

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

**“Identificação de parceiros de interação da proteína FEF1
(Flower-Expressed F-box1) de *Nicotiana tabacum* L.”.**

Vitória de Paula Pereira Cesar

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

RIBEIRÃO PRETO – SP
2014

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

**“Identificação de parceiros de interação da proteína FEF1
(Flower-Expressed F-box1) de *Nicotiana tabacum* L.”.**

Vitória de Paula Pereira Cesar

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

Orientador: Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman

RIBEIRÃO PRETO – SP

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Cesar, Vitória de Paula Pereira

Identificação de parceiros de interação da proteína FEF1 (Flower-Expressed F-box1) de *Nicotiana tabacum* L. Ribeirão Preto, 2014. 47 p.

Monografia (Curso de Ciências Biológicas), Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Goldman, Maria Helena de Souza

1- Proteína F-box 2- Desenvolvimento do pistilo 3- Interações proteína-proteína

RESUMO

As angiospermas compõem um grupo muito abundante e diverso. Apresentam como características exclusivas, a presença de estruturas reprodutivas chamadas de flores e a presença de frutos protegendo suas sementes. O Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP – FFCLRP/USP) estuda principalmente o desenvolvimento do órgão feminino das flores, o pistilo, utilizando como modelo a espécie *Nicotiana tabacum*. Para entender os mecanismos que controlam o desenvolvimento é essencial estudar os genes que são expressos nos órgãos da flor e, principalmente, no pistilo. Um destes genes, o FEF1 (Flower-Expressed F-box1) foi identificado pelo nosso grupo de pesquisa como sendo expresso preferencialmente na flor de *N. tabacum*. Em trabalho anterior, foram produzidas plantas transgênicas de superexpressão e de silenciamento (por RNAi), para estudar a função da proteína FEF1. As plantas de RNAi apresentaram pistilos reduzidos, em comparação com as plantas controle, enquanto que as plantas de superexpressão produziram flores com pistilos maiores. A proteína codificada pelo gene FEF1 foi caracterizada como uma proteína da família F-box, por possuir em sua estrutura um domínio de mesmo nome. Estas proteínas fazem parte do complexo SCF, o qual é um tipo de complexo enzimático E3-ligase, que faz parte da via de proteólise intracelular denominada de via da ubiquitina-proteassoma. Dentro deste complexo, a proteína F-box, como a FEF1, é a subunidade responsável por reconhecer as proteínas-alvo de degradação. Estes alvos podem ser proteínas defeituosas, mal enoveladas ou, então, proteínas que precisem ter suas concentrações finamente reguladas ao longo da vida da célula. O presente trabalho teve como objetivo identificar os putativos parceiros de interação da proteína FEF1 e propor hipóteses sobre como esta proteína pode afetar o tamanho final do pistilo. Para isto, foram analisadas colônias de levedura identificadas em um *screening* de duplo-híbrido (Y2H) realizado anteriormente, para identificar as proteínas candidatas à interação com FEF1. Entre os candidatos, encontrados no presente trabalho, estão as proteínas SKP1, fatores de transcrição (TCPs, *SIP1-like;storekeeper*), e uma *MOB1-like*.

Palavras chave: Proteína F-box; Desenvolvimento do pistilo; Interação proteína-proteína; Proteassoma

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha orientadora, a Prof.^a Dr.^a Maria Helena de Souza Goldman por ter me acolhido no laboratório e me aceitado como aluna de iniciação científica, sempre estando disponível para conversar e sanar toda e qualquer dúvida e estimulando a busca por conhecimento. Agradeço também pela paciência e por toda a ajuda nas dificuldades com os experimentos e escritas de relatórios e da monografia.

Às agências de fomento à pesquisa CAPES, CNPq e FAPESP, pelos auxílios e bolsas que viabilizaram a realização deste trabalho.

Agradeço à Dra. Andréa Carla Quiapim pelo sequenciamento de todos os clones aqui descritos, sem o qual este trabalho não teria sido possível.

Aos colegas de laboratório Francine, Danilo, Vítor, Pedro, Luis Fernando, Andréa, Greice e Paulo. Agradeço também aos colegas que já não estão mais no laboratório, como a Hebréia, que me ajudou muito e teve muita paciência comigo logo que entrei no laboratório, Lígia, Edward e Lúcia. Todos, sem exceção, foram excelentes colegas de trabalho e de uma maneira ou de outra me ensinaram muitas coisas importantes e me ajudaram muito no laboratório, sempre deixando o ambiente de trabalho mais leve e divertido.

