**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA**

**“Caracterização das plantas transgênicas de
silenciamento e de superexpressão do gene 092H06 e
estudo da sua proteína recombinante”**

VIVIANI COSSALTER

**Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, como parte
das exigências para obtenção do título de Mestre em
Ciências - Área: Biologia Comparada**

Versão Corrigida

**RIBEIRÃO PRETO, SP
2012**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA**

“Caracterização das plantas transgênicas de silenciamento e de superexpressão do gene 092H06 e estudo da sua proteína recombinante”

VIVIANI COSSALTER

**Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, como parte
das exigências para obtenção do título de Mestre em
Ciências - Área: Biologia Comparada**

Orientadora: Profª Drª Maria Helena de Souza Goldman

**RIBEIRÃO PRETO, SP
2012**

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

Cossalter, Viviani

“Caracterização das plantas transgênicas de silenciamento e de superexpressão do gene 092H06 e estudo da sua proteína recombinante”/ Viviani Cossalter; orientadora: Maria Helena de Souza Goldman – Ribeirão Preto – 2012.

90 p. 27il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração Biologia Comparada.

Palavras-chave: 1) desenvolvimento do pistilo; 2) *Nicotiana tabacum*. 3) expressão gênica; 4) endoreduplicação; 5) ensaio de duplo híbrido; 6) expressão heteróloga; 7) sinalização por peptídeo

"A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade."

Julio Verne

Dedico

À minha mãe Aparecida Cossalter, exemplo de força e perseverança. À minha tia Therezinha Dacanal e a meu irmão Daniel Cossalter, por todo amor, carinho, ajuda e paciência para que eu chegasse até aqui. **Amo Vocês.**

Agradecimentos...

A Deus, pelo dom da Vida.

À Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman, toda minha gratidão pela oportunidade oferecida, confiança, orientação, apoio e amizade.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, pela oportunidade de aprendizado e por todo apoio financeiro recebido durante este trabalho.

Ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, pela utilização de sua estrutura e recursos.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À CAPES, ao CNPq e à FAPESP por todo o suporte financeiro oferecido para o desenvolvimento da pesquisa em nosso laboratório.

Aos professores membros da Banca Examinadora, pelo tempo e atenção dispensados ao meu trabalho e pela gentileza em participar desta banca.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman e seu grupo de pesquisa, pela ajuda, pelo uso de equipamentos e empréstimos de materiais.

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

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

Ao Prof. Dr. Wagner Ferreira, do Departamento de Biologia da FFCLRP/USP, pela utilização do micrótomo.

Ao Prof. Dr. Luis Lamberti Pinto da Silva, do Departamento de Biologia Celular e Molecular da FMRP/USP, pelos empréstimos e ajuda com os experimentos de Western blot.

À Profa Dra. Maria Cristina Roque A. Barreira, do Departamento de Biologia Celular e Molecular da FMRP/USP, pela utilização do citômetro de fluxo.

Ao Msc. Marcel Montels Trevisani pela ajuda com os experimentos

Ao Msc. Thiago Aparecido da Silva pela ajuda com experimentos de citometria de fluxo.

À Sandra Maria de Oliveira Thomaz, técnica do Laboratório de Imunologia e Glicobiologia do Departamento de Biologia Celular e Molecular da FMRP/USP pela ajuda prestada.

À Dra. Andréa Carla Quiapim da Silva, técnica do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, pela amizade e colaboração na realização deste trabalho.

Ao Dr. Michael dos Santos Brito, por acreditar que eu fosse capaz de continuar o trabalho por ele iniciado, pela amizade e por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Msc. Edward José Strini, pela colaboração nos experimentos de duplo-híbrido e pela amizade.

À Dra. Fernanda Andrade Silva Torres, por toda ajuda nos experimentos de qRT-PCR e pela amizade.

À Dra. Hebréia Oliveira Almeida Souza, pela imensa ajuda nos experimentos de expressão e purificação de proteínas, pela revisão deste trabalho e pela amizade.

Ao Msc. Luis Antônio Alves de Toledo Filho, meu querido “Louis”, pelas conversas, ajudas e principalmente pela amizade.

À Msc. Samantha Vieira Abbad, pela ajuda e pela amizade.

À Msc. Greice Lubini, pela ajuda, convivência e amizade.

À mestranda Lígia Tereza Bertolino, pela ajuda e amizade.

Aos amigos do laboratório: Tamiris, Nilton, Ian, Danilo, Henrique, Douglas, Ana, Cristiane, Maria Cristina (Cris Protein), obrigada pela convivência, amizade e ajuda.

A minha amiga e cunhada Kamila, pelos momentos de alegria e distração e pela ajuda na edição deste trabalho.

Ao Paulo Rosa Júnior, técnico do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, FFCLRP, pela amizade e colaboração.

Aos Funcionários do Viveiro de Mudas Fláuzio e Flávio pelo auxílio no manejo das plantas e da casa de vegetação.

À Leomina de Jesus da Silva Souza (Dona Nina), funcionária do Departamento de Biologia, FFCLRP, pela convivência de todos os dias e amizade.

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

Muito Obrigada.

Índice

Conteúdo	Página
Resumo	1
Abstract.....	3
Introdução.....	4
Objetivos.....	16
Material e Métodos.....	17
Resultados e Discussão.....	39
Conclusões.....	75
Perspectivas.....	76
Referências Bibliográficas.....	77

RESUMO

A eficiência da reprodução sexual de plantas depende do correto desenvolvimento dos órgãos sexuais: estame e pistilo. Mecanismos moleculares complexos controlam a proliferação e expansão celular que resultam no correto desenvolvimento destes órgãos. Em nosso laboratório foi identificado um gene preferencialmente expresso no pistilo de *Nicotiana tabacum*, o gene 092H06. Este gene codifica uma pequena proteína de 68 aminoácidos, e função desconhecida. Análises anteriores sugerem que o produto proteico do gene 092H06 seja responsável por inibir o processo de expansão celular nos órgãos reprodutivos (Brito, 2010).

Para compreender o papel deste gene, no desenvolvimento do pistilo, foram realizados experimentos de qRT-PCR para determinar se os níveis de expressão de genes para α -expansina, β -expansina, ciclina B1.2 e actina, ligados aos processos de divisão e expansão celular, em plantas transgênicas de silenciamento e superexpressão do gene 092H06. Foram realizadas análises morfológicas nos estigmas/estiletos e ovários das plantas transgênicas de segunda geração (T2), por microscopia óptica. Os resultados mostram uma tendência de aumento no volume das células tanto nas plantas transgênicas de silenciamento, como nas de superexpressão. Entretanto, nas plantas de silenciamento ocorreu um aumento visível das estruturas reprodutivas, o que não foi observado nas plantas de superexpressão. Adicionalmente, foram realizados experimentos de citometria de fluxo, para verificar a ocorrência de endoreduplicação. Os resultados mostraram que não ocorreu endoreduplicação nas células das plantas transgênicas.

No “screening” de uma biblioteca de duplo híbrido, usando 092H06 como isca, foram encontrados 4 candidatos a parceiros de interação: 1) “biotin/lipoyl attachment domain-containing protein”; 2) “unknown protein”; 3) “trypsin proteinase inhibitor precursor”; e 4) RING/U-box. Para auxiliar no estudo da função do gene 092H06, a proteína recombinante 092H06-HIS₆ foi produzida com sucesso, na forma solúvel, em *E. coli*. Os resultados alcançados neste trabalho contribuem para avançar o conhecimento sobre este novo gene expresso nos órgãos reprodutivos das plantas.

Palavras-chave: 1) desenvolvimento do pistilo; 2) *Nicotiana tabacum*. 3) expressão gênica; 4) endoreduplicação; 5) ensaio de duplo híbrido; 6) expressão heteróloga; 7) sinalização por peptídeo.

ABSTRACT

The efficiency of plant sexual reproduction depends on the correct development of the sexual organs: stamen and pistil. Complex molecular mechanisms control cell proliferation and expansion that result in the correct development of these organs. In our laboratory a gene preferentially expressed in *Nicotiana tabacum* pistil has identified, the 092H06 gene. This gene encodes a small protein of 68 amino acids of unknown function. Previous analyzes suggest that the protein product of the gene 092H06 is responsible for inhibiting the cell expansion process in the reproductive organs (Brito, 2010).

To understand the role of this gene in pistil development, experiments of qRT-PCR to determinate the expression levels of the α -expansins, β -expansins, cyclin B1.2 and actin, genes which connected to the cell division and expansion processes, were carried out on transgenic plants silencing and overexpressing the 092H06 gene. Morphological analyzes on stigmas/styles and ovaries of second generation (T2) transgenic plants were performed by optical microscopy. The results show a tendency to increased cellular volume on the silencing transgenic plants, as well as on the overexpressing plants. However, in the silencing plants there was a visible increase of the reproductive structures, what has not been observed on the overexpressing plants. Additionally, flow cytometry experiments were carried out to verify the occurrence of endoreduplication. The results showed that no endoreduplication has occurred on the cells of the transgenic plants.

The screening of an yeast two-hybrid assay, using 092H06 as bait, has found 4 interaction partners candidates: 1) biotin/lipoly attachment domain-containing protein; 2) unknown protein; 3) trypsin proteinase inhibitor precursor and 4) RING/U-box. To assist the study of the 092H06 function, the recombinant 092H06-HIS tag protein has been produced with success, in the soluble form, in *E.coli*. The results obtained in this work contribute to advance the knowledge of this novel gene expressed on the plant reproductive organs.

Keywords: 1) pistil development; 2) *Nicotiana tabacum*; 3) gene expression; 4) endoreduplication; 5) two hybrid assay; 6) heterologous expression; 7) signaling peptide

1. INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais da flor

A flor é um ramo altamente modificado, apresentando apêndices especializados (Apezatto Da Glória & Carmello-Guerreiro, 2006). Sua presença é característica principal das angiospermas e são essenciais para a reprodução sexual e perpetuação deste grande e diversificado grupo de plantas. São importantes devido a nossa alimentação apresentar uma grande dependência das flores, uma vez que muitos dos nossos alimentos são frutos ou sementes, ambos resultantes do desenvolvimento de partes do pistilo, após a fertilização.

A flor constitui-se de pedicelo, cuja porção inferior é dilatada, formando o receptáculo, e apêndices laterais: sépalas, pétalas, estames e carpelos (Figura 1). Sépalas e pétalas constituem respectivamente cálice e corola, que são estruturas estéreis, e tem, em geral, sua função ligada à proteção ou atração de polinizadores (Apezatto Da Glória & Carmello-Guerreiro, 2006). Geralmente localizam-se na porção mais externa da flor. Os estames e o pistilo das flores são órgãos férteis e especializados, responsáveis pelo processo reprodutivo em plantas e correspondem, respectivamente, aos termos masculino e feminino. Os estames encontram-se na parte central, cujo conjunto é denominado androceu. Os estames são constituídos por filete e antera, unidos através de uma estrutura estéril denominada conectivo, tem como função primordial, a produção de esporos. O gineceu, conjunto de órgãos femininos, é formado pelos carpelos. Os carpelos são diferenciados em: estigma, região apical cuja função está relacionada à recepção e reconhecimento do grão de pólen; estilete, região mediana onde os tubos polínicos irão crescer; e ovário, porção inferior que pode abrigar um ou mais óvulos. Quando há a fusão de dois ou mais carpelos, o órgão feminino denomina-se pistilo.

Figura 1: Esquema de uma flor completa, mostrando as peças florais estéreis (sépalas e pétalas) e as peças florais férteis (estame e pistilo) (Mauseth, 2003).

1.1- O pistilo, órgão reprodutivo feminino das plantas.

O pistilo, órgão reprodutivo feminino das plantas é formado por estigma, estilete e ovário, é possuidor de dupla função: a produção dos gametófitos femininos (contidos nos ovários) e a discriminação entre os diferentes tipos de grãos de pólen que chegam ao seu ápice (estigma). O papel de discriminar os grãos de pólen (gametófitos masculinos) é exercido pelo tecido transmissor do estigma e do estilete. Este tecido é a principal inovação floral, essencial para o sucesso das angiospermas (Sage et al., 2009). Ele facilita a rápida adesão, hidratação, nutrição e crescimento direcionado do tubo polínico em direção aos gametófitos femininos (Goldman et al., 1994; Cheung et al., 1995; Sage et al., 2009). Adicionalmente, o tecido transmissor funciona na seleção molecular, promovendo o reconhecimento espécie-específico (congruidade) e compatibilidade, assim como a competição entre os gametófitos masculinos (Hiscock & Allen, 2008; Quiapim et al., 2009; Sage et al., 2009). Portanto, este tecido tem um papel decisivo na determinação do genótipo dos futuros embriões e plantas.

As angiospermas podem ser divididas em 2 grandes grupos de acordo com o tipo do tecido transmissor e a estratégia adotada para interagir com os grãos de pólen: espécies de estigma seco e espécies de estigma úmido (Heslop-Harrison & Shivanna, 1977; Hiscock & Allen, 2008). Estigmas secos são aqueles que, em flores maduras, possuem uma camada extracuticular proteica hidratada ou película, mas nenhuma secreção livre e geralmente possuem uma superfície receptiva com papilas grandes e estão presentes em espécies que possuem grãos de pólen trinucleados (Heslop-Harrison & Shivanna, 1977; Hiscock & Allen, 2008). Quando o sistema de auto-incompatibilidade está presente em espécies de estigma seco, ele é normalmente do tipo esporofítico (Heslop-Harrison & Shivanna, 1977). As plantas modelo *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) e arroz (*Oryza sativa*) possuem estigmas secos. Por outro lado, os estigmas úmidos, no estado receptivo (flores maduras), são cobertos por uma secreção fluída ou exudato. Estes estigmas, em geral, possuem uma superfície lisa ou com pequenas papilas e estão associados com grãos de pólen binucleados (uma célula vegetativa e uma célula generativa) (Heslop-Harrison & Shivanna, 1977; Hiscock & Allen, 2008). Quando o sistema de auto-incompatibilidade está presente em espécies de estigma úmido, ele é do tipo gametofítico (Heslop-Harrison & Shivanna, 1977). Espécies da família Solanaceae, tais como *Nicotiana tabacum*, possuem estigmas úmidos.

Nicotiana tabacum possui ocorrência geográfica nas Américas e Austrália, onde membros do gênero *Nicotiana* L., considerado o quarto maior gênero da família, com cerca de 77 espécies ocorrendo naturalmente, são importantes na medicina popular (Chase et al., 2003).

N. tabacum é bastante usado como modelo devido ao seu ciclo de vida relativamente curto, fácil manuseio e, principalmente, devido à presença de órgãos florais grandes e bem definidos. Seu desenvolvimento floral foi dividido em 12 estágios (Figura 2) baseado em características próprias, que vão desde a alteração de tamanho e peso dos botões, até mudanças morfológicas (Koltunow et al., 1990).

Figura 2: Estádios de desenvolvimento floral de *N. tabacum* dividido em 12 estágios; botões florais (A), pistilos (B) e anteras (C). Retirado de Koltunow et al. (1990).

1.2- O Pistilo de *Nicotiana tabacum*

O pistilo de *N. tabacum* (Figura 3), usado como modelo em nosso estudo da biologia da reprodução de estigma úmido, é formado pela fusão de 2 carpelos (Bell & Hicks, 1976). O estigma é bilobado e sua superfície é formada por uma epiderme com células papilares esparsamente distribuídas (Bell & Hicks, 1976; Kandasamy & Kristen, 1987). Abaixo das células papilares existe uma zona secretória e um tecido parenquimático de suporte (Kandasamy & Kristen, 1987). A zona secretória do estigma converge no estilete, de tipo sólido, como uma região central de tecido transmissor, circundado pelo cortex parenquimático e pela epiderme (Kandasamy & Kristen, 1987; Kandasamy et al., 1990). Assim, nesta espécie, o tecido transmissor do tubo polínico é formado pela zona secretória do estigma, pelo tecido transmissor do estilete e pela continuação deste tecido dentro do ovário.

Figura 3: Modelo esquemático do pistilo de *N. tabacum*, indicando as estruturas presentes no estigma, estilete e ovário (Modificado de Kandasamy *et al.*, 1990)

Para desempenhar suas funções reprodutivas, estigmas/estiletes devem expressar genes codificando proteínas necessárias para seu desenvolvimento apropriado e para realizar as interações pólen-pistilo. Devido a suas funções restritas e bem definidas, é esperado que muitos destes genes sejam específicos ou preferenciais dos estigmas/estiletes.

