição da sua diferenciação. As raízes laterais são derivadas de células do periciclo, um meristema secundário, que desenvolvem competência para entrar no ciclo mitótico, sendo o hormônio auxina, o sinal que dispara o início deste evento (Casimiro et al., 2003).

Após deixar os meristemas, as células vegetais são mantidas num estado não proliferativo e diferenciado por interações célula a célula entre as vizinhas. Em outras

palavras, a identidade da célula vegetal não é dependente da linhagem celular como no caso dos animais e sim da sua posição dentro do tecido. Além disso, as células pós-mitóticas em plantas não perdem totalmente a capacidade de divisão celular ou de regenerar a planta como um todo, mostrando que as relações de proliferação e diferenciação diferem entre plantas e animais.

Inicialmente, acreditava-se que para manter a população estável de células tronco, a raiz e o caule empregavam mecanismos distintos. No entanto, os efeitos da mutação nos genes *CLV* parecem ser limitados ao SAM e, além disso, entre os vários genes estudados que afetam RAM, nenhum parece ser relacionado com o sistema *CLV-WUS* de caule. Somente alguns genes como *FASCIATA* (*FAS1* e *FAS2*) apresentam expressão nos dois meristemas (Kaya et al., 2001). No entanto, recentes estudos mostram que a atividade de *CLV* é compartilhada por outros genes da mesma família e que alguns exercem função apenas na raiz (Hobe et al., 2003; Veit, 2004). Em adição, o gene *QUIESCENT CENTER HOMEODOMAIN* (*QHB*), da mesma família de *WUS*, foi observado somente na raiz e sua superexpressão causa uma atividade alterada do RAM similar àquela observada com a superexpressão de *WUS* (Kamiya et al., 2003). Estes resultados podem indicar existem mecanismos similares para estabelecer e manter as células totipotentes e a organização de ambos os meristemas.

A atividade meristemática é controlada principalmente pelas condições do meio. As plantas são organismos sésseis, anexados a um substrato imóvel e, para explorar seu meio de forma eficiente, requerem taxas flexíveis de crescimento. Embora crescimento não seja a única resposta às condições ambientais, a divisão e expansão celular são essenciais para trazer o corpo vegetal em contato com essas fontes. Assim, os caminhos que regulam a proliferação celular em plantas são provavelmente para responder aos sinais do meio, diferentemente do que ocorre nos animais. Desta forma, os genes que codificam ciclinas, CDKs (quinases dependentes de ciclinas) e inibidores de CDKs, como a proteína KRP-2 recentemente estudada (Casimiro et al., 2003), são alvos importantes durante o desenvolvimento vegetal (Ferreira et al., 1994).

Em adição, plantas usam sinalização de longa distância para fazer a comunicação entre órgãos distantes e coordenar seu crescimento, como ocorre em outros organismos multicelulares. Reguladores do crescimento vegetal, incluindo hormônios,

lipooligossacarídeos e peptídios têm sido implicado em vários aspectos da regulação do crescimento. Mutantes que são defectivos em síntese, percepção ou resposta a hormônios, mostram mudanças drásticas na sua aparência e nos seus hábitos de crescimento. Auxinas e citocininas são dois reguladores de crescimento que provavelmente têm um papel direto na regulação da divisão celular. Culturas de células vegetais requerem esses hormônios para a continuada proliferação; a falta de cada um deles resulta na prisão do ciclo celular em G₁ ou G₂, respectivamente (Hartig & Beck, 2006).

Portanto são vários os fatores que influem no desenvolvimento vegetal e que mantêm a flexibilidade de acordo com as condições do meio, durante toda a vida da planta. Essa riqueza de mecanismos reforça o estudo de possíveis reguladores dessas atividades, nesse caso, as proteínas PUF.

Através da comparação entre as seqüências de aminoácidos das proteínas codificadas pelos 25 genes descritos como pertencentes à família PUF no banco de dados TAIR (www.tair.org), nosso laboratório observou que apenas as seis proteínas mais próximas ao de *Drosophila* (mostradas na Figura 5, grupo I) apresentam um domínio de ligação a RNA com as oito repetições PUF conservadas. Além disso, ensaios de triplo-híbrido mostraram que essas proteínas se ligam especificamente à seqüência NRE no transcrito *HUNCHBACK* de *Drosophila* e são capazes de se ligar a mensageiros do meristema apical de caule relacionados com manutenção e proliferação de células tronco (Francischini & Quaggio, artigo submetido). As proteínas APUM-7 até APUM-12 também possuem oito repetições PUF, no entanto, apresentam substituições nos aminoácidos críticos ao reconhecimento do RNA.

Figura 5: Dendrograma das proteínas PUF de *Arabidopsis*. As 25 proteínas foram analisadas pelo programa MEGA 3.1 (bootstrap = 1000trials) e podem ser separadas em três grupos. Aqueles que apresentam capacidade conservada de ligação específica a RNA estão localizadas no grupo I, dentre os quais se encontram APUM-1, APUM-2 e APUM-3 (Francischini & Quaggio, artigo submetido).

O gene *APUM-2* de *Arabidopsis* (Figura 5) foi estudado pelo laboratório e observou-se que sua expressão se limita às regiões meristemáticas do caule e da raiz, bem como, dos primórdios foliares e nos pólenes, ou seja, tecidos envolvidos em processos de desenvolvimento. Também foi feita uma tentativa de se obter plantas carregando sistemas sense e antisense constitutivo para *APUM-2*. As transgênicas sense apresentaram como fenótipo grande quantidade de ramos e de folhas, perda de dominância apical e baixa

fertilidade, no entanto, esse comportamento não era freqüente e reproduzível. Com relação às plantas antisense, nenhuma transformante foi selecionada (Favaro, 2002).

O fato de *APUM-2* ter sido localizado em tecidos meristemáticos e germinativos é um forte indício de sua relação com desenvolvimento, da mesma forma que o observado nos outros organismos modelo estudados. Como existem mais dois genes codificando proteínas com alta taxa de identidade entre si (*APUM-1* e *APUM-3*, Figura 5), este trabalho pretende estudar melhor a função destas proteínas, relacionando-as com os processos de desenvolvimento vegetal e levando em consideração sua grande taxa de similaridade e a possível ocorrência de redundância funcional entre as mesmas.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo caracterizar os genes *APUM-1* e *APUM-3* de *Arabidopsis thaliana*, comparando-os com *APUM-2*. Primeiramente, serão analisadas plantas transgênicas carregando sistemas repórteres com o cDNA da enzima β -glicuronidase (GUS) ligado aos 2kb anteriores ao início de tradução de cada gene *APUM*, de forma a localizar a expressão de cada um nos diferentes tecidos e períodos do desenvolvimento vegetal. Esses resultados serão comparados com análises de RT-PCR e de imunolocalização.

Em seguida, o papel biológico será estudado através da análise fenotípica de plantas contendo sistemas induzíveis de expressão para cada um dos cDNAs (expressam cada uma das proteínas ectopicamente sob a ação de um agente indutor) e de expressão antisense (reduz a expressão normal dos três genes sob a ação de um indutor). Esses resultados serão comparados com plantas contendo a sequência de cada gene *APUM* interrompida por uma inserção de T-DNA (sementes fornecidas pelo SALK Institute).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ESTERILIZAÇÃO E SEMEADURA DE *ARABIDOPSIS THALIANA* EM PLACAS DE PETRI:

Um volume de sementes de *Arabidopsis* ecotipo Columbia foi esterilizado com três volumes de uma solução de 50% cândida e 0,1% Tween 20 durante dez minutos. Imediatamente, elas foram lavadas várias vezes com água deionizada estéril num fluxo laminar. Após eliminar o excesso de água, as sementes foram ressuspensas em seis volumes de uma solução estéril de 0,1% ágar e aplicadas com uma pipeta Pasteur sobre placas de Petri com meio ½xMS (Murashige & Skoog, 1962) da Gibco com 0,8% de ágar autoclavado numa ambiente estéril.

Após a semeadura, as placas foram seladas com esparadrapo microporoso e mantidas no escuro por quatro dias a 4°C para depois serem transferidas para uma estufa a 22°C com regime de 16 horas de luz.

Os calos foram gerados a partir de plantas de uma semana transferidas para o meio CIM (Callus Induced Medium): ½x MS sólido (0,8% de ágar) com 1,5% sacarose mais 2,2µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 0,2µM de cinetina (Ki).

Em alguns experimentos, foram adicionados ao meio sólido outros reagentes como os antibióticos higromicina a 20µg/mL e kanamicina a 50µg/mL, concentrações de acordo com Croy (1993); o hormônio ácido alfa-naftalenoacético (NAA) a 10µM, o inibidor de transporte de auxina ácido N-1-naftilftalâmico (NPA) a 10µM e o inibidor de síntese de proteína cicloeximida a 10µM, de acordo com Himanen et al., 2002. Os ensaios de indução foram com dexametasona, solução estoque de 10mM em etanol absoluto, diluída em meio ½xMS de acordo com o descrito na seção de resultados.

3.2 OBTENÇÃO DAS CONSTRUÇÕES REPÓRTERES:

Os sistemas repórteres foram construídos no vetor binário pBINPLUS (Van Engelens et al., 1995), resistente à kanamicina, através da amplificação dos 1753 e 2033 pares de bases anteriores ao início de tradução dos genes de *APUM-1* e *APUM-3*, respectivamente, e ligados ao cDNA da enzima β-glicuronidase (GUS), seguido do terminador NOS (da enzima nopalina sintase).

As regiões promotoras de *APUM-1* e *APUM-3* foram amplificadas por reação de PCR utilizando como molde o BAC F16P2 (gi: 20197195), fornecido pelo *Arabidopsis* Biological Resource Center. As reações de PCR foram feitas com a enzima Taq polimerase High Fidelity da Invitrogen, seguindo seu protocolo. O programa para as reações de PCR foi: 94°C por dois segundos e 30 ciclos de 94°C por trinta segundos, 55°C por trinta segundos e 68°C por dois minutos. Os oligonucleotídeos utilizados, mostrados na Tabela 1, foram desenhados com sítios de restrição nas pontas com o auxílio do software Gene Runner e sintetizados pela Invitrogen.

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para as construções repórteres. As bases sublinhadas correspondem a sítios de restrição.

Região a ser amplificada	Oligonucleotídeos
Promotor de <i>APUM-1</i>	5'- ATA TCC <u>AAG CTT</u> TGG TTC GGG TCG GAT CCA GTT G -3' (Hind III) 5'- GT AGT TCC <u>GGA TCC</u> ATT GTC ACC TAA ACA ACA AAA AAC CCA AAA T -3' (BamH I)
Promotor de <i>APUM-3</i>	5'- T <u>AAG CTT</u> GTG ATA CTG GTA AAT GAT GA -3' (Hind III) 5'- CCG GTA <u>GGA TCC</u> TCA CCT AAA CAA CAA GAA A -3' (BamH I)

Primeiramente, o cDNA de GUS e o terminador NOS foram transferidos do vetor pBI221 (Clontech) por digestão com BamH I e EcoR I e ligação ao pBINPLUS com T4 DNA ligase (Biolab) (os vetores e os sítios de clonagem estão ilustrados na Figura 6). Na etapa seguinte, os produtos de PCR, obtidos com os oligonucleotídeos com sítios de restrição para Hind III e BamH I nas pontas (Tabela 1), deveriam ser introduzidos diretamente por digestão na construção de GUS em pBINPLUS, mas a clivagem não foi eficiente e os produtos de PCR foram clonados no sítio de Sma I (extremidades cegas) de pUC18. Após essa clonagem intermediária, os promotores foram isolados por digestão e ligados à construção no pBINPLUS.

Figura 6: Vetores utilizados na construção dos repórteres. O pBI221, esquematizado em (A), é constituído do "backbone" do pUC19 mais o gene da enzima GUS, seguido do terminador NOS, ambos utilizados nas construções repórter. A parte (B) e (C) da figura representam o plasmídeo binário pBINPLUS, com resistência a kanamicina (NPT – nopalina fosfotransferase II) e seu sítio de clonagem (MCS), respectivamente. RB: borda direita e LB: borda esquerda.

Todas as enzimas de restrição utilizadas agem a 37° C e são da New England Biolabs. As reações foram feitas no período de uma noite com pelo menos 50ng de DNA e 0,4U de enzima, seguindo as especificações de cada uma. Os insertos e vetores digeridos foram separados em gel de agarose (Sambrook et al., 1989), purificados com kit de extração de gel da Qiagen e, em seguida, misturados numa proporção de 3:1, respectivamente, para a reação de ligação com T4 DNA ligase (New England Biolabs), seguindo as especificações do fornecedor. Finalmente, as reações de ligação foram precipitadas com acetato de sódio/ etanol (Sambrook et al., 1989) e eletroporadas em *Escherichia coli* DH10B competente a 2,5KV, 50µF e 100Ω em cubetas de 0,1cm (Tung & Chow, 1996); e plaqueadas em meio contendo kanamicina (100µg/mL) para a seleção.

As colônias selecionadas foram crescidas em meio líquido LB para posterior mini-preparação dos vetores. As ligações foram confirmadas por clivagem com enzima de restrição e em seguida por sequenciamento das regiões promotoras.

As reações de sequenciamento foram feitas com o kit Big Dye Terminator Ready Reaction Mix da Applied Biosystems, modificando algumas condições em relação ao protocolo do fabricante. Os reagentes utilizados foram: 6µL de tampão "save money" (200mM de Tris-Cl pH=9,0 e 5mM de cloreto de magnésio), 3.2pmols de oligonucleotídeos (sintetizados pela Invitrogen e ilustrados na Tabela 2), 200 a 500ng de DNA, 1,5µL de Terminator Ready Reaction Mix completando a reação com água

deionizada estéril para um volume final de 20µL. O programa para as reações de PCR foi: 96°C por dez segundos, 50°C por cinco segundos e 60°C por quatro minutos durante quarenta ciclos. A precipitação e a aplicação no seqüenciador automático ABI 377 da Perkin Elmer foram realizados de acordo com protocolo do equipamento.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para o seqüenciamento das construções repórter.

Região a ser seqüenciada	Oligonucleotídeos
Promotor de <i>APUM-1</i>	5' TTG TAC CAG GTA ATT TCC AG 3' 5' TAA ACA AAG TCA ATT CAA TG 3' 5' GTT ACT TTG AGA AAT GTT CC 3' 5' CCT AAG GTT CTT GCA TCG C 3'
Promotor de <i>APUM-3</i>	5' CTC ATG ATT CGA TCA ATA GG 3' 5' ACT CGT GGA CTT CGG AG 3' 5' TGC AGA GAG AAC ATG CAA 3' 5' CAT AGA ATC TTG AAG TGT TG 3' 5' CTT ACA TCG CCG TCG AT 3'

Os oligonucleotídeos para as reações de seqüenciamento também foram desenhados com o software Gene Runner. Após a confirmação da seqüência dos promotores, os vetores foram transformados em *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 para posterior transformação em *Arabidopsis*.

3.3 OBTENÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DE EXPRESSÃO CONSTITUTIVA E DE ANTISENSE INDUZÍVEIS:

O pTA210 é um vetor derivado da família pZP (Hajdukiewicz et al., 1994) mas com um sistema que induz a expressão de genes clonados nele através de estímulos externos.

Os receptores de glicocorticóides (GR) não são apenas receptores de membrana mas também fatores de transcrição que ativam promotores contendo os GREs (Glucocorticoids Response Elements). O pTA210 (Figura 7) contém um fator quimérico, chamado GVG, constituído do domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição de levedura GAL4, domínio de ativação trans da proteína VP16 do vírus do herpes e o domínio HBD (Hormone-Binding Protein) do receptor de GRs de camundongo. O GVG está sob o controle do promotor mínimo do promotor constitutivo do vírus do mosaico da couve-flor 35S (CaMV 35S). O domínio VP16 interage com os fatores gerais de

transcrição que são muito conservados em todos os eucariotos e portanto apresenta atividade forte nos diversos tipos celulares. E9 é uma sequência poli(A) extraída da enzima ribulose bifosfato carboxilase de ervilha.

O hormônio mais eficaz para a indução deste sistema em planta é a dexametazona. Esse composto endereça a proteína GVG ao núcleo que por sua vez ativa a transcrição da sequência sob o controle do promotor UAS (clonada entre os sítios de Xho I e Spe I). A indução do sistema pode ser medida trinta minutos após a aplicação do hormônio e até oito dias após sua remoção. É importante mencionar que não ocorrem efeitos fisiológicos adversos, permitindo a indução dos genes alvos sem efeitos pleiotrópicos (Ayoama & Chua, 1997).

Figura 7: Vetor induzível pTA210. Em (A), esquema do plasmídeo que apresenta o gene de resistência à estreptomicina em bactéria, aminoglicosídeo-3'-adeniltransferase (aadA). Em (B), diagrama do T-DNA contendo os sítios únicos das enzimas de restrição Sse8387 I, Pme I, Xho I e Spe I e vários para as enzimas BamH I - B, EcoR I - E e Hind III - H. HYG: gene de resistência à higromicina em planta, controlado pelo promotor constitutivo NOS. GVG: proteína que interage com indutor para ativar o promotor 5xUAS e transcrever a sequência clonada entre os sítios de Xho I e Spe I. RB: borda direita e LB: borda esquerda.

Os experimentos de mapeamento da expressão dos genes em estudo e na análise de nocaute trouxeram indícios de redundância funcional entre eles. Desta forma, o sistema induzível de antisense tem o objetivo de reduzir a expressão dos três genes ao mesmo tempo. Assim, foi utilizado o primeiro exon (com 582 pares de bases) dos genes *APUM*, que apresenta 100% de identidade entre eles, para servir de sequência antisense e titular os mensageiros dos genes em estudo.

Esta sequência foi amplificada a partir do gene *APUM-2* por reação de PCR com a enzima Taq polimerase High Fidelity da Invitrogen, seguindo o protocolo do fornecedor e utilizando os oligonucleotídeos da Tabela 3. Em seguida foi ligada diretamente ao promotor UAS do vetor pTA210 no sítio de Xho I (New England Biolabs) com extremidades reparadas com a enzima Klenow (Invitrogen). A reação de ligação e a eletroporação em células foram feitas da mesma forma que para os repórteres, mas no lugar da cepa DH10B, foi usada a DH5 α porque o pTA210 tem resistência à estreptomicina e a primeira é resistente a este antibiótico.

A construção foi primeiramente confirmada por digestão com EcoR I e em seguida por sequenciamento, com os mesmos oligonucleotídeos utilizados na amplificação.

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para produzir as construções induzíveis. As bases sublinhadas correspondem aos sítios de restrição e em negrito aos sítios de recombinação. Todos os oligonucleotídeos foram desenhados com o software Gene Runner.

Região a ser amplificada	Oligonucleotídeos
Primeiro exon de apum (antisense)	5'- CGT GAT AAT GAT ACC GGA ACT GG -3' 5'- CCA AAC TCA TGC TGC TTC CTC TG -3'
cDNA de apum-1	5'- <u>AA AAA GCA GGC TGT</u> GAG TAT AAA CTA TTG AAT -3' 5'- <u>A GAA AGC TGG GTT</u> TAA GCC ATC TGG GGC TGG GTT -3'
cDNA de apum-3	5'- <u>AA AAA GCA GGC TCA</u> TCT TTA GGA TTT TTA GCG TA -3' 5'- <u>A GAA AGC TGG GTT</u> TAC GCC ACC AGA GGC TGG GGT -3'
cDNA de apum-2	5'- <u>AAA AAG CAG GCT</u> TCG AAA ACC TGT ATT TTC AGG GCA TGA TAC CGG AAC TGG GG -3' 5'- <u>AGA AAG CTG GGT</u> TTA CGC CAT CTG AGG CTG GGT TAG GGA CTG CAA AGC CAT CC -3'
Oligonucleotídeos adaptadores	5'- GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CT -3' 5'- GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT -3'

Nas construções para expressão constitutiva, os cDNAs de *APUM-1*, *-2* e *-3* foram clonados por recombinação no vetor pTA210. Para esta finalidade, o sítio de recombinação RfA do sistema Gateway (Gateway Vector Conversion System, n°cat.11828-029) da Invitrogen, foi inserido no sítio da enzima Xho I reparado com Klenow (Invitrogen) por ligação com T4 DNA ligase (New England Biolabs). Esta clonagem e a orientação do fragmento foram confirmadas por digestão com EcoR I. Os oligonucleotídeos para a amplificação de cada cDNA foram desenhados com sítios de recombinação nas pontas, como mostra a Tabela 3.

Os cDNAs de cada gene em estudo foram produzidos a partir de RNA total de 100mg de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia de duas semanas, congeladas e pulverizadas em nitrogênio líquido, e extraído com o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fornecedor. Os experimentos com RNA foram realizados levando em consideração sua labilidade e, portanto, água deionizada e soluções foram incubadas com 0,1% Dietilpirocarbonato (DEPC) durante uma noite e em seguida autoclavadas.

Após a extração do RNA total, foram feitas reações de transcrição reversa com o kit SuperScript III RNase H⁻ Reverse Transcriptase da Invitrogen utilizando 2µg de RNA e 250ng de hexâmeros randômicos da Invitrogen em 20µL totais de reação, seguindo seu protocolo.