Às minhas amigas de Ribeirão Letícia, Bruna, Flávia, Gabriela, Lara, Paula, Lenisa, Nathalia, Carolina e Bárbara por me ajudarem e apoiarem na realização deste trabalho. Obrigada também por compartilharem e compreenderem os meus anseios e angústias quanto ao final da graduação.

Aos meus amigos de Bauru, Renato, Júlia, Mayara, Letícia, Renata, Layla e Luisa, também por me apoiarem sempre, principalmente emocionalmente!

A todos os meus professores, desde o ensino infantil, fundamental, médio e superior, por me passarem os seus conhecimentos e por me fazerem, diretamente ou indiretamente, gostar cada vez mais de biologia, pois eu com certeza não faria outro curso.

À Faculdade de Filosofia Ciências e Letras por ceder o espaço sem o qual este trabalho não seria possível.

Por fim, à minha família, principalmente aos meus pais e irmão, por acreditarem em mim e sempre estarem ao meu lado, me apoiando não importando qual fosse a minha escolha, porém me aconselhando e fazendo críticas construtivas quando necessário. Obrigada por terem me educado da melhor maneira possível e por terem me passado valores e ensinamentos que eu vou levar para a vida toda. Sem vocês nada do que eu já alcancei na vida seria possível! Tudo o que eu sou hoje, devo a vocês.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. As angiospermas e suas estruturas reprodutivas exclusivas, as flores	9
1.2. Desenvolvimento das flores	10
1.3. A espécie <i>Nicotiana tabacum</i> como modelo	11
1.4. Degradação de proteínas pela via Ubiquitina-proteassoma	11
1.5. FEF1 (Flower-Expressed F-box1)	13
1.6. Possíveis candidatos à interação com FEF-1	15
1.7. Ensaio de Duplo Híbrido	15
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Extração de DNA plasmidial de <i>S. cerevisiae</i>	18
3.2. Transformação de <i>E. coli</i> eletrocompetentes	18
3.3. Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	19
3.4. Digestão com enzimas de restrição	20
3.5. Análise de fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose	20
3.6. Limpeza de DNA plasmidial pelo método do fenol-clorofórmio	21
3.7. Sequenciamentos de DNA	22
3.8. Preparo de <i>S. cerevisiae</i> competentes	22
3.9. Transformação de <i>S. cerevisiae</i> por choque térmico	23
3.10. Ensaio de duplo-híbrido em <i>S. cerevisiae</i>	23
3.11. Os vetores pDEST32 e pDEST22	26
3.12. Meios de cultura utilizados	27
3.12.1. Meio LB (Luria-Bertani).....	27
3.12.2. Meio SD (Synthetic Dropout).....	27
3.12.3. Meio YPAD (Yeast extract, Peptone, Adenine, Dextrose).....	27
4. RESULTADOS	28
4.1. Análise das colônias do <i>screening</i> de Y2H	28
4.2. Obtenção de <i>E. coli</i> contendo os plasmídeos das presas	28

4.3.	Análise dos padrões de bandas encontrados	29
4.4.	Identificação dos putativos parceiros de interação da FEF1	32
4.5.	Re-teste das interações por ensaio de duplo híbrido	37
5.	DISCUSSÃO	40
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. Introdução

1.1. As angiospermas e suas estruturas reprodutivas exclusivas, as flores

As angiospermas compõem o grupo mais abundante e diverso dentre os vegetais e variam enormemente em suas características vegetativas e adaptações, contudo elas apresentam como características comuns: a presença de flores, frutos protegendo suas sementes e um ciclo de vida diferenciado dos demais táxons (Raven *et al.*, 1996, Alvarez-Buylla *et al.*, 2010).

As estruturas reprodutivas exclusivas deste grupo, as flores, são compostas por partes férteis e partes vegetativas, as quais estão esquematizadas na Figura 1. As partes vegetativas da flor são representadas pelas pétalas, sépalas, receptáculo e pedúnculo ou pedicelo. Já as partes férteis, ou seja, as estruturas que participam diretamente da reprodução, são representadas pelo androceu, a parte masculina, e pelo gineceu, a parte feminina (Raven *et al.*, 1996).

O gineceu é formado por uma ou mais unidades básicas denominadas carpelos, os quais, quando se encontram fusionados, caracterizam a estrutura total como um pistilo. Um carpelo é formado por um estigma na parte superior, o qual recebe os grãos de pólen, um ovário na parte inferior, que contém os óvulos, e uma estrutura denominada estilete, que une o estigma ao ovário (Raven *et al.*, 1996). Quando ocorre a polinização e posterior fecundação, os óvulos dão origem às sementes e o ovário forma o fruto (Taiz & Zeiger, 2010).