1.3- O gene específico de órgãos reprodutivos, representado pelo clone de cDNA 092H06

Vários estudos de larga escala têm sido realizados para identificar genes expressos de forma preferencial ou específica nos estigmas/estiletes nas espécies de estigma seco *Arabidopsis* e arroz (Swanson *et al.*, 2005; Tung *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007) e, por nosso grupo de pesquisa, na espécie *N. tabacum*, de estigma úmido (Quiapim *et al.*, 2009). Para ter uma visão geral dos genes expressos nos estigmas/estiletes, foi construída uma biblioteca de cDNAs e estes clones foram seqüenciados, gerando o banco de dados TOBEST (TOBacco ESTs - <http://gbi.fmrp.usp.br/mhelen>).

A partir de um experimento de macroarranjo (Quiapim et al., 2009) foi identificado o clone de cDNA 092H06, com expressão preferencial no estigma/estilete de *N. tabacum*. Esse gene codifica uma proteína de 68 aminoácidos, encontrada somente em plantas, e conservada entre diferentes espécies vegetais, mas de função desconhecida. Experimentos de RT-PCR quantitativo (qRT-PCR), realizados durante o doutorado de Michael dos Santos Brito (2010), em nosso laboratório, demonstraram que este gene é especificamente expresso nos órgãos reprodutivos de *N. tabacum* e preferencialmente expresso nos estigmas/estiletos. Análises de expressão realizadas em amostras do pistilo, em diferentes estádios do desenvolvimento floral, mostraram que este gene é expresso do início ao final do desenvolvimento. Em estames, o maior nível de expressão foi verificado no início do desenvolvimento floral, o qual diminui em direção a antese. De forma complementar, foi verificado que este gene encontra-se expresso mesmo antes da diferenciação dos órgãos reprodutivos, indicando um possível papel no início do desenvolvimento dos órgãos reprodutivos. Análises de hibridização *in situ* demonstraram que este gene é expresso principalmente nos tecidos especializados do estigma e estilete, respectivamente, zona secretória e tecido transmissor. Para estudar o papel exercido por este gene, foram obtidas plantas transgênicas de silenciamento por RNA de interferência (RNAi) e para superexpressão deste gene. Todas as plantas transgênicas apresentaram desenvolvimento vegetativo normal e floresceram. As plantas de superexpressão não apresentaram nenhuma alteração fenotípica, a nível macroscópico, nos órgãos reprodutivos. Por outro lado, foi possível observar alterações morfológicas nas duas plantas transgênicas com maior nível de silenciamento (Ri9.2 e Ri19.3). Essas plantas apresentaram um aumento no diâmetro do estigma/estilete, no volume do ovário, bem como, no tamanho das anteras, quando comparados aos mesmos órgãos das plantas selvagens. Esse aumento pode ser resultado de dois processos: divisão celular e/ou expansão celular. Para determinar qual desses processos está envolvido no aumento destes órgãos, estigmas/estiletos, ovários e anteras das plantas Ri9.2 e Ri19.3 foram utilizados para a confecção de lâminas histológicas. A análise dessas lâminas, por microscopia óptica, revelou uma diminuição do número de células, em uma mesma área, e o aumento do tamanho celular, sugerindo que o

produto proteico do gene 092H06 seja responsável por inibir o processo de expansão celular nos órgãos reprodutivos. Neste caso, o peptídeo 092H06 representaria uma nova classe de peptídeos sinalizadores.

1.4 - A organogênese em plantas

O estudo do desenvolvimento/crescimento das plantas é de grande interesse, devido às implicações no aumento da produtividade de culturas de importância agrônômica e, também, para entender as divergências evolutivas de formas e tamanhos das estruturas vegetais (Tsukaya & Beemter, 2006). O tamanho final de um órgão é definido a partir de divisões celulares que levam a um aumento no número final de células dentro do órgão em desenvolvimento (Krizek, 2009). Posteriormente, as divisões celulares cessam e o crescimento ainda acontece, porém, agora como resultado de um mecanismo de expansão celular (Krizek, 2009). Entretanto, outros autores propõem uma atuação em conjunto desses dois processos na determinação final do tamanho e forma dos órgãos (Tsukaya & Beemter, 2006). Por exemplo, quando a proliferação celular é inibida em folhas, o número de células no órgão diminui significativamente, como esperado. Entretanto, ao mesmo tempo o volume de cada célula aumenta e, como resultado, a diminuição na área foliar total é menor do que o esperado com a diminuição no número de células. Este fenômeno é chamado de “compensação” e, apesar de explicações teóricas terem sido propostas, a base molecular dessa interação ainda não é compreendida (Tsukaya & Beemter, 2006; Krizek, 2009). Outro fenômeno que pode levar a expansão celular, com consequente aumento do volume celular é a endorreduplicação. A endorreduplicação corresponde a sucessivas duplicações do material genético, porém sem que ocorra a divisão celular (Rechenmann, 2010).

Apesar de uma grande discussão em torno de como ocorre a organogênese, sabe-se que o número e o tamanho das células são de fundamental importância na determinação da morfologia final de um órgão (Tsukaya & Beemter, 2006). A expansão celular consiste em alguns processos celulares que culminarão no aumento do volume da célula. A expansão celular depende do alongamento celular ao longo do eixo longitudinal e do alargamento ao longo do eixo transversal. Fitohormônios tais como auxinas,

ácido giberélico (GA3), citocininas e brassinosteróides são conhecidos por estarem envolvidos no controle deste processo (Bereterbide et al., 2001; Mockaitis & Estelle, 2004).

Em plantas, todas as células possuem uma parede celular que delimita o conteúdo citoplasmático. Assim, para que ocorra a expansão, uma das primeiras alterações a nível celular é um afrouxamento da parede celular como resposta ao aumento da pressão de turgor mediante a captação de água. Entretanto, a magnitude desta pressão não é normalmente o fator que controla a taxa de expansão celular (Fry, 1994). Esse controle é feito pela parede celular, a qual pode se expandir rapidamente ou resistir à expansão. A susceptibilidade da parede à extensão não é simplesmente um atributo físico dos seus polímeros estruturais, mas depende da ação de proteínas da parede celular (Fry, 1994). Existem evidências experimentais que as expansinas estão envolvidas na expansão celular (Fry, 1994), como, por exemplo, na ontogenia do fruto do tomate (Rose et al., 2000) e na iniciação de raízes laterais (Cho & Cosgrove, 2002).

Até o momento, pouco se sabe a respeito dos fatores que controlam os mecanismos de divisão e expansão celular, e como ocorre a interação entre esses processos, para determinar a organogênese. Recentemente, alguns genes codificando peptídeos hormonais, como os peptídeos RALF e RALF-like, com expressão específica em óvulos (Germain et al., 2005) e pólen (Covey et al., 2010), foram sugeridos como importantes para regular a elongação celular.

1.4.1 Expansinas

Expansinas são proteínas que promovem o afrouxamento e a extensão da parede celular (Choi et al., 2006). Foram primeiramente isoladas como mediadores do crescimento ácido. O crescimento ácido refere-se à rápida estimulação do crescimento ocorrido quando as células vegetais em crescimento são expostas a pHs ácidos (McQueen-Mason et al., 1992; Li et al., 1993). Inicialmente foram identificados dois membros da família que atualmente se conhece como α -expansinas ou EXPA, estas proteínas foram capazes de provocar o alongamento de paredes celulares isoladas (McQueen-

Mason et al., 1992). Posteriormente, demonstrou-se que proteínas pertencentes a uma família conhecida como alérgenos do grupo I de pólen, isolados de gramíneas, eram capazes de alongar paredes celulares isoladas. Estas proteínas compartilham entre 20 e 40% de identidade de aminoácidos com as α -expansinas previamente conhecidas, então, denominou-se esta família como β -expansinas. Mais tarde, encontraram proteínas análogas a estas últimas, também em tecidos vegetais, tanto em gramíneas como em outros grupos de plantas (Sharova, 2007). Baseados em análises filogenéticas, atualmente são definidas quatro famílias de expansinas em plantas (Sampedro & Cosgrove, 2005), representadas esquematicamente na figura 4. Da família mais numerosa a família menos numerosa, são denominadas: α -expansinas (EXPA), β -expansinas (EXPB), expansina-like A (EXLA) e expansina-like B (EXLB). A família EXPA é composta de 26 genes em *Arabidopsis* e 34 em arroz. A família EXPB, possui 6 representantes em *Arabidopsis* e 19 em arroz. Pezzotti et al (2002) identificou, em *N. tabacum*, uma β -expansina com expressão específica no pistilo, a qual foi denominada PPAL, e cuja função está ligada ao afrouxamento da parede celular durante a polinização.

O genoma de *Arabidopsis* possui 3 representantes do grupo EXLA, enquanto que no genoma de arroz foram encontrados 4 genes. Finalmente, cada um destes genomas possui um representante da família EXLB (Choi et al., 2006). As expansinas são proteínas evolutivamente conservadas. A identidade entre sequências da família das α -expansinas geralmente se encontra entre 60 e 90%. As β -expansinas caracterizam-se por ter uma maior diversidade, apresentando uma identidade entre os diferentes membros da família que varia entre 28 e 76%. A conformação das expansinas é mais conservada que sua sequência; por exemplo, a semelhança topológica entre as α e β - expansinas é de 75% (Cosgrove et al., 1997). As expansinas são proteínas pequenas, constituídas por 250-275 aminoácidos, e sua estrutura inclui dois domínios (domínio 1 e domínio 2), precedidos de um peptídeo sinal de aproximadamente 15 a 25 aminoácidos (Figura 4). O peptídeo sinal dirigiria as expansinas a uma rota secretória, segundo um programa de predição como o PSORT (Nakai & Horton, 1999) ou o TargetP (Emanuelsson et al., 2000), conduzindo-as à parede celular. A eliminação do peptídeo sinal gera proteínas maduras com tamanho aproximado de 25 a 28 kDa. Os efeitos das expansinas

sobre a parede celular têm sido amplamente estudados, assim com são consideráveis os conhecimentos sobre as características bioquímicas e moleculares destas proteínas mas, ainda assim, o mecanismo preciso pelo qual as expansinas agem na parede celular ainda não é completamente esclarecido.

Estudos recentes demonstraram que as expansinas tem importância no crescimento celular, amolecimento de frutos, abscisão, germinação, resposta a stress e parasitismo (Choi et al., 2006) e também como mediadores de hormônios (Cho & Cosgrove, 2004).

Figura 4: Esquema das quatro famílias de expansinas: EXPA, EXPB, EXLA e EXLB. Estão indicados os dois domínios, as posições dos resíduos conservados de Cisteína (C), o domínio HFD e os resíduos de Triptofano (W). O peptídeo sinal está destacado em azul e as setas vermelhas indicam a posição dos 6 resíduos de cisteína e do resíduo de triptofano conservados em todas as famílias. (Modificado de Choi et al, 2006)

1.4.2 Peptídeos como sinalizadores em plantas

Interações célula a célula são muito importantes para o desenvolvimento da organização multicelular e para a funcionalidade de muitos órgãos (Matsubayashi & Sakagami, 2006). Sabe-se que, em animais, a comunicação intercelular é comumente mediada por peptídeos. Em plantas, por muito tempo, acreditou-se que estas interações eram mediadas por hormônios: auxinas, citocininas, giberilinas, ácido abscísico, etileno e brassinosteróides. Recentemente, pesquisas indicaram que peptídeos estão

envolvidos em vários aspectos regulatórios do desenvolvimento, desde respostas de defesa, mecanismos de auto-incompatibilidade até diferenciação de células meristemáticas (Moura & Silva-Filho, 2006; Matsubayashi & Sakagami, 2006; Ryan et al., 2002; Lindsey et al., 2002). Os peptídeos correspondem a proteínas de pequeno tamanho que geralmente são secretadas, atuando como hormônios sobre receptores específicos na membrana plasmática (Lindsey et al., 2002; Matsubayashi & Sakagami, 2001; Matsubayashi & Sakagami, 2006). A maioria destes peptídeos é rico em resíduos de cisteína, sendo denominados CRPs (Cysteine-rich peptides). São processados a partir de um precursor, para tornarem-se ativos e, aparentemente, a alteração dos resíduos de cisteína alteram a especificidade e o grau de atividade destes (Marshall et al., 2011). Recentemente, alguns destes peptídeos apresentam funções relacionadas com a expansão celular, como é o caso de RALF ("Rapid Alkalinization Factor"), SIRALF e POLARIS. RALF, isolado inicialmente de folhas de *N. tabacum*, possui 49 aminoácidos, sendo originado a partir de uma pré-proteína de 115 aminoácidos (Pearce et al., 2001), e foi capaz de inibir a expansão celular em raízes de *Arabidopsis*. SIRALF foi proposto como inibidor do processo de elongação celular do tubo polínico, embora este não tenha alterado a hidratação do grão de pólen nem a germinação do tubo polínico (Covey et al., 2010). Em cana, SacRALF, homólogo do gene RALF, foi capaz de inibir a expansão celular em cultura celular; foi observado que seu nível de expressão apresentou-se alto durante a fase de proliferação celular e diminuído na fase de expansão celular, em folhas de cana, portanto ele atua na regulação do desenvolvimento como inibidor da expansão celular (Mingossi et al., 2010). POLARIS corresponde a um peptídeo de 36 aminoácidos, que regula a elongação celular em raízes e na determinação do padrão de vascularização de folhas de *Arabidopsis* (Casson et al., 2002). Há muito que se estudar sobre esta nova classe de pequenos peptídeos e muitos destes resultados podem vir do estudo de interações entre estes peptídeos e seus receptores e/ou parceiros de interação.

1.5 Estudo das interações proteína-proteína

Interações entre proteínas são a base para grande parte dos processos biológicos. Como descrito anteriormente, o processo de desenvolvimento vegetal é mediado pela ação de hormônios e peptídeos hormonais. A percepção e reconhecimento destas moléculas ocorrem em decorrência da interação com receptores específicos. A resposta celular é ativada por uma cascata de sinalização toda baseada em sucessivas interações e modificações de proteínas (Santner & Estelle, 2009). Desta forma, estudos para identificar estas interações são de fundamental importância para compreender e identificar os processos biológicos nos quais a proteína em estudo atua.

1.5.1 O sistema duplo-híbrido de leveduras

Observando a maquinaria da ativação gênica em leveduras, Fields e Songs (1989) criaram o sistema duplo-híbrido de leveduras. Os autores utilizaram o sistema GAL4 de ativação de genes do metabolismo da lactose em *Saccharomyces cerevisiae* para criar um sistema quimérico com a utilização de genes repórteres. O fator de transcrição GAL4 foi separado em dois domínios funcionais, o domínio de ligação ao DNA (N-terminal), e o domínio de ativação da RNA polimerase (C-terminal). Isso tornou possível a obtenção das duas proteínas quiméricas, chamadas de “isca” e “presa”, respectivamente. A proteína isca consiste de uma proteína X conhecida, fusionada ao domínio GAL4 de ligação ao DNA, e a proteína presa é uma proteína Y, fusionada ao domínio GAL4 de ativação da polimerase. Se expressas ao mesmo tempo em células de levedura, uma vez que as proteínas X e Y mostrem interação, o fator transcricional GAL4 é reconstituído, ocorrendo à ativação específica de genes repórteres, colocados sob controle da sequência regulatória reconhecida por GAL4.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Considerando a importância da reprodução das plantas e o interesse em compreender a função de genes expressos durante o desenvolvimento do pistilo, este trabalho teve como objetivo estudar o gene 092H06, expresso preferencialmente nos estigmas/estiletes de *N. tabacum*.

2.2 Objetivos específicos

Analisar a expressão de genes para α -expansina, β -expansina, ciclina B1.2 (marcador de ciclo celular) e actina, por qRT-PCR, nos pistilos das plantas transgênicas de silenciamento e de superexpressão.

Analisar a morfologia dos estigmas/estiletes e ovários das plantas transgênicas de silenciamento e de superexpressão, por microscopia óptica.

Verificar a ocorrência de endoreduplicação nas células das plantas transgênicas de silenciamento e de superexpressão, por meio de citometria de fluxo.

Identificar candidatos a parceiros de interação proteína-proteína com a proteína 092H06, a partir do ensaio de duplo híbrido.