A amplificação de *APUM-1*, *APUM-2* e de *APUM-3* por reação de PCR foi realizada em duas etapas: na primeira utilizando 2µL da reação de transcrição reversa e 10pmol dos oligonucleotídeos específicos para cada cDNA (Tabela 3) em 50µL finais; enquanto na segunda etapa foi utilizado 10µL da primeira reação mais 40pmol dos oligonucleotídeos adaptadores (Tabela 3) em 50µL finais. Foi utilizada a Taq polimerase High Fidelity da Invitrogen, de acordo com suas especificações, e o programa de temperatura para a primeira reação foi 95°C por dois minutos e 10 ciclos de 94°C por quinze segundos, 55°C por trinta segundos e 68°C por três minutos; e o da segunda reação foi 95°C por um minuto; 5 ciclos de 94°C por quinze segundos, 45°C por trinta segundos e 68°C por três minutos e 20 ciclos de 94°C por quinze segundos, 55°C por trinta segundos e 68°C por três minutos.

Os cDNAs amplificados foram purificados em gel de agarose (Sambrook et al., 1989) com kit de extração de gel da Qiagen e clonados no vetor pDONR221 por reação de recombinação BP do sistema Gateway Clonase (Invitrogen), de acordo com as instruções do fornecedor. Após a recombinação, os vetores contendo os cDNAs foram eletroporados em células *E. coli* DB3.1, que acompanha o kit de clonagem, e as colônias foram selecionadas com kanamicina. Mini-preparações destas colônias foram realizadas e os vetores purificados foram checados por digestão com enzimas de restrição e, por último, seqüenciados da mesma forma que as regiões promotoras, utilizando os oligonucleotídeos da Tabela 4.

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento das construções obtidas. Todos os oligonucleotídeos foram desenhados com o software Gene Runner.

Região a ser sequenciada	Oligonucleotídeos
cDNA de <i>APUM-1</i>	5'- AGT TGA ATC CGA GGT TGC CA -3'
	5'- GGA GGC AAG CAG AAG AGT TT -3'
	5'- GAT CGG AGT CAG GCT GAG CA -3'
	5'- GGA ATG GAC TCT AGA CAT CAT GG -3'
	5'- CCT GGC AGC CCA TTG GCT -3'
	5'- GCT GGC CAT GTT GTG GAG TTC -3'
	5'- CAG AGG AGA GAA TTG GCA GAG A -3'
	5'- TGG CCA TGT GGT GAC CCT -3'
	5'- GCC TGA TGA GCG CAC TGT GA -3'
	5'- CTC GTT GCT GCT GGA GAG AG -3'
cDNA de <i>APUM-2</i>	5'- AGT TGA ATC CGA GGT TGC CA -3'
	5'- GGA GGC AAG CAG AAG AGT TT -3'
	5'- TTG GGA GTG GGA GAG TGA GT -3'
	5'- AAT GAT GGA GGT GGA GTA GC -3'
	5'- GGA CGT GAA CTT TAT GGG TA -3'
	5'- GCT GGC CAT GTT GTA GAG TT -3'
	5'- GAG AAG AGA ATT GGC AGA TA -3'
	5'- GCA ATG TTG TGA CCC TCT -3'
	5'- CAC GGA AAG CCT GAT GAG CG -3'
	5'- GAG CTG ATC CTT GGT CGT AT -3'
cDNA de <i>APUM-3</i>	5'- AGT TGA ATC CGA GGT TGC CA -3'
	5'- GGA GGC AAG CAG AAG AGT TT -3'
	5'- AAT GCT TTA TCC GGC TTG AA -3'
	5'- AAT GCT TCT GCC ACT TTG G -3'
	5'- AGC TAT TAT GGC AGT CCA AC -3'
	5'- GCT GGC CAT GTT GTA GAG TT -3'
	5'- GAG AAG AGA ATT GGG AGA G -3'
	5'- TGG CCA TGT GGT GAC CCT -3'
	5'- CGT GAA CTG ATA CTG ACT CG -3'

Confirmadas as seqüências de cada cDNA pelo sequenciamento, elas foram transferidas do pDONR221 para o sitio RfA previamente clonado no vetor pTA210 por recombinação LR (sistema Gateway da Invitrogen), seguindo o protocolo do fornecedor. O produto da recombinação foi eletroporado em *E.coli* DH5 α e os vetores, recuperados por mini-preparação de DNA, foram confirmados por digestão com a enzima de restrição EcoR I para posterior transformação em *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 e depois em *Arabidopsis*.

3.4 OBTENÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS:

A transformação das construções em *Arabidopsis* foi mediada pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, das cepas LBA4404 (com resistência à estreptomicina) para os repórteres clonados em pBINPLUS e EHA105 (com resistência à cloramfenicol) para as construções induzíveis em pTA210.

Primeiramente, os vetores foram eletroporados em *Agrobacterium* competente a 2,5KV, 25µF e 200Ω em cubetas de 0.1cm, de acordo com Wen-Jun & Forbe (1989) e Lin et al. (1994), e plaqueadas em meio contendo estreptomicina e cloramfenicol para a EHA105 e kanamicina e estreptomicina para a LBA4404.

O método de transformação de plantas utilizado foi baseado no “floral dip” (Desfeux et al. 2000), mas ao invés de pingar suspensão de bactérias nas flores, as plantas foram totalmente imersas nela. Assim, uma colônia de *Agrobacterium*, selecionada para cada construção após a eletroporação, foi crescida em 250mL de meio LB por uma noite (EHA105) ou duas (LBA4404) a 200rpm e 28°C e a suspensão de bactérias foi centrifugada a 5000rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com uma solução de 5% sacarose e 0,005% Silwet L-77 e novamente centrifugado. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e as bactérias ressuspensas em 1L da solução de sacarose e Silwet. Seis vasos (vasos para violeta) contendo aproximadamente quinze plantas, foram utilizados para transformar cada construção.

Após a imersão, as plantas foram embrulhadas em filme de PVC transparente e deixadas na horizontal por uma noite. No dia seguinte, foi aberta a parte superior do filme e somente no próximo dia, ele foi retirado e as plantas lavadas em água corrente. Finalmente, os vasos foram transferidos para a estufa a fim de produzir sementes. A progênie foi selecionada em meio ½xMS com kanamicina, para as construções repórteres, e com higromicina, para as induzíveis.

3.5 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO VEGETAL E SOUTHERN BLOT:

A análise das inserções das plantas transformantes foi feita por Southern Blot. Desta forma, para cada planta analisada, o DNA genômico foi extraído a partir de três inflorescências, congeladas em nitrogênio líquido e imediatamente pulverizada num eppendorf com o auxílio de um pistilo. Em seguida, o pó foi ressuspendido em 750µL de

tampão de extração (50mM de Tris-HCl pH=8, 10mM de EDTA pH=8, 100mM de NaCl, 1% SDS e 10mM de β -mercaptoetanol) e incubado a 65°C por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 200 μ L de acetato de potássio 5M e incubado por 20 minutos em gelo. A suspensão foi centrifugada a 12000rpm por 15 minutos e o sobrenadante recolhido para a precipitação do DNA com o mesmo volume de isopropanol. O DNA foi isolado por centrifugação (12000rpm por 10 minutos), lavado com 70% etanol e, depois de seco, ressuspenso em 50 μ L de TE (10mM de Tris-HCl pH 8 e 5mM de EDTA). Metade desse material foi utilizada para as digestões com as enzimas de restrição adequadas para a observação das inserções no genoma: para as plantas repórteres foi utilizada BamH I e para as induzíveis e nocautes EcoR I. A clivagem com as enzimas de restrição (Biolabs) seguiu o protocolo do fornecedor.

O produto da digestão foi separado em gel de agarose 1% sem brometo de etídeo em tampão TAE 1x (Sambrook et al., 1989). O gel foi tratado com 250mM de HCl por 10 minutos, seguido de uma solução 1,5M de NaCl e 0,5M de NaOH por 20 minutos e de outra contendo 1,5M de NaCl e 500mM de Tris-HCl pH=8 por 20 minutos. Em seguida, o gel foi equilibrado com uma solução 10xSSC (1,5M de NaCl e 150mM de citrato de sódio) por 20 minutos e o DNA foi transferido por capilaridade por uma noite do gel para uma membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham Biosciences). Após a transferência, o DNA foi ligado covalentemente por exposição a 1200J/cm de luz UV.

A membrana contendo os fragmentos de DNA foi pré-hibridizada numa solução de 7% SDS, 500mM de acetato de sódio (pH 7.2) e 1mM de EDTA por duas horas a 65°C. A preparação da sonda foi feita com o kit de Random Primers DNA Labeling System da Invitrogen e (α -³²P) dCTP (Amersham), que amplifica a sequência de interesse com a enzima klenow, de acordo com o protocolo do fornecedor. Os moldes utilizados para a produção das sondas foram a sequência do gene GUS (para as plantas repórteres), do gene de resistência à kanamicina (para as plantas nocautes) e do GVG (para as plantas induzíveis), produzidas por reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos da Tabela 5, desenhados com o programa GenRunner.

Tabela 5: Oligonucleotídeos para a obtenção de moldes para produzir sondas utilizadas para a análise de Southern Blot.

Gene	oligonucleotídeos
GUS	5'-ATG TTA CGT CCT GTA GAA ACC C -3' 5'-CAC CGA AGT TCA TGC CAG -3'
NPT II (Nopalina S transferase II)	5'-GGG CGA AGA ACT CCA GCA TG -3' 5'-CCG GAT CTG GAT CGT TTC GC -3'
GVG	5'-GGG GGA GCT CAT GAA GCT ACT GTC TTC TAT -3' 5'-TTT ATT AAC TCT TAT CCA TCC ATT TGC -3'

Após a preparação da sonda, esta e DNA de esperma de salmão (100µg/µL) foram desnaturados a 100°C, imediatamente transferidos para o gelo por dois minutos e misturados à solução de hibridização contendo a membrana. Após a adição da sonda e do DNA de salmão, a membrana foi incubada a 65°C por uma noite. No dia seguinte, as lavagens foram feitas a 55°C de acordo com a referência Sambrook et al. (1989). Após a hibridização, a membrana foi exposta num Phosphor Screen da Molecular Dynamics e revelado no equipamento Phosphor Storm.

3.6 PCR DE DNA GENÔMICO PARA A CONFIRMAÇÃO DOS NOCAUTES:

As linhagens com inserções do T-DNA nos genes *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3* foram obtidas da coleção de inserções em *Arabidopsis* oferecida pelo Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu>). As linhagens contêm inserções do T-DNA, originalmente parte do vetor pROK2 (derivado do plasmídeo pBIN19). O DNA genômico foi extraído da mesma maneira que o explicado para o Southern no item anterior. Foi utilizado 1µL da extração, diluído 10x, para as reações de PCR com a enzima Taq polimerase High Fidelity da Invitrogen, seguindo seu protocolo. O programa para as reações de PCR foi: 94°C por dois minutos e 30 ciclos de 94°C por trinta segundos, 55°C por trinta segundos e 68°C por dois minutos. Foram utilizados oligos que anelavam entre as inserções, dando diferença entre plantas com e sem a inserção no local desejado, de acordo com o tamanho das bandas geradas em gel de agarose 1%, e desta forma também é possível observar se a planta é homo ou heterozigoto.

As três linhagens avaliadas foram a SALK_100910 (#10): oligonucleotídeos 5'-GGT GTG AGT ATA AAC TAT TG-3' e 5'-CTC CCT TTA AGC CTC TGA GC-3', SALK_028830 (#30): oligonucleotídeos 5'-GAT CAG AGG AAG CAG CAT GAG-3' e

5'-GTG ACA GGA TGT CCA TGC CC-3', e SALK_076082 (#82): oligonucleotídeos 82-S1 5'-TTG CCT TAC TCC CAT TGG CAG TGG-3' e 5'-TTG GGC TAT CAT GAT GCT GGT AAG G-3'.

3.7 ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENZIMA β -GLICURONIDASE (GUS) E CLARIFICAÇÃO DOS TECIDOS PARA MICROSCOPIA:

As plantas contendo o gene GUS infiltradas com uma solução de 2mM de substrato X-Gluc, 50mM de tampão fosfato pH=7, 0.2% de Triton X-100, 2mM de ferrocianeto de potássio e 2mM de ferricianeto de potássio, sob vácuo contínuo durante 15 minutos por três vezes. Após este tratamento, foram colocadas a 37°C protegidas da luz por 16 horas e, em seguida, a solução contendo X-Gluc foi substituída por etanol 70% para eliminar a clorofila.

A reação para a observação da atividade de GUS requer um par redox, $K_4[Fe(CN)_6]$ e $K_3[Fe(CN)_6]$, que diminui o vazamento do pigmento azul para outras células ou tecidos inespecíficos. Entretanto, esses reagentes também podem inibir a ação da enzima. Assim, foram feitos testes com concentração de 2; 1.5; 1 e 0mM de cada reagente e observou-se que a melhor concentração é de 1mM.

Os espécimes foram clarificados com o seguinte tratamento: incubação dos tecidos por 15 minutos a 57°C numa solução de 0,24M de HCl e 20% metanol e, em seguida, neutralizados numa solução de 7% de NaOH e 60% de etanol por 15 minutos à temperatura ambiente. Os tecidos foram reidratados por cinco minutos em soluções de 40, 20 e 10% de etanol e, por último, infiltrados sob vácuo com uma solução de 25% glicerol e 5% etanol por 15 minutos.

Após a clarificação, as plantas foram montadas em lâminas com 50% glicerol, observadas sob um microscópio Nikon Eclipse E600 e fotografadas com uma câmera Nikon Coolpix 995. As imagens foram editadas com o programa Corel Photo-Paint 9.

3.8 OBTENÇÃO DO ANTICORPO CONTRA A REGIÃO N-TERMINAL DE APUM-2:

A proteína recombinante foi produzida com cauda de histidina a partir do cDNA de APUM-2 clonado em pDEST17 (Invitrogen) clivado com a enzima de restrição Sty I e autoligado com T4 DNA ligase. A região N-terminal mais uma pequena região de 11

aminoácidos da região C-terminal (Figura 8A) foram expressas em *E.coli* BL21(SI) contendo plasmídio mágico e a proteína recombinante foi utilizada para produzir o anti-soro em dois coelhos. Assim, a quantificação do anti-soro foi feita através de Western Blot com 10µg da proteína recombinante (Figura 8B), utilizando proteína A conjugada com peroxidase (Sigma) como anticorpo secundário e o sistema ECL (GE Healthcare) para a detecção.

Figura 8: Quantificação dos anti-soro contra o N-terminal de APUM-2. Em (A), sequência de aminoácidos da região N-ter de APUM-2, sendo que a região em azul é uma pequena parte do C-ter, utilizado para a produção de anticorpo em coelhos. Em (B), Western blot da proteína acima para a quantificação de anticorpo produzido em dois coelhos. Os poços 1, 2 e 3 são diluições de 1:400, 1:1000 e 1:10000 para o coelho 1 e 5, 6 e 7 são as mesmas diluições para o coelho 2. Os poços 4 e 8 são os soros pré-imune dos coelhos 1 e 2, respectivamente.

Em todos os experimentos de imunolocalização e de Western Blot deste trabalho foi utilizado anti-soro do coelho 1 em diluições menores que 1:1000, pois acima disso, o número de interações inespecíficas pode ser muito elevado.

3.9 CORTES HISTOLÓGICOS E IMUNOLocalização:

Amostras de plantas foram fixadas em PFA (4% de paraformaldeído, 4% DMSO em tampão PBS – 130mM NaCl, 7mM Na₂HPO₄ e 3mM NaH₂PO₄, pH 7) sob vácuo até afundarem na solução, isto é, aproximadamente uma semana (Jackson, 1991). Em seguida, os tecidos foram lavados duas vezes por 30 minutos em tampão PBS e passados por uma série de soluções de etanol e álcool terc-butilico (TBA) em água (10%TBA e 47,5% etanol, 20% TBA e 47,5% etanol, 35% TBA e 47,5% etanol, 75%TBA e 25%

etanol, 100% TBA) por uma hora em cada para desidratá-los (Ruzin, 1999). As amostras permaneceram na última solução da série, a de 67% de álcool terc-butílico e 33% óleo mineral, por uma noite, e depois foram infiltradas com paraplast (Oxford) a 62°C e colocadas em moldes de papel também seguindo o protocolo de Ruzin, 1999. Seções de 5µm foram cortadas com um micrótomo Microm modelo HM 340E e montadas em lâminas silanizadas.

As lâminas ficaram 2 dias a 42°C para a adesão das secções e, em seguida, estas foram subsequenteiramente desparafinadas em duas lavagens em NeoClear (Harleco) por 10 minutos e hidratadas gradualmente com uma série de etanol (de 100 % a 30%) por 2 minutos em cada etapa (Jackson, 1991). Após a hidratação, as lâminas contendo os cortes para a observação das plantas repórteres, foram montadas em 50% glicerol e observadas num microscópio Nikon Eclipse E600. As imagens foram capturadas com uma câmera Nikon Coolpix 995 e editadas com o programa Corel Photo-Paint 9.

As lâminas destinadas à imunolocalização foram tratadas com 200mM de HCl por 20 minutos, seguido de lavagens com água e 5xSSC, e com 10µg de proteinase K (Roche Molecular Biochemicals) em 100mM de Tris-HCl pH=8 e 50mM de EDTA por 10 minutos. Após lavagem com PBS por 10 minutos, os cortes foram incubados em tampão BTX (100mM de Tris-HCl pH=7.5, 400mM de NaCl, 1% de BSA e 0,3% de Triton X-100) por 30 minutos. Sobre cada lâmina, foi espalhado o anti-soro anti N-terminal de APUM-2 de coelho diluído a 1:1000 em BTX e foram incubadas por uma noite em câmara úmida a 4°C. No dia seguinte, os cortes foram lavados três vezes em BTX por 15 minutos, incubados por uma hora em câmara úmida com anti-soro anticoelho de cabra conjugado com fosfatase alcalina (Kirkegaard & Perry Labs.), diluído 1:50 em BTX, e novamente lavadas três vezes em BTX (Welgel & Glazebrook, 2002).

Finalmente, a detecção foi feita com NBT/BCIP (Roche Molecular Biochemicals). Assim, as lâminas foram equilibradas em tampão TMN (100mM de Tris-HCl pH=9.5, 100mM de NaCl e 50mM de MgCl₂) por 10 minutos e em cada uma foram adicionados 150µg/mL de NBT e 75µg/mL de BCIP diluídos em TMN. As lâminas foram fechadas com lamínulas e incubadas em câmara úmida no escuro por 24h. Após a observação de cor, a reação foi parada com tampão TE (10mM de Tris-HCl pH 8 e 5mM de EDTA). Os espécimes foram observados em 50% num microscópio Nikon Eclipse

E600 e fotografados com uma câmera Nikon Coolpix 995. As imagens foram editadas com o programa Corel Photo-Paint 9.

3.10 CORTES HISTOLÓGICOS INCLUÍDOS EM HISTORESINA:

A fixação dos tecidos foi feita em PFA, da mesma forma usada para os cortes com parafina. Após essa etapa, as amostras foram desidratadas através de incubação por duas horas numa série de soluções de etanol (30, 50, 60, 70, 85, 95 e 100%). A resina utilizada foi monômeros de glicolmetaacrilato Technovit A fixação dos tecidos foi feita em PFA da mesma forma que para os cortes com parafina. Após essa etapa, as amostras foram desidratadas numa série de soluções de etanol (30, 50, 60, 70, 85, 95 e 100%), incubadas por duas horas em cada. A resina utilizada foi monômeros de glicolmetaacrilato Technovit 7100 (Kulzer) e a infiltração e inclusão dos tecidos foram feitas de acordo com as instruções do fabricante. Para melhor orientar os tecidos na resina, os moldes foram feitos em transparências para retro-projetor de acordo com a referência Beeckman & Viane (1999). Seções de 5µm foram cortadas com diamante num micrótomo Microm modelo HM 340E e montadas em lâminas com 50% glicerol.

3.11 EXTRAÇÃO DE RNA E NORTHERN BLOT:

O RNA total foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fornecedor, a partir de 100mg de tecido vegetal, congelados e pulverizados em nitrogênio líquido. Todo o material utilizado para a extração era livre de RNAses (soluções tratadas com DEPC, material de vidro aquecido a 200°C por uma noite e material plástico tratado com 100mM de NaOH).

O RNA obtido foi ressuspenso em 100µL de água deionizada e quantificado por espectrofotometria a 260nm. Então, 20µg do produto foram desnaturados com 50% de formamida e 2% de formaldeído a 65°C por 15 minutos e as amostras de RNA foram separadas em gel 1% de agarose e 2,2mM de formaldeído a 5V/cm de acordo com Sambrook et al., 1989. Após a corrida, o gel foi lavado com água deionizada (tratada com DEPC) para eliminar o formaldeído e o RNA foi transferido para uma membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham Biosciences) em 20xSSC (3M de NaCl e 300mM de

citrato de sódio) por uma noite por capilaridade segundo Sambrook et al., 1989. Após a transferência, o DNA foi ligado covalentemente por exposição a 1200J/cm de luz UV.

A preparação da sonda e a hibridização foram feitas da mesma forma que para o Southern Blot (protocolo acima). O tempo de exposição após a hibridização e as lavagens foi de dois dias.

3.12 REAÇÕES DE RT-PCR SEMI-QUANTITATIVO:

O RNA total foi obtido a partir de 100mg de tecido vegetal, congelados e pulverizados em nitrogênio líquido. A extração foi feita com o reagente Trizol (Invitrogen), da mesma forma que para os ensaios de Northern Blot, de acordo com o protocolo do fornecedor. Desta forma, o RNA obtido desta massa de plantas foi ressuspenso em 100µL de água deionizada e quantificado por espectrofotometria a 260nm. A reação de transcriptase reversa foi feita com o kit SuperScript III RNase H⁻ Reverse Transcriptase da Invitrogen utilizando 2µg de RNA total e 250ng de hexâmeros randômicos da Invitrogen em 20µL totais de reação, seguindo seu protocolo.