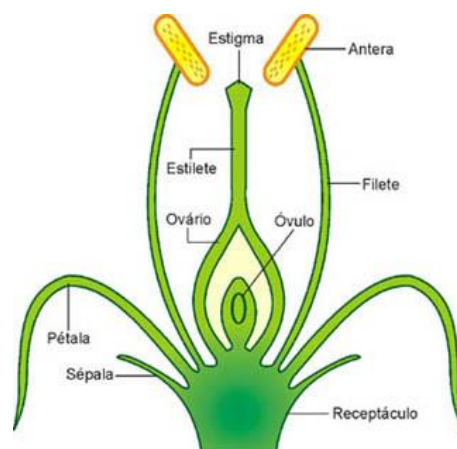


Figura 1: Esquema de uma flor de Angiosperma.

Retirado de: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos4/angiospermas.php>.

1.2. Desenvolvimento das flores

A transição do crescimento vegetativo para o crescimento reprodutivo (floral) é um processo chave no desenvolvimento das plantas e está sob o controle de diversos genes. Este processo deve ser regulado temporalmente de acordo com as condições fisiológicas e ambientais em que a planta se encontra (Wellmer & Riechmann, 2010).

Inicialmente as flores se desenvolvem a partir de um tecido especial, o meristema floral, o qual é formado por células indiferenciadas. Posteriormente este meristema se desenvolve em quatro verticilos, que são representados por círculos concêntricos, os quais darão origem aos órgãos florais finais: os carpelos, os estames, as pétalas e as sépalas (Taiz & Zeiger, 2010; Alvarez-Buylla *et al.*, 2010).

De maneira geral, existem dois tipos de famílias de genes que regulam o desenvolvimento das flores. São eles: os genes de identidade meristemática e os genes de identidade floral. Os primeiros codificam fatores de transcrição que dão início à diferenciação do meristema, pois ativam a expressão dos genes do segundo tipo. Já os genes de identidade floral também codificam fatores de transcrição, porém que estão envolvidos diretamente na formação e na função dos órgãos florais (Taiz & Zeiger, 2010; Alvarez-Buylla *et al.*, 2010).

A princípio, foi descrito na literatura que os verticilos florais eram definidos pela expressão diferencial e sobreposta de apenas três tipos de genes de identidade floral, segundo o modelo ABC proposto por Coen e Meyerowitz (1991). Neste modelo, os genes do tipo A são responsáveis pela formação de sépalas, já os genes do tipo B, juntamente com os genes A especificam as pétalas. Os genes B e C dão início aos estames e os genes tipo C sozinhos são necessários à formação dos carpelos (Taiz & Zeiger, 2010). Recentemente este modelo foi atualizado, incluindo mais dois tipos de genes, o D e o E (Komeda, 2004). Os genes D estariam envolvidos no desenvolvimento de óvulos e os genes E estariam relacionados à especificação das pétalas, juntamente com A e B, ao desenvolvimento dos estames, com B e C, e por fim ao desenvolvimento do carpelo, adicionalmente à ação dos genes C (Theissen & Saedler, 2001).

1.3. A espécie *Nicotiana tabacum* como modelo

O Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP - FFCLRP/USP) estuda o desenvolvimento e funcionamento do pistilo, e utiliza como planta-modelo a espécie *Nicotiana tabacum*. Esta espécie, pertencente à família Solanaceae, é uma dicotiledônea do grupo das angiospermas. É classificada como uma erva de hábito arbustivo, podendo alcançar de 0,90 a 1,50 metros de comprimento. Teve sua origem na América do Sul e apresenta uma preferência por climas mais quentes, apesar de ser cultivada hoje no mundo todo por seu valor comercial (Van Hoof, 2011). A espécie *N. tabacum* é muito utilizada como modelo de estudo, pois apresenta um ciclo de vida relativamente curto, de aproximadamente seis meses, produz sementes em grande quantidade, possui flores grandes e seu cultivo em laboratório é relativamente fácil (Ganapathi *et al.*, 2004).

O pistilo de *N. tabacum* é composto pela fusão de dois carpelos e possui um estigma bilobado do tipo úmido, com células papilares esparsamente distribuídas, abaixo das quais há uma zona de secreção do estigma (Bell & Hicks, 1976). Esta zona produz, durante a maturidade, uma substância viscosa, ou exsudado, que facilita a adesão dos grãos de pólen ao estigma da flor. O estigma e o estilete são formados por quatro camadas de tecido, a epiderme, o córtex, tecido vascular e o tecido transmissor, no sentido da superfície exterior para o interior do pistilo. Este tecido transmissor é o meio pelo qual o tubo polínico crescerá em direção ao óvulo, localizado no interior do ovário. O estilete, por sua estrutura, é classificado como do tipo sólido (Bell & Hicks, 1976).

1.4. Degradação de