Obter a proteína recombinante 092H06 por expressão heteróloga em bactérias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

No presente trabalho, foram estudadas as plantas transgênicas T2, resultantes do cruzamento das seis plantas transgênicas primárias Ri9.2, Ri10.1, Ri19.3, Sex7.0, Sex22 e Sex33 (T1), usadas como progenitor feminino, com pólen de plantas selvagens SR1. Sementes, oriundas destas plantas transgênicas T1, foram semeadas em meio com canamicina para seleção da presença do transgene. Quatro plântulas resistentes, descendentes de cada uma das plantas T1, foram transferidas para solo e levadas à casa de vegetação. Algumas das plantas da geração T2 foram perdidas por problemas externos ao experimento. Portanto, de cada planta transgênica T1, foi analisada uma única descendente da geração T2 (Ri9.2.4, Ri10.1.2, Ri19.3.2 e Sex7.4, Sex22.1.1, Sex33.2). As plantas tiveram seus órgãos florais coletados nos estádios 6, 8, 10 e 11 do desenvolvimento floral, segundo Koltunow et al. (1990). As amostras dos estádios 6, 8 e 10 foram usadas para microscopia, portanto foram coletadas e imediatamente incubadas em fixador apropriado. Amostras de estágio 11 foram usadas para a extração de RNA sendo imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, e armazenadas em freezer - 80°C até extração do RNA.

3.2 Recuperação dos clones cDNA TOBEST

Os clones TOBESTS050D06 e TOBESTC054E01 (α -expansinas); TOBESTC062A05 e TOBESTS020B09 (β -expansinas); TOBESTC021H04 (expansina putativa); foram recuperados a partir de eletroporações de DNA usando bactérias *E. coli* cepa DH10B.

3.2.1 Preparação de células de *Escherichia coli* eletrocompetentes para transformação

Utilizando-se uma alça de platina, estriou-se uma placa contendo meio LB sólido (10g/l de triptona, 5g/l de extrato de levedura, 10g/l de NaCl e 1% de

ágar) a partir de uma suspensão bacteriana de *E. coli*, cepa DH10B. A placa foi incubada por 16 horas, a 37°C. Transferiu-se uma colônia para 5ml de meio LB líquido (10g/l de triptona, 5g/l de extrato de levedura, 10g/l de NaCl) e incubou-se durante 16 horas, a 37°C, sob agitação de 250rpm. Foi transferido 1ml da suspensão bacteriana para 200ml de meio LB, que foi mantido por 16h a 37°C, sob agitação de 250rpm (a leitura da absorbância atinge o ponto ideal D.O.600 entre 0,3 e 0,5 nm). Posteriormente, a cultura foi mantida no gelo por 30 minutos e em seguida centrifugada a 5.000rpm por 10 minutos, a 4°C (Centrifuga *Eppendorf 5810R*). Retirou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas delicadamente em 200ml de água estéril a 4°C. Centrifugou-se novamente sob as mesmas condições e descartou-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas delicadamente em 100ml de água estéril a 4°C e submetidas a nova centrifugação. Descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas delicadamente em 10ml de glicerol 10% gelado. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas delicadamente em um volume final de 500µl de glicerol 10% a 4°C. Foram feitas alíquotas de 40µl, as quais foram estocadas a -80°C.

3.2.2 Eletroporação de *E. coli*

Adicionou-se 1µl do DNA em 40µl de células DH10B eletrocompetentes, previamente preparadas e alíquotadas (item 3.2.1). Colocou-se a mistura em uma cubeta de eletroporação previamente resfriada no gelo, que foi, então, submetida a um pulso elétrico de 1,8 kV/25 µF (eletroporador Gene Pulse, BioRad). Logo após, foi adicionado 1ml de meio LB líquido e ressuspendeu-se delicadamente as células, que foram posteriormente transferidas para um tubo de ensaio, e incubadas a 37°C, sob agitação de 200rpm, por 1 hora. Em seguida, a cultura foi distribuída uniformemente, com o auxílio de uma alça de Drigalski, em placas contendo meio LB sólido com antibiótico apropriado. As placas foram, então, incubadas a 37°C durante 16-20 horas.

3.2.3 Preparação de DNA plasmidial

3.2.3.1 Mini-preparação de DNA Plasmidial (Método da Lisozima)

Colônias transformadas e plaqueadas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 5ml de meio LB líquido (contendo antibiótico adequado) e, em seguida, incubadas a 37°C, com agitação de 230rpm “overnight”. As culturas foram centrifugadas a 14.000rpm (Centrífuga Eppendorf 5415C) por 2 minutos. Em seguida, o precipitado de células de cada tubo foi totalmente ressuscitado em 175µl de tampão TES (10mM de Tris-HCl, pH 8,0, 1mM de EDTA, pH 8,0 e 15% Sacarose) e adicionou-se 20µl de lisozima (10mg/ml) O material foi mantido à temperatura ambiente por 10 minutos e incubado a 73°C, durante 15 minutos. Posteriormente, os tubos foram submetidos a uma centrifugação a 14.000rpm (centrífuga Eppendorf 5415C) por 15 minutos.

O sobrenadante foi transferido para um tubo novo de 1,5 ml. O material foi precipitado adicionando-se 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol absoluto, que foram deixados por no mínimo 1 hora a -20°C e, em seguida, centrifugado por 15 minutos a 14.000rpm. O precipitado de DNA foi lavado com etanol 70% e, em seguida, ressuscitado em 50µl de água destilada estéril.

3.2.3.2 Digestão por enzimas de restrição

As digestões foram realizadas utilizando aproximadamente 5µl de DNA, 2µl de tampão adequado para a enzima (solução 10x concentrada) e 0,2µl de enzima de restrição (depende da concentração de cada enzima e da quantidade de DNA a ser digerida), sendo o volume final da reação de 20µl. As digestões foram colocadas em banho-maria à 37°C, “overnight” e, posteriormente, submetidas a uma corrida eletroforética.

3.3 Eletroforese em gel de agarose

As corridas eletroforéticas foram realizadas em gel de agarose 1%, em tampão 0,5X TBE (TBE10X: 108g/l de Tris base, 55g/l de ácido bórico, 8,3g/l de EDTA), contendo 0,5µg/ml de brometo de etídeo. O brometo de etídeo é um agente intercalante de DNA e permite a visualização das bandas de DNA, quando exposto à luz UV. Para cada amostra a ser analisada, foi adicionado 1/5 do volume de tampão de carregamento (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol e 15% ficol tipo 400-DL). O gel de agarose (ainda líquido) foi colocado em uma bandeja apropriada para inserção de pentes, possibilitando a formação de canaletas, onde as amostras são inseridas. Após solidificação, o gel de agarose foi colocado em uma cuba de acrílico, e esta foi preenchida com tampão 0,5X TBE, ligado a uma fonte de energia que fornece uma corrente elétrica que polariza a cuba. Devido ao DNA possuir carga elétrica negativa, migra entre os poros do gel em direção ao pólo positivo da cuba. Tal fenômeno permite a formação de bandas separadas de acordo com o tamanho molecular do fragmento de DNA. O tamanho de tais fragmentos foi inferido através da comparação com a migração de fragmentos de marcador de peso molecular (1kb Plus DNA Ladder – Invitrogen), também aplicado no gel. Ao final, as eletroforeses foram fotografadas.

3.4 Sequenciamento

As amostras foram preparadas com o kit de reação ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems). Para cada amostra a ser sequenciada em microplaca de 96 poços, foram usados aproximadamente 500ng de DNA, 2µl de “primer” 5 pmoles/µl, 2µl de “Big Dye” (deoxinucleotídeos, dideoxinucleotídeos fluorescentes, enzima Taq DNA-Polimerase.), 2µl de tampão de diluição do “Big Dye” (200mM Tris-HCl pH 9,0 e 5mM de Cloreto de Magnésio) e água milli-Q estéril, para completar o volume final de 10µl. A microplaca foi então selada, levada ao vortex por 1 minuto e centrifugada rapidamente a 1.000rpm. O programa de PCR utilizado foi um passo inicial de 96°C por 2 minutos passando por um ciclo de 96°C por 45 segundos; 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos, sendo o ciclo repetido

por 35 vezes. Logo após o término da reação o material foi mantido a 4°C por tempo indeterminado.

3.5 Isolamento de RNA total de Estigmas/Estiletos

A extração de RNA total foi feita utilizando o “Plant RNA Reagent” (Invitrogen), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e, em seguida, ressuspendido em 350µl de “Plant RNA Reagent”. Posteriormente, a amostra ressuspendida foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Após centrifugação a 12.000rpm (Centrífuga Eppendorf 5415C) por 2 minutos, o sobrenadante foi transferido para um tubo novo de 1,5ml. Ao sobrenadante foram adicionados 100µl de NaCl 5M e 300µl de clorofórmio (Mallinckrodt). A amostra foi centrifugada a 10.500rpm (rotor fixo- Centrífuga Eppendorf 5810R) a 4°C por 10 minutos. A fase aquosa obtida foi transferida para um tubo novo de 1,5ml e a ela foram adicionados 500µl de isopropanol. Após inversão do tubo por 10 vezes para homogeneizar, a amostra foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, centrifugadas a 10.500rpm (rotor fixo, Centrífuga Eppendorf 5810R) por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado em etanol 75% e, posteriormente, centrifugado por 1 minuto a 10.500rpm (rotor fixo, Centrífuga Eppendorf 5810R) a 4°C. O precipitado ressuspendido em 35µl de água-DEPC.

3.6 qRT-PCR

3.6.1 Tratamento com a enzima DNase para realizar o RT-PCR em tempo real

A uma alíquota de RNA (10µg) extraída de cada órgão adicionou-se 2,5µl de DNase (1U/µl-Promega), 5ul de tampão 10X concentrado (Promega), 2,5µl DTT 100mM e 0,5µl de RNase OUT (40U/µl - Invitrogen), sendo o volume final da reação completado para 50µl com água DEPC. Essa reação foi incubada em banho-maria a 37°C por 1 hora e, em seguida, foram feitas reações de PCR utilizando “primers” Sq actina 3 (10pmol/µl), para verificar uma possível contaminação de DNA genômico. Para a reação PCR foram

usados: 2µl de RNA, 1µl dNTP, 1µl primer Sq actina 3 FW, 1µl primer Sq actina 3 Rv, 2µl de tampão 10x, 0,5µl Taq DNA polimerase (Biotools). Programa: 95°C por 5 minutos, 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, 72°C por 10 minutos e 10°C indeterminadamente. Após a reação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1%. Em seguida, adicionou-se na reação 1 volume de fenol, sendo vigorosamente agitada e, posteriormente, centrifugada a 14.000rpm por 3 minutos. A fase superior foi recuperada e, adicionou-se 1 volume de fenol/clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Como na etapa anterior, a mistura foi agitada e centrifugada a 14.000rpm por 3 minutos. A fase superior foi recuperada, então adicionou-se 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), sendo agitada e centrifugada como na etapa anterior. Após essas três etapas de limpeza, o RNA foi precipitado com 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol absoluto, permanecendo a -20°C durante pelo menos uma hora. A amostra foi centrifugada a 14.000rpm durante 15 minutos e o precipitado foi ressuspensionado em 12µl de água autoclavada DEPC 0,1%.

3.6.2 Reação com a transcriptase reversa (RT)

As amostras de RNA foram usadas como molde para a síntese de cDNA, por tratamento enzimático com transcriptase reversa (Superscript III - 200U/µl, Invitrogen). Foram adicionados em um microtubo, 12µl de RNA tratado com DNase, 1µl de oligonucleotídeo (dT)V (50uM), 1µl de dNTPs mix (10mM). Essa mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos no termociclador (para permitir a desnaturação do RNA, rompendo estruturas secundárias) e, mantidas no gelo por pelo menos 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 4µl de First Strand Buffer (5x, Invitrogen), 1µl de DTT (0,1M), 1µl de RNase OUT (40U/µl Invitrogen) e 1µl de Superscript III (Invitrogen). Os tubos de reação foram colocados em termociclador e utilizou-se o programa: 50°C por 40 minutos, 55°C por 20 minutos, 70°C por 15 minutos e 4°C indeterminadamente.

3.6.3 Corridas de qRT-PCR

As reações de PCR, para a análise de expressão por qRT-PCR, foram feitas utilizando o aparelho 7500 Fast System (Applied Biosystems). As reações de PCR foram feitas com 5µl de “POWER SyBR Green – PCR Master Mix” (Applied Biosystems), 1µl dos “primers” Fw e Rv (1pmol/µl), 1ul cDNA e 2ul de água milliQ autoclavada. As reações foram feitas em triplicata, e, os resultados das triplicatas apresentaram uma variação maior que 1 ciclo, novas repetições foram feitas. Em todos os experimentos foram realizadas reações-controle (*NTC – Non Template Control*), que não contêm molde de DNA, para verificar possíveis contaminações.

Para cada gene a ser testado, foi utilizado um par de “primers” (Tabela 1). O cálculo do número de cópias de cada gene foi realizado através do cálculo do ddCT (Livak & Schmittgen, 2001). Os resultados foram normalizados com relação à expressão de um gene constitutivo em plantas, GAPDH, validado anteriormente por Quiapim et al (2009).

Tabela 1: Pares de “Primers” (Forward + Reverso) utilizados para as reações de qRT-PCR para os genes medidos. Legenda: pb = pares de base, Tm = temperatura de melting.

Primer	Sequencia (5'→ 3')	Pb	Tm
092H06 qPCR Fw	TCC ATA TTG TGG AGG GAC AGT GGA	24	59,5°C
092H06 qPCR Rv	GCG TTT GAA CCT CAA GCA AAT GGG	24	59,4°C
α-expa1 qPCR Fw	TGA GTT CAT ACG TCA TAG GCA GCG	24	58,7°C
α-expa1 qPCR Rv	TGG CCG GTG TGT TTC GAA TAT CAG	24	59,4°C
β-expa qPCR Fw	GCC TGG CCA AGC TGA TTT ATT TCG	24	58,9°C
β-expa qPCR Rv	GTC GAT CTT GAA TGT CAC TGT TGT	24	55,3°C
SCI1 qPCR Fw	TCG TCT GAG ACT GCA CGC GAT TTA	24	60,2°C

SCI1 qPCR	ATA TTC CAA GCG TGG GAT CAC CGA	24	60,2°C
CyC B1.2Fw	AGA CCT TAC GTA T TT CTG GCC CGT	24	69,1°C
CyC B1.2 Rv	TAT TGA GGG TGT GTC GAG CAG CAT	24	70,6°C
Sq actina 3 Fw	TAA GGC TGG ATT TGC CGG AGA TGA	24	60,3°C
Sq actina 3 Rv	TCT TCT GGA GCC ACA CGA AGT TCA	24	60,2°C
GAPDHFW-qPCR	GCA TCT TTG ATG CCA AGG CTG GAA	24	60,3
GAPDHRV-qPCR	TCG AGT GCT GTA GCC CAT TTC GTT	24	60,6

3.7 Preparação do material para análises histológicas

3.7.1 Preparação das lâminas com organosilano (3-aminopropiltriethoxisilano) (Engler *et al.*, 2001)

Lâminas novas foram lavadas em água quente (60°C) com detergente por duas horas ou deixadas em água com detergente durante a noite, à temperatura ambiente, e secas naturalmente. Posteriormente, as lâminas foram incubadas por 2h a 180°C para eliminar RNases, lavadas com etanol 45%, contendo 1% de ácido acético, e novamente secas ao ar. Em seguida, as lâminas foram incubadas por 15 minutos em 2% de organosilano em acetona e, então, foram enxaguadas com 100% de acetona por 2 minutos, em seguida com 10% de acetona por 2 minutos e, finalmente, em água DEPC por 2 minutos. As lâminas foram secas ao ar e acondicionadas a 4°C em caixas apropriadas.

3.7.2 Fixação/Desidratação/Emblocação

1º Dia: foi preparada uma quantidade suficiente de PBS 1X para a coleta do material e, em seguida, ajustou-se a solução para pH 11 com NaOH. A solução foi aquecida até 70°C, então, foi adicionado o paraformaldeído (na capela), o qual deve dissolver em mais ou menos um minuto. Após dissolução do paraformaldeído, a solução foi resfriada até 4°C e o pH novamente ajustado

para 7 com H_2SO_4 . Adicionou-se glutaraldeído 4% (v/v). O tecido foi coletado e imediatamente colocado no fixador previamente gelado. Esse fixador é constituído de paraformaldeído 4%, glutaraldeído 4% e PBS 1X (PBS 10X: NaCl (82g/l), Na_2HPO_4 (10,5 g/l) e NaH_2PO_4 (3,55 g/l). Em seguida, foi aplicado um vácuo de 20 mmHg por 15 minutos, o qual foi repetido por mais 3 vezes. Antes da última aplicação de vácuo o fixador foi trocado. Após o último vácuo, os tecidos foram mantidos durante a noite a 4°C.

2º Dia: foram feitas duas lavagens com PBS1X por 30 minutos cada. Em seguida, foram feitas várias lavagens em etanol em diferentes diluições (30% a 95%) por 30 minutos cada, sob agitação, a 4°C. Após as lavagens o material foi deixado em etanol 95%, a 4°C durante a noite.