Finalmente, as reações de PCR foram feitas com a enzima Taq polimerase Platinum (Invitrogen), seguindo suas especificações, e para cada 50µL de reação de amplificação, foi utilizado 1µL da reação de transcrição reversa.

Para cada cDNA sintetizado e par de oligonucleotídeos, foram identificados os ciclos nos quais a reação de PCR estava na fase linear, através da quantificação do produto retirado em diferentes ciclos. A quantificação do produto foi feita em gel de agarose 2% com brometo de etídio, fotografado sob luz UV numa câmera Epi Chemi II Darkroom (UVP BioImaging Systems) e a intensidade das bandas produzidas foi analisada com o programa LabWorks 4.0. Determinado esse parâmetro, as amplificações foram feitas em triplicata no ciclo determinado anteriormente e esta etapa repetida por mais duas vezes.

Foi analisado o padrão de expressão dos genes *APUM* nos vários tecidos de plantas selvagens e; em planta total das linhagens selvagem, antisense e sense. Além dos genes *APUM*, também foi avaliado o gene *KRP-2*. Os oligonucleotídeos utilizados para as reações de PCR foram desenhados com o programa Gene Runner e estão ilustrados na Tabela 6.

Tabela 6: Oligonucleotídeos utilizados para a quantificação dos transcritos de *APUM-1*, *APUM-2*, *APUM-3*, *KRP2* e *TUBULINA*.

Gene quantificado	Amplicon (pares de bases)	Oligonucleotídeos
<i>APUM-1</i> At2g29200	137	5'- CAC CGG GTT TTG AAG GTG AG -3' 5'- ATG CCC CAT ATC AGC CTG AAA G -3'
<i>APUM-2</i> At2g29190	150	5'- GAT CAG AGG AAG CAG CAT GAG -3' 5'- ATG CCC CAT ATC AGC CTG AAA G -3'
<i>APUM-3</i> At2g29140	127	5'- CAC CTG GTT TTG AGG CTG GA -3' 5'- ATG CCC CAT ATC AGC CTG AAA G -3'
<i>KRP2</i> At3g50630	121	5'- ACG ATG ATT TGA ATA AGA GTG AGG AAT C -3' 5'- TCA GCT TCC TTC ACC GTC TCA TGG -3'
<i>TUBULINA</i> At5g12250	110	5'- ACC ACT CCT AGC TTT GGT GAT CTG -3' 5'- AGG TTC ACT GCG AGC TTC CTC A -3'

A expressão dos genes em estudo foi padronizada com a da *TUBULINA*, gene que em plantas é considerado “housekeeping” (Czechowski et al., 2004). Assim, as reações foram feitas em triplicata e média da intensidade das bandas amplificadas de cada gene analisado foi dividida pela média da intensidade da amplificação de *TUBULINA* e essas relações foram comparadas entre si. As reações (em triplicata) para cada situação foram repetidas três vezes a partir disso foi calculada a média entre elas e o desvio padrão.

A comparação da expressão do gene *KRP-2* foi feita entre as relações das várias transgênicas e a selvagem. Então, foi dividida a relação *KRP-2/TUBULINA* de cada transgênica com a relação *KRP-2/TUBULINA* da selvagem. Da mesma forma que para os genes *APUM*, o *KRP-2* foi analisado em triplicata e em três reações diferentes para o cálculo do desvio padrão.

3.13 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E ANÁLISE POR WESTERN BLOT:

A extração de proteína total foi feita a partir de 50mg de tecido, pulverizados em N₂ líquido e ressuspenso em 50μL de tampão de extração (50mM de Tris-acetato pH=7.9, 100mM de acetato de potássio, 1mM de EDTA, 1mM de DTT, 20% de glicerol e 200μM de PMSF). A suspensão foi centrifugada a 14000rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante recolhido em um novo microtubo para as análises (Welgel & Glazebrook, 2002).

Os extratos foram quantificados pelo método de Hartree (Hartree, 1972) e 10μg de proteínas foram separados em gel de 12% poliacrilamida (SDS-PAGE) de acordo com

Sambrook et al., 1989. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences) em tampão de transferência (20% de metanol, 40mM de Tris-HCl pH=7.5, 39mM de glicina e 0,037% de SDS) com o equipamento Trans-Blot Semi-Dry Eletroforetic Transfer Cell (Bio-Rad), de acordo com suas especificações, por três horas a 15V. Com relação ao Slot Blot, foi utilizado um equipamento da BioRad, sob vácuo, para carregar a membrana com os extratos que foram diluídos em tampão de extração para 100µL finais.

Após a transferência, tanto a membrana de Western quanto a de Slot foram coradas com solução de Ponceau, para checar a eficiência, e em seguida, bloqueadas por duas horas sob leve agitação em 5% de leite desnatado em tampão TBS-TT (20mM de Tris-HCl pH=7.6 e 137mM de NaCl mais 0,03% de Tween-20 e 0,05% de Triton X-100). O anti-soro anti N-ter de APUM-2 de coelho foi adicionado a cada membrana, na diluição de 1:10000, em TBS-TT mais 5% leite e incubado por uma noite. No dia seguinte, as membranas foram lavadas cinco vezes em TBS-TT por 15 minutos cada e incubadas por duas horas com proteína A conjugada a uma peroxidase (SIGMA), numa diluição de 1:30000, em TBS-TT mais 5% leite. As membranas foram novamente lavadas cinco vezes em TBS-TT por 15 minutos cada e uma vez em água destilada também por quinze minutos. Por último, foram banhadas em solução de ECL (GE Biosciences) e expostas em filme Kodak (MXG-1) para raio X por uma noite no caso do Western e por 5 minutos no do Slot.

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS GENES APUM.

4.1.1 *Análise das seqüências dos genes APUM:*

Como foi mencionado na Introdução desse trabalho, o genoma de *Arabidopsis* contém vinte e cinco genes que codificam ortólogos ao PUMILIO de *Drosophila*. Apesar da existência de domínios PUF na região C-terminal, essas proteínas não tem similaridade em relação à região N-terminal. Contudo, dentre as vinte e cinco proteínas, apenas seis apresentam o genuíno domínio PUF, ou seja, as oito repetições necessárias para o reconhecimento de seqüências consenso em mensageiros alvos, e dentre essas seis, três apresentam alta taxa de identidade entre si, que foram nomeadas pelo nosso laboratório de *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3* (Francischini & Quaggio, artigo submetido).

Os genes que codificam as proteínas em estudo estão situados muito próximos um do outro no cromossomo II e a seqüência nomeada de *APUM-1* (At2g29200) está ao lado de *APUM-2* (At2g29190) enquanto que *APUM-3* (At2g29140) está a 8800 pares de bases da segunda com a janela de leitura invertida. A Tabela 7 apresenta alguns dados de cada um dos genes estudados.

Tabela 7: Dados dos genes apum disponíveis no GenBank.

<i>APUM</i>	gene (pares de bases)	número de exons	cDNA (pares de bases)	proteína (aminoácidos)	proteína (Da)
1 (At2g29200)	3902	9	2907	969	106565
2 (At2g29190)	4009	9	2919	973	106657
3 (At2g29140)	3866	9	2895	965	105988

O alinhamento com o programa ClustalW (<http://clustalw.genome.ad.jp>) mostra o quanto essas proteínas são idênticas entre si, tanto na região C-terminal (nos domínios PUF) quanto na N-terminal. As seqüências genômicas também apresentam alta taxa de identidade entre si, dificultando até mesmo o desenho de oligonucleotídeos específicos para a clonagem e a análise de expressão de cada um deles. As seqüências de aminoácidos estão ilustradas na Figura 9.

```

apum-1 -MI PELGRRPMHRGNEDSSFGDDYEKEIGVLLGEQQRQVEADELERELNLFRRSGSAPPTVDGSVSAAGGLFSGGGGAPFL
apum-2 -MI PELGRRPMHRGNEDSSFGDDYEKEIGVLLGEQQRQVEADELERELNLYRSGSAPPTVDGSVSAAGGLFSGGGGAPFL
apum-3 MMI PELGRRPMHRGNEDSSFGDDYEKEIGVLLGEQQRQVEADELERELNLYRSGSAPPTVDGSLSAAGGLFSGGGGASFL
*****;*****;*****;**

apum-1 EFGGVNKGNGFGGDDEEFRKDPAYLSYYYANMKLNRLPPPLMSREDLRVAQRLKGSNNVLGGVGDRRKVNDNRSLESMPP
apum-2 EFGGVNKGNGFGGDDEEFRKDPAYLSYYYANMKLNRLPPPLMSREDLRVAQRLKGSNNVLGGVGDRRKVNDNRSLESMPP
apum-3 EFGGVNKGNGFGGDDEEFRKDPAYLSYYYANMKLNRLPPPLMSREDLRVAQRLKGSNNVLGGVGDRRKVNDNRSLESMPP
*****;*****;*****;*****

apum-1 -----GFEG-----EKTGASASEWDANGLIGLPGLGLGGKQKSFADIFQADMGHGHPVAQQPSRPASRNTFDENVDSN
apum-2 -----GFDQRKQHEFEVEKTSASSEWDANGLIGLPGLGLGGKQKSFADIFQADMGHGHPVTKQPSRPASRNTFDENVDSK
apum-3 GFEAG-----KPGASASEWDAN--GLIGLPGLGLGGKQKSFADIFQADMGH--PVVQQPSRPASRNTFDENVDSN
*..**.* **.*;***** **.*;***** **.*;*****

apum-1 NNLSPSASQIGI GAPSPY SYAAVLGSSLRNPTDPQAIARVPSPCLTPI GSGRMSNDKRNNTSNQSPFNGVTSGLNESSDL
apum-2 NNLSPSASQIGI GAPSPY SYAAVLGSSLRNPTDPQAIARVPSPCLTPI GSGRVSNDKRNNTSNQSPFN--GGLNESSDL
apum-3 NNLSPSASQIGI GAPSPY CYAAVLGSSLRNPTDPQAIARVPSPCLTPI GSGRVSSNDKRNNTSNQSPFNGVTSGLNESSDL
*****;*****;*****;*****

apum-1 VNALSGNLSCSVGLDDRSQAEQDVEKVRNYMFLQGGHNEVNQHGFENKSDQAHKATGSLRNSQLRGPHGSAYNGVGGLA
apum-2 VNALSGMNLSCSVGLDDRSQAEQDVEKVRNYMFLQGGHNEVNQHGFENKSDQAHKATGSLRNSQLRGAQGSTYNDGGGVA
apum-3 VNALSGNLSCSVGLDDRSQAEQDVEKVRNYMFLQGGHNEVNPHGFENKSD-QARGTASCRNSQMRGSGSAYNSGSGVA
*****;*** : ***;***** ***** * ***;*** :*. *****;***;***;***;***

apum-1 NPYQQLDSPNYCLNNYALNPAVASMMANQLGNNNFAPMYDN--VSALGFSGMDSRHHGRGFVSSGQNLSESRNLGRFSNR
apum-2 TQYQHLDSPNYCLNNYALNPAVASMMANQLGNNNFAPMYDN--VSALGFSGMDSRHHGRGFVSSGQNLSESRNLGRFSNR
apum-3 NPYQHLDSPNYCLNNYALNPAVASMMANQLGNNNFAPMYDN--VSALGFSGMDSRHHGRGFVSSGQNLSESRNLGRFSNR
*.*; *** *.*;*****;***;***;*** :***;*** :***;*** :***;*** :***;*** :***;***

apum-1 MMGGGAGLQSHMVDPMYHQYA-----DSLDDLNDPSMDR--NFMGGSSYMDMLELQRAYLGAQKSQYGVYPYKSGSPNS
apum-2 MMGGGTGLQSHMADPMYHQYA-----DSLDDLNDPSMDV--NFMG-NSYMMMLELQRAYLGAQKSQYGVYPYKSGSPNS
apum-3 MMEGGTGHPSHLADPMYHQYARFSENADSFDDLNDPSMDRNYGN-----SYMNMLEI QRAYLGSQKSQYGLPYKSGSPNS
** **;* **.*;*****;*** **.*;***** * **.*;***;*****;*****;*****

apum-1 HSYYGSPTFGSNMSYPGSPLAHHGMPNSLMSPYSPMRREVNMRFP SATRNYSGGLMGSWHMDASFDEGFGSSMLEEFKS
apum-2 HTDYGSPTFG--SYPGSPLAHHLLPNSLVSPCSPMRREVNMRFP SATRNYSAGGVMGSHWMDASLDEGFGSSMLEEFKS
apum-3 HSYYGSPTFGSNMSYPGSPLAHHGMPNSLMSPYSPMRREVNMRFP SATRNYSAGGVMGSHWMDASLDEGFGSSMLEEFKS
*.*; ***** *****;***;*** *****;***;***;***;***;***;*****;*****;*****

apum-1 NKTRGFELSEIAGHVVEFS SDQYGSRFIQKLETTATDEKNMVEEIMPEALVIMTDVFGNYVIQKFFEHGLPPQRRELA
apum-2 NKTRGFELAEIAGHVVEFS SDQYGSRFIQKLETTATDEKNMVEEIMPEALVIMTDVFGNYVIQKFFEHGLPPQRRELA
apum-3 NKTRGFELSEIAGHVVEFS SDQYGSRFIQKLETTATDEKNMVEEIMPEALVIMTDVFGNYVIQKFFEHGLPPQRRELA
*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****

apum-1 EKLFDHVLPLSLQMYGCRVIQKAIEVVLDQKIMVKELDGHVMRCVRDQNGNHVVQKCI ECVPEENIEFIISTFFGHVV
apum-2 DKLFDHVLPLSLQMYGCRVIQKAIEVVLDQKIMVKELDGHVMRCVRDQNGNHVVQKCI ECVPEENIEFIISTFFGHVV
apum-3 EKLIDHVLPLSLQMYGCRVIQKAIEVVLDQKIMVKELDGHVMRCVRDQNGNHVVQKCI ECVPEENIEFIISTFFGHVV
*.*;*.*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****

apum-1 TLSTHPTGCRVIQGVLENCHDPTQSKVMEEILSTVSMLAQDQYGNVYVQHVLEHGKPDERTVII KELAGKIVQMSQGF
apum-2 TLSTHPTGCRVIQGVLENCHDPTQSKVMEEILSTVSMLAQDQYGNVYVQHVLEHGKPDERTVII KELAGKIVQMSQGF
apum-3 TLSTHPTGCRVIQGVLENCHDPTQSKVMEEILSTVSMLAQDQYGNVYVQHVLEHGKPDERTVII KELAGKIVQMSQGF
*****;*****;***;***;***;*****;*****;*****;*****;*****;*****

apum-1 AHHVVEKCLTFGGFEKELLVNEGLSTHENE PLQAMKDGPFANYVVGKVLCTCDDQREILILTRIKVHLTALKKYTYGK
apum-2 AHHVVEKCLTFGGFEKELLVNEGLSTHENE PLQAMKDGPFANYVVGKVLCTCDDQREILILTRIKVHLNALKKYTYGK
apum-3 AHHVVEKCLTFGGFEKELLVNEGLSTHENE PLQAMKDGPFANYVVGKVLCTCDDQREILILTRIKVHLNALKKYTYGK
*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****

apum-1 HVVARIEKLVAAGERRMALQSLTQPQMA
apum-2 HIVARVEKLVAAGERRMALQSLTQPQMA
apum-3 HIVARVEKLVAAGERRMALQSLPQPLVA
*.*;***;*****;*****;***;*

```

Figura 9: Alinhamento das seqüências de aminoácidos de APUM-1, APUM-2 e APUM-3. As seqüências coloridas são cada uma das oito repetições PUF.

4.1.2 Expressão dos genes *APUM* nos vários tecidos vegetais:

O RNA total de órgãos vegetais foi extraído para a identificação dos tecidos que apresentam expressão dos genes em estudo. Desta forma, foi realizada uma análise por Northern Blot, utilizando como sonda a sequência do primeiro exon, que detecta os três ao mesmo tempo, uma vez que o grau de identidade entre os cDNAs é muito alto, impossibilitando a identificação individual. A Figura 10 mostra o resultado da hibridização e é possível perceber uma banda larga e fraca na altura de 3Kb, correspondente aos *APUMs*, em todos os tecidos vegetais analisados: raiz, caule (nó e internó), folhas e flores. O RNA total de frutos foi extraído mas por algum motivo, após a extração, se recuperaram quantidades ínfimas, mesmo do ribossomal, e por isso este órgão não foi analisado. Assim, é possível concluir que os mensageiros dos genes *APUMs* não são abundantes e que aparentemente os tecidos de flor e folha apresentam maior quantidade. Com relação ao caule de internó (região que não contém os meristemas axilares) apresenta uma representatividade muito baixa.

Figura 10: Northern Blot de 20µg de RNA total dos órgãos de plantas selvagens: raiz (R), caule nós (Cn), caule internós (Ci), folha (Fo) e flor (FI).

Devido à baixa expressão dos genes em estudo, os dados de Northern foram comparados com ensaios de RT-PCR. As amplificações de cada *APUM* foram

comparadas com a de *TUBULINA* (At5g12250), gene considerado “housekeeping” para análise de expressão em planta. As amostras foram coletadas no ciclo 28, ponto medido experimentalmente onde o crescimento da concentração de produto em relação ao número de ciclos mostrou-se linear. A relação entre esses dados está ilustrada no gráfico da Figura 11.

Figura 11: Análise de expressão dos genes *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3* por RT-PCR de amostras dos vários tecidos vegetais.

Assim, a análise do gráfico confirma a presença dos três genes em todos os órgãos vegetais, como observado no Northern, e indica que *APUM-3* é o mais representado enquanto *APUM-2* é o menos expresso. Além disso, é possível dizer que no internó do caule, a expressão é mais baixa em relação aos demais tecidos.

No Northern, as amostras de flores e de folhas apresentaram maior quantidade de mensageiros *APUM*, enquanto que pelo RT-PCR, fica difícil dizer qual tecido tem maior representatividade, pois o erro experimental é grande. Entretanto, é possível considerar flor e raiz como os tecidos que mais expressam os genes em estudo, ao passo que folha fica em quarto lugar.

Para efeito de comparação, as amplificações de cada gene para uma mesma amostra foram feitas juntas para efeito de comparação. Em todas as reações de PCR para todos os tecidos, foi observada uma diferença de expressão entre *APUM-1* e *APUM-3* de $0,23 \pm 0,02$, enquanto que a diferença entre *APUM-2* e *APUM-1* foi de $0,11 \pm 0,03$.

4.1.3 Localização da Expressão dos genes APUM:

O conhecimento de onde e quando o produto de um gene está sendo expresso pode fornecer importantes indícios sobre a função deste no organismo. Desta forma, a expressão dos genes *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3* foi rastreada através de sistemas repórteres com o gene *UIDA* de *Escherichia coli*, cujo produto é a enzima β -glicuronidase (Jefferson et al., 1987). A expressão do repórter é observada através do tratamento dos tecidos com X-GLUC, um substrato da enzima que quando clivado por ela produz a cor azul.

Apesar da seqüência de nucleotídeos e de proteínas ter grande identidade, as regiões promotoras não mostram o mesmo resultado (por exemplo, apenas *APUM-2* apresenta seqüências de ativação por auxina TGTCTC) e portanto foram feitas três construções repórteres, uma para cada gene em estudo.

Os sistemas repórteres foram construídos no vetor binário pBINPLUS, resistente a kanamicina, através da reação de PCR dos 1753 e 2033 pares de bases anteriores ao início de tradução dos genes de *APUM-1* e *APUM-3*, respectivamente, utilizando como molde o BAC F16P2 (gi: 20197195). Esses promotores foram ligados a GUS seguido do terminador NOS (da enzima nopalina sintase de ervilha), provenientes do vetor pBI221 (Clontech), produzindo *APUM-1::GUS::NOS* e *APUM-3::GUS::NOS* (ver Materiais e Métodos). Os vetores obtidos foram confirmados por digestão com enzimas de restrição, e posteriormente seqüenciados para garantir a inexistência de mutações que possam colocar em dúvida os resultados subseqüentes.

Após a transformação em *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia, as sementes colhidas foram semeadas em meio com kanamicina e cinco plantas foram selecionadas com o repórter de *APUM-1* e três plantas com o repórter de *APUM-3*. A análise das inserções de cada um desses indivíduos foi feita por Southern Blot utilizando como sonda a seqüência do gene GUS, amplificado por reação de PCR.

As transformantes do repórter *APUM-1*, ilustradas na Figura 12A, mostraram vários T-DNAs inseridos no genoma mas cada indivíduo foi gerado por eventos independentes, com exceção das plantas 4 e 5, que apresentaram o mesmo padrão de clivagem do DNA. Em adição, a de número 2 é a que contém o maior número de insertos (no mínimo seis). O controle (DNA de planta selvagem) não apresentou marcações

indicando a especificidade da sonda. Apesar do grande número de inserções, as cinco plantas obtidas para *APUM-1::GUS::NOS* mostraram fenótipos normais em relação ao controle selvagem.

As linhagens de *APUM-3::GUS::NOS* também foram avaliadas por Southern, mostrado na Figura 12B, e as três linhagens obtidas foram produzidas por diferentes eventos de inserção. Além disso, as plantas 2 e 3 possuem apenas uma inserção ao passo que a de número 1 apresenta grande número de inserções (mínimo de cinco).