3º Dia: foram feitas 4 trocas de etanol 100% por 30 minutos cada, a temperatura ambiente. Em seguida, foram feitas lavagens da seguinte maneira:

Xilol 25% + etanol 75% por 30 minutos

Xilol 50% + etanol 50% por 30 minutos

Xilol 75% + etanol 25% por 30 minutos

Xilol 100% por 60 minutos

Xilol 100% por 60 minutos

Xilol 100% + $\frac{1}{4}$ do volume de pastilhas de parafina, deixando durante a noite sem agitação.

4º Dia: o material foi colocado a 42°C, até que as pastilhas de parafina derretessem completamente e, em seguida, foi adicionado $\frac{1}{4}$ do volume de pastilhas deixando derreter completamente. A temperatura foi aumentada para 60°C e foi feita substituição de parafina/Xilol por parafina fundida e o material foi deixado durante a noite a 60°C.

5º Dia ao 7º Dia: foram realizadas duas trocas de parafina por dia. No oitavo dia o material foi colocado em formas e estocado a 4°C.

3.7.3 Cortes histológicos

As lâminas, previamente banhadas com organosilano, foram aquecidas a 42°C em uma mesa aquecedora. O material emblocado foi mantido a -20°C por 1 hora antes de ser montado em bloco de madeira para posterior corte no

micrótomo. O material foi cortado com uma espessura de 8µm em micrótomo rotativo (Microtome 820 Spencer) (equipamento cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Wagner Ferreira – Depto. de Biologia FFCLRP/USP). Antes de colocar as fitas de parafina cortadas sobre as lâminas, foi colocado água sobre as lâminas para que as fitas de parafina distendessem. Após distensão das fitas, o excesso de água foi retirado e as lâminas foram deixadas sobre mesa aquecida para que a água evaporasse e o tecido aderisse à lâmina. As lâminas foram analisadas no microscópio KS 300 Zeiss e as microscopias foram capturadas através do programa AxiovisionRel 4.8.

3.8 Citometria de Fluxo

3.8.1 Extração de núcleos de estigma/estiletes e folhas de *Nicotina tabacum* (Arumuganathan e Earle, 1991 apud Lee H-C and Lin T-Y, 2005)

Para a realização do experimento de citometria de fluxo, 100mg de tecido fresco de folhas e estigmas/estiletes de planta selvagem e das plantas transgênicas de silenciamento e superexpressão foram cortados em pedaços bem finos com auxílio de um bisturi em placa de vidro contendo 1ml de tampão de extração A (tampão MgSO_4 [10 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 50mM KCl; 5mM HEPES (pH 8,0)]; 1%(w/v) polivinilpirrolidona (PVP)-40; 6,5 mM ditioneitol (DTT); 0,25%(v/v) Triton X-100), em seguida 2ml do mesmo tampão foram adicionados e o material foi mantido sob agitação por 1 minuto. O material foi filtrado em uma coluna com algodão em seu interior, desprezando-se o primeiro filtrado. Os núcleos foram eluídos da coluna em 7ml do tampão de extração A gelado e foram coletados em tubos de 15ml. Os tubos foram centrifugados a 120g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspenso em 400ul do tampão de extração B (tampão MgSO_4 ; 6,5mM ditioneitol; 0,25%(v/v) Triton X-100; 0,2mg/ml iodeto de propídeo (Sigma); 1,25µg/mL RNase). Os tubos foram mantidos por 15 minutos a 37°C e submetidos a leitura no aparelho Guava EasyCyte Mini System (Millipore and Guava Technologies).

3.9 Ensaio de Duplo-híbrido

Para o ensaio de duplo-híbrido, os experimentos foram realizados com o Kit ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway Technology (Invitrogen). Os controles utilizados foram: controle positivo de interação forte (Krev1-RalGDS-wt); controle positivo de interação fraca (Krev1-RalGDS-m1), e controle de interação negativa (Krev1-RalGDS-m2), todos presentes no kit. O gene 092H06, foi utilizado como isca. As presas utilizadas foram aquelas presentes na biblioteca de cDNAs de estigmas/estiletes, construída em vetor de expressão adequado ao sistema de duplo-híbrido (pDEST22).

3.9.1 Clonagem da região codificadora CDS do gene 092H06 (isca) no vetor pDEST32

Anteriormente, foi construída em nosso laboratório uma biblioteca de cDNAs de estigmas/estiletes (parte do trabalho de Doutorado de Edward J.Strini), que representam as presas (“prey”) para uso no sistema de duplo-híbrido, disponível em nosso laboratório, foi construída no vetor pDEST22 (Invitrogen), que possui a sequência do domínio de ativação (AD) do fator de transcrição GAL4 (Figura 5), o vetor de expressão utilizado para a clonagem da isca (“bait”), no caso o clone 092H06, foi o pDEST32 (Invitrogen) (Figura 6), que contém o domínio de ligação ao DNA (DBD) do fator de transcrição GAL4. A construção 092H06+ pDEST32 foi feita por Michael dos Santos Brito em seu trabalho de doutorado e gentilmente cedida para este experimento.

Figura 5: Mapa do vetor de expressão em leveduras pDEST22 (Invitrogen), usado para clonagem das presas, via recombinação pela reação LR (Sistema Gateway). O vetor apresenta o gene de resistência à ampicilina em bactérias e o gene TRP1, que codifica uma enzima da via de biossíntese do triptofano, para seleção em leveduras. Os cDNAs da biblioteca foram clonados neste vetor, produzindo as presas. A sequência dos cDNAs fusionam-se à sequência do domínio de ativação (AD) do fator de transcrição GAL4, na porção 3' de AD. As presas são clonadas por recombinação entre os sítios attL, presentes nas presas, com os sítios attR, presentes no vetor.

Figura 6: Mapa do vetor de expressão em leveduras pDEST32 (Invitrogen), usado para clonagem da isca, via recombinação pela reação LR (Sistema Gateway). O vetor apresenta o gene de resistência à gentamicina em bactérias e o gene Leu2, que codifica uma proteína da via de biossíntese da leucina, para seleção em leveduras. A CDS do clone 092H06 foi clonada neste vetor, através da recombinação entre os sítios attL, presentes na construção 092H06+pDONR221, com os sítios attR do vetor pDEST32. A sequência da isca fusiona-se à sequência do domínio de ligação ao DNA (DBD) do fator de transcrição GAL4, na porção 3' de DBD.

3.10 Preparação de células de levedura quimiocompetentes para transformação

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4A, que apresenta os genes repórteres HIS3 (para histidina), ADE2 (para adenina) e lacZ, foi recuperada do estoque em glicerol, estriando-se em uma placa contendo meio YPAD sólido, incubada por 3 dias, à 30°C. Após a incubação, uma colônia isolada foi raspada da placa com uma alça de platina e ressuspendida em 50ul de água milli-Q estéril. A suspensão foi plaqueada no centro de uma nova placa com meio YPAD sólido e incubada à 30°C por uma noite. As células foram ressuspensas em 5ml de água milli-Q estéril. Uma quantidade suficiente de células foi adicionada a 50ml de meio YPAD líquido para que a D.O.600 atingisse o valor de 0,1. A cultura foi então incubada a 30°C, sob agitação de 250rpm até atingir D.O.600= 0,4. A cultura foi centrifugada a 3000rpm

(centrífuga Eppendorf 5810R) por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 10ml 1x TE/LiAc. (solução estoque: 10xTE [100mM Tris-HCl(pH 7,50), 10 mM EDTA, autoclavado] e 10x LiAc [acetato de lítio 1M, esterilizado em filtro]). Centrifugou-se novamente e o precipitado foi a ressuspendido em 175ul de 1x TE/LiAc, adicionado 10ul glicerol10% e foram feitas alíquotas de 50ul da suspensão celular que foram congeladas a -80°C.

3.10.1 Transformação de leveduras

A transformação de leveduras foi feita pelo método do choque térmico. Para tanto, a uma alíquota de 50ul de células competentes foram adicionados gentilmente, 5ul de esperma de salmão sonicado (10mg/ml) fervido por 5 minutos a 100°C, e 500 ng da construção 092H06+pDEST32 para preparação de leveduras competentes e para os testes de auto-ativação; 1ug para transformação com a biblioteca) e 300ul de 40%PEG-3350/1X LiAc/ 1X TE estéril, misturando-se gentilmente por pipetagem. Os tubos foram incubados em banho-maria, a 30°C por 30 minutos, e imediatamente transferidos para outro banho, a 42°C por 15 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 8000rpm por 30 segundos a temperatura ambiente (centrífuga Eppendorf 5415 D). O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi ressuspendido em 200ul de solução salina 0,09%. Cada suspensão foi plaqueada em meio de cultura adequado.

3.10.2 Teste de auto-ativação

Da isca: Células de levedura competentes contendo a construção 092H06+pDEST32 foram transformadas com 500ng do vetor pDEST22 vazio, para testar se a proteína híbrida DBD-092H06, expressa juntamente com o domínio AD, é capaz de auto-ativar o sistema. O produto da transformação foi distribuído em placa contendo meio de cultura SC sem leucina e sem triptofano (SC-Leu-Trp), para seleção dos transformantes, incubada a 30°C por 48 horas.

Uma colônia isolada foi estriada em placa contendo o meio SC-Leu-Trp-His (sem histidina), incubada a 30°C por 48 horas. Se houver crescimento de colônias, a isca, sozinha, auto-ativa o sistema. Se não houver crescimento, a isca, não ativa o sistema, podendo ser utilizada para o “screening” na biblioteca de duplo-híbrido.

Das presas: Células de levedura competentes contendo pDEST32 vazio foram transformadas com 500ng do o vetor pDEST22 contendo a presa de teste. A co-transformação foi plaqueada em meio SC-Leu-Trp para seleção dos transformantes para ambos os vetores. Após crescimento, a transformação foi estriada em meio SC-Leu-Trp-His, como descrito para o teste com a isca.

3.11 “Screening” do clone 092H06 contra biblioteca de duplo-híbrido de cDNA de estigma/estilete de tabaco.

Para a realização do “screening” da biblioteca, foram utilizadas células de levedura competente contendo a construção 092H06+pDEST32. Foram realizadas 30 transformações, quantidade necessária para obtenção de 10⁶ transformantes (eficiência previamente determinada em nosso laboratório), sendo, de acordo com o protocolo, a quantidade ideal de transformantes para a realização do “screening”. Para cada transformação, foi utilizado: uma alíquota de levedura competente contendo a construção 092H06+pDEST32; 1µg de DNA da biblioteca; 5µl de DNA de esperma de salmão sonificado (50µg) e 300µl de 40%PEG-3350/ 1X LiAc / 1X TE. Os tubos foram cuidadosamente homogeneizados e incubados a 30°C por 30 minutos. Em seguida, a cada tubo foram adicionados 36µl de DMSO (“dimethyl sulfoxide”) estéril (Sigma), e cuidadosamente homogeneizados. As transformações por choque térmico foram realizadas de acordo com o descrito no item 3.10.1. Cada transformação foi plaqueada em uma placa de Petri de 15 cm contendo Sc-Leu-Trp-His, sendo o gene HIS3 utilizado como gene repórter neste momento. As 30 placas foram incubadas a 30°C por 48 horas e em seguida, mantidas por 48 horas a temperatura ambiente. Após este período, as colônias que cresceram neste meio seletivo foram inoculadas em placas de cultura de 96 poços contendo 1,5ml de meio líquido SC-Leu-Trp e crescidas por 24 horas a 30°C sob agitação de 250rpm. Após crescimento, 300ul de cada cultura foram utilizados para

obtenção de estoque em glicerol 20% e armazenados a -80°C. Uma alíquota de 230µl de cada cultura foi transferida para placas de 96 poços (Corning). O restante da cultura, presente na placa de cultura, foi centrifugado a 1250 x g por 5 minutos (centrífuga Eppendorf 5810R). O “pellet” foi armazenado a -20°C até o momento da extração do DNA plasmidial das leveduras.

3.11.1 Análise do fenótipo dos transformantes para o gene repórter HIS3

A placa de 96 poços contendo os 230µl de cada cultura foi utilizada como molde para replicar as culturas. Com o auxílio de um replicador (Boekel), estéril, que foi inserido nos 96 poços as culturas foram replicadas em uma placa contendo meio SC-Leu-Trp, servindo como controle do crescimento das células para o teste com o gene repórter. A segunda réplica foi feita em meio SC-Leu-Trp-His, para testar novamente os clones de interação com 092H06 para ativação do gene repórter HIS3. As réplicas foram incubadas a 30°C por 48 horas. Após este período, as colônias que cresceram foram analisadas.

3.11.2 Extração do DNA plasmidial de levedura

Algumas das colônias positivas para o teste com o gene repórter HIS3 foram selecionadas para identificação da presa, podendo corresponder a um parceiro de interação do clone 092H06. Portanto, colônias precipitadas na placa de cultura (descrito no item 10.2.3) foram ressuspendidas em 100µl de 3% SDS/ 0,2N NaOH, e removidos para tubos de 1,5ml. Os tubos foram incubados 15 minutos a temperatura ambiente, invertendo-se rapidamente algumas vezes. Em seguida, foram adicionados 500µl de TE (10mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA) homogeneizou-se por inversões, adicionou-se 60µl de acetato de sódio 3M e 600µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Os tubos foram agitados em vortex por 2 minutos e centrifugados a 14000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente (Centrífuga Eppendorf 5415D). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 650µl de isopropanol gelado, misturados por inversão. Os tubos foram incubados a -20°C por pelo menos 20 minutos. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado,

adicionou-se 100ul de etanol 70% para lavagem e centrifugou-se a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e, após secar, o precipitado foi ressuspensionado em 10 ul de TE e armazenado em freezer -20°C.

3.11.3 Identificação das presas

Para identificação das presas, possíveis parceiros de interação do clone 092H05, 1µl do DNA plasmidial extraído de levedura de cada clone foi inserido em células DH10B de bactérias, por eletroporação. Todo o conteúdo de cada transformação (1ml) foi plaqueado em meio LB suplementado com ampicilina (100µg/ml) para seleção das células que incorporaram apenas o plasmídeo da presa, o pDEST22. Após crescimento, seis colônias isoladas foram selecionadas e inoculadas em meio LB líquido contendo ampicilina. Após 16-20 horas de crescimento, o DNA plasmidial de todas as colônias foi extraído, como descrito no item 4.1 e posteriormente, checados por digestão com as enzimas SacI e XhoI. Após eletroforese em gel de agarose, o DNA das colônias selecionadas foram submetidos a sequenciamento. Após a obtenção das sequências, estas foram analisadas nos banco de dados NCBI e TAIR (The Arabidopsis Information Resource), pela ferramenta TBlastX, comparando-se com as sequências já existentes nestes bancos.

3.11.4 Re-transformação das leveduras com pDEST22-presas

Cada DNA obtido das presas foi novamente inserido em leveduras competentes contendo a construção 092H06 + pDEST32. As transformações foram realizadas seguindo o item 3.10.1 e as células foram plaqueadas em meio SC-Leu-Trp-His para testar a interação mediante ativação do gene repórter HIS3. O crescimento do transformante neste meio indica que a interação entre 092H06 e a presa correspondente é positiva.

3.12 Expressão da proteína recombinante codificada pelo clone 092H06

3.12.1 Indução da expressão da proteína codificada pelo clone 092H06 em *E. coli* cepa ArcticExpressDE3RIL

As construções pEXP17-092H06 e pET28-092H06 (gentilmente cedidas por Michael dos Santos Brito) foram inseridas na linhagem de *E. coli* competente ArcticExpressDE3RIL por eletroporação. Essas linhagens transformadas foram induzidas, para a produção da proteína recombinante 092H06.

Da placa contendo células de *E. coli* transformadas com os plasmídeos de expressão, uma colônia isolada de cada linhagem foi recuperada, e um pré-inóculo foi preparado com 5ml de meio LB suplementado com os antibióticos adequados nas concentrações apropriadas. Após crescimento “overnight” (16-20 horas), a 37°C, sob agitação (230rpm), foi feita uma diluição na proporção de 1:100, adicionando-se 500µl do pré-inóculo em um erlenmeyer contendo 50ml de meio LB, acrescido dos antibióticos apropriados. A seguir, essas culturas foram incubadas a 30°C, sob agitação (230rpm) até atingir uma D.O._{600nm} ~ 0,4 – 0,6. Ao se atingir tal densidade, a cultura foi mantida a 12°C por 10 minutos, em seguida, foi retirada uma alíquota de 1ml, que foi utilizada como tempo zero (pré-indução), e adicionou-se 1mM de IPTG em cada linhagem, para início de indução da expressão. A proteína recombinante foi induzida por 24hs, a 12°C, período no qual alíquotas em diferentes tempos de expressão foram retiradas. Ao término da indução, a cultura foi centrifugada a 5000rpm e 4°C, por 10 minutos, para a obtenção dos precipitados celulares. Ao final das centrifugações, o sobrenadante foi descartado, e as células precipitadas foram estocadas em freezer -20°C, para posterior lise celular, e análise dos extratos proteicos pelo sistema de SDS-PAGE.

3.12.2 Indução da expressão da proteína codificada pelo clone 092H06 em *E. coli* cepa BL21(DE3)ROSETTA

A construção pET28-092H06 foi inserida na linhagem de *E. coli* competente BL21(DE3) Rosetta por eletroporação. A linhagem transformada foi induzida, para a produção da proteína recombinante 092H06.

Uma colônia isolada foi recuperada da placa contendo células de *E. coli* transformadas com os plasmídeo de expressão, e foi preparado um pré-inóculo com 5ml de meio LB suplementado com os antibióticos adequados nas concentrações apropriadas. Após crescimento “overnight” (16-20horas), a 37°C, sob agitação (230rpm), foram feitas duas diluições na proporção de 1:100, adicionando-se 500µl do pré-inóculo em dois erlenmeyer contendo 50ml de meio LB, mais os antibióticos apropriados. A seguir, uma cultura foi incubada a 37°C e outra a 25°C, sob agitação (230rpm) até atingir uma D.O.600nm ~ 0,4 – 0,6. Ao se atingir tal densidade, foi retirada uma alíquota de 1ml de cada cultura, que foi utilizada como tempo zero (pré-indução), e adicionou-se 1mM de IPTG em cada cultura, para início de indução da expressão. A cultura induzida a 37°C permaneceu em indução por apenas 4horas. A cultura induzida a 25°C foi retirada uma alíquota com 4horas de indução e o restante da cultura foi induzida por 24horas. Ao término da indução, a cultura foi centrifugada a 5000rpm e 4°C, por 10 minutos, para a obtenção dos precipitados celulares. Ao final das centrifugações, o sobrenadante foi descartado, e as células precipitadas foram estocadas em freezer -20°C, para posterior lise celular, e análise dos extratos proteicos pelo sistema de SDS-PAGE.

3.12.3 Lise bacteriana para liberação das proteínas, utilizando sonicador

Os precipitados bacterianos (obtidos nos itens 3.12.1 e 3.12.2) foram ressuspensos em 5ml de Tampão de Lise (PBS 20mM, NaCl 5M, Lisozima (10mg/ml, Inibidor de protease, glicerol e água milliQ). Logo após, os precipitados foram incubados no gelo por 30 minutos e, então, deu-se início ao processo de lise celular por meio de sonicação. A amostra foi sonicada, aplicando-se 10 pulsos de 60 segundos cada, a 60W de potência, com

intervalos de 30 segundos, utilizando-se um aparelho Vibracell TM (Sonic & Materials Inc, Dunbury, CT, USA). Ao final, as suspensões celulares sonicadas foram centrifugadas por 30 minutos, a 10.500 rpm, a 4°C, em centrífuga Eppendorf (modelo 5810R). Os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos, e os precipitados, ressuspensos em 5ml do mesmo Tampão de Lise e em seguida, submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

3.12.4 Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As corridas eletroforéticas foram realizadas em gel de poliacrilamida 17,5% em condições desnaturantes, seguindo a técnica proposta por Laemmli (1970). As corridas foram realizadas no Sistema “Mini Protein Tetra Cell” (BioRad) a uma voltagem de 100V, em tampão de corrida Tris-Glicina 1X, diluído a partir de uma solução estoque Tris-Glicina 5X (15,125g Tris-base (125mM); 25ml SDS 10% (0,5%); 72g Glicina (960mM) e água destilada para completar o volume para 1000ml). Antes da corrida eletroforética, as amostras foram preparadas, adicionando-se aos extratos proteicos, tampão de amostra 4X (1,25ml Tris-HCl 1M, pH 6,8 (125mM); 4ml SDS10% (4%); 1ml glicerol (10%); 20mg azul de bromofenol (0,2%); 400µL β-mercaptoetanol (4%) e água destilada para completar o volume para 10ml). Após a aplicação do tampão de amostra, os extratos proteicos foram submetidos a uma temperatura de 100°C, por 5 minutos e, em seguida, aplicados no gel. Ao final da corrida eletroforética, os géis foram corados por azul de Coomassie 0,2% (Metanol 50%; ácido acético 10%; completar volume com água destilada para 100ml; Coomassie Blue R-250 0,2g - 0,2% p/v). Marcadores de baixo peso molecular (LMW Calibration – Amersham) foram utilizados nas corridas, sendo constituído pelas proteínas: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), albumina de ovo de galinha (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

3.12.5 Análise por Western blot

A transferência das bandas das proteínas obtidas no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), para a membrana de nitrocelulose (Hybond TM-C extra, Nitrocellulose, 45 Micron – Amersham Life Science), foi realizada no sistema “Mini Protein Tetra Cell” (BioRad). Para tanto, imediatamente após a corrida eletroforética, o gel foi incubado por 15 minutos em um recipiente contendo o tampão de transferência previamente gelado (Tris-HCl 25mM, pH 8,3; glicina 192mM e 20% de metanol), juntamente com todos os acessórios da transferência, incluindo a membrana, as esponjas e os papéis de filtro. A transferência foi realizada por 1 hora à 100V. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau (0,5g de Ponceau, 2,5ml de ácido acético para 250ml de água), com o intuito de verificar a eficiência da transferência das bandas do gel para a membrana. Após a visualização das bandas, a membrana foi lavada em água destilada para a retirada do Ponceau e, então, colocada na solução de bloqueio, contendo leite em pó desnatado 5% em tampão TBS (Tris-HCl 20mM, pH 7,5; NaCl 150mM; Tween 0,05%), por no mínimo 1 hora em geladeira. Após sair da solução de bloqueio, a membrana foi submetida a uma lavagem de 15 minutos, com tampão TBS (Tris-HCl 20mM, pH 7,5; NaCl 150mM; Tween 0,05%). Posteriormente, 15ml da solução de bloqueio, contendo 6µl (1:2500) do anticorpo primário anti-histidina produzido em camundongo (H1029- Sigma), foram adicionados sobre a membrana, e o recipiente contendo a membrana com a solução foi incubada por 1 hora, a temperatura ambiente, sob fraca agitação. Após esta incubação, foram efetuadas três lavagens de 10 minutos cada, com o tampão de lavagem (TBS) e, a seguir, a mesma foi incubada por 2 horas em 15ml da solução de bloqueio, contendo 5µl (1:3000) do anticorpo secundário, produzido em cabra, contra IgG de camundongo, conjugado com peroxidase (A4416- Sigma). Após esta incubação, a membrana passou por três lavagens de 10 minutos cada, e foi submetida ao procedimento de revelação. Para revelação com peroxidase, foram preparadas as soluções: Solução 1: 1ml de Tris/HCl 1M pH 8,5, 100ul luminol 250mM, 44ul “p-coumaric acid” 90mM, 8,85ml água destilada; solução2: 6ul água oxigenada 30%, 1ml Tris/HCl 1M pH 8,5, 9ml de água

destilada. Na sala escura, as duas soluções foram misturadas e colocadas sobre a membrana por aproximadamente 2 minutos, depois descartada. A membrana foi envolvida em um plástico e colocada dentro de um cassete de autoradiografia, no qual foi colocado um filme, cuja exposição inicial foi de 5 minutos e depois 30 minutos, que foram revelados em máquina reveladora (Kodak).

3.13 Purificação da proteína 092H06

Para a purificação da proteína 092H06 com tag de histidina foi utilizada a cromatografia por afinidade em coluna de níquel. Inicialmente a resina foi lavada com etanol antes da aplicação da proteína. Logo após, o etanol presente na resina foi totalmente lavado aplicando-se 8 ml de tampão de lavagem/equilíbrio, pH7.2 (50mM NaH₂PO₄ pH8.0, 500mM NaCl, 20mM imidazol). Em seguida, 10 ml da fração sobrenadante do lisado celular da linhagem ArcticExpressDE3RIL de *E. coli* contendo a proteína 092H06 com His-tag fusionada em sua porção N-terminal foi aplicada na coluna, coletando-se o material após a passagem pela coluna ("flow through"). Em seguida, a resina foi novamente lavada com 10 ml de tampão de lavagem/equilíbrio (lavagem). Posteriormente, foi utilizado o mesmo tampão de lavagem com um gradiente de imidazol de 50 a 300mM. O material eluído foi coletado em frações de 400ul e posteriormente submetido a uma corrida eletroforética para determinar em quais frações há uma maior quantidade de proteína e o nível de purificação atingido.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimentos anteriores demonstraram que o gene, correspondente ao clone 092H06 do TOBEST (daqui em diante denominado gene 092H06), é expresso especificamente em órgãos reprodutivos e preferencialmente em estigmas/estiletes. Para elucidar a função do gene 092H06, foram geradas plantas transgênicas de silenciamento (RNAi) e superexpressão (Brito, 2010). As três plantas T1 de silenciamento, com menor nível de transcritos de 092H06 (Ri9.2, Ri10.1 e Ri19.3), e três plantas T1 de superexpressão de 092H06 (Sex7, Sex22.1 e Sex33) foram escolhidas para estudos mais detalhados.

No presente trabalho, foram estudadas as plantas transgênicas T2, resultantes do cruzamento das seis plantas transgênicas primárias (T1) mencionadas acima, usadas como progenitor feminino, com pólen de plantas selvagens SR1. Sementes, oriundas destas plantas transgênicas T1, foram semeadas em meio com canamicina para seleção da presença do transgene. Quatro plântulas resistentes, descendentes de cada uma das plantas T1, foram transferidas para solo e levadas à casa de vegetação. Algumas das plantas da geração T2 foram perdidas por problemas externos ao experimento. Portanto, de cada planta transgênica T1, foi analisada uma única descendente da geração T2 (Ri9.2.4, Ri10.1.2, Ri19.3.2 e Sex7.4, Sex22.1.1, Sex33.2). Destas plantas T2, foram coletadas amostras para qRT-PCR e para microscopia óptica. É interessante observar que as plantas Ri9.2.4 e Ri19.3.2 possuíam flores com fenótipo evidente e distinto das flores das plantas selvagens SR1.

4.1 Análise da expressão gênica nas plantas transgênicas T2 de silenciamento (RNAi) e superexpressão de 092H06

Para verificar a estabilidade da expressão dos transgenes nas plantas transgênicas T2, de silenciamento (Ri) e superexpressão (Sex) de 092H06, foram realizados experimentos de qRT-PCR com “primers” específicos para o gene 092H06, em amostras de RNAs extraídos de estigmas/estiletes, ovários e estames de flores no estágio 11 do desenvolvimento floral. Nestes

experimentos, a expressão do gene GAPDH foi usada como referência. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 7.

Os resultados de expressão do gene 092H06 em estigmas/estiletos, nas plantas T2 de RNAi (Figura 7A), reproduziram a expressão obtida nas plantas transgênicas T1, demonstrando a estabilidade da expressão do transgene neste órgão. A estabilidade da expressão do transgene também foi encontrada nos ovários das plantas Ri9.2.4 e Ri10.1.2. Entretanto, ao contrário do menor nível de expressão de 092H06 em ovários da planta T1 Ri19.3, na geração T2 (Ri19.3.2) foi encontrado um nível de transcritos maior do que em SR1. No caso da expressão de 092H06 nos estames, os resultados obtidos para a geração T2 estão fortemente correlacionados com os níveis de transcritos detectados na geração T1, mostrando a estabilidade da expressão do transgene.

No caso das plantas transgênicas de superexpressão, na geração T1 os níveis de transcritos de 092H06 nos estigmas/estiletos e ovários estavam reduzidos em relação a SR1 (controle), exceto no ovário da planta Sex33 (Brito, 2010). Foi observada superexpressão, para as três plantas transgênicas T1, apenas nos estames. No presente trabalho, foi feita a análise do nível de transcritos nas plantas de superexpressão da geração T2 (Figura 7B). Os resultados mostraram níveis elevados de transcritos nos três órgãos analisados, em todas as plantas transgênicas T2 (Sex7.4, Sex22.1.1, Sex33.2). Os resultados divergentes entre as plantas T1 e T2 podem ter ocorrido por alguns motivos: 1) a substituição do gene de referência (β -actina em T1 e GAPDH em T2); e 2) ativação do transgene, provavelmente por desmetilação do DNA, durante a passagem pela fase de semente. Nas análises realizadas por Brito (2010), com as plantas transgênicas T1, o gene de referência foi β -actina. Entretanto, devido à hipótese de 092H06 afetar a expansão celular, a troca de gene de referência era recomendada e, portanto, no presente trabalho foi usado o GAPDH, um gene de expressão bastante estável nos diferentes órgãos de *N. tabacum*, conforme previamente determinado em nosso laboratório. Níveis elevados de transcritos eram esperados para as plantas de superexpressão e isto foi o observado nas plantas transgênicas T2.

Figura 7: Padrão de expressão do gene 092H06 em estigmas/estiletos, ovários e estames, de flores no estágio 11 do desenvolvimento, de plantas transgênicas T2 de silenciamento (Ri) **(A)** e superexpressão (Sex) **(B)**, comparado com o padrão em SR1. O gráfico mostra a quantificação relativa normalizada em relação à expressão do gene de referência GAPDH.

A expressão de transgenes pode ser instável de uma geração para a seguinte, o que frequentemente é associado ao silenciamento gênico, como metilação do DNA do transgene (Fagard & Vaucheret 2000; Eamens et al.,

2008). A instabilidade também pode ocorrer, mais raramente, por perda de genes. A estabilidade da expressão do transgene ao longo de gerações é fundamental para permitir o uso de transgênicos na agricultura, assim como para os estudos de genômica funcional. No caso das plantas de silenciamento por RNAi e de superexpressão, a instabilidade dos transgenes resultaria na expressão do gene 092H06, nos órgãos reprodutivos, em níveis semelhantes aos encontrados para a planta controle SR1. Entretanto, os níveis de transcritos de 092H06 foram bem distintos dos níveis encontrados para o controle.

É importante observar que, em algumas amostras das plantas de RNAi (ovário da planta Ri19.3.2 e estame das plantas de silenciamento Ri9.2.4, Ri10.1.2 e Ri19.3.2.), os níveis de transcritos de 092H06 foram mais elevados do que nas plantas SR1 controle (Figura 7A). Este resultado, apesar de inesperado, já havia sido observado para as amostras de estames, nas plantas transgênicas T1. Este resultado pode ser decorrente de um artefato experimental, no qual o excesso de transcritos de 092H06, produzidos na forma de grampo ("hairpin") a partir do promotor forte e constitutivo 35S, nas plantas de RNAi, não é totalmente degradado na via Dicer-RISC ("RNA-induced silencing complex"). Estes transcritos serviriam como molde para os "primers" usados no qRT-PCR, gerando um resultado que se assemelha à superexpressão. Este tipo de artefato não é exclusivo das plantas de silenciamento de 092H06 e já foi observado para outros genes em nosso laboratório. Para ultrapassar algumas das dificuldades aqui relatadas, o ideal seria analisar a quantidade da proteína 092H06 nos órgãos reprodutivos das plantas transgênicas, usando anticorpo anti-092H06.

No conjunto, foi possível verificar a diminuição no nível dos transcritos de 092H06 na maioria das amostras das plantas de RNAi, assim como o aumento no nível dos transcritos de 092H06 nas plantas de superexpressão. Estes resultados demonstram que as plantas da geração T2, de RNAi e de superexpressão de 092H06, podem ser usadas em análises subsequentes de expressão gênica e microscopia.

4.2 Análise das expansinas expressas no estigma/estilete de *N. tabacum*

Expansinas são proteínas extracelulares que aumentam a extensibilidade da parede celular nas células vegetais e que podem ser divididas em 2 famílias de proteínas: as α -expansinas e as β -expansinas (Lee et al., 2001). Acredita-se que estejam envolvidas com a regulação de vários processos, como a expansão celular, morfogênese, amolecimento de frutos e crescimento do tubo polínico através do estigma/estilete (Lee et al., 2001). Devido à hipótese de 092H06 afetar a expansão celular, inicialmente foi feita uma análise no banco de dados do TOBEST (Quiapim et al., 2009), para identificar as expansinas que são expressas nos estigmas/estiletos de *N. tabacum*.

4.2.1 Identificação de clones para expansinas no banco do TOBEST

Uma análise no banco de dados de ESTs do TOBEST permitiu a identificação de pelo menos 5 clones de cDNA para expansinas: TOBESTS020B09, TOBESTS050D06, TOBESTC021H04, TOBESTC054E01 e TOBESTC062A05. Estes clones foram recuperados da biblioteca e completamente sequenciados.