Figura 12: Southern blot de plantas transformadas com as construções repórteres *APUM-1::GUS::NOS* em (A) e *APUM-3::GUS::NOS* em (B). A membrana foi marcada com a sequência do gene GUS presente no T-DNA. O DNA genômico foi clivado com as enzimas de restrição BamH I e EcoR I, discriminado na parte inferior da membrana. O número sobre os poços corresponde ao número da linhagem.

Apesar de algumas linhagens conterem grande número de inserções, todas foram submetidas ao tratamento com X-GLUC, desde o início do desenvolvimento. Os vários tecidos foram corados nas diversas etapas do desenvolvimento e todas apresentaram o mesmo padrão de expressão, variando apenas a intensidade entre indivíduos da mesma linhagem e entre as diferentes linhagens.

Desta forma, expressão de *APUM-1* é detectada inicialmente após o desenvolvimento dos cotilédones, na região do meristema apical de caule, no momento em que este está produzindo o primeiro par de folhas. Não somente a região meristemática mas também os primórdios foliares tornaram-se azuis na presença do substrato (Figuras 13 A e B). Esses primórdios se mantêm corados até o quinto ou sexto dia de desenvolvimento apenas. As folhas em crescimento após esse período e já maduras não apresentam mais a expressão do repórter. Os meristemas axilares do caule também

apresentaram padrão de expressão semelhante ao apical, comportamento esperado uma vez que apresentam a mesma natureza.

Com relação à parte subterrânea, a radícula quando inicia o crescimento em extensão também mostrou marcação na região do meristema, incluindo a zona de alongamento. A cor azul também surge nas regiões onde as raízes laterais e adventícias (Figura 13E e F) se desenvolverão e, conforme ocorre o crescimento destas, o azul se concentra nas regiões do meristema e de alongamento da raiz (Figuras 13C e D). Em plantas mais velhas, foi possível observar uma leve expressão do repórter no periciclo na região próxima da junção caule-raiz.

Figura 13: Expressão de GUS em plantas contendo a construção *APUM-1::GUS::NOS*. Em (A) e (B), a expressão se concentrando no meristema caulinar e nos primórdios foliares, em (C) nas pontas das raízes, em (D), (E) e (F) em raízes laterais de desenvolvimento (Microscopia Normansky).

Após a transição do meristema apical de caule para meristema de inflorescência, a expressão do repórter desaparece, também não sendo observado nos meristemas florais. O repórter só aparece novamente nas flores, mais especificamente nos estames (Figura 14A e B), no período de formação dos polens, estágios 10 e 11 de desenvolvimento, e na

porção central dos polens maduros. Não foi observada expressão durante a formação de sementes e nem no embrião formado.

Figura 14: Expressão de GUS nas flores de plantas contendo a construção *APUM-1::GUS::NOS* onde se pode notar cor azul na região dos estames. (A) flor no estágio dez de desenvolvimento (as pétalas não são visíveis nesta figura) e (B) no estágio 11. BF é um botão floral no estágio 5 de desenvolvimento. (Microscopia Normansky).

Com relação ao repórter *APUM-3::GUS::NOS*, as três linhagens também foram submetidas aos ensaios com X-GLUC e o padrão de expressão de todas elas foi semelhante ao de *APUM-1*. Isto significa que a coloração foi observada no meristema apical de caule e nas gemas axilares, bem como em todos os primórdios foliares (Figura 15). Além disso, foi observado nas pontas das raízes (Figura 16A) e em raízes laterais e adventícias (Figura 16B e C).

Da mesma forma que para *APUM-1*, a marcação desaparece após a transição do meristema apical de caule para meristema de inflorescência. A expressão de *APUM-3* também não foi observada nos meristemas florais, aparecendo apenas nos estames, desde o início da formação das células germinativas masculinas e nos polens maduros (Figura 16D). Não foi observada expressão durante a formação de sementes e nem no embrião maduro.

Figura 15: Expressão de GUS no meristema apical e laterais de plantas contendo a construção *APUM-3::GUS::NOS*. Em (A), planta de três semanas exibindo a coloração azul no meristema apical e nos primórdios foliares (ampliado em B), e nas gemas axilares (ampliada em C). Microscopia Normansky.

Figuras 16: Expressão de GUS em plantas contendo a construção *APUM-3::GUS::NOS*. Em (A), expressão nas pontas das raízes, em (B) e (C), em raízes laterais em desenvolvimento. Em (D), a cor azul se concentra nos estames. (Microscopia Normansky).

O promotor de *APUM-2* foi estudado anteriormente pelo laboratório (Favaro, 2002) e as análises mostraram padrão de expressão semelhante aos obtidos com os promotores *APUM-1* e *APUM-3*. Em resumo, os promotores dos genes *APUM-1*, *-2* e *-3* dirigem a expressão nos mesmos tempos e estágios do desenvolvimento.

Como mencionado anteriormente, a intensidade de expressão de cada repórter foi bastante variável entre os indivíduos da mesma linhagem e entre linhagens diferentes. Entretanto, foi observado que *APUM-3* apresentou a coloração azul mais intensa nos tecidos em relação aos outros dois. Quando se comparam plantas repórteres de *APUM-1* com as de *APUM-2*, todas apresentaram expressão fraca e devido à grande variabilidade de intensidade entre as plantas repórteres não foi possível perceber diferença de

expressão entre *APUM-1* e *APUM-2*. É importante lembrar que as linhagens de *APUM-1* continham grande número de inserções no genoma, fato que pode influenciar no funcionamento normal do promotor, podendo ocorrer diminuição da expressão ou mesmo silenciamento.

4.1.4 Análise dos tecidos que expressam os genes *APUM* e comprovação por imunolocalização:

Após uma avaliação macroscópica das regiões que produzem cada um dos três genes *APUM*, foram feitos cortes histológicos para identificar quais os grupos de células responsáveis pela produção da enzima GUS e também para comprovar se a expressão dos genes é redundante. Assim, os vários tecidos de todas as linhagens obtidas para cada repórter, inclusive as de *APUM-2* (quatro plantas sendo que três apresentam uma inserção e uma com mais de quatro, todas em pontos diferentes do genoma), foram incluídas em parafina ou historesina e seccionadas. Como não houve diferença de expressão entre os três genes, eles serão chamados genericamente de *APUM*.

Como mencionado anteriormente, o meristema apical de caule é formado por três regiões: o centro do meristema, a zona periférica e a zona medular. A Figura 17 mostra que os genes *APUM* estão mais concentrados na região periférica, mais especificamente na posição onde as novas folhas emergirão. Na Figura 17(A), entre os dois primórdios é possível observar uma mancha que, pela filotaxia da *Arabidopsis*, é o ponto onde uma nova folha irá se desenvolver, mostrando que as proteínas *APUM* se expressam desde o início do desenvolvimento foliar. A Figura 17(C) apresenta dois primórdios azuis em outros estágios, mais avançados, expressando as proteínas em estudo. Finalizando, é possível concluir que o centro do meristema é bastante pobre em proteína *APUM* (corte feito com historesina) e sua concentração vai aumentando a partir da zona periférica até o primórdio.

Figura 17: Meristema apical de caule de plantas *APUM::GUS* de duas semanas. (A) e (B) apresentam a cor azul na zona periférica do meristema e nos primórdios foliares, e (C) é um corte histológico da mesma região (microscopia Normansky). c: centro do meristema, p: primórdios foliares.

A raiz também foi analisada e os cortes, feitos com historesina, apresentados na Figura 18, sugerem que os repórteres não estão necessariamente no centro quiescente, mas espalhados por todos os tecidos internos na zona de alongamento, região onde as células estão em vários estágios de desenvolvimento e que apresentam intensa atividade mitótica. Este resultado é coerente com o observado no meristema caulinar, uma vez que não foi observado em células com natureza totipotente e sim já determinadas e se diferenciando.

Figura 18: Detalhes da expressão dos genes *APUM::GUS* e raiz. Em (A), a ponta de uma raiz inteira e dois cortes longitudinais feitos com historesina, mostram a expressão em todos os tecidos internos na região de alongação. Em (B), raiz lateral emergindo, no estágio II de desenvolvimento, indicada pela seta. CQ: Centro Quiescente.

Com relação às raízes laterais, foi possível observar a expressão dos genes a partir do estágio II de desenvolvimento (Benfey & Malamy, 1997), ilustradas na Figura 18B. As revisões sobre desenvolvimento de raízes laterais sempre enfatizam a impossibilidade de se detectar qual célula será a iniciadora do órgão e a dificuldade de observar seu primeiro estágio (Himanen et al. 2002). Sendo assim, com este ensaio não é possível afirmar que a expressão dos genes *APUM* está correlacionada com a fundação das raízes laterais.

As inflorescências também sofreram cortes e apenas os estames, mais precisamente os polens, mostraram a presença de expressão de *APUM*. Na Figura 19A, é possível observar que a cor azul não está apenas delimitada nos polens mas também na região geradora deles. Apesar disso, o grão de pólen apresenta a cor azul apenas na porção central, como mostra a Figura 19B. É provável que os polens tenham uma expressão muito forte e por isso o pigmento azul se disperse para outros tecidos como o gerador do gameta.

Figura 19: Cortes longitudinais de flores expressando os repórteres *APUM::GUS*. Em (A), uma flor apresentando nas anteras, polens corados de azul (a: antera, o: ovários). Em (B), polens apresentando a cor azul apenas na região central.

A expressão dos repórteres foi confirmada por imunolocalização, utilizando anti-soro de coelho contra a porção N-terminal da proteína *APUM-2*. Esta região contém alta taxa de identidade entre as três proteínas em estudo, mas não com os outros homólogos de *Arabidopsis*. Isto significa que serão detectadas as três proteínas de interesse ao mesmo tempo.

Cortes de plantas selvagens de várias idades foram imunizados com duas diluições diferentes (1:5000 e 1:10.000) para detectar a presença das proteínas *APUM*

nos tecidos vegetais. Os resultados mostraram o mesmo padrão de expressão encontrado nos repórteres. Foi utilizado como anticorpo secundário IgG anti-coelho de cabra conjugado com fosfatase alcalina (Kirkgaard & Perry Labs). A detecção foi feita com os substratos NBT e BCIP (Roche) que produz cor castanha azulada na presença da fosfatase alcalina.

A Figura 20 mostra a imunolocalização do meristema apical de caule onde pode-se observar que todos os primórdios ficaram marcados em relação ao controle (a secção 20C não foi tratada com o anticorpo primário). A Figura 20A mostra um corte oblíquo e, pela análise da série de cortes, esta região corresponde à zona periférica do meristema, fortemente corada. Em 20B, está representado um corte longitudinal do meristema, mostrando a zona central com leve marcação do anticorpo.

Figura 20: Imunolocalização em cortes histológicos do meristema apical de caule de plantas selvagens. (A) e (C) foram imunizados com 1:5000 de anti-soro de coelho e (B) com 1:10000. (D) é o controle não incubado com anti-soro. **M** é meristema, **P** primórdios foliares e **F** folhas maduras.

As flores também foram cortadas e as proteínas em questão foram rastreadas por imunolocalização. A Figura 21A apresenta o corte de um estame produzindo polens e, da

mesma forma que para os repórteres, foi observado uma intensa expressão dos genes *APUM* que dificultava saber se tecido gerador de pólen também apresenta expressão. Mas a evidência é forte quando se observa a Figura 21B que apresenta flores no estágio 7 de desenvolvimento ((Smyth et al., 1990), onde os polens ainda não estão formados.

O único tecido que não foi observado nos repórteres e sim na imunolocalização foi a célula mãe do megásporo e nas tétrades. As Figuras 21 (C) e (D) mostram que a expressão dos genes *APUM* é bastante baixa e isto é evidenciado pelo “background” alto.

Figura 21: Imunolocalização de cortes histológicos de flores de plantas selvagens imunizados com 1:5000 de anti-soro de coelho. (A) e (B) correspondem as anteras, sendo aquele num estágio de desenvolvimento mais tardio. Em (B), as setas correspondem ao tecido gerador de polen. (C) e (D) correspondem aos óvulos dentro do ovário, e as setas indicam as tétrades e C a célula mãe de megásporo.

As raízes também foram cortadas e analisadas nos experimentos de imunolocalização, mas a obtenção de cortes de raízes utilizando parafina é muito complicado, devido à espessura e fragilidade do órgão. Por esse motivo, a qualidade dos cortes obtidos não foi boa e nenhuma imagem foi capturada. Entretanto, foi observada uma pequena expressão em todas as células do periciclo, ao longo da raiz. Isso também foi observado como repórter GUS na porção da raiz próxima ao hipocótilo. É provável que as proteínas *APUM* estejam em pequena proporção no periciclo na região mais

madura da raiz, ou em toda a sua extensão, e que, durante a formação das raízes laterais, essa expressão é aumentada, possibilitando a observação com os repórteres. Não foi obtido nenhum corte do meristema de raiz.

Sementes e vagens também foram analisadas por imunolocalização e não apresentaram expressão dos genes em estudo, resultado semelhante ao obtido com os repórteres.

4.1.5 Comportamento dos genes *APUM* na presença dos hormônios auxinas e citocininas e de sacarose:

As análises de imunolocalização e de repórteres mostraram a presença dos genes *APUM* em regiões de divisão e diferenciação celular. As auxinas e citocininas são dois reguladores de crescimento vegetal que provavelmente têm um papel direto na regulação da divisão celular. Cultura de células vegetais requer esses hormônios para a continuada proliferação e a falta de auxina e citocinina resulta na prisão do ciclo celular em G₁ ou G₂, respectivamente. Mudanças na expressão dos reguladores de ciclo celular, como as ciclinas, e na atividade de divisão celular são as primeiras respostas ao tratamento com hormônios (Hartig & Beck, 2006).

A auxina regula crescimento e desenvolvimento das plantas alternando a expressão de genes de resposta precoce através do elemento TGTCTC que confere repressão e ativação do elemento constitutivo, presentes na região promotora, quando as quantidades de auxina são diminuídas ou aumentadas, respectivamente (Ulmasov et al., 1997). A análise das regiões promotoras dos genes *APUM* mostra que apenas o gene *APUM-2* contém o sítio de resposta à auxina (TGTCTC). Assim, é possível que haja alguma relação entre este hormônio e a função de pelos menos um dos nossos genes de estudo.

Um estudo preliminar de resposta à auxina foi realizado com as várias linhagens de plantas repórteres de *APUM-1*, 2 e 3. Após uma semana de crescimento em meio sólido com kanamicina, plantas *APUM-1::GUS*, *APUM-2::GUS* e *APUM-3::GUS* foram transferidas para o meio ½xMS em três condições diferentes: uma contendo apenas 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), uma auxina sintética; outra contendo apenas Ki (cinetina), citocinina também sintética; e outro meio contendo ambos os hormônios, correspondendo

ao meio para produção de calos CIM (Callus Induced Médium, ver Materiais e Métodos). Amostras de plantas de cada placa foram coradas 24h, 48h e 72h após a transferência para esses meios.

As Figuras 22, 23 e 24 mostram que as plantas repórteres de *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3*, respectivamente, têm aumento na intensidade da cor azul na medida em que as plantas ficam mais tempo expostas aos meios que contém 2,4-D ao passo que na presença de Ki a coloração do repórter permanece inalterada em relação ao controle. Isto significa que a exposição ao hormônio auxina e não à citocinina interfere na expressão normal dos nossos genes de interesse. Como controle, o mesmo ensaio foi realizado com o repórter de *CYCBI-1::GUS*, mostrado na Figura 25, que é um marcador de divisão celular ativa (Ferreira et al., 1994). O padrão de expressão dos genes *APUM* é semelhante ao do marcador, mesmo na ausência de auxina, tanto na parte aérea quanto nas raízes. Então, os genes *APUM* estão sendo expressos nas áreas onde está ocorrendo intensa atividade mitótica.

Figura 22: Comportamento do repórter *APUM-1::GUS* após 24, 48 e 72 horas de exposição ao meio CIM (Callus-induced medium) e aos meios contendo os hormônios 2,4-D e Ki (cada um dos componentes do meio CIM). O controle foi feito com plantas de mesma idade em meio sem hormônios. Pode-se notar o aumento na expressão do repórter na presença de 2,4-D e no meio CIM (que também contém 2,4-D).

Figura 23: Comportamento do repórter *APUM-2::GUS* após 24, 48 e 72 horas de exposição ao meio CIM (Callus-induced medium) e aos meios contendo os hormônios 2,4-D e Ki (cada um dos componentes do meio CIM). O controle foi feito com plantas de mesma idade em meio sem hormônios. Pode-se notar o aumento na expressão do repórter na presença de 2,4-D e no meio CIM (que também contém 2,4-D).

Figura 24: Comportamento do repórter *APUM-3::GUS* após 24, 48 e 72 horas de exposição ao meio CIM (Callus-induced medium) e aos meios contendo os hormônios 2,4-D e Ki (cada um componentes do meio CIM). O controle foi feito com plantas de mesma idade em meio sem hormônios. Pode-se notar o aumento na expressão do repórter na presença de 2,4-D e no meio CIM (que também contém 2,4-D).

Figura 25: Comportamento do repórter *CYCB-1::GUS* após 24, 48 e 72 horas de exposição ao meio CIM (Callus-induced medium) e aos meios contendo os hormônios 2,4-D e Ki (cada um dos componentes do meio CIM). O controle foi feito com plantas de mesma idade em meio sem hormônios. Pode-se notar o aumento na expressão do repórter na presença de 2,4-D e no meio CIM (que também contém 2,4-D).

A auxina produz uma rápida expansão celular, formando células gigantes e, quando associada a citocininas, resulta numa rápida divisão celular, de modo que é formado um grande número de células relativamente pequenas e indiferenciadas, produzindo os chamados calos (Raven, 2004). Além disso, a auxina dispara a formação de raízes laterais a partir de células iniciadoras do periciclo. A partir disso e dos resultados do ensaio preliminar, foram feitos dois experimentos, onde o efeito da auxina sobre os repórteres foi observado durante a formação destes tecidos de calos em meio CIM (Callus Induced Médium), e num meio que ativa a produção de raízes RIM (Root Induced Médium).

Assim, plantas dos três repórteres crescidas por uma semana em meio $\frac{1}{2}$ xMS sólido foram transferidas para o meio CIM, de onde foram retirados diariamente alguns indivíduos para o ensaio com X-GLUC. A Figura 26A ilustra o que acontece com os três promotores: o periciclo das raízes das plantas repórteres fica completamente azul (desde o primeiro dia de coleta) e após dois dias de crescimento no meio de indução de calo começa sofrer um espessamento, ou seja, as células começam a se dividir sem se diferenciar. Essa multiplicação celular rompe os tecidos internos da raiz produzindo o

calo. A expressão de *APUM-2* e *APUM-3* aumentam durante a formação do calo e se mantém forte após o estabelecimento da cultura, como mostrado na Figura 26 A, B.b e B.c. Em contraste, *APUM-1* tem um aumento de expressão durante a formação do calo, mas após seu estabelecimento ocorre uma diminuição sendo possível observar apenas um leve azul do repórter (Figura 26B.a). Assim, *APUM-2* é mais expresso em calos em relação a *APUM-1* e esta relação se inverte em plantas, enquanto que *APUM-3* é expresso em grande quantidade tanto em calos quanto em plantas.

Figura 26: Calos de plantas repórteres. Em (A), processo de formação de calos a partir de plantas repórteres *APUM-2::GUS* de uma semana transferidas para CIM (experimento desenvolvido pelo aluno de iniciação científica Carlos Hotta). Este resultado é semelhante ao obtido com as plantas repórteres *APUM-1::GUS* e *APUM-3::GUS*. Em (B), comparação entre calos estabelecidos de plantas *APUM-1::GUS* (a), *APUM-2::GUS* (b) e *APUM-3::GUS* (c).

Este acréscimo de expressão dos genes *APUM* em calos, com exceção de *APUM-1*, pode ser observado na Figura 27 que mostra aumento tanto da quantidade de mensageiros como de proteínas *APUM* quando comparados com planta total. Nessas análises não é possível discernir cada um dos *APUMs*, uma vez que a sonda reconhece os três mensageiros (a sonda é o exon 1 de *APUM-2*) e o anti-soro as três proteínas (o anti-soro foi produzido com a região N-terminal de *APUM-2*, como dito anteriormente) ao mesmo tempo e esses produtos apresentam tamanhos muito próximos.

Os mRNAs de *APUM* têm, cada um, aproximadamente 3Kb e apresentam expressão mais baixa em plantas, sendo aumentada em calos, como mostra a Figura 27A.

A Figura 27B mostra que abaixo de 5µg de um extrato de planta total não é possível detectar as proteínas APUM (com aproximadamente 107KDa) ao passo que em calos, as proteínas em questão são bem evidentes a partir da utilização de 2,5µg de extrato total de plantas (os demais ensaios de western com extrato de plantas foram feitos com 10µg de proteína total, quantidade possível de se observar as bandas de APUM).

Figura 27: Análise molecular de calos e plantas por Northern Blot em (A), e por Western Blot em (B). O experimento de Northern foi realizado pelo aluno de iniciação científica Carlos Hotta. O controle (ctl) do Western são 10µg da proteína recombinante utilizada para a produção do anti-soro (80KDa) e foi adicionada a quantidade discriminada de extrato em cada poço do gel. Wt: planta selvagem, 30.2: planta *apum-2*⁻ (tratada na próxima seção), cWT: calos de plantas selvagens e c30.2: calos de plantas *apum-2*⁻.