De posse das sequências, foram realizadas buscas no NCBI e TAIR através da ferramenta TBlastX. Após as buscas e alinhamento das sequências, observou-se que as sequências recuperadas do TOBEST para α -expansina (TOBESTS050D06 e TOBESTC054E01) e expansina putativa (TOBESTC021H04) apresentavam regiões conservadas entre si, porém correspondiam a três α -expansinas diferentes, tanto no NCBI quanto em *Arabidopsis* (Tabela 2). As duas sequências para β -expansina apresentaram alta similaridade entre si, ambas correspondendo a PPAL, uma β -expansina específica do pistilo de *N. tabacum* (Pezzotti et al., 2002) e ao gene AtEXPB4 de *Arabidopsis* (Tabela 2). Desta forma, foram desenhados um par de “primers” para α -expansina TOBESTS050D06 (AtEXPA11), em uma região de baixa similaridade entre as três α -expansinas, e um par de “primers” para a β -expansina PPAL.

Tabela 2: resultados do Tblastx nos bancos de dados NCBI e TAIR

Clone TOBEST	TBlastx NCBI	TBlastX TAIR
TOBESTS050D06	AF049350.1 <i>Nicotiana tabacum</i> alpha-expansin precursor (Nt-EXPA1)	At1G20190.1 AtEXPA11
TOBESTC054E01	AF049354.1 <i>Nicotiana tabacum</i> alpha-expansin precursor (Nt-EXPA5)	At1G69530.5 AtEXPA1
TOBESTC021H04	AAM12782.1 putative expansin <i>Capsicum annuum</i>	At2G03090.1 AtEXPA15
TOBESTC062A05	AF333386.1 <i>Nicotiana tabacum</i> beta-expansin-like protein (PPAL)	At2G45110.1 AtEXPB4
TOBESTS020B09	AF333386.1 <i>Nicotiana tabacum</i> beta-expansin-like protein (PPAL)	At2G45110.1 AtEXPB4

4.2.2 Análise da expressão da α -expansina nas plantas transgênicas de 092H06

Devido à hipótese de 092H06 afetar a expansão celular, foi feita uma análise da expressão de α -expansina nos órgãos reprodutivos das plantas transgênicas de silenciamento e superexpressão de 092H06. Foi possível verificar um aumento no nível de transcritos de α -expansina nas amostras de estigmas/estiletes e ovários da planta Ri9.2.4 e de estames da planta Ri19.3.2. Nas plantas transgênicas da geração T1, o fenótipo de células expandidas foi bem evidente nos estigmas/estiletes e ovários das plantas Ri9.2 e Ri19.3. A expansão observada nos estigmas/estiletes e ovários da planta Ri9.2, parental de Ri9.2.4, pode estar associada ao aumento no nível de transcritos de α -expansina. Entretanto, o mesmo não pode ser dito da expansão nos estigmas/estiletes e ovários da planta Ri19.3, já que não ocorreu aumento no nível de transcritos de α -expansina nestas amostras de Ri19.3.2 (Figura 8A).

Adicionalmente, também foi verificado um aumento no nível de transcritos de α -expansina nos estigmas/estiletes da planta Sex22.1.1, nos

ovários de Sex7.4, Sex22.1.1 e Sex33.2 e nos estames das plantas Sex22.1.1 e Sex33.2 (Figura 8B).

Figura 8: Análise por qRT-PCR da expressão do gene para α -expansina em estigmas/estiletos, ovários e estames de plantas transgênicas de silenciamento (Ri) **(A)** e superexpressão (Sex) **(B)**, comparada com a expressão nos mesmos órgãos de plantas selvagens SR1. Estigmas/estiletos, ovários e estames foram coletados no estágio 11 do desenvolvimento floral. Os gráficos mostram a quantificação relativa, normalizada em relação à expressão do gene de referência GAPDH.

4.2.3 Análise da expressão da β -expansina nas plantas transgênicas de 092H06

Assim como descrito acima, devido à hipótese de 092H06 afetar a expansão celular, foi feita a análise da expressão de β -expansina nos órgãos reprodutivos das plantas transgênicas de silenciamento e superexpressão de 092H06. Conforme o esperado (Pezzotti et al., 2002), esta β -expansina (PPAL) não é expressa em estames.

No caso da β -expansina, foi possível verificar um aumento no nível de transcritos para as amostras de estigmas/estiletes e ovários da planta Ri9.2.4 e ovários de Ri10.1.2. Nota-se que as mesmas amostras que tiveram aumento no nível de transcritos de α -expansina, também tiveram aumento no nível de transcritos de β -expansina (Figura 9A).

Nas plantas de superexpressão, foi verificado um aumento no nível de transcritos de β -expansina em estigmas/estiletes da planta Sex33.2 e em ovários de Sex22.1.1. Por outro lado, observa-se uma diminuição evidente no nível de transcritos da β -expansina em estigmas/estiletes das plantas Sex7.4 e Sex22.1.1, assim como nos ovários de Sex7.4 e Sex33.2, nestas últimas amostras chegando a níveis indetectáveis (Figura 9B).

Figura 9: Análise por qRT-PCR da expressão do gene para β -expansina em estigmas/estiletes, ovário e estames de plantas transgênicas de silenciamento (Ri) **(A)** e superexpressão (Sex) **(B)**, comparada com a expressão nos mesmos órgãos de plantas selvagem SR1. Estigmas/estiletes, ovários e estames foram coletados no estágio 11 do desenvolvimento floral. Os gráficos mostram a quantificação relativa, normalizada em relação à expressão do gene de referência GAPDH.

Os resultados obtidos para a expressão da α -expansina e da β -expansina nas plantas transgênicas da geração T2 não permitem concluir algo sobre o seu papel na expansão celular observada nas plantas Ri9.2 e Ri19.3,

ou sobre uma correlação entre a expressão de 092H06 e expansinas. As expansinas pertencem a uma grande família multigênica. Em *Arabidopsis*, existem 26 genes para α -expansinas e 6 genes para β -expansinas. Em *Nicotiana tabacum*, cujo genoma ainda não está totalmente sequenciado, não é possível saber o número total de genes para as α -expansinas e β -expansinas. Sem este conhecimento, não é possível afirmar se os “primers” usados nestes experimentos estavam amplificando simultaneamente vários genes ou não. É possível que, em cada órgão da planta, um membro diferente (ou alguns membros) da família das expansinas seja expresso. Neste caso, diferentes pares de “primers” deveriam ser selecionados para as análises de expressão.

4.2.4 Análise da expressão do gene para actina

Actina é a principal proteína do citoesqueleto e tem um papel fundamental no desenvolvimento de plantas, regulando processos tais como a divisão e expansão celular (Barrero et al., 2003). Os resultados obtidos na análise de expressão do gene para actina nas plantas de silenciamento e superexpressão podem ser visualizados na figura 10. Na maioria das amostras analisadas, não houve uma alteração considerável do nível de transcritos de actina nas plantas de silenciamento por RNAi. Entretanto, níveis elevados de transcritos de actina foram verificados em ovários e estames da planta Ri10.1.2 (Figura 10A).

No caso das plantas de superexpressão (figura 10B), os níveis de transcritos de actina foram consideravelmente alterados nas diferentes amostras analisadas, porém sem uniformidade. Enquanto os níveis de actina estavam aumentados em todas as amostras da planta Sex7.4 e nas amostras de vários e estames da planta Sex22.1.1, os níveis de transcritos para actina estavam diminuídos em estigmas/estiletos da planta Sex22.1.1 e em todas as amostras da planta Sex33.2.

Figura 10: Análise por qRT-PCR da expressão do gene para actina em estigmas/estiletes, ovário e estames de plantas transgênicas de silenciamento (Ri) **(A)** e superexpressão (Sex) **(B)**, comparada com a expressão nos mesmos órgãos de plantas selvagens SR1. Estigmas/estiletes, ovários e estames foram coletados no estágio 11 do desenvolvimento floral. Os gráficos mostram a quantificação relativa, normalizada em relação à expressão do gene de referência GAPDH

4.2.5 Análise da expressão do gene CycB1.2

O gene CycB1.2 é considerado um marcador estágio-específico da mitose (Weingartner et al., 2003) e sua expressão foi analisada neste trabalho na tentativa de investigar se a divisão celular foi alterada em consequência do silenciamento ou superexpressão do gene 092H06. Foi possível verificar que na maioria das amostras, tanto das plantas de silenciamento por RNAi (figura 11A) como nas plantas de superexpressão (figura 11B), ocorreu um acentuado aumento no nível de transcritos de CycB1.2. A redução no nível de transcritos de CycB1.2 ocorreu apenas em estigmas/estiletos das plantas Ri9.2.4 e Ri19.3.2 e, também, da planta Sex33.2.

Figura 11: Análise por qRT-PCR da expressão do gene para CyCB1.2 em estigmas/estiletes, ovário e estames de plantas transgênicas de silenciamento (Ri) **(A)** e superexpressão (Sex) **(B)**, comparada com a expressão nos mesmos órgãos de plantas selvagens SR1. Estigmas/estiletes, ovários e estames foram coletados no estágio 11 do desenvolvimento floral. Os gráficos mostram a quantificação relativa, normalizada em relação à expressão do gene de referência GAPDH.

Os resultados obtidos para a expressão do gene CycB1.2 não permitiram estabelecer uma correlação com o silenciamento e/ou a superexpressão de 092H06.

4.3 Análise dos órgãos reprodutivos das plantas de silenciamento e superexpressão de 092H06 por microscopia óptica

Assim como as plantas transgênicas de silenciamento Ri9.2 e Ri19.3, da geração T1, suas descendentes Ri9.2.4 e Ri19.3.2 apresentaram fenótipo nitidamente distinto da planta selvagem SR1, com aumento de tamanhos dos órgãos reprodutivos feminino e masculino em nível macroscópico. Para estudar o fenótipo das plantas transgênicas e as alterações de tamanho dos órgãos reprodutivos, fez-se necessária uma análise em nível microscópico para verificar possíveis alterações no número e/ou tamanho das células nestas estruturas. Com esta finalidade, estigmas/estiletos e ovários de plantas selvagens (SR1), de silenciamento (Ri) e de superexpressão (Sex), no estágio 10 do desenvolvimento floral, foram fixados, cortados e tratados para confecção de lâminas que foram analisadas por microscopia óptica.

A Figura 12 mostra a comparação entre estigmas/estiletos das plantas transgênicas de silenciamento e de superexpressão com a planta selvagem SR1. A análise destas imagens sugerem diferenças entre os tecidos correspondentes nas plantas transgênicas e selvagem.

Figura 12: Microscopia óptica de cortes longitudinais de estigma/estilete (estádio 10), corados com azul de toluidina 0,05%. A primeira linha mostra cortes das plantas de silenciamento, a segunda linha mostra o corte da planta selvagem SR1 e a terceira linha mostra cortes das plantas de superexpressão. Escala = 20µm. (aumento de 10x)

Para uma análise mais precisa, foram realizadas medições da espessura, contagem do número de células e do número de camadas de diferentes regiões do estigma/estilete (tecido transmissor, zona secretória e parênquima) e do ovário (região cortical) (Tabela 3). Os dados foram submetidos ao teste estatístico Tukey, através do programa SigmaStat.

Foi possível verificar que as plantas de silenciamento Ri9.2.4, Ri10.1.2 e Ri19.3.2 apresentaram diferenças significativas quanto ao número de camadas e ao número de células na zona secretória do estigma e, também, quanto ao número de células do parênquima, possuindo valores médios menores que os observados no controle SR1. Para a espessura do tecido transmissor e

número de camadas do parênquima, estas também apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao controle, possuindo médias maiores que as de SR1. As plantas Ri9.2.4 e Ri19.3.2 também apresentaram diferenças significativas quanto a espessura do parênquima e média da área celular das células parenquimáticas, sendo as médias maiores que as de SR1. A planta Ri10.1.2 só apresentou diferença significativa para a média da área celular na zona secretória, quando comparada a SR1. Embora algumas medidas aferidas não apresentem diferenças significativas, foi possível verificar que todas as plantas de silenciamento apresentaram aumento do volume celular quando comparadas a SR1, para todas as regiões do estigma/estilete (Figuras 13 e 14, primeira linha).

Tabela 3: Medições das estruturas presentes nos estigmas/estiletes das plantas transgênicas de silenciamento (Ri) e superexpressão (Sex) comparadas com a planta selvagem (SR1).

Estruturas	Plantas						
	Ri 9.2.4	Ri 10.1.2	Ri 19.3.2	SR1	Sex 7.4	Sex 22.1.1	Sex 33.2
Espessura zona secretória (µm)	238,87 ±11,53	293,96 ±15,15	275,11 ±9,46	218,09 ±60,49	218,35 ±21,56	229,95 ±22,6	211,68 ±17,13
Nº camadas zona secretória	11,33* ±2,30	14,33* ±0,58	13* ±1,73	16,33 ±0,58	12* ±0,0	13,66* ±1,53	15,33 ±0,58
Nº células zona secretória(200x200µm)	26* ±2,65	34,33* ±3,79	27,33* ±2,52	49 ±1,73	36,68* ±3,06	45 ±2,0	37,68* ±2,08
Média da área celular da Zona Secretória (µm)	898,37* ±888,63	830,07* ±208,42	811,53* ±224,60	482,22 ±138,70	758,09* ±177,80	662,29* ±172,86	756,9* ± 147,85
Espessura tecido transmissor (µm)	337,53* ±18,27	271,42* ±12,5	293,47* ±23,43	221,82 ±7,24	271,28* ±8,42	228,81 ±26,27	192 ±31,15
Espessura Parênquima(µm)	451,96* ±15,16	323,58* ±5,83	427,79 ±69,85	369,91 ±26,51	378,34 ±63,57	332,58 ±66,20	360,66 ±59,65
Nº camadas parênquima	12,67* ±0,58	14,33* ±0,58	14,67* ±0,58	16,33 ±0,58	15 ±1,0	15 ±1,0	16 ±1,0
Nº células parênquima (200x200 µm)	24,33* ±1,53	22,33* ±4,62	19,67* ±2,52	34,33 ±2,08	23* ±1,0	25,67* ±1,53	25,67* ±0,58
Média da área celular do PAR (µm)	1185,04 ±388,87	917,48* ±296,61	1151,65 ±364,60	1070,34 ±278,37	1081,03 ±273,13	1299,06* ± 365,46	1012,62 ± 272,86

* indica diferença significativa quando comparado a SR1, $p \leq 0,05$ (Teste de Tukey). ZS- Zona secretória, TT- Tecido transmissor, PAR- Parênquima. As linhas brancas correspondem ao local onde as medições foram realizadas e as camadas celulares contadas; os quadrados brancos correspondem aos locais onde células foram contadas e tiveram suas áreas medidas.

Figura 13: Microscopia óptica de cortes longitudinais de estigma/estilete (estádio 10), corados com azul de toluidina 0.05%. Estes cortes mostram destaque na Zona secretória. A primeira linha mostra cortes das plantas de silenciamento (Ri), a segunda linha mostra corte da planta selvagem (SR1) e a terceira linha mostra cortes das plantas de superexpressão. Escala = 20 μ m. (aumento de 40x).

Figura 14: Microscopia óptica de cortes longitudinais de estigma/estilete (estádio 10), corados com azul de toluidina 0,05%. Estes cortes mostram destaque no Parênquima. A primeira linha mostra cortes das plantas de silenciamento (Ri), a segunda linha mostra corte da planta selvagem SR1 e a terceira linha mostra cortes das plantas de superexpressão (Sex). Escala = 20μm. (aumento de 40x)

Para as plantas de superexpressão, após a aplicação do teste estatístico, foi possível observar que as plantas Sex7.4, Sex22.1.1 e Sex33.2 apresentaram diferenças significativas para o número de camadas da zona secretória e número de células do parênquima, onde as médias são menores que as observadas em SR1. Estas plantas apresentaram diferenças significativas também para a média da área celular na zona secretória, onde as médias observadas foram maiores do que em SR1.

As plantas Sex7.4 e Sex33.2 apresentaram diferenças significativas para o número de células na zona secretória, cujas médias foram menores quando

comparadas a SR1. Adicionalmente, as plantas Sex7.4 e Sex22.1.1 apresentaram diferenças significativas respectivamente a espessura do tecido transmissor e média da área celular no parênquima, onde as médias ficaram acima da obtida para SR1.

A Tabela 4 apresenta as medições realizadas no ovário e os resultados do teste estatístico. Verifica-se que as plantas de silenciamento Ri9.2.4, Ri10.1.2 e Ri19.3.4 apresentam diferenças significativas para as médias da área celular, espessura e número de células da camada cortical, quando comparadas com as médias obtidas para SR1. Ocorre um aumento na média da área celular e na espessura do ovário, enquanto ocorre uma diminuição no número de células corticais. É possível observar (Figura 15, linha inferior) que as células das plantas de superexpressão também são maiores que as células de SR1.

Um aumento do número de amostras medidas auxiliaria nas análises estatísticas, porém isto demandaria muito mais tempo do que o disponível para a elaboração da Dissertação de Mestrado. No conjunto, foi possível verificar que estigmas/estiletos e ovários das plantas de silenciamento e de superexpressão são significativamente maiores que SR1, porém os órgãos das plantas de superexpressão são menores que os das plantas de silenciamento. Estes resultados sugerem que alterações nos níveis normais da proteína 092H06, para mais ou para menos, resultam em aumento do tamanho final do órgão reprodutivo feminino das plantas.

Tabela 4: Medições das estruturas presentes no ovário das plantas transgênicas de silenciamento (Ri) e superexpressão (Sex), comparadas com a planta selvagem (SR1).

Estruturas	Ri 9.2.4	Ri10.1.2	Ri 19.3.4	SR1	Sex 7.4	Sex 22.1.1	Sex 33.2
Espessura(μm)	127,38* ±4,71	116,24* ±3,09	132,48* ±7,18	96,01 ±9,76	105,02 ±63	92,89 ±8,46	110,77 ±12,49
Nº de Camadas	8	8	8	8	8	8	8
Nº de céls(100 x100 μm)	10,33* ±0,577	13,33* ±1,53	14,33* ±1,53	41,67 ±4,73	18,33* ±1,53	25* ±6,25	24,33* ±6,43
Média da área celular (μm)	440,30* ±130,13	259,74* ±57,86	453,21* ±145,91	322,33 ±87,64	311,27 ±86,48	340,15 ± 87,73	347,73 ± 99,0

* indica diferença significativa quando comparado a SR1, $p \leq 0,05$ (Teste de Tukey). A linha branca corresponde ao local onde as medições foram realizadas e as camadas celulares contadas; o quadrado branco corresponde ao local onde as células foram contadas e tiveram suas áreas medidas.

Figura 15: Microscopia óptica de cortes transversais do ovário (estádio 10), corados com azul de toluidina 0,05%. Estes cortes mostram em destaque a região cortical do ovário. A linha superior mostra cortes das plantas de silenciamento (Ri), a linha do meio mostra corte da planta selvagem SR1 e a linha inferior mostra cortes das plantas superexpressão (Sex). Escala = 20μm. (aumento de 40x).

Foi observado que para a medida da espessura, do número de células e medida da área celular, todas as plantas de silenciamento apresentam diferenças significativas quando comparadas a SR1, enquanto as plantas de superexpressão apresentam diferenças significativas apenas quanto ao número de células quando comparadas a SR1.

Embora algumas diferenças observadas na microscopia entre as plantas transgênicas de silenciamento e superexpressão, quando comparadas com a planta selvagem SR1, não sejam estatisticamente significativas, foram observadas diferenças no número de camadas da zona secretória e no parênquima das plantas de silenciamento Ri9.2.4 e Ri19.3.2, que

apresentaram estigmas/estiletes e ovários maiores quando observados a olho nu. Através da microscopia, foi observada uma tendência ao aumento no volume celular das células das plantas transgênicas de silenciamento e superexpressão, embora nas plantas de superexpressão não ocorra aumento visível das estruturas reprodutivas. Tendo em vista que experimentos realizados anteriormente (Brito, 2010) sugeriram que o clone 092H06 seja um inibidor da expansão celular, ao observar aumento do volume celular em plantas de silenciamento e também de superexpressão, é possível propor que este aumento seja resultado de uma combinação entre expansão celular e um fenômeno denominado compensação.

Sabe-se que diferentes mecanismos atuam na regulação da expansão celular e que expansão celular e o fenômeno da compensação estão intimamente relacionados, mas pouco se sabe sobre os mecanismos responsáveis pela compensação. Na expansão celular, atuam a regulação hormonal e fatores de transcrição (Busov et al., 2008). Na regulação hormonal, destacam-se a auxina e os brassinosteróides (Mockaitis & Estelle, 2004), que regulam a expressão de genes relacionados à expansão celular. Há ainda, genes que regulam a síntese, afrouxamento e deposição de componentes da parede celular envolvidos neste processo (Smith & Oppenheimer, 2005). Recentemente, uma nova classe de proteínas, a dos peptídeos sinalizadores, mostrou-se envolvida com a regulação do processo de expansão celular. A compensação foi descrita em folhas, como um processo decorrente da inibição da proliferação celular, no qual o número de células no órgão diminuiu significativamente, porém o volume de cada célula aumentou, levando a diminuição na área foliar total, porém menor do que o esperado com a diminuição no número de células (Tsukaya & Beemster, 2006; Krizek, 2009). Recentemente, Kawade et al. (2010) demonstraram que a comunicação célula a célula é a chave do mecanismo por trás da compensação, porém a coordenação dos processos de proliferação celular e expansão, ainda não está elucidada (Horiguchi & Tsukaya, 2011).

4.4 Análises de endorreduplicação nas das plantas de silenciamento e superexpressão de 092H06

Sabe-se que a endorreduplicação, processo no qual o material genético é duplicado sem a ocorrência da divisão celular, pode levar a uma expansão celular (Inzé & DeVeylder, 2006). No intuito de verificar se o aumento observado nos estigmas/estiletes das plantas de RNAi poderia ser ocasionado por endorreduplicação, foram extraídos núcleos dos pistilos e das folhas de plantas selvagens (SR1), de silenciamento por RNAi (Ri) e superexpressão (Sex) para determinação da quantidade de material genético nas plantas por citometria de fluxo. Os resultados demonstraram que as plantas transgênicas de silenciamento e de superexpressão apresentam a mesma quantidade de DNA que as plantas selvagens SR1 (Figura 16). Este resultado demonstra que a endorreduplicação não está ocorrendo nas plantas transgênicas, descartando a possibilidade de este ser o fator responsável pelo aumento dos pistilos e/ou expansão celular das plantas transgênicas.

Figura 16: Análise da quantidade de DNA, avaliada por citometria de fluxo, nos núcleos extraídos de estigmas/estiletes (A e B) e folhas (C) de plantas transgênicas de silenciamento (Ri), superexpressão (Sex) e selvagem (SR1). As amostras foram marcadas com iodeto de propídio (P4170 – Sigma). **A)** Linha vermelha = SR1, linha rosa = Ri19.3.2, linha Verde limão = Ri9.2.4, linha verde água = Ri10.1.2. **B)** Linha vermelha = SR1, Linha rosa = Ri9.2.4, linha verde limão = Sex7.4, linha verde água = Sex22.1.1, linha marrom = Sex33.2 **C)** Linha vermelha = SR1, linha rosa= Ri9.2.4, linha verde limão= Sex7.4, linha verde água = Sex22.1.1, linha marrom = Sex33.2, linha laranja= Ri 19.3.

4.5 Busca de parceiros de interação da proteína 092H06

A busca por parceiros de interação da proteína codificada pelo clone 092H06 foi realizada na tentativa de compreender melhor a função desempenhada por este gene e vislumbrar hipóteses para explicar a expansão celular observada nas plantas transgênicas. Essa busca foi realizada por meio do “screening” de uma biblioteca de cDNA de estigmas/estiletes de *N. tabacum*, construída em vetor do sistema do duplo-híbrido de levedura.

Antes de dar início à busca por parceiros de interação, foi necessário investigar se a proteína codificada pelo clone 092H06, sozinha, era capaz de auto-ativar o sistema, isto é, ativar a transcrição dos genes repórteres *HIS3*, *ADE2* e *lacZ*. Para isso, foram preparadas leveduras competentes contendo a construção pDEST32+092H06, que foram posteriormente transformadas com o vetor pDEST22 vazio, contendo o domínio AD. As células transformadas foram plaqueadas em meio SC sem leucina e sem triptofano (SC-Leu-Trp) para seleção das colônias que continham os dois vetores. Posteriormente, uma das colônias foi selecionada, crescida em meio líquido por 48 horas e plaqueada em meio SC-Leu-Trp-His (sem histidina), para verificar se a proteína codificada pelo clone 092H06, juntamente com o domínio AD, ativava a transcrição do gene *HIS3*. Caso houvesse crescimento de colônias, ficaria demonstrado que a proteína codificada pelo clone 092H06, juntamente com o domínio AD, sem proteínas parceiras, era capaz de ativar o sistema. Isso poderia acontecer caso a proteína 092H06, fusionada ao domínio BD do fator de transcrição GAL4, na presença do domínio AD, fosse capaz de ativar a transcrição do gene repórter *HIS3*. Felizmente, não foi verificado o crescimento de nenhuma colônia, portanto, a proteína codificada pelo clone 092H06 não é capaz de auto-ativar o sistema e, então, o “screening” da biblioteca de duplo-híbrido podia ser realizado.

O “screening” da biblioteca de duplo-híbrido foi realizado utilizando-se leveduras competentes previamente preparadas contendo a construção pDEST32-092H06 (Isca). As leveduras foram transformadas com alíquotas da biblioteca e plaqueadas em meio SC-Leu-Trp-His, para seleção dos clones positivos para o gene repórter *HIS3*. Após o período de incubação, foram obtidos 240 clones que cresceram em meio sem adição de histidina. Todas as

colônias foram transferidas, uma a uma, para poços de placas de cultura de 96 poços (totalizando 3 três placas para os 240 clones), contendo meio líquido SC-Leu-Trp. Foram feitas réplicas das placas de 96 poços em duas placas de Petri: 1) SC-Leu-Trp, apenas para seleção dos vetores inseridos nas leveduras; e 2) SC-Leu-Trp-His, para seleção da presença dos vetores e para a ativação do gene repórter *HIS3*. Nas placas da seleção 1, houve crescimento de todos os 240 clones, enquanto nas placas da seleção 2, houve crescimento de apenas 196 clones. A Figura 17 ilustra uma das placas de Petri obtidas para seleção do gene repórter *HIS3*.

Figura 17: Crescimento dos clones candidatos à interação com a proteína 092H06, em meio SC-Leu-Trp-His, de seleção para o gene repórter *HIS3*. As colônias numeradas na última linha correspondem à: **1)** controle positivo de interação forte (Krev1-RalGDS-wt); **2)** controle positivo de interação fraca (Krev1-RalGDS-m1); **3)** controle de interação negativa (Krev1-RalGDS-m2).

Foram selecionados, aleatoriamente, 88 clones com crescimento nestas placas, para os experimentos de confirmação da interação com 092H06. Para isso, o DNA plasmidial de cada clone de levedura foi extraído e introduzido em bactérias DH10B, por eletroporação. Cada transformação foi plaqueada em meio LB com ampicilina e, desta forma, apenas as bactérias que receberam o

vetor pDEST22 contendo a presa foram selecionadas. De cada transformação de bactérias, correspondendo a um único clone de levedura, foram selecionadas seis colônias para extração de DNA plasmidial (ou um número menor, para transformações que produziram menos de 6 colônias). Isto é necessário porque, durante a transformação da levedura, com a biblioteca de duplo-híbrido, mais de um plasmídeo pDEST22-presas, contendo diferentes cDNAs, pode ter sido introduzido por célula. Portanto, essa estratégia permite identificar os diferentes plasmídeos que possam ter entrado durante a transformação de leveduras. Posteriormente, é possível identificar qual plasmídeo contém a presa que, juntamente com o clone 092H06, ativou o sistema.

O DNA plasmidial de cada uma das seis colônias foi checado por digestão enzimática, na qual foram utilizadas as enzimas SmaI e XhoI. Essas enzimas cortam o vetor pDEST22, já recombinado com um cDNA, em três regiões, formando uma banda de 5250pb, outra de 1493pb e as demais bandas equivalem à sequência do cDNA recombinado ao vetor. O resultado de uma eletroforese em gel de agarose, ilustrando algumas dessas digestões, pode ser visualizado na Figura 18.

Figura 18: Análise do padrão de restrição do DNA plasmidial extraído de 18 colônias de bactérias, correspondendo a 5 colônias de levedura, candidatas a interação com o clone 092H06. As canaletas 1 e 2 representam DNAs de duas colônias de bactéria, provenientes de um único clone de levedura, selecionado na placa SC-Leu-Trp-His (teste de *HIS3*). As canaletas 3 e 4 representam DNAs de duas colônias de bactérias, equivalendo a um segundo clone de levedura. As canaletas 5, 6 e 7 representam um terceiro clone de levedura. As canaletas 8 a 13 representam um quarto clone de levedura e as canaletas 14 a 18 representam um quinto clone de levedura. As setas vermelhas correspondem, de cima para baixo, às bandas de 5250pb e 1439pb. As demais bandas observadas equivalem ao cDNA clonado no vetor pDEST22 (presas). **M.** Marcador de tamanho molecular 1 kb Plus DNA Ladder. Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.

Na Figura 18 é possível observar que o primeiro (canaletas 1 e 2), o segundo (canaletas 2 e 3) e o quinto (canaletas 14 e 15) clones de levedura apresentaram padrões diferentes de digestão entre suas colônias. Esses são casos em que mais de um plasmídeo distinto da biblioteca foi inserido durante a transformação da levedura. Nestes casos, para esse clone de levedura, não se sabe se a presa que está interagindo com a isca equivale ao cDNA apresentado na canaleta 1 ou 2, para primeiro clone; canaleta 2 ou 3 para o

segundo clone; canaleta 14 ou 15 para o quinto clone. Para tanto, o DNA de uma colônia de cada padrão foi selecionado para sequenciamento (colônias 1, 2, 3, 4, 7, 14 e 15 foram escolhidas) e re-teste de interação no sistema de duplo-híbrido. No caso dos outros clones, que apresentaram o mesmo padrão em todas as colônias de bactérias, o DNA de uma das seis colônias foi selecionado para sequenciamento e re-teste. As sequências obtidas foram analisadas pela ferramenta TBlastX (NCBI), para busca de sequências similares nos bancos de dados.

Cada um dos DNAs sequenciados foi utilizado para transformar leveduras competentes, já contendo a construção pDEST32+092H06, para identificar qual presa está interagindo com a isca (re-teste). Para tanto, as transformações foram plaqueadas em meio SC-Leu-Trp-His, obtendo-se colônias isoladas para a presa positiva. Após determinação das presas, foi feito teste de auto-ativação para as mesmas, para verificar se elas não estavam auto-ativando o sistema. Para os 88 clones de levedura testados, foram obtidas 4 presas positivas distintas para o teste de ativação do gene repórter *HIS3*, e que não auto-ativaram o sistema. As presas identificadas foram: 1) BCCP – “biotin/lipoyl attachment domain-containing protein” (At3g56130), pertencente a um grupo de proteínas ligadas a via de metabolização do carbono e biossíntese de ácidos graxos; 2) “unknown protein” (At5g64180), ainda não caracterizada; 3) *Nicotiana tabacum* “trypsin proteinase inhibitor precursor” (GenBank: DQ158189.1); e 4) RING/U-box (At1g45180). A Figura 19 mostra as colônias de levedura referentes às interações obtidas.

Figura 19: Ensaio de duplo-híbrido (re-teste). O gene repórter *HIS3* foi utilizado para confirmação da interação isca-presa (crescimento em meio SC-Leu-Trp-His). **1)** representa colônia de levedura contendo o controle de interação fraco. **2-** BCCP- “biotin/lipoyl attachment domain-containing protein”, **3-** “unknown protein”, **4-** *Nicotiana tabacum* “trypsin proteinase inhibitor precursor” e **5-** RING/U-box.

4.6 Produção da proteína 092H06 recombinante

Dada à importância da obtenção da proteína nativa codificada pelo gene 092H06 para produção de anticorpo; realização de experimentos funcionais e busca por parceiros de interação, dados que possibilitem a compreensão da função deste gene, inúmeros foram os esforços na tentativa de expressá-la em sistema heterólogo.