Aparentemente, grande parte das células do calo expressa os genes *APUM* e por isso é observado maior quantidade de mensageiros e proteínas neste tecido do que em plantas que os ativam apenas em alguns grupos específicos de células, como primórdios foliares e células do meristema. Os calos são células que se mantêm totipotentes e podem se transformar em qualquer tipo celular vegetal quando adequadamente induzidos. A observação da expressão dos genes *APUM* nos meristemas e nos calos pode indicar uma correlação de sua função a processos de desenvolvimento da mesma forma que o estudado nos outros organismos modelo citados na Introdução.

Os ensaios em RIM foram feitos de forma diferente em relação aos em CIM. Em *Arabidopsis*, o primeiro primórdio de raiz lateral é iniciado aproximadamente 36h após a germinação e é posicionado na metade superior da raiz (Beeckman et al., 2001), sendo dependente do transporte de auxina do caule pois é ela quem determina a posição e a frequência das raízes laterais (Himanen et al., 2002). Entretanto, em uma população de

plântulas, esse evento é espacial e temporalmente dessincronizado. Além disso, a iniciação envolve um número limitado de células. Desta forma, para contornar esses problemas, as sementes foram germinadas em NPA (ácido N-1-naftilftalâmico) que por ser um inibidor de transporte de auxina, previne a divisão celular no periciclo e conseqüente a ativação de primórdios de raízes adventícias na junção hipocótilo-raiz.

Assim, plantas repórteres foram primeiramente germinadas e crescidas por três dias em meio $\frac{1}{2}$ xMS contendo $10\mu\text{M}$ de NPA e, em seguida, transferidas para os meios $\frac{1}{2}$ xMS e $\frac{1}{2}$ xMS mais NAA (ácido 1-naftalenoacético, outra auxina).

As plantas repórteres que foram coradas após a incubação por três dias em NPA não mostram nenhuma atividade de GUS no periciclo e nem formação de raiz lateral. A única região da raiz que acusou expressão dos repórteres foi a ponta, como mostra a Figura 28. O NPA concentra a auxina na ponta da raiz e nenhum hormônio produzido na região do caule consegue migrar através da mesma (Casimiro et al., 2001).

Após a transferência para o meio RIM, contendo NAA, o periciclo mostra atividade de GUS a partir da ponta da raiz, levando tempos diferentes para atingir todo o periciclo nas várias vezes em que o experimento foi repetido, entre sete e doze horas. Nestas condições, a auxina que chega mais rápido nas raízes é a exógena, penetrando principalmente pela ponta da raiz. Em contraponto, os repórteres crescidos em meio $\frac{1}{2}$ xMS somente apresentavam uma leve coloração azul no periciclo na porção mais próxima do hipocótilo. Isto pode ser um indicio de que o aumento ou a totalidade da expressão dos genes *APUM* em raiz é dependente de auxina.

De acordo com Himanen et al. (2002), plantas transferidas do NPA para NAA têm a subida do hormônio após três horas de incubação e a formação da primeira raiz lateral ocorre entre quatro e seis horas. O marcador *CYCBI-1::GUS* leva oito horas para mostrar atividade em todo o periciclo, apesar de se apresentar forte nos pontos de iniciação das raízes laterais. Já *APUM::GUS* levou tempos variáveis para atingir todo o periciclo, de seis a doze horas, como mostra a Figura 28A, mas sempre sendo bem representado nos sítios de iniciação de raiz, de maneira semelhante a *CYCBI-1::GUS*.

Essas raízes foram acompanhadas por quatro dias, sendo possível observar que o periciclo se mantinha corado em todo o processo. Após a emergência das raízes laterais, o azul se concentrava nas pontas do órgão semelhante ao acontecido com o marcador *CYCBI-*

I::GUS (Himanen et al., 2002). Durante a incubação em CIM, as células do periciclo sofrem divisão como fazem na formação das raízes laterais, mas a proliferação das células é mais uniforme ao longo do comprimento da raiz e não é limitado a sítios locais como na formação de raízes laterais (Cary et al., 2002).

Figura 28: Estudo da expressão dos genes *APUM* em plantas repórteres durante a formação das raízes laterais. As plantas germinaram em NPA por três dias e depois foram transferidas para um meio contendo NAA. Em (A), raízes principais de plantas incubadas em NAA por 0 (controle), 12, 24, 72 e 96 horas. Em (B), plantas *DR5::GUS*, *CYCB-1::GUS* e o repórter *APUM::GUS* que também germinaram em NPA mas foram transferidas para um meio contendo NAA mais o inibidor de síntese de proteínas cicloeximida e incubadas por 12h.

Algumas plantas crescidas em NPA foram transferidas para um meio contendo NAA mais 10 μ M de cicloeximida, um inibidor de síntese de proteínas em plantas nesta concentração. Como controle, plantas contendo a construção *DR5::GUS*, marcador da presença de auxina no tecido vegetal, sofreram o mesmo procedimento. A Figura 28B mostra que o marcador *DR5::GUS*, quando transferido apenas para NAA e sendo incubados por 12 horas, está presente em todos os tecidos vegetais indicando que o

mesmo ocorre com a auxina. Quando transferido para NAA mais cicloeximida, não há formação de raiz lateral e *DR5::GUS* fica concentrado nos cotilédones e na ponta da raiz enquanto que o marcador *CYCB-1::GUS* e *APUM::GUS* não são observados no periciclo e nem mesmo na ponta da raiz, sugerindo que ambos precisam de síntese de proteína e por isso a sinalização da auxina não é direta.

Uma última consideração feita sobre as plantas repórteres foi se a presença de sacarose interfere na expressão da enzima GUS. A sacarose estimula a divisão celular (Ballard & Wildman, 1964) e regula diretamente a expressão de ciclinas D, tendo um papel importante durante a fase G₁ (Riou-Khamlichi et al., 2000). Além disso, é vista como um bom candidato para a modulação das taxas de divisão celular pois sua disponibilidade em células proliferantes é um reflexo de toda a capacidade fotossintética e então das condições ambientais predominantes (Koch, 1996). Assim, plantas foram crescidas em meio MS sólido na presença de 1,5% de sacarose e coradas com o substrato da enzima GUS. O resultado deste ensaio está ilustrado na Figura 29.

Figura 29: Influência da sacarose na expressão dos repórteres. Em (A), aumento da expressão dos genes *APUM::GUS* no periciclo quando as plantas repórteres foram germinadas e crescidas em meio contendo 1,5% de sacarose. Em (B), aumento de uma raiz com o periciclo corado.

A comparação entre repórteres crescidos com e sem sacarose mostra que as primeiras apresentam o periciclo corado em quase toda a extensão da raiz enquanto que nas sem sacarose, é possível observar apenas nas pontas e nas raízes laterais em desenvolvimento.

Para investigar a existência de um aumento na quantidade de proteínas APUM na presença de sacarose, foi feito um ensaio de Western Blot, no entanto, não houve diferença significativa entre os extratos de plantas crescidas na ausência e presença do açúcar. Como visto anteriormente, a concentração das proteínas APUM é muito baixa e talvez esse aumento não seja perceptível num experimento deste tipo.

Em resumo, os experimentos realizados com as plantas repórteres mostram que a expressão dos genes *APUM* está presente em tecidos onde as células estão em atividade mitótica. Além disso, sofre grande influência da sacarose e do hormônio auxina nas raízes, sendo provavelmente ativado por este de forma indireta. Apesar dessas informações, não é possível inferir sobre a função biológica dos genes em questão, pois a presença nesses tecidos não significa que seu papel esteja relacionado ao ciclo celular ou mesmo a processos de desenvolvimento. Desta forma, a próxima etapa do trabalho foi o estudo de plantas nocautes para cada gene e de plantas transgênicas que carregam construções para a diminuição da expressão dos genes *APUM* e para a expressão constitutiva e ectópica de cada um deles.

4.2 ESTUDO DE PLANTAS NOCAUTE DOS GENES APUM.

4.2.1 *Análise de plantas nocaute apum*:

A maioria dos genes de desenvolvimento foi descoberta e estudada em plantas mutantes que apresentavam alterações fenotípicas em relação às plantas selvagens contribuindo para a inferência funcional. Seguindo esta metodologia, foram analisadas plantas apresentando mutações nos genes *APUM*, com a finalidade de se entender melhor o papel desses genes em planta.

O SALK Institute (<http://signal.salk.edu>) fornece sementes de plantas transformadas com o vetor binário pROK2 (http://signal.salk.edu/tdna_protocols.html) e que possuem T-DNAs inseridos em regiões aleatórias do genoma vegetal. Além das linhagens, o SALK também disponibiliza a análise genômica dessas sementes, indicando qual a posição da inserção no DNA. Nosso laboratório adquiriu várias linhagens apresentando inserções dentro da região estrutural de cada gene *APUM*, que estão ilustradas na Tabela 8. Para facilitar, ao longo desse trabalho essas linhagens serão

referidas com os dois últimos algarismos do código SALK (mostrados na terceira coluna da Tabela 2).

Tabela 8: Linhagens fornecidas pelo SALK Institute para a análise de nocautes dos genes *APUM*.

Gene nocauteado	Código da progênie	Nome simplificado	Posição do T-DNA no genoma
<i>APUM-1</i>	Salk_100910	#10	nucleotídeo 20 da região estrutural (exon).
<i>APUM-1</i>	Salk_131626	#26	nucleotídeo 3600 da região estrutural (exon).
<i>APUM-2</i>	Salk_013632	#32	região promotora (500pb a montante do códon de iniciação).
<i>APUM-2</i>	Salk_085205	#05	região promotora (150pb a montante do códon de iniciação).
<i>APUM-2</i>	Salk_028830	#30	nucleotídeo 600 da região estrutural (intron).
<i>APUM-2</i>	Salk_016283	#83	nucleotídeo 1200 da região estrutural (exon).
<i>APUM-3</i>	Salk_076082	#82	nucleotídeo 1100 da região estrutural (exon).
<i>APUM-3</i>	Salk_111850	#50	nucleotídeo 2450 da região estrutural.(exon)

As sementes fornecidas foram germinadas em meio $\frac{1}{2}$ xMS e o DNA de vários representantes de cada linhagem foi analisado por Southern Blot para checar a posição do T-DNA e identificar se existem mais inserções no genoma vegetal. A sonda utilizada para marcar as membranas foi a seqüência do gene de resistência à kanamicina (NPT II) presente no T-DNA. O resultado do Southern está ilustrado na Figura 30.

Figura 30: Southern Blot de vários indivíduos de cada linhagem nocaute fornecida pelo SALK Institute. A sonda utilizada reconhece o gene de resistência à kanamicina (NPT II) presente no T-DNA inserido no genoma vegetal e todas as amostras foram clivadas com EcoR I. As duas primeiras membranas correspondem aos nocautes de *APUM-1* (#10 e #26), as quatro posteriores de *APUM-2* (#5, #32, #30 e #83)

e as duas últimas aos de *APUM-3* (#50 e #82). Os asteriscos (*) correspondem ao T-DNA que está interrompendo o gene *APUM*.

A Figura 30 mostra que, com exceção da #30 em *APUM-2*, todas as linhagens testadas apresentam várias inserções além da esperada. Sendo assim, a análise de fenótipo fica comprometida pelo excesso de T-DNAs no genoma uma vez que não é possível determinar se a alteração, se houver, está correlacionada à interrupção dos genes *APUM* ou a outro segmento do genoma que também não está intacto. Desta forma, algumas linhagens foram escolhidas para sofrer cruzamentos com plantas selvagens com a finalidade de eliminar as inserções indesejadas.

Como *APUM-2* tem um representante com apenas a inserção no local desejado, as linhagens #10 e #82, correspondentes aos nocautes *APUM-1* e *APUM-3*, respectivamente, foram escolhidas para os cruzamentos pois as demais disponíveis, #26 e #50, não produzem plantas normais fato que dificultou o crescimento e formação de flores para o experimento e também poderia influenciar na análise do fenótipo.

Assim, após quatro cruzamentos entre as plantas #10 e #82, a primeira perdeu várias inserções, como mostra a Figura 31, restando apenas a de interesse. Com relação à #82, a observação da Figura 31 indica que essas plantas perderam poucas inserções com os cruzamentos. Então, apenas as plantas #30 de *APUM-2*, chamadas a partir de agora de *apum-2⁻*, foram estudadas e para isso, foram selecionados os homozigotos para os ensaios. A interrupção do gene foi confirmada por PCR e seqüenciamento, e também por cruzamento com plantas selvagens cuja progênie apresentou 25% de plantas inviáveis à kanamicina.

Figura 31: Southern Blot de plantas nocaute #10 e #82 após quatro cruzamentos com plantas selvagens. A sonda utilizada reconhece o gene de resistência à kanamicina (NPT II) presente no T-DNA inserido no

genoma vegetal. Todas as amostras foram clivadas com EcoR I. Os asteriscos (*) correspondem ao T-DNA que está interrompendo o gene *APUM* e S ao DNA de planta selvagem (controle).

As plantas *apum-2⁻* foram analisadas em vários estágios do desenvolvimento quanto à estrutura da roseta (filotaxia e número de folhas), comprimento da raiz principal, número de raízes laterais, tempo de floração e formação de frutos e sementes. Em todos esses quesitos, as nocautes se desenvolveram dentro dos padrões das plantas selvagens, sem nenhuma anormalidade. A formação de calos *apum-2⁻* também foi observada e comparada com a de plantas selvagens. O resultado obtido mostrou que a ausência de APUM-2 desta não impede o desenvolvimento desses tecidos indiferenciados.

As plantas #10, nocaute de *APUM-1*, também foram observadas para efeito de comparação. Apesar de conter duas inserções, foram selecionadas plantas homozigotas para a interrupção em *APUM-1* por reação de PCR e, da mesma forma que para *apum-2⁻*, também não foi observado fenótipo alterado.

A falta da proteína APUM-2 pôde ser confirmada por Western Blot, ilustrado na Figura 27B. Como planta total apresenta quantidade mais baixa das proteínas em estudo em relação a calos, a comparação entre quantidades iguais de extratos destes tecidos evidencia a ausência de APUM-2, que entre as três é a proteína com maior peso molecular.

O RNA total de plantas *apum-2⁻* foi analisado por Northern Blot, mostrado na Figura 27A, e pode-se perceber uma banda forte abaixo dos *APUMs*, correspondente ao *APUM-2* truncado. A formação desta banda pode indicar que na porção 3'-UTR, ausente no truncado, exista alguma região de controle do transcrito. Nosso laboratório identificou nos três mensageiros estudados o elemento de ligação a APUM, o que significa que é possível que eles sofram auto-regulação.

4.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE SISTEMAS INDÚZÍVEIS DE SENSE E ANTISENSE.

4.3.1 Obtenção das plantas induzíveis:

A estratégia de RNA antisense é uma técnica largamente usada em plantas para investigar papel de enzimas específicas em passos do metabolismo e outros processos fisiológicos, além de permitir a elucidação de funções importantes de certos genes no

desenvolvimento. O antisense oferece um dos poucos recursos para a observação de fenótipos conseqüentes da redução da expressão de um dado gene, quando seu mutante não está disponível ou quando o gene em questão faz parte de uma família multigênica, como no caso dos genes *APUM*.

Os resultados de localização de *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3* e dos nocautes *apum-1⁻* e *apum-2⁻* mostraram forte indício de redundância funcional e por isso a sequência escolhida para o antisense foi o primeiro exon de *APUM-2*, que possui praticamente 100% de identidade entre eles, de forma a interferir com a expressão dos três ao mesmo tempo sem interferir com a expressão dos demais genes da família PUF de *Arabidopsis*.

Além do antisense, também foram feitas construções com o cDNA de cada um dos genes *APUM*, para a observação de fenótipos relacionados com a expressão ectópica de cada uma das proteínas APUM em estudo.

Nosso laboratório produziu construções de antisense e de sense sob o controle do promotor CaMV 35S, que promove a expressão constitutiva em todos os tecidos e etapas do desenvolvimento (Favaro, 2002). Entretanto, após a transformação das plantas, milhares de sementes foram plaqueadas em meio contendo o marcador de seleção e nenhuma planta antisense foi selecionada. Pôde-se observar nas placas que algumas plântulas demoravam mais tempo para morrer: até duas semanas mais do que aquelas sensíveis ao antibiótico, mantendo os cotilédones verdes. Isto sugere a hipótese de que a falta das proteínas APUM impede o desenvolvimento vegetal e inviabiliza a obtenção de transformantes carregando um antisense constitutivo.

Assim, as plantas antisense e sense foram obtidas através de um sistema de expressão induzível por dexametasona, utilizando o vetor binário pTA210, via expressão da proteína GVG (ver Materiais e Métodos).

Como mencionado na seção de materiais e métodos, o antisense foi obtido por reação de PCR utilizando como molde a sequência genômica de *APUM-2* seguido de ligação com extremidades cegas no sítio de Xho I do vetor pTA210. Os cDNAs de cada um dos genes em estudo foram obtidos por reação de RT-PCR a partir de RNA de planta total e clonados no vetor binário por reação de recombinação.

Após a obtenção das construções no vetor binário pTA210, cada construção foi transformada em *Arabidopsis* via *Agrobacterium* EHA105. A cepa LBA4404 usada para transformação dos repórteres em planta não foi utilizada porque esta apresenta o plasmídeo interno com o mesmo marcador de seleção que o pTA210 (estreptomicina) e também porque a EHA105 é muito mais virulenta. Essa eficiência da virulência pôde ser comprovado pelo número de transformantes: partindo da mesma quantidade de plantas selvagens, foram obtidas mais de quarenta plantas transformadas com cada uma das construções induzíveis enquanto que não foram obtidas nem dez plantas transformadas com os repórteres utilizando a LBA4404.

A seleção foi feita com higromicina e o DNA das plantas transformadas foi analisado por Southern Blot para identificar as linhagens contendo uma inserção e em posições diferentes do genoma. A Figura 32A apresenta algumas linhagens antisense obtidas, dentre elas as de número 9, 14, 31 e 36, que apresentam inserção única, foram utilizadas nos ensaios. Além das antisense, esta figura mostra também o resultado de duas plantas contendo a construção sense para *APUM-2*, a CD-2-2 e CD2-9, que também apresentam uma inserção em pontos distintos do genoma, e que foram utilizadas nos ensaios com o indutor de dexametasona. As demais transformantes para essas duas construções também foram analisadas por Southern, mas como foram feitas em diferentes membranas, para facilitar foi mostrada apenas aquela contendo as linhagens estudadas.

Como controle, algumas plantas foram transformadas com o vetor pTA210 sem nenhuma sequência sendo induzida pela proteína GVG para certificar de que não hajam fenótipos relacionados com a interferência do sistema induzível. Após as transformações, foram selecionadas 84 plantas controle e 27 delas foram analisadas por Southern blot, como mostra a Figura 32B.

Figura 32: Southern blot de plantas transformadas com as construções induzíveis antisense (de número 9, 31, 36 e 14) e constitutiva para *APUM-2* (CD2-2 e CD2-9) em (A), e com o vetor pTA210 vazio, isto é, sem nenhuma construção para ser induzida em (B). O DNA genômico foi clivado com *EcoR* I e as membranas marcadas com a sequência do gene GVG presente no T-DNA amplificada por PCR e também clivada com *EcoR* I.. O número sobre os poços corresponde ao número da linhagem obtida. Em B, a linhagem 4 não foi adicionada (estéril). C: controle, DNA de planta selvagem.

As transformantes com as construções sense para os cDNAs de *APUM-1* e *APUM-3* também foram avaliados por Southern Blot. Foram obtidas mais de quarenta plantas para cada uma e algumas estão representadas nas membranas da Figura 33.

Figura 33: Southern blot de plantas transformadas com a construção induzível constitutiva do cDNA de *APUM-1* (A) e *APUM-3* (B). O DNA genômico foi clivado com *EcoR* I e as membranas foram marcadas com a sequência do gene GVG presente no T-DNA amplificada por PCR e clivada com *EcoR* I. O número sobre os poços corresponde ao número da linhagem obtida. C: controle, DNA de planta selvagem.

Assim, para os ensaios com o indutor dexametasona foram utilizadas as plantas antisense 9, 14, 31 e 36, com inserção única, e 22 e 23 que contêm mais de uma inserção (a primeira com duas e a segunda com mais de três, não mostradas nas membranas acima).

Como controle, foram escolhidas as de número 13 e 23 (cada uma com inserção única em pontos diferentes do genoma), e a 16 (contendo duas inserções). Com relação às plantas sense, para *APUM-2* foram analisadas as CD2-2 e CD2-9, para *APUM-1* foram analisadas as de número 6, 9 e 13 (chamadas de CD1-6, CD1-9 e CD1-13) e para *APUM-3* as de número 5, 7 e 9 (chamadas de CD3-5, CD3-7 e CD3-9), todas com inserção única.

4.3.2 Ensaios de indução e identificação dos fenótipos relacionados com expressão reduzida e expressão ectópica dos genes APUM:

Os ensaios preliminares de indução foram feitos através da semeadura de linhagens homozigotas sense, antisense e controle, discriminadas na seção anterior, em placas contendo diversas concentrações de dexametasona (0, 0.1, 1, 3, 5, 7 e 10 μ M) diluídas em meio $\frac{1}{2}$ xMS sem o marcador de seleção. Essas plantas cresceram em regime de dia longo durante duas semanas, sendo observadas todos os dias.

Todas as linhagens testadas, com exceção das plantas controle e selvagem, desenvolveram fenótipo na presença do indutor que se intensificava conforme o aumento de sua concentração.

As linhagens contendo uma inserção heterozigotas em meio com indutor mostraram que apenas 25% delas apresentavam fenótipo realmente forte enquanto que as demais tinham desde a aparência normal até uma leve mudança. Isso poderia indicar que uma única cópia do inserto no genoma não era suficiente para provocar a diminuição da expressão dos genes *APUM* e por isso os experimentos foram feitos com sementes homozigotas. Em contraponto, as linhagens antisense 22 e 23 com mais de uma inserção não desenvolveram fenótipo.