4.6.1 Expressão da proteína 092H06 em *E. coli* cepa ArcticExpressDE3RIL a partir do plasmídeo pEXP17+092H06

Células eletrocompetentes de ArcticExpressDE3RIL foram eletroporadas com DNA de pEXP17+092H06 e também com DNA de pET28+092H06. Ambas as construções deveriam expressar a proteína 092H06, juntamente com uma “tag” de 6 histidinas, apresentando aproximadamente 13kDa. As possíveis bandas representando a proteína estão indicadas pelas setas vermelhas (Figura 20). Para confirmar que a banda assinalada corresponde à proteína esperada, realizou-se o experimento de Western blot usando anticorpo contra histidina conjugado à peroxidase

Figura 20: Análise por SDS-PAGE 15% das proteínas extraídas das culturas de *E. coli* ArcticExpressDE3RIL expressando 092H06 recombinante. **M:** marcador proteína LMW; **1:** T0 pEXP17+092H06; **2:** SB pEXP17+092H06; **3:** P pEXP17+092H06; **4:** T0 pET28+092H06; **5:** SB pET28+092H06; **6:** P pET28+092H06 .T0 sem indução; P (“pellet”) e SB (sobrenadante) após 24h de indução

4.6.2 Expressão da proteína 092H06 em *E. coli* cepa BL21(DE3) Rosetta a partir do plasmídeo pET28+092H06

Células eletrocompetentes de BL21(DE3) Rosetta foram eletroporadas com o DNA pET28+092H06. Essa construção deveria expressar a proteína juntamente com uma “tag” de 6 histidinas, apresentando aproximadamente 13kDa. Neste experimento foram testados dois tempos de indução, 4h e 24h. As bandas candidatas, possivelmente representando a proteína recombinante, estão indicadas pelas setas vermelhas (Figura 21). Para confirmar que a banda assinalada corresponde à proteína desejada, realizou-se o experimento de Western blot usando anticorpo contra histidina conjugado à peroxidase

Figura 21: Análise por SDS-PAGE 15% das proteínas extraídas das culturas de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta expressando 092H06 recombinante. **M:** marcador proteína LMW; **1:** T0 pET28+092H06; **2:** SB pET28+092H06 4h; **3:** P pET28+092H06 4h; **4:** T0 pET28+092H06; **5:** SB pET28+092H06 24h; **6:** P pET28+092H06 24h .T0 sem indução; P (“pellet”) e SB (sobrenadante).

4.6.3 Reconhecimento da proteína recombinante - Western Blot

Um experimento de Western blot foi realizado para verificar se as bandas de tamanho esperado realmente continham as proteínas recombinantes, obtidas a partir da expressão dos plasmídeos pEXP17+092H06 e pET28+092H06, nas cepas ArcticExpressDE3RIL e BL21(DE3) Rosetta. Para isso, dois géis SDS-PAGE foram confeccionados, utilizando-se alíquotas das expressões do sobrenadante de pET28+092H06 em BL21(DE3) Rosetta, “pellet” de pET28+092H06 em BL21(DE3) Rosetta, sobrenadante de pET28+092H06 em ArcticExpressDE3RIL e sobrenadante de pEXP 17+092H06 em Arctic DE3RIL, descritas nos itens anteriores. Um gel foi corado com Coomassie blue para comprovar a presença das bandas relativas à proteína recombinante, que estão indicadas pelas setas vermelhas na Figura 22. O outro gel foi transferido para membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo contra histidina, conjugado com peroxidase (Figura 23).

Figura 22: Análise por SDS-PAGE 15% das proteínas extraídas das culturas de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta e ArcticExpressDE3RIL, expressando 092H06 recombinante. **M:** marcador proteína LMW; **1:** SB pET28+092H06 em BL21(DE3) Rosetta; **2:** pET28+092H06 em BL21(DE3)Rosetta **3:** SB pET28+092H06 em ArcticExpressDE3RIL ; **4:** SB pEXP 17+092H06 em ArcticExpressDE3RIL. P (“pellet”) e SB (sobrenadante)

Figura 23: Western Blot das proteínas extraídas das culturas de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta e ArcticExpressDE3RIL expressando 092H06 recombinante. **M:** marcador proteína LMW; **1:** SB pET28+092H06 em BL21(DE3) Rosetta; **2:** pET28+092H06 em BL21(DE3)Rosetta **3:** SB pET28+092H06 em ArcticExpressDE3RIL; **4:** SB pEXP 17+092H06 em ArcticExpressDE3RIL. P (“pellet”) e SB (sobrenadante)

Desta forma, através desse experimento de Western Blot, verifica-se que o vetor pET28+092H06 foi capaz de expressar a proteína recombinante na forma solúvel em ambas as cepas de *E. coli* testadas.

4.5.4 Expressão e purificação da proteína recombinante 092H06

Após confirmação da expressão da proteína 092H06 recombinante, realizou-se uma nova expressão, usando a cepa ArcticExpressDE3RIL com o plasmídeo pET28+092H06. Após 4 horas de indução, a cultura foi centrifugada, ressuspensa em tampão de lise, sonicada e passada em coluna de resina de níquel. As alíquotas coletadas durante a purificação foram aplicadas em gel SDS-PAGE 15%. Observou-se a banda correspondente à proteína recombinante na alíquota referente à lavagem e não na alíquota

eluída. Este resultado significa que não foi possível purificar a proteína 092H06 recombinante. Isto pode ter ocorrido devido a um mau dobramento da proteína, ocasionando que a “tag” de histidinas ficasse escondida e não acessível para ligação à resina da coluna. Experimentos adicionais deverão ser realizados para permitir a purificação da proteína 092H06 recombinante.

5 CONCLUSÕES

As análises de expressão dos genes para α -expansina, β -expansina, ciclina B1.2 e actina não permitem correlacionar os níveis de expressão destes genes com o silenciamento ou a superexpressão do gene 092H06.

As análises por microscopia óptica mostraram que estigmas/estiletos e ovários de plantas de silenciamento e de superexpressão possuem células maiores que as respectivas estruturas em SR1, sugerindo que alterações nos níveis da proteína 092H06, para mais ou para menos, resultam em expansão celular.

Com base em resultados de citometria de fluxo, foi possível descartar a endorreducação como causadora da expansão celular nas plantas transgênicas.

Experimentos de duplo-híbrido permitiram identificar 4 candidatos a parceiros de interação com a proteína 092H06.

A proteína recombinante 092H06 foi produzida na forma solúvel em *E. coli*.

É possível que a proteína codificada pelo gene 092H06 seja um novo representante da classe de peptídeos sinalizadores, atuando como inibidor da expansão celular nos órgãos reprodutivos de *N. tabacum*.

6 PERSPECTIVAS

Testar os níveis de expressão de diferentes membros da família das α -expansinas em pistilos das plantas transgênicas T2.

Confirmar as interações obtidas no ensaio de duplo híbrido através de outros ensaios de interação proteína-proteína, como “pull-down” e BiFC (“Bimolecular Fluorescence Complementation”).

Purificação da proteína recombinante 092H06 e a produção de um anticorpo anti-092H06.

Testar a ação da proteína recombinante diretamente em células da linhagem BY-2 de *N. tabacum*, a fim de analisar seus efeitos sobre o processo de expansão celular.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Apezatto Da Glória, B & Carmello-Guerreiro, SM. Anatomia Vegetal, 2ª Edição, Universidade Federal de Viçosa, 2006, 438pp.

Barrero RA, Umeda M, Yamamura S, Uchimiya H. (2003). Over-expression of Arabidopsis CAP causes decreased cell expansion leading to organ size reduction in transgenic tobacco plants. Ann. Bot. 91: 599-603.

Bell J and Hicks G. (1976). Transmitting tissue in the pistil of tobacco: ligth and electron microscopic observations. Planta. 131: 187-200.

Bereterbide A, Hernould M, Castera S, Mouras A. (2001). Inhibition of cell proliferation, cell expansion and differentiation by the Arabidopsis SUPERMAN gene in transgenic tobacco plants. Planta 214: 22-29.

Brito MS (2010). Caracterização do gene NtSPICE, um putativo inibidor da expansão celular, expresso nos órgãos reprodutivos de *Nicotiana tabacum* L. Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP/USP, 115p.

Busov VB, Brunner AM, Strauss SH. (2008). Genes for control of plant stature and form. New Phytologist 177: 589-607.

Casson SA, Chilley PM, Topping JF, Evans IM, Souter MA, Lindsey K. (2002). The POLARIS Gene of Arabidopsis encodes a predicted peptide required for correct root growth and leaf vascular patterning. Plant Cell 14: 1705-1721.

Chase MW, Knapp S, Cox AV, Clarkson JJ, Butsko Y, Joseph J, Savolainen V, Paokonny AS. (2003). Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). Ann. Bot. 92: 107-127.

Cheung AY, Wang H, Wu HM. (1995). A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* 82: 383-393.

Cho H-T, Cosgrove DJ. (2002). Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 3237-3253.

Cho H-T, Cosgrove DJ. (2004). Expansins as agents in hormone action. In: Davies PJ (ed.) *Plant Hormones*, 3rd edn. 262–281

Choi D, Cho H, Lee Y. (2006). Expansins: expanding importance in plant growth and development. *Physiologia Plantarum* 126: 511-518.

Cosgrove DJ, Bedinger P, Durachko DM. (1997). Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(12):6559-6564.

Cosgrove DJ. (1998). Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiol*. 188: 333-339.

Covey PA, Subbaiah CC, Parsons RL, Pearce G, Lay FT, Anderson MA, Ryan CA, Bedinger PA. (2010). A pollen-specific RALF from tomato that regulates pollen tube elongation. *Plant Physiology* 153: 703-715.

Eamens A, Wang MB, Smith NA, Waterhouse PM.(2008). RNA silencing in plants: yesterday, today and tomorrow. *Plant Physiol*. 147: 456-468.

Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, Von-Heijne G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology* 300: 1005-1016.

Engler JA, De Grooth R, Van Montagu M, Engler G .(2001). In situ hybridization to mRNA of *Arabidopsis* tissue sections. *Methods* 23: 325-334.

Fagard M and Vaucheret H. (2000) (Trans)gene silencing in plants: how many

mechanisms?. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51: 167-194.

Fields S, Songs O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature, 340: 245-256.

Fry SC. (1994) Plant cell expansion: unzipped expansins. Current Biology 4(9):815-817.

Germain H, Chevalier E, Caron S, Matton DP. (2005). Characterization of five RALF-like genes from *Solanum chacoense* provides support for a developmental role in plants. Planta 220: 447-454,

Goldman MHS, Goldberg RB, Mariani C. (1994). Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. EMBO J. 13: 2976-2984.

Heslop-Harrison Y, Shivanna KR. (1977). The receptive surface of the angiosperm stigma. Ann. Bot. 41: 1233-1258.

Hiscock SJ and Allen AM. (2008). Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus. New Phytol. 179: 286-317.

Horiguchi G, TsukayaH. (2011). Organ size regulation in plants: insights from compensation. Frontiers in Plant Science 2: 1-6.

Inzé D, De Veylder L. (2006). Cell cycle regulation in plant development. Annual Review of Genetics 40: 77-105.

Kandasamy MK, Kristen U. (1987). Developmental aspects of ultrastructure, histochemistry and receptivity of the stigma of *Nicotiana sylvestris*. Ann. Bot. 60: 427-437.

Kandasamy MK, Dwyer KG, Paolillo DJ, Doney RC, Nasrallah JB, Nasrallah ME. (1990). Brassica S-proteins accumulation in the intercellular matrix along the path of pollen tubes in the transgenic tobacco pistils. Plant Cell 2: 39-49.

Kawade K, Horiguchi G, Tsukaya H. (2010). Non-cell-autonomously coordinated organ size regulation in leaf development. *Development* 137: 4221-4227.

Koltunow AM, Truettner J, Cox KH, Wallroth M, Goldberg RB. (1990). Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* 2: 1129-1130.

Krizec BA. (2009). Making bigger plants: key regulators of final organ size. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 17–22

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lee, Hsiao-Ching and Lin, Tsai-Yun. 2005. Isolation of plant suitable for flow cytometry from recalcitrant tissue by use of a filtration column. *Plant Molecular Biology* 23: 53-58.

Lee Y, Choi D, Kende H. (2001). Expansins: ever-expanding numbers and functions. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 527-532.

Li M, Xu W, Yang W, Kong Z, Xue Y. (2007). Genome-wide gene expression profiling reveals conserved and novel molecular functions of the stigma in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology* 144(4):1797-1812.

Li ZC, Durachko DM, Cosgrove DJ. (1993). An oat coleoptile wall protein that induces wall extension in vitro and that is antigenically related to a similar protein from cucumber hypocotyls. *Planta* 191: 349–356

Lindsey K., Casson S, Chilley P. (2002). Peptides: New signalling molecules in plants. *Trends in Plant Sci* 7: 72-83.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods* **25**: 402-408.

Marshall E, Costa LM, Marcos JG. (2011) Cysteine-rich peptides(CRPs) mediate diverse aspects of cell-cell communication in plant reproduction and development. *Journal of Experimental Botany* 62: 1677-1686.

Matsubayashi Y, Yang H, Sakagami Y. (2001). Peptide signals and their receptors in higher plants. *Trends in Plant Sci* 6: 573-577.

Matsubayashi Y, Sakagami Y. (2006). Peptide hormones in plants. *Annual Review on Plant Biology* 57: 649-674.

Mauseth JD. (2003). *Botany: An Introduction to Plant Biology*. 3ª edição. University of Texas, Austin, Texas.

McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ. (1992). Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* 4: 1425-1433.

Mingossi FB, Matos JL, Rizzato AP , Medeiros AH, Falco MC, Silva-Filho MC, Moura DS. (2010). SacRALF1, a peptide signal from the grass sugarcane (*Saccharum* spp.), is potentially involved in the regulation of tissue expansion. *Plant Molecular Biology* 73: 271-281.

Mockaitis K, Estelle M. (2004). Integrate transcriptional controls for plant cell expansion. *Genome Biology* 5: 245.

Moura DS, Silva-Filho MC. (2006). Plant peptide hormones, from defense to pollen self-incompatibility, cell fate and development: small peptides as signaling molecules in plants. In: SILVA, J.A.T. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: advances and topical issue*. London: Global Science Books, 203-209.

Nakai K and Horton P. (1999). PSORT: a program for detecting the sorting signals of proteins and predicting their subcellular localization. Trends in Biochemical Science 24: 34-35.

Pearce G, Moura DS, Stratmann J, Ryan CA. (2001). RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington 98: 12843-12847.

Pezzoti M, Feron R, Mariani C.(2002). Pollination modulates expression of the PPAL gene, a pistil-specific beta-expansin. Plant Mol Biol 49:187-197.

Quiapim AC, Brito MS, Bernardes LA, Dasilva I, Malavazi I, DePaoli HC, Molfetta-Machado JB, Giuliatti S, Goldman GH, Goldman MH. (2009). Analysis of the *Nicotiana tabacum* stigma/style transcriptome reveals gene expression differences between wet and dry stigma species. Plant Physiol. 149: 1211-1230.

Rechenmann Catherine Perrot. (2010). Cellular responses to auxin: division versus expansion. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2010;2:a001466.

Rose JKC, Cosgrove DJ, Albersheim P, Darvill AG, Bennett AB. (2000). Detection of expansin proteins and activity during tomato fruit ontogeny. Plant Physiol. 123: 1583-1592.

Ryan CA, Pearce G, Scheer J, Moura DS. (2002). Polypeptides homones. Plant Cell 14: 251-264.

Sage TL, Hristova-Sarkovski K, Koehl V, Lyew J, Pontieri V, Bernhardt P, Weston P, Bagha S, Chiu G. (2009). Transmitting tissue architecture in basal-relictual angiosperms: implications for transmitting tissue origins. American Journal of Botany 96: 183-206.

Sampedro J, Cosgrove DJ. (2005). The expansin superfamily. *Genome Biology* 6: 242

Santner A, Estelle M. (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. *Nature Reviews* 459: 1071-1078.

Sharova I. (2007). Expansins: proteins involved in cell wall softening during plant growth and morphogenesis. *Russian journal of Plant Physiology* 54; 713-727.

Shivanna KR. (1982). Pollen-pistil interaction and control of fertilization. In: *Experimental Embriology of Vascular Plants*, B. H. Johri, ed. (New York: Springer-Verlag), 131-174.

Smith LG, Oppenheimer DG. (2005). Spatial control of cell expansion by the plant cytoskeleton. *Ann. Rev. Cell and Devel. Biol* 21: 271-295.

Swanson R, Clarck T, Preuss D. (2005). Expression profiling of *Arabidopsis* stigma tissue identifies stigma-specific genes. *Sex Plant Reprod.* 18: 163-171.

Tsukaya H and Beemster GTS. (2006). Genetics, cell cycle and cell expansion in organogenesis in plants. *J Plant Res* 119:1–4.

Tung CW, Dwyer KG, Nasrallah ME, Nasrallah JB. (2005). Genome-wide identification of genes expressed in *Arabidopsis* pistils specifically along the path of pollen tube growth. *Plant Physiol.* 138: 977-989.

Weingartner M, Pelayo HR, Binarova P, Zwerger K, Melikant B, de la Torre C, Heberle-Bors E, Bögre L. (2003). A plant cyclin B2 is degraded early in mitosis and its ectopic expression shortens G2-phase and alleviates the DNA-damage checkpoint. *J Cell Sci.* 116:487:498.