Os organismos transgênicos modificados por RNA antisense não são estritamente mutantes do gene de interesse, uma vez que a estrutura do gene alvo não é afetada. Por isso, a expressão não é completamente inibida podendo haver taxas residuais e algum acúmulo de proteína funcional. Desta forma, linhagens provenientes da mesma transformação podem apresentar taxas diferentes de expressão. Entre as antisense, a linhagem 31 foi a que mostrou o fenótipo mais exacerbado enquanto que a 14 apresentou a menor diferença. Com relação às plantas sense, as CD2-2 e CD2-9, que induzem

APUM-2, foram as mais fortes em comparação com as demais. A Figura 24 ilustra um ensaio de gradiente de concentração de dexametasona com as linhagens mais fortes.

Figura 34: Análise de fenótipo em gradiente de concentração do indutor. Foram plaqueadas as linhagens antisense 31 e as do cDNA de *APUM-2* (linhagens CD2-2 e CD2-9), além do controle (linhagem 23 - Ctl) e planta selvagem (S). No canto inferior direito está discriminada a concentração de dexametasona.

Nas várias concentrações de dexametasona, pôde-se observar que em 0.1 e 1µM, as plantas não apresentavam o fenótipo que se inicia a partir de 3µM, aumentando em 5µM e se estabilizando entre 7 e 10µM, não apresentando diferenças significativas na intensidade das características. Foi testado também as concentrações de 20 e 30µM que não apresentou mudanças significativas em relação às crescidas em 7 e 10µM.

O fenótipo descrito apareceu na presença do indutor em todas as vezes que o experimento foi repetido. As sementes controle também foram germinadas e crescidas em meio com as mesmas concentrações de dexametasona, em homo e heterozigose, e não houve diferença entre elas e as selvagens, indicando que provavelmente as características observadas são provocadas pelas seqüências sense e antisense clonadas e não pela influência do T-DNA e de seus genes ou do indutor no metabolismo vegetal.

O fenótipo mencionado acima se caracteriza por plantas cloróticas, com a roseta 35 a 40% menor em relação à selvagem mas mantendo a filotaxia normal, raízes menores e menos ramificadas e produção de flores estéreis (sem formação de sementes). A Figura 25A ilustra plantas de duas semanas com essas características. Curiosamente, tanto as linhagens sense quanto as antisense desenvolveram o mesmo fenótipo.

Além de plantas com este conjunto de aspectos, foi possível observar plantas que não se desenvolviam, isto é, elas abrem os cotilédones mas sem nenhum tipo de crescimento ou desenvolvimento de raiz ou folhas como mostra a Figura 35B. Plantas com essas características apareciam corriqueiramente em todas as linhagens em qualquer concentração de indutor, mas não foram observadas entre as selvagens e as controle. Entretanto, o número de plantas com essas características não apresentou proporcionalidade com o aumento de dexametasona no meio.

É importante lembrar que essas plantas que não se desenvolvem foram observadas durante a seleção de transformantes contendo o antisense sob o controle do promotor constitutivo CaMV 35S, como mencionado anteriormente. Portanto, existe a possibilidade de que esse fenótipo seja o efeito mais drástico da modificação da expressão dos genes *APUM*.

Figura 35: Aspecto do fenótipo das várias linhagens sense e antisense com três semanas de vida. Em (A), plantas antisense (AS), cloróticas, que apresentam o diâmetro da roseta menor em relação a plantas selvagens (S). Em (B), plantas cujo desenvolvimento é interrompido (possível ação mais drástica do antisense) em relação a uma selvagem de mesma idade. As plantas sense apresentaram as mesmas características.

Como a observação do fenótipo das plantas cloróticas estava diretamente relacionada com a presença do indutor e com o aumento da sua concentração, estas foram analisadas através de testes moleculares. Assim, o RNA total das plantas crescidas nas concentrações de 0, 5 e 10 μ M foi submetido a um ensaio de Northern blot para

comprovar a indução do antisense. A sonda utilizada foi o exon 1 (a mesma sequência do antisense) e foram aplicados 20µg de RNA total. A Figura 36 representa o resultado do experimento de Northern indicando a forte expressão da sequência antisense na linhagem 31, que apresentou um efeito mais forte e um fenótipo mais reprodutível. Quando essas plantas são crescidas na vertical o fenótipo fica mais intenso e se mantém por mais tempo, talvez pelo aumento da disponibilidade de indutor e conseqüentemente de absorção. O poço 6 da primeira membrana mostra esse aumento na expressão do antisense em relação à crescida na horizontal na mesma concentração (poço 7) e este resultado comprova que o fenótipo observado é efeito da expressão do antisense. As demais também foram analisadas por Northern e apresentaram o mesmo resultado mas menos intenso.

Figura 36: Northern blot de 20µg de RNA total de plantas selvagem, sense e antisense em duas membranas de nylon. Na primeira membrana, os poços 1, 2 e 3 são respectivamente, selvagens crescidas com 10µM de dexametasona, plantas controle 23 crescidas com 0 e 10µM de dexametasona. Os poços 4, 5 e 6 são plantas antisense 31 crescidas em 0 µM, 5 µM, e 10µM de dexametasona e 7 são plantas crescidas em 10µM na vertical. Na segunda membrana, os poços 8, 9 e 10 são amostras de plantas sense CD2-2 crescidas em 0µM, 5µM e 10µM de dexametasona, respectivamente, e para efeito de comparação, os poços 11 e 12 são plantas selvagens e controle 23 crescidas em 10µM de dexametasona.

Com relação à população de mensageiros, o ensaio de Northern não é esclarecedor, uma vez que a expressão dos genes *APUM* não é abundante. Entretanto, é possível observar que a banda nas plantas sense CD2-2, na segunda membrana da Figura 36, é levemente mais forte do que os controles aplicados juntos. A comprovação desta observação foi feita por experimentos de RT-PCR semiquantitativo onde foi feita a razão entre a quantidade dos mensageiros de cada *APUM* e de *TUBULINA* amplificadas por reação de PCR para cada linhagem crescida nas concentrações de 0 e 10µM de

dexametasona e para plantas selvagens (controle). Em seguida, as razões das linhagens transgênicas foram divididas pela razão da selvagem para a identificar se ocorreu alteração no padrão de expressão dos genes *APUM*. Essas relações estão mostradas no gráfico da Figura 37.

Figura 37: Relação obtida por RT-PCR semiquantitativo entre a expressão dos genes *APUM* das linhagens 31 antisense e CD2-2, crescidas em 0 e 10µM de indutor, e plantas selvagens, crescidas em 10µM.

A Figura 37 mostra que o nível de mensageiros *APUM* das plantas 31 crescidas em meio com 0 e 10µM de dexametasona e das CD2-2 na ausência de indutor é semelhante ao das plantas selvagens, pois a relação entre eles está próxima de 1. Já a CD2-2 crescida em 10µM de indutor, apresenta um aumento de pelo menos 40% na expressão dos três genes. Então, o antisense não está interferindo na população de mensageiros *APUM* enquanto que a expressão constitutiva de *APUM-2* produziu um aumento também no nível de transcrição dos outros dois.

Desta forma, foi avaliada a quantidade de proteína dessas plantas para observar a influência do antisense e do aumento dos níveis de transcrição nas plantas CD2 na regulação da tradução de *APUM*. Com esta finalidade, extratos de proteínas de plantas 31 e CD2-2 crescidas nas várias concentrações de dexametasona foram quantificados pelo método Hartree e 10µg de cada amostra foram analisados por Western blot, como mostra a Figura 38.

As linhagens 31 apresentaram uma leve redução na quantidade de proteínas *APUM*, sendo mais expressiva em 7 e 10µM de indutor. Na parte inferior da Figura 38A

está quantificada a banda de proteína marcada sendo possível que com o aumento da concentração de dexametasona, ocorra uma diminuição da quantidade de proteína presente no extrato. Para comprovar a diminuição dos APUM, foi feito um Slot blot (Figura 38B), no qual 2.5, 1, 0.5 e 0.1 μg das mesmas amostras de proteína total foram aplicadas numa membrana para facilitar a visualização. Os extratos contêm plantas com intensidade do fenótipo descrito variada, e portanto é uma média do comportamento delas naquela concentração de indutor. O resultado mostra que o antisense está realmente diminuindo a quantidade de proteína presente.

Figura 38: Análise de extrato de proteínas das linhagens 31 e CD2-2. (A) Western blot da linhagem 31, os números embaixo das bandas indicam a densidade óptica da banda das proteínas APUM e S é amostra de planta selvagem. Em (B), Slot blot da linhagem 31 e (C) é Western Blot de plantas CD2-2. Os números entre parênteses indicam a concentração de dexametasona presente no meio de crescimento. Tanto as membranas de Western quanto de Slot blot foram marcadas com o anti-soro de coelho contra a região N-terminal de APUM. Na membrana C foi utilizado o sistema de detecção NBT/BCIP (que aumentou o surgimento de interações inespecíficas devido ao tempo de exposição de uma noite) e A e B o sistema ECL.

Como dito anteriormente, as plantas sense mostraram fenótipo semelhante às antisense na presença do indutor. Assim, os níveis de proteína APUM também foram avaliados, como ilustra a Figura 38C e, da mesma forma que nas antisense, está ocorrendo diminuição da tradução de proteínas APUM, a partir de 3 μM de dexametasona, o que indica que o fenótipo observado é devido à redução nos níveis das

proteínas em estudo e que as plantas CD2 não estão expressando a proteína APUM-2 na presença do indutor, apesar do aumento no nível dos mensageiros mostrado na Figura 37.

As plantas CD2 mostraram um fenótipo mais intenso do que as antisense. Em alguns casos, a redução da expressão de genes específicos pode ser atingida pela inserção de construções sense, liderando a uma cossupressão tanto do gene introduzido quanto da cópia natural do genoma em um número variável de transformantes (Jorgensen, 1995). Assim, não foi possível obter fenótipos relacionados com superexpressão.

Com relação às plantas CD1 e CD3, estas apresentam fenótipo semelhante ao antisense e a CD2 mas os mensageiros e as proteínas não foram avaliados. As plantas controle apresentaram taxas de expressão de mensageiros e de tradução de proteínas semelhante às plantas selvagem.

Foi dito anteriormente que um dos fenótipos muito comum encontrado nos experimentos de indução foi o de plantas que apresentavam o desenvolvimento interrompido, como o mostrado na figura 35B e que ele foi observado também durante a seleção de plantas contendo o antisense constitutivo. Essas plantas apenas abrem os cotilédones e se mantêm neste estado por semanas. Foi feita uma tentativa de avaliar a expressão das proteínas APUM destes indivíduos por Western Blot, comparando-a com a de plantas desde a germinação até o desenvolvimento dos primeiros primórdios. A Figura 39 mostra um Western feito a partir de 10µg de extrato de plantas (quantidade máxima de extrato que pode ser transferida para uma membrana de nitrocelulose; Weigel & Glazebrook, 2002) colhidas desde o dia 1 até o dia 7 de desenvolvimento. Nesta mesma membrana foi adicionado extrato destas plantas (chamadas de P na membrana).

No dia 1, o embrião de *Arabidopsis* rompe o endosperma e a semente se abre emergindo o hipocótilo e a raiz. A saída dos cotilédones só ocorre entre os dias 2 e 3 e com o estímulo da luz tomam-se verdes. A partir do dia 2 ocorre um aumento expressivo na quantidade das proteínas APUM. Os primeiros primórdios foliares despontam entre os dias 3 e 4 e, nesta etapa, o meristema ainda apresenta um número menor de células na zona central e periférica, se expandindo até o dia 7 onde manterá um número constante de células até o final da fase vegetativa. No dia 6, o primeiro par de folhas está maior mas ainda em fase de desenvolvimento e o segundo começa a despontar, aumentando a massa crítica da planta e diluindo a quantidade das proteínas APUM (Bowman, 1994).

Figura 39: Análise de extratos de proteínas de plantas com 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias de vida em comparação com plantas antisense que tem seu desenvolvimento interrompido (P). A membrana foi exposta por uma noite no filme fotográfico.

As plantas P chegam a abrir os cotilédones e param de se desenvolver, apresentando simplesmente a formação dos dois primeiros primórdios, podendo ser comparadas com plantas do dia 2 ou 3. A análise do Western Blot, mostra que a banda correspondente aos APUM não aparece no poço das plantas com esse fenótipo. Além disso, o extrato dessas plantas apresentou marcação inespecífica semelhante ao dos poços do dia 1 e 2, uma vez que a membrana foi exposta por uma noite. Então, é provável que a falta de desenvolvimento dessas plantas seja uma resposta à diminuição da expressão dos genes *APUM*, talvez o fenótipo mais severo, embora não seja possível dizer que ocorreu supressão total da tradução.

4.3.3 Análise do fenótipo:

Após a comprovação de que o fenótipo observado está correlacionado com a diminuição na tradução das proteínas APUM, alguns aspectos destas plantas foram analisados. Como dito anteriormente, as transformantes, na presença do indutor, apresentaram o diâmetro da roseta menor em relação às selvagens, redução do comprimento das raízes e do número de raízes laterais assim como baixa fertilidade. Não existe efeito óbvio no tamanho do caule e na taxa de alongamento do hipocótilo.

É importante dizer que entre as transformantes antisense, a linhagem 31 foi a que apresentou o fenótipo mais intenso e por isso, os dados mostrados nesta seção são correspondentes a esta linhagem.

Figura 40: Comparação entre folhas P1 selvagens (S) e transformantes da linhagem 31(AS) de vários indivíduos. Ocorre uma diminuição do limbo nas transformantes, variável entre cada indivíduo, em relação à selvagem.

A redução do tamanho da roseta ocorreu devido à diminuição do tamanho do limbo foliar, como observado na Figura 40, e isto pode ser consequência da diminuição do tamanho das células que compõem as folhas ou da menor taxa de divisão celular durante o desenvolvimento do órgão. Desta forma, foi feita a comparação dos tecidos internos entre as plantas induzíveis e selvagens por microscopia óptica (vista frontal).

Foi observado que, quando as folhas provenientes de plantas transformantes crescidas em dexametasona apresentavam o mesmo tamanho que as selvagens, embora cloróticas, as células do parênquima paliádico e da epiderme, por exemplo, eram maiores como observado nas Figuras 41A e B, respectivamente. Além disso, a comparação entre folhas selvagens e transformantes de mesma idade mas de tamanhos diferentes, como as da Figura 40 onde as induzíveis são menores, o tamanho das células é equivalente. Portanto, essas observações sugerem que a redução do tamanho das folhas é proveniente da diminuição do número de células como resultado de uma menor taxa de divisão celular dentro da folha em formação.

Figura 41: Tecidos internos de folhas P1 selvagens e da transformante antisense 31 (AS31). Em (A), comparação das células do parênquima paliçádico e, em (B), da epiderme, de plantas selvagens e AS31. As transformantes apresentam volume celular maior do que as selvagens (Vista frontal, 200x).

O aspecto clorótico das folhas também é devido a essa redução na quantidade de células. A observação dos cloroplastos nas células por microscopia de imersão mostrou que o número de cloroplastos por célula é equivalente entre as várias linhagens estudadas e a selvagem (dado não mostrado). A expansão das células foliares não interfere na produção de cloroplastos dentro delas.

Com relação às raízes, foi possível observar menor ramificação e crescimento em extensão. A comprovação quantitativa foi feita através do crescimento de plantas em placas na vertical. Primeiramente, as sementes foram germinadas por três dias em duas placas contendo meio $\frac{1}{2}$ xMS e NPA, este último para sincronizar o desenvolvimento das raízes laterais, e em uma delas foi adicionado o indutor dexametasona. Em seguida, as plântulas de cada placa foram transferidas para quatro meios diferentes contendo: apenas MS, MS mais dexametasona, MS mais sacarose e MS mais sacarose e dexametasona, como mostra o esquema da Figura 42.

Figura 42: Esquema do experimento de análise das raízes laterais e principal. Plantas foram germinadas em duas placas contendo meio MS e NPA sendo que uma delas continha também dexametasona. Após três dias, as plântulas de cada placa foram transferidas para quatro meios diferentes (círculos em azul) e após duas semanas em crescimento vertical, as raízes laterais foram contadas e a principal foi medida. As setas indicam transferência; **sac**: sacarose, **dex**: dexametasona.

Após a transferência, as placas foram colocadas na vertical numa estufa em regime de dia longo por duas semanas e em seguida, as raízes laterais foram contadas e as principais medidas. Na Tabela 9, estão ilustrados os valores obtidos para a selvagem e para a linhagem AS31.

Tabela 9: Comprimento da raiz principal e número de raízes laterais produzidas por plantas selvagens e pela linhagem antisense 31 na presença e ausência de indução.

Germinadas em:	Transferidas para:	Número de RL AS31	Comprimento da raiz principal AS31 (cm)	Número de RL selvagem	Comprimento da raiz principal selvagem (cm)
NPA	MS	8,4±1,4	3,8±0,3	7,1±2,6	4,3±0,2
	MS + dex	5,5±0,8	2,0±0,5	8,8±1,8	4,2±0,2
	MS + sac	11,6±1,9	6,2±0,3	10,0±1,4	5,7±0,2
	MS + sac + dex	10,2±3,2	6,2±0,3	10,5±1,6	5,7±0,3
NPA + dex	MS	9,1±1,7	3,6±0,9	8,0±1,9	4,6±0,8
	MS + dex	4,7±0,7	2,7±0,4	8,5±1,3	4,6±0,5
	MS + sac	10,5±2,6	6,3±0,8	11,2±3,2	6,8±0,9
	MS + sac + dex	8,1±2,5	5,8±0,2	12,4±2,5	6,4±0,4

A análise da Tabela 9 mostra que as plantas AS31 transferidas para dexametasona apresentaram número menor de raízes e comprimento de raiz principal menor do que as crescidas na ausência do indutor. As selvagens mostraram o mesmo comportamento com ou sem dexametasona e semelhante às AS31 na ausência do indutor. As plantas controle também foram avaliadas e tiveram o mesmo resultado das selvagens. A presença de dexametasona durante a germinação (NPA + dex) não traz uma diferença significativa na formação das raízes, mas mostra uma leve redução em comprimento da principal e número de laterais, reforçando o papel do indutor e conseqüentemente, das proteínas APUM, no desenvolvimento desses órgãos.

As plantas transferidas para um meio com sacarose parecem não sofrer grande influência do indutor na formação das raízes e no crescimento longitudinal. Entretanto, é possível observar o aspecto clorótico das plantas no início da primeira semana, no entanto uma avaliação da ramificação feita neste período não trouxe informações significativas do número de raízes. Assim, a sacarose complementa o fenótipo da sacarose.

Esse experimento foi repetido quatro vezes e o mesmo comportamento foi observado. Em alguns casos, o desvio padrão para as plantas antisense foi bastante elevado, coerente com o fato de não estarmos trabalhando com mutantes.

O desenvolvimento das raízes laterais é dependente da auxina transportada do caule que por sua vez interfere na atividade do ciclo celular das células do periciclo. A adição de auxina exógena faz com que várias células iniciem o desenvolvimento de raízes ao mesmo tempo, como descrito anteriormente. Então, foram feitos testes de resposta à auxina para observar o comportamento das plantas com taxa de APUM reduzida frente aos estímulos do NAA. Desta maneira, plantas selvagens e transformantes foram germinadas em NPA por três dias, para a sincronização da iniciação das raízes laterais, e depois foram transferidas para duas placas contendo NAA sendo que uma delas continha o indutor dexametasona. As plantas cresceram por duas semanas e o resultado deste experimento pode ser observado na Figura 43.

Figura 43: Influência da auxina na formação de raízes laterais de plantas com baixa expressão de proteínas APUM. Em (A), plantas crescidas por duas semanas em meio contendo auxina sintética na ausência e presença do indutor dexametasona. Em (B), Western Blot dessas transformantes crescidas em NAA com e sem indução, os números correspondem à quantificação das bandas de APUM, mostrando uma redução da expressão de 57% na presença do indutor.

O crescimento longitudinal e o desenvolvimento de raízes laterais são eventos distintos. Ao longo das duas semanas, as plantas transgênicas apresentaram um atraso no desenvolvimento das raízes laterais, mas devido ao grande número de raízes que emergem na presença de auxina a contagem dos primórdios é muito complicada. É provável que a quantidade de raízes formadas nas plantas AS31 seja menor do que nas selvagens. Com relação ao crescimento longitudinal das raízes laterais, a Figura 43A deixa bem evidente de que a diminuição dos APUM, comprovada pelo Western Blot da Figura 43B, produz uma redução do comprimento.

Com relação aos tecidos florais, não foi possível observar nenhuma alteração morfológica que explica a baixa taxa de fertilidade. As células germinativas masculinas e femininas se desenvolveram normalmente nas transformantes e talvez tenha ocorrido alguma alteração em termos de funcionamento celular que interfira na fertilidade, mas que não foi estudado neste trabalho.

4.3.4 Relação entre APUM e KRP-2:

Fazendo uma pesquisa na literatura disponível sobre controle de ciclo celular e diferenciação em *Arabidopsis*, é possível relacionar as características do fenótipo observado nas plantas induzidas com redução da concentração da proteína APUM com o

de plantas que superexpressam o gene *KRP-2*, um inibidor de CDK (quinase dependente de ciclina). A superexpressão de *KRP-2* inibe a progressão do ciclo celular nos primórdios foliares afetando o padrão temporal de divisão e diferenciação celular (De Veyler et al., 2001, Beemster et al., 2006), reduzindo também a ramificação das raízes sendo um dos principais reguladores da iniciação dos primórdios de raízes (Casimiro et al., 2003). Também foi observada baixa fertilidade, mas ainda não existem estudos publicados sobre a função de *KRP-2* em flores.

Em nosso laboratório, foi provado que os genes *APUM* em estudo codificam proteínas que têm a capacidade de interagir especificamente com RNAs, reconhecendo seqüências no 3'-UTR de mensageiros. Através de “screenings” de uma biblioteca de RNAs no sistema triplo-híbrido de levedura, também foi possível identificar uma seqüência consenso para os 3 APUMs, chamada de Elemento de ligação a APUM (Francischini & Quaggio, artigo submetido). Interessantemente, o mensageiro de *KRP-2* contém um elemento de ligação a APUM, o que faz dele um alvo em potencial das proteínas PUF de *Arabidopsis*. Dessa forma, se torna possível levantar a hipótese de que a diminuição da quantidade de proteínas APUM, pode estar reduzindo a regulação dos mensageiros *KRP-2*, o que poderia estar resultar em uma maior quantidade de proteína, mimetizando o fenótipo de superexpressão já estudado por outros laboratórios.

Baseado na hipótese acima, foi avaliada a quantidade de mensageiros de *KRP-2* presentes em plantas AS31 e CD2-2 através de experimentos de RT-PCR semiquantitativo. Assim, foi feita a razão entre a quantidade dos mensageiros de *KRP-2* e de *TUBULINA* amplificadas por reação de PCR para cada linhagem crescida nas concentrações de 0 e 10 μ M de dexametasona e para plantas selvagens crescidas em 10 μ M do indutor (controle). Em seguida, as razões das linhagens transgênicas foram divididas pela razão da selvagem para a identificar se ocorreu alteração no padrão de expressão do gene *KRP-2*. Essas relações estão mostradas na Figura 44, que mostra o resultado de reações de RT-PCR feitas com três extrações diferentes de RNA.

Figura 44: Relação obtida por RT-PCR semi-quantitativo da expressão do gene *KRP-2* entre as linhagens 31 antisense e CD2-2, crescidas em 0 e 10 μ M de indutor em relação a expressão de plantas selvagens crescidas em 10 μ M. Para cada cDNA analisado, foram feitas quatro reações de PCR.

A Figura 44 mostra que o nível de mensageiros de *KRP-2* das plantas 31 e das CD2-2 crescidas sem indução é semelhante ao das plantas selvagens, pois a relação entre eles está próxima de 1, enquanto que em meio contendo 10 μ M de dexametasona, ambas as linhagens apresentam um aumento de quase 50% na expressão de *KRP-2*. Portanto, a diminuição da quantidade das proteínas APUM pode ser a causa direta ou indireta do aumento da expressão de *KRP-2*, sendo este um provável alvo regulado.

Como mencionado na introdução deste trabalho, uma única proteína PUF pode estar envolvida em diferentes processos do desenvolvimento, regulando a tradução de diferentes mensageiros. Desta forma, o fenótipo observado também pode ser consequência da interferência na expressão de vários outros mRNAs.

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A expressão gênica em células eucarióticas é regulada através de uma rede intrincada de passos interconectados, onde muitos mensageiros são regulados através da ligação de proteínas reguladoras a suas regiões 3' não traduzida (3'-UTR). Esses complexos proteína-RNA controlam a localização do mensageiro, bem como sua tradução e estabilidade. Uma família deste tipo de reguladores, a família PUF, é caracterizada por um domínio de ligação a RNA altamente conservado na região C-terminal da proteína, presente desde leveduras a humanos e plantas. As elucidações das características bioquímicas e da função genética conservada dessas proteínas emergiram de estudos com organismos modelos. Frequentemente, as proteínas PUF funcionam criando gradientes de proteínas que causam divisão celular assimétrica e regulam a especificação do destino da célula. Em adição, foi proposto recentemente, que a função ancestral destas proteínas é a de sustentar a proliferação mitótica de células tronco (Wickens et al., 2002).

Em *Arabidopsis*, não foi associada função biológica a nenhuma das vinte e cinco putativas proteínas PUF (Figura 5). Nosso laboratório tem demonstrado que dentre essas proteínas, apenas APUM-1 a APUM-6 parecem ter função molecular conservada, ou seja, reconhecem RNA com especificidade semelhante a homólogos de outros organismos (Francischini & Quaggio, artigo submetido). Neste trabalho, foram feitos experimentos na tentativa de esclarecer as funções biológicas das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3.

Inicialmente, os experimentos de Northern Blot e de RT-PCR semiquantitativo (Figuras 10 e 11) mostraram que é possível encontrar transcritos de cada um dos três genes estudados nos vários tecidos vegetais, embora não sejam abundantes. O tecido que mais expressa os três mensageiros é o floral, enquanto o de caule internó apresenta menor expressão.

O curioso da expressão desses genes é que a diferença da quantidade de mensageiros é sempre a mesma entre eles, independente da amostra analisada (Figura 11). Isto é um forte indício de que eles devem trabalhar de maneira complementar ou redundante (Spasov & Jurecic, 2003). Em adição, a proximidade dos genes em estudo no

cromossomo II, sendo *APUM-1* e *APUM-2* encontrados lado a lado, e o alto nível de identidade entre eles, superior a 90%, mostram que essas duplicações no genoma são recentes e que provavelmente não houve tempo suficiente para que cada gene evoluísse de forma a desenvolver papéis diferentes. Como mencionado na Introdução, homólogos com altos níveis de identidade em termos de sequência apresentando redundância funcional, são características muito comuns nos organismos que apresentam diversas cópias de genes PUF.

Os experimentos com os nocautes também confirmam a complementaridade de função entre os três genes em estudo. As linhagens *apum-1⁻* e *apum-2⁻* não apresentaram fenótipo aparente, fato que indica que quando uma cópia está ausente, as demais podem substituí-la. Apesar disso, o Northern Blot da Figura 27 apresenta a formação de uma banda forte correspondente ao transcrito *APUM-2* truncado. Uma hipótese para explicar esse comportamento é a de que *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3* possam se auto-regular. De fato, nosso laboratório identificou um elemento de ligação a *APUM* nos três transcritos em questão e o Doutorando Carlos Francischini obteve resultados mostrando que *APUM-2* pode se ligar ao seu próprio transcrito. Esse comportamento já foi descrito em *C. elegans*, onde foi mostrado que a falta das proteínas altamente idênticas FBF-1 ou FBF-2 acarreta um aumento na quantidade de proteína do homólogo expresso (Lamont et al., 2004).

Infelizmente, a falta de plantas mutantes individuais apresentando apenas uma inserção de T-DNA para cada gene estudado dificultou uma análise mais detalhada da função biológica dos mesmos, uma vez que seria possível obter duplo e triplo mutantes através de simples cruzamentos entre as plantas.

Na tentativa de compreender o papel de cada proteína, foram obtidas plantas carregando sistemas repórteres com a enzima GUS controlados pela região promotora de cada um dos genes, pois, apesar das sequências gênica e de proteína serem bastante idênticas, as regiões promotoras de *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3* são distintas.

Os ensaios de atividade de GUS mostraram que os promotores de *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3* dirigem a expressão nos mesmos estágios e períodos do desenvolvimento, produzindo mais um indício de redundância de função. Além disso, os três promotores respondem a auxina e a sacarose, aumentando a atividade do repórter no

periciclo. A única diferença foi vista nos tecidos de calos, onde *APUM-1* mostrou expressão reduzida em relação a *APUM-2* e *APUM-3* (Figura 26).

A expressão foi observada nos meristemas apical e axilares de caule, nos primórdios foliares, nas pontas de todas as raízes e naquelas iniciando o desenvolvimento (laterais e adventícias), assim como nos estames, mas especificamente nos polens. Cortes histológicos mostraram que, no meristema de caule, a expressão dos genes *APUM* se concentrou mais na zona periférica, região contendo células já determinadas e em vários graus de desenvolvimento e no primórdio foliar que nada mais é do que uma extensão da zona periférica contendo células de mesma natureza, apenas mais diferenciadas. Da mesma maneira, a porção da raiz que apresentou atividade do repórter foi a zona de alongamento, que também é constituída de células em vários estágios de desenvolvimento também determinadas a produzir os vários tipos de tecidos internos da raiz, e o periciclo durante a iniciação das raízes laterais e a formação de calos. Além disso, foi observada a expressão destes genes dentro do saco polínico, no tecido responsável pela formação das células germinativas, desde o início da formação dos polens até quando estes estão maduros, sendo que a parte central fica com a coloração mais forte (Figura 19). Assim, os genes *APUM* estão concentrados em regiões de intensa divisão e de diferenciação celular, sugerindo que eles possam estar desempenhando um importante papel no desenvolvimento vegetal, semelhante aos membros desta família já estudados em outros organismos modelo.

Os resultados obtidos com os repórteres foram comprovados por ensaios de imunolocalização. Todos os tecidos que apresentaram atividade de GUS ficaram marcados com o substrato NBT/BCIP da imuno. O único tecido que não foi observado nos repórteres e sim na imunolocalização foi a célula mãe de megásporo e nas tétrades. As Figuras 17C e D mostram que a expressão dos genes *APUM* é bastante baixa e isto é evidenciado pelo "background" alto. Talvez por esse motivo a expressão do repórter não foi detectada nestas células. Além disso, a infiltração de soluções como a do substrato X-GLUC em flores é muito mais difícil do que em qualquer outro tecido vegetal.

A localização da expressão dos genes auxilia, mas não é suficiente para inferir sobre sua função. A forma mais comum de se descobrir o papel de proteínas em plantas é a análise de fenótipos produzidos por mutantes. Entretanto, como dito anteriormente,

plantas *apum-1*⁻ e *apum-2*⁻ estudadas neste trabalho não apresentaram fenótipo diferente das selvagens. Portanto, em casos de famílias multigênicas, como a PUF de *Arabidopsis*, a técnica de RNA antisense tem sido uma ótima alternativa para a obtenção de fenótipos relacionados com a diminuição da quantidade de proteínas específicas em estudo (Bourque, 1995; Munroe, 2004). A sequência antisense utilizada foi o primeiro exon de *APUM-2* que apresenta quase 100% de identidade entre eles e que é específico para os três *APUM* em estudo e não com os demais genes da família PUF.

Os testes de indução foram realizados com várias linhagens e comparados com plantas selvagens e plantas carregando o sistema de indução sem o antisense como controle. O fenótipo observado foi reprodutível e confirmou os resultados da localização da expressão dos genes *APUM*, pois apresentou alterações nos tecidos marcados pela atividade de GUS. Além disso, testes moleculares comprovaram a eficiência tanto da indução como da diminuição da quantidade de proteínas *APUM* traduzidas (Figuras 36, 37 e 38).

As plantas antisense na presença do indutor mostraram uma diminuição no diâmetro da roseta conseqüente da redução do tamanho das folhas e estas se apresentaram cloróticas. A distribuição dos tecidos internos se manteve como nas folhas selvagens, em compensação, houve um aumento no tamanho celular em comparação com folhas selvagens de mesma idade (Figura 41). Isto significa que a falta das proteínas *APUM* faz com que o meristema assim como os primórdios foliares sofram menor número de divisão, sem interferir com o padrão de diferenciação, e a compensação deste fenômeno é feita pelo aumento do volume das células. Então, a observação dos repórteres na região periférica e nos primórdios foliares, pode significar que as proteínas *APUM* estão regulando a divisão celular enquanto a diferenciação ocorre.

As plantas antisense produziram flores estéreis, mas houve desenvolvimento de polens e óvulos com aparência normal. A causa da infertilidade não foi avaliada.

Outra característica do fenótipo obtido foram raízes com menor comprimento e ramificação. Foi observada a atividade do repórter GUS nas pontas das raízes e, da mesma forma que para o desenvolvimento foliar, é provável que a taxa de mitose tenha sido diminuída na zona de alongamento e por isso o crescimento em extensão foi reduzido.

As raízes laterais originam-se da região distal da zona de alongamento da raiz. Conseqüentemente, a proliferação celular durante o desenvolvimento da raiz lateral é um evento distinto da proliferação do meristema apical. Em *Arabidopsis*, as raízes laterais são originadas de células do periciclo adjacentes aos pólos do xilema, chamadas de fundadoras, que apresentam um destino diferente de sua progenitora. Como consequência disso, desempenha um papel principal durante os primeiros estágios da iniciação da raiz lateral.

Foi observada atividade de GUS durante a formação das raízes laterais. Como já dito anteriormente, não foi possível observar no primeiro estágio da iniciação pela dificuldade de se reconhecer qual célula será a iniciadora. Entretanto, as plantas com diminuição de tradução das proteínas APUM mostraram uma redução no número de raízes laterais de 35 a 50%, apresentada na Tabela 9, e portanto, a falta das proteínas APUM interfere de alguma forma na iniciação destes órgãos laterais. Além disso, o crescimento de plântulas em meio RIM mostrou a presença dos repórteres no periciclo antes da formação da grande produção de raízes laterais (Figura 28).

Em adição, foi observado que os promotores dos genes *APUM* respondem à auxina, elevando a expressão de GUS em todo o periciclo (quando está ocorrendo intensa atividade mitótica, como mostrou o marcador *CYCB1::GUS::NOS*). Além disso, o crescimento de plantas repórteres na presença do inibidor de transporte de auxina NPA não acusa a ativação do repórter no periciclo assim como não há formação de raízes laterais. O NPA não deixa a auxina produzida no caule migrar ao longo da raiz e aquela produzida neste órgão fica concentrada na ponta, local onde foi possível observar a expressão dos repórteres nesta condição (Figura 28A).

A formação das raízes laterais é disparada pela auxina e sem o sinal deste hormônio não ocorre o estímulo para a divisão celular nas células iniciadoras (Casimiro et al., 2003). Desta forma, os genes *APUM* estão envolvidos na coordenação da formação das raízes laterais em resposta à auxina.

Apesar do promotor de *APUM-2* apresentar a seqüência de resposta à auxina, este hormônio ativou os três repórteres de forma indireta (Figura 28B), uma vez que na presença de cicloeximida, não houve ativação de GUS, mostrando que há necessidade de síntese de proteínas para que o sinal do hormônio se conclua.

A auxina não apresenta efeito apenas na iniciação de novas raízes, ela também regula a iniciação de folhas, a posição e o tamanho das maduras, coordenando o sistema aéreo com o subterrâneo (Berleth & Sachs, 2001). Então, o fato das plantas antisense mostrarem má formação de folhas e redução da ramificação de raízes assim como os repórteres responderem à auxina, leva a conclusão de que os genes *APUM* estão envolvidos com o desenvolvimento vegetal coordenando a formação de folhas com as raízes em resposta a este hormônio, provavelmente através da regulação da taxa de divisão celular.

Também é provável que os genes *APUM* sejam regulados de acordo com os nutrientes do meio, mais especificamente pela sacarose, uma vez que os repórteres GUS são mais ativados no periciclo na presença deste açúcar (Figura 29). Além disso, as plantas antisense recuperaram o fenótipo normal quando transferidas para um meio contendo sacarose, mesmo contendo o indutor dexametasona (Tabela 9). A sacarose é um mediador de desenvolvimento em resposta ao meio ambiente, isto porque é o produto majoritário da fotossíntese (a glicose é convertida em sacarose para ser transportada para os outros tecidos) e também por regular vários genes codificadores de enzimas fotossintéticas. As condições de luz e de nutrientes são avaliadas pelo metabolismo vegetal através da concentração de sacarose em circulação (Riou-Khamlichi et al., 2000; Hatig & Beck, 2006).

Para finalizar, o fenótipo observado com as plantas com redução da quantidade de proteínas *APUM* é semelhante ao de superexpressão de *KRP-2*, um inibidor de CDK, que também sofre ação da auxina, mas de maneira contrária. A superexpressão de *KRP-2* resulta em plantas pequenas, com folhas reduzidas e cloróticas, assim como diminuição do número de raízes laterais e baixa fertilidade (De Veylder et al., 2001; Himanen et al., 2002). Desta forma, foi proposto que *KRP-2* pode ser um dos alvos das proteínas *APUM* em estudo.

O periciclo expressa constitutivamente transcritos de muitos genes do ciclo celular, em especial o da *CDKA-1*, no entanto, a completa ausência de seu regulador *CYCBI-1*, leva a hipótese de que esta ciclina é a responsável pela iniciação das raízes laterais. Entretanto, a expressão ectópica de *CYCBI-1* no periciclo não resulta num aumento do número de raízes laterais, indicando que a expressão de *CYCB-1* é uma

consequência e não o disparador da iniciação. Como dito anteriormente, raízes privadas de auxina endógena devido ao crescimento na presença de NPA falham em iniciar mitose e as células do periciclo se mantêm em fase G_1 enquanto sua readição promove a transição G_1 -S. Os níveis de expressão do gene *KRP-2* são altos na presença de NPA e declina dramaticamente com a administração de auxina (Stals & Inzé, 2001), situação contrário aos genes *APUM*. Além disso, a hibridização in situ revelou que *KRP-2* se acumula nas células do periciclo não implicadas em iniciação de raízes laterais e sua superexpressão reduziu mais de 60% delas (Himanen et al., 2002). Os experimentos em meio RIM (de indução de raiz lateral), mostram que o periciclo fica totalmente ativado durante a grande formação de raízes desencadeada pela auxina. Portanto, através da ligação e posterior inibição dos complexos CDK-ciclina presentes constitutivamente, *KRP-2* controla a atividade de divisão do periciclo (Casimiro et al., 2003) e pode estar sendo regulado pós-transcricionalmente pelos genes *APUM*.

Da mesma forma que em raízes, a progressão do ciclo celular é dramaticamente inibida por altas concentrações de *KRP-2* em primórdios foliares sem afetar o padrão temporal de divisão e diferenciação celular. Entretanto, em folhas a saída do ciclo celular mitótico e a iniciação da diferenciação celular frequentemente coincidem com o início da endoreduplicação, um ciclo celular modificado no qual o DNA continua sendo duplicado na ausência de mitose (Jacquard et al., 1999). Assim, a endoreduplicação é caracterizada como o interruptor entre proliferação e diferenciação durante o desenvolvimento (Joubès & Chevalier, 2000). A maquinaria de endoreduplicação e do ciclo celular é a mesma e, assim como em raízes, *CDKA-1* também é inibida especificamente por *KRP-2*, regulando a transição entre mitose e endociclo durante o desenvolvimento de folhas em *Arabidopsis* (Veskest et al., 2005; Beemster et al., 2006).

Em mamíferos, as proteínas inibitórias do ciclo celular são marcadas para a proteólise, pelo passo dependente de ubiquitina. Em plantas, a auxina mostrou estar envolvida no sistema de proteólise SCF^{tir} dependente de ubiquitinação (Himanen et al., 2002). Entretanto, nenhum dado mostra acúmulo de *KRP* em plantas. Em contraste com os sistemas de mamíferos, os *KRPs* vegetais parecem ser controlados mais no nível transcricional, o que pode indicar diferenças fundamentais na regulação desses inibidores entre plantas e animais (Himanen et al., 2002).

Os ensaios de RT-PCR mostraram que as plantas com redução na quantidade de APUM apresentam um aumento muito expressivo na quantidade de mensageiros de *KRP-2*, como mostrado na Figura 44. Este resultado mais o fato de *KRP-2* apresentar um elemento de ligação a APUM em sua região 3'-UTR, pode indicar que este mensageiro é um alvo das proteínas APUM, embora haja a necessidade de ensaios de interação *in vitro* e *in vivo* para comprovar a regulação direta. Assim é possível levantar a hipótese de que as proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 regulam a mitose em detrimento da diferenciação pela ligação ao mRNA de *KRP-2*, conservando a função ancestral das proteínas PUF também em plantas.

Em resumo, os genes *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3* estão envolvidos em processos importantes do desenvolvimento vegetal, atuando no balanceamento entre a produção de folhas e raízes através da manutenção do ciclo celular, sob a influência da auxina.

5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Algumas linhagens repórteres mais fortes mostraram a presença de atividade de GUS nos vasos condutores, como mostra a Figura 45. As linhagens com atividade menos intensa do repórter mostraram esporadicamente o feixe de vasos corado. Nos ensaios de imunolocalização, foi observada a marcação dos vasos independente do órgão estudado. Entretanto, os vasos condutores são difíceis de se estudar pela sua característica lenhosa que podem ficar impregnados o substrato NBT/BCIP utilizado no ensaio da imuno.

Figura 45: Expressão de *APUM::GUS::NOS* nos vasos condutores de folhas.

Apesar do repórter não ter sido observado no sistema condutor em 100% das vezes e os ensaios de imuno terem deixado dúvidas quanto a marcação destes tecidos (se fazem parte ou não do “background”), é provável que os genes *APUM* sejam expressos também nos vasos. A auxina determina a diferenciação e a relação entre células dos contatos vasculares entre as novas folhas e raízes. Além disso, existe um espessamento nestes tecidos durante a formação de calos (Cary et al., 2001), na posição onde foi observada forte expressão dos genes *APUM*.

A expressão dos genes em estudo nos vasos condutores também explica o porquê dos mensageiros de *APUM* serem amplificados a partir de caule internó, uma vez que os experimentos de localização não mostraram nenhuma estrutura que expresse os genes de interesse nessa região. Em adição, existem alguns grupos de pesquisa que estudam estes tecidos e de acordo com eles há fortes indícios de que os genes *APUM* estão envolvidos no processo de diferenciação dos vasos condutores ([http://www.upsc.se/RishikeshBhalerao Project Page](http://www.upsc.se/RishikeshBhaleraoProjectPage)).

Com relação às plantas que apresentaram o desenvolvimento interrompido (Figura 35B), o único experimento molecular realizado foi um Western Blot, que mostrou a falta das proteínas *APUM* nestes indivíduos. Este fenótipo é perfeitamente coerente com o observado em plantas com redução de expressão das proteínas *APUM*. Então, uma redução muito drástica da quantidade de *APUM* pode cessar a divisão celular, não ocorrendo o balanceamento de KRP-2 impedindo que o processo de desenvolvimento e formação de órgãos ocorra. Foram realizados alguns experimentos de imunolocalização “whole mount” com esses espécimes, mas até o momento não foi possível padronizar as condições para comprovar a redução ou a completa falta das proteínas em estudo nestes indivíduos.

Por último, não foi possível obter plantas com expressão induzível de cada um dos genes *APUM*. Essas plantas sofreram cossupressão apresentando comportamento molecular e fenótipo igual ao das plantas antisense. A única diferença foi o aumento na quantidade de mensageiros de todos os genes *APUM*, mas que não se traduziu em acréscimo de proteínas.

Durante as análises, foram observadas algumas plantas que produziam número superior de folhas em relação às plantas selvagens, como a da Figura 46A. Através do

acompanhamento do desenvolvimento desses indivíduos, foi observado que eles produziram grande quantidade de folhas e ramos sem dominância apical e também flores estéreis. Esse comportamento também foi visto com plantas transgênicas expressando constitutivamente APUM-2 (Favaro, 2002) mas, da mesma maneira que as induzíveis, esse fenótipo não foi reprodutivo entre as gerações.

Figura 46: Fenótipos observados com plantas sense induzível e com plantas constitutivas para APUM-2 (35S::APUM-2::NOS). Em (A), planta sense produzindo mais folhas em relação a uma planta selvagem (S) de mesma idade. Em (B), Western Blot destas plantas, sendo que S corresponde às selvagens, **sense** são plantas sense induzível apresentando fenótipo igual ao da planta selvagem, **sense(f)** são indivíduos sense induzível com o fenótipo mostrado am A e **constitutiva** são plantas 35S::APUM-2::NOS também apresentando o fenótipo mostrado am A. Os números no Western indicam a densidade óptica das bandas de APUM.

Foi feito um Western Blot com esses indivíduos, ilustrado na Figura 46B, e houve um aumento significativo na concentração de APUM, tanto na constitutiva quanto na planta sense induzível, que apresentavam este fenótipo. Como foram eventos esporádicos, é provável que o acréscimo na quantidade de proteínas seja a consequência do aumento do número de folhas (que quando jovens expressam bastante as proteínas APUM), no entanto, essas suposições requerem estudos adicionais, uma vez que não é possível definir se este fenótipo está relacionado com o aumento da expressão dos genes em questão.

6. CONCLUSÕES

Este projeto teve como objetivo caracterizar os genes *APUM-1* e *APUM-3* de *Arabidopsis thaliana*, comparando-os com *APUM-2*. Foi mostrado que esses genes tem redundância funcional (pelo menos parcial), sendo expressos nos meristemas apical e axilares de caule, nos os primórdios foliares, na zona de alongamento da raiz e também no periciclo durante a formação de calos e de raízes laterais. Além disso, foi observada a expressão no saco polínico e polens maduros.

Os genes *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3* respondem à auxina de forma indireta e também à sacarose.

Foram produzidas plantas antisense induzíveis que comprovadamente reduziram a expressão conjunta dos três genes na presença de dexametasona. Essas plantas mostraram fenótipo condizente com os resultados de localização, apresentando redução do tamanho das folhas, do comprimento das raízes e diminuição do número de raízes laterais produzidas. O fenótipo observado é resultado da diminuição do número de divisões, sendo semelhante ao de superexpressão de *KRP-2*, um inibidor de CDK que regula a formação de raízes laterais e também a endoreduplicação em folhas, evento chave entre a mitose e a diferenciação (maturação celular).

Assim, foi proposto que os genes *APUM* devem regular a expressão de *KRP-2*, uma vez que o 3'UTR de seu mensageiro possui uma sequência consenso de ligação a *APUM*, além de colocalizar com os genes em estudo pelo menos em raiz (Himanen, 2002) e de apresentar comportamento oposto ao de *APUM* em relação à auxina e ao NPA. Ensaio de RT-PCR demonstraram a validade desta hipótese, pois plantas com expressão reduzida das proteínas *APUM* apresentaram um aumento significativo na quantidade de mensageiros *KRP-2*.

Em conclusão, os genes *APUM* regulam o balanceamento entre a produção de folhas e raízes através da manutenção do ciclo celular, de forma a coordenar a formação de folhas e raízes, sob a influência da auxina. Assim, a função ancestral dessas proteínas PUF, a de manter o ciclo celular em detrimento da diferenciação, é conservada também em plantas.

7. BIBLIOGRAFIA

Asaoka-Taguchi, M. Yamada, M., Nakamura, A., Hanyu, K. & Kobayashi, S. Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in *Drosophila* embryos. *Nature Cell Biology*, v.1, n.7, p.431-437, 1999.

Ayoama, T. & Chua, N.H. A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants, *Plant Journal*, v.11, n.3, p.605-612, 1997.

Ballard, L. & Wildman, S.G. 1964. Induction of mitosis by sucrose in excised and attached dormant buds of sunflower *Helianthus annuus*. *L. Aust. J.Biol. Sci.* v.17, p.36-43, 1964.

Beeckman, T., Burssens, S. & Inzé, D. The peri-cell cycle in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, v.52, p.403-411, 2001.

Beeckman, T. & Viane, R. Embedding thin plants specimens for oriented sectioning. *Biotechnic & Histochemistry*, v. 75, n. 1, p.23-26, 1999.

Beemster, G.T.S., Vercruysse, S., De Veylder, L., Kuiper, M. & Inzé, D. The *Arabidopsis* leaf as a model system for investigating the role of cell cycle regulation in organ growth. *J. Plant Research*, v.119, p.43-50, 2006.

Benfey, P.N. & Malamy, J.E. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, v.124, p.33-44, 1997.

Berleth, T. & Sachs T. Plant morphogenesis: long distance coordination and local patterning. *Current Opinion in Plant Biology*, v.4, p.57-62, 2001.

Bernstein, D., Hook, B., Hajamavis, A., Opperman, L. & Wickens, M. Binding specificity and mRNA targets of a *C. elegans* PUF protein, FBF-1. *RNA*, v.11, n.4, p.447-458, 2005.

Bourque, J.E. Antisense strategies for genetic manipulation in plants. *Plant Science*, v.105, p.125, 1995.

Bowman, J.L. **Arabidopsis : an atlas of morphology and development**. 1.ed. New York : Springer-Verlag, 1994.

BowmanN, J.L. & Eshed, Y. Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends in Plant Sciences*, v.5, p.110-115, 2000.

Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 1.ed. California, John Wiley Professio, 2001.

Cary, A., Che, P. & Howell, S.H. Developmental events and shoot apical meristem gene expression patterns during shoot development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, v.32, p.867-877, 2002.

Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R. Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G. & Bennett, M.J. Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *TRENDS in Plant Science*, v. 8, n.4, 2003.

Chagnovich, D. & Lehmann, R. Poly(A)-independent regulation of maternal hunchback translation in the *Drosophila* embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.98, p.11359-11364, 2001.

Crittenden, S.L., Bernstein, D.S., Bachorik, J.L., Thompson, B.E., Gallegos, M., Petcherski, A.G., Moulder, G., Barstead, R., Wickens, M. & Kimble, J. A conserved RNA-binding protein controls germline stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, v.417, p.660-663, 2002.

Crittenden, S.L., Eckmann, C.R. Bernstein, D.S., Wickens, M. & Kimble, J. Regulation of the mitosis/meiosis decision in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, v.358, p.1359-1362, 2003.

Croy, R.R.D. **Plant Molecular Biology**. 1.ed. Oxford, United Kingdom: Bios Scientific Publisheers & Blackwell Scientific Publications, 1993.

Curtis, D. Lehman, R. & Zamore, P.D. Translational regulation in development. *Cell*, v.81, p.171-178, 1995.

Czechowski, T., Bari, R.P., Stitt, M., Scheible, W. & Udvardi, M.K. Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *The Plant Journal*, v.38, p.366-379, 2004.

Decker, C.J. & Parker, R. Diversity of cytoplasmic for the 3'untranslated region of eucariotic transcript. *Current Opinion of Cell Biology*. V.7, p.386-392, 1995.

Desfeux, C., Clough, S.J. & Bent, A.J. Floral spray transformation can efficiently generate *Arabidopsis* transgenic plants. *Transgenic Research*, v.9, n.6, p.471-476, 2000.

De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T.S., Krols, L., Terras, F. Landrieu, I., Schueren, E.V.D., Maes, S., Naudts, M. & Inzé, D. Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, v. 13, p. 1653-1667, 2001.

Di Laurenzio, L., Wysolcka-Diller, J., Malamy, J.E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Feldmann, K.A. & Benfey, P.N. The SCARECROW gene regulates na asymmetric cell division that is essencial for generating tha radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell*, v.66, p.423-433, 1996.

Edwards, T.A., Trincao, J., Escalante, C.R., Wharton, R.P. & Aggarwal, A.K. Crystallization and characterization of Pumilio: a novel RNA-binding protein. *Journal of Structural Biology*, v.132, p.251-254, 2000.

Edwards, T.A., Pyle, S.E., Wharton, R.P. & Aggarwal, A.K. Structure of Pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motifs. *Cell*, v.105, p.281-289, 2001.

Favaro, E.C. Clonagem e caracterização do gene *PUMILIO* de *Arabidopsis thaliana*. [Dissertação de Mestrado] Instituto de Química. São Paulo, 2002.

Ferreira, P., Hemerly, A.S., de Almeida Engler, J., Van Montagu, M., Engler, G. & Inzé, D. Three discrete classes of *Arabidopsis* cyclins are expressed different intervals of the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 91, p.11313-11317, 1994.

Francischini, C.W. & Quaggio, R.B. Molecular characterization of *Arabidopsis thaliana* Puf proteins: binding specificity and target candidates. Artigo submetido.

Gerber, A.P., Herschlag, D. & Brown, P.O. Extensive association of functionally and citotopically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLOS Biology*, v.2, n.3, p.342-354, 2004.

Hajdukiewicz, P., Svab, Z. & Maliga, P. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vector for plant transformation. *Plant Molecular Biology*, v.25, p.989-994, 1994.

Hartig, K. & Beck, E. Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. *Plant Biol.*, v.8, p. 389-396, 2006.

Hartree, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry Method that gives a linear photometric response. **Analytical Chemistry**, n.48, p. 422-427, 1972.

Hazelrigg, T. The destinations of RNAs. *Cell*, v. 95, n.13, p.451-460, 1998.

Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M.T. & Benfey, P.N. The *SHORT-ROOT* gene control radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell*, v.101, p.555-567, 2000.

Himanen, K., Boucheron, E., Vanneste, S., Engler, J.A., Inzé, D. & Beeckman, T. Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. **The Plant Cell**, v.14, p.1-13, 2002.

Hobe, M., Muller, R., Grunewald, M., Brand, U. Simon, R. Loss of CLE40, a protein functionally equivalent to the stem cell restricting signal CLV3, enhances root waving in *Arabidopsis*. *Dev. Genes Evol.*, v.213, p.371-381, 2003.

Jackson, D. In-situ hybridization in plants. **Molecular Pathology: a practical approach**. Eds. Bowles, D.J., Gurr, S.J. and McPherson, M. Oxford University Press, 1991.

Jacqmard, A., De Veylder, L., Sergers, G. de Almeida Engler, J., Bernier, G., Van Montagu, M. & Inzé, D. CKSAt expression in *Arabidopsis thaliana* suggests a role for the protein in both mitotic and the endoreduplication cycle. *Planta*, v.207, p.496-504, 1999.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. & Bevan, M.w. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*, v.6, p.3901-3907, 1987.

Jorgensen, R. Cosuppression, flower color patterns, and metastable gene expression states. *Science*, v.268, p.686-691, 1995.

Joubés, J. & Chevalier, C. Endoreduplication in higher plants. *Plant Molecular Biology*, v. 43, p. 735-745, 2000.

Jürgens, G. Growing up green: cellular basis of plant development. *Mechanisms of Development*, v.120, p.1395-1406, 2003.

Kaya, H., Shibahara, K., Taoka, K., Iwabuchi, M., Stillman, B. & Araki, T. FASCIATA genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristem. *Development*, v.125, p.3843-3851, 1998.

Kamiya, N., Nagasaki, H., Morikami, A., Sato, Y., Matsuoka, M. Isolation and characterization of a rice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. *Plant Journal*, v.35, p.429-441, 2003.

Kennedy, B.K., Gotta, M., Sinclair, D.A., Mills, K., McNabb, D.S., Murthy, M., Pak, S.M., Laroche, T., Gasser, S.M. & Guarente, L. Redistribution of silencing proteins from telomeres to the nucleolus is associated with extension of life span in *S. Cerevisiae*. *Cell*, v.89, p.381-391, 1997.

Koch, K.E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, v. 47, p. 509-540, 1996.

Kraemer, B., Crittenden, S., Gallegos, M., Moulder, G., Barstead, R., Kimble, J. & Wickens, M. Nanos-3 and FBF proteins physically interacts to control the sperm-oocyte switch in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, v.9, p.1009-1018, 1999.

Kuwabara, P.K. Gametogenesis: keeping the male element under control. *Current Biology*, v.8. p.R278-R281, 1998.

Lamont, L.B., Crittenden, S.L., Bernstein, D. Wickens, M. & Kimble, J. FBF-1 e FBF-2 regulate the size of the mitotic region in the *C.elegans* germline. *Dev. Cell.*, v.7, n.5, p.697-707, 2004.

Landis, G., Bhole, D. Lu, L. & Tower, J. High-frequency generation of conditional mutations affecting *Drosophila melanogaster* development and life span. *Genetics*, v.158, p.1167-1176, 2001.

Lenhard, M., Jurgens, G. & Laux, T. The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in *Arabidopsis* shoot meristem regulation. *Development*, v.129, p.3195-3206, 2002.

Lin, J., Garcia, N.A. & Kuo, J. Effects of *Agrobacterium* cell concentration on the transformation efficiency *Tobacco* and *Arabidopsis thaliana*. *Focus*, v.16, n.3, p.72-77, 1994.

Malamy, J.E. & Benfey, P.N. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, v.124, p.33-44, 1997.

Mayer, K.F.X., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G. & Laux, T. Role of WUSCHEL in regulating stem fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell*, v.95, p.805-815, 1998.

Moore, F.L., Jaruzelska, J., Fox, M.S., Urano, J. Firpo, M.T., Turek, P.J., Dorfman, D.M. & Pera, R.A. Human Pumilio-2 is expressed in embrionic stem cells and germ cells and interacts with DAZ (Deleted in AZoospermia) and DAZ-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.100, p.538-543, 2003.

Mortimer, R.K. & Johnston, J.R. Life span of individual yeast cell. *Nature*, v.183, p.1751-1752, 1959.

Munroe, S.H. Diversity of Antisense regulation in eukaryotes: multiple mechanisms, emerging patterns. *J. Cellular Biochemistry*, v.93, p.664-671

Murashide, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiology Plant*, v.15, p.493-497, 1962.

Murata, Y. & Wharton, R.P. Binding of Pumilio to maternal hunchback mRNA is required for psoterior patterning in *Drosophila* embryos. *Cell*, v.80, p.747-756, 1995.

Nakajima, K. & Benfey, N. Signaling in and out: control of cell division and differentiation in the shoot and root. *Plant Cell*, supplement, S.265-S276, 2002.

Nakahata, S., Katsu, Y. Mita, K., Inoue, K., Nagahama, Y. & Yamashita, M. Biochemical identification of *Xenopus* Pumilio as a sequence-specific CycB1 mRNA-binding protein that physically interacts with a Nanos homolog (Xcat-2) and a Cytoplasmic

Polyadenylation Element-Binding Protein (CPEB). *Journal of Biological Chemistry*, v.276, p.20945-20953, 2001.

Olivas, W. & Parker, R. The Puf3 protein is a transcript-specific regulator of mRNA degradation in yeast. *The EMBO Journal*, v.19, n.23, p.6602-6611, 2000.

Parisi, M. & Lin, H. The *Drosophila* pumilio gene encodes two functional protein isoforms that play multiple roles in germline development, gonadogenesis, oogenesis and embryogenesis. *Genetics*, v.153, p.235-250, 1999.

Parisi, M. & Lin, H. A duet Nanos and Pumilio. *Current biology*, v.10, p.R81-83, 2000.

Raven, P.H. **Biologia Vegetal**, 6.ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001.

Richter, J.D. & Theurkauf, W.E. The message is in the translation. *Science*, v.293, p.60-62, 2001.

Riou-Khamlichi, C.; Menges, M., Healy, J.M.S. & Murray, J.A.H. Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Molecular and Cell Biology*, v. 20, n. 13, p. 4513-4521, 2000.

Ruzin, S.E. Plant Microtechnique and Microscopy. 1.ed.Oxford, N.Y: Oxford University Press, 1999.

Sambrook, J., Fristsh, E.F., Maniatis, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2.ed. Plainview, N.Y., USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Schweeb, B.A. & Walters, K.J. & Stern, M. The *Drosophila melanogaster* translational repressor pumilio regulates neuronal excitability. *Genetics*, v.61, p.1177-1185, 2002.

Smyth, D.R., Bowman, J.L. & Meyerowitz, E.M. Early flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, v.2, p.755-767, 1990.

Sonoda, J. & Wharton, R.P. Recruitment of Nanos to hunchback mRNA by Pumilio. *Genes & Development*, v.13, p.2704-2712, 1999.

Sonoda, J. & Wharton, R.P. *Drosophila* Brain Tumor is a translational repressor. *Genes & Development*, v.15, n.6, p.762-773, 2001.

Souza, G.M., da Silva, A.M. & Kuspa, A. Starvation promotes Dictyostelium development through Yak kinase pathway. *Development*, v.26, p.3263-3274, 1999.

Spasov, D.S. & Jurecic, R. The PUF family of RNA-binding proteins: Does evolutionary conserved structure equal conserved function? *IUBMB Life*, v.55, n.7, p.359-366, 2003.

Spasov, D.S., Jurecic, R. Mouse *Pum-1* and *Pum-2* genes, members of the *Pumilio* family proteins, show differential expression in fetal and adult hematopoietic stem cells and progenitors. *Blood Cells Mol. Dis.*, v.30, p.55-69, 2003.

Stals, H. & Inzé, D. When the plant cells decide to divide. *TRENDS in Plant Science*, v. 6, p. 359-364, 2001)

Tadauchi, T., Matsumoto, K., Herskowitz, I. & Irie, K. Post-transcriptional regulation through the *ho* 3'-UTR by Mpt5, as a yeast homolog of Pumilio and FBF. *The EMBO Journal*, v.20, p.552-561, 2001.

Tung, W.L. & Chow, K.C. A modified medium of efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends in Genetics*, v.11, p.128-429, 1995.

Ulmasov, T., Hagen, G. & Guilfoyle, T.J. ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science*, v.276, p.1865-1868, 1997.

Van Engelen, F.A., Molthoff, J.W., Conner, A.J., Nap, J.P., Pereira, A. & Stiekema, W.J. pBINPLUS: an improved plant transformation vector based on pBIN19. *Transgenic Research*, v.4, p.288-290, 1995.

Veit, B. Determination of cell fate in apical meristems. *Current Opinion in Plant Biology*, v.7, p.57-64, 2004.

Veskest, A., Manes, C.O., Vercruysse, S., MAES, S., Schueren, E.V., Beeckman, T., Genschik, P., Kuiper, M., Inzé, D. & De Veylder, L. The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP-2 controls the onset of the endoreduplication cycle during Arabidopsis leaf development through inhibition of mitotic CDKA-1 kinase complexes. *The Plant Cell*, v. 17, p. 1723-1736, 2005.

Wang, X., Zamore, P.D. & Hall, T.M. Crystal structure of a Pumilio homology domain. *Molecular Cell*, v.7, p.855-865, 2001.

Weigel, D. & Glazebrook, J. **Arabidopsis: a laboratory manual**. 1.ed., N.Y., USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.

Weigel D. & Jürgens, G. Stem cells that make stems. *Nature*, v.415, p.751-754, 2002.

Wen-Jun, S. & Forbe, B.G. Efficient transformation of *Agrobacterium* ssp. By high voltage electroporation. *Nucleic Acid Research*, v.17, n.20, p.8385, 1989.

Wharton, R.P., Sonoda, J., Lee, T., Patterson, M. & Murata, Y. The Pumilio RNA-binding domain is also a translational regulator. *Molecular Cell*, v.1, p.863-872, 1998.

Wickens, M. Bernstein, D.S., Kimble, J. & Parker, R. A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *TRENDS in Genetics*, v.18, n.3, p.150-157, 2002.

Zamore, P.D., Bartel, D.P., Lehmann, R. & Willianson, J.R. The Pumilio RNA interaction: a single RNA binding domain monomer recognizes a bipartite target sequence. *Biochemistry*, v.38, p.596-604, 1999.

Zhang, B., Gallegos, M., Puoti, A., Durkin, E., Fields, S., Kimble, J. & Wickens, M.P. A conserved RNA-binding protein that regulates sexual fates in the *C. elegans* hermaphrodite germ line. *Nature*, v.390, n.4, p.477-484, 1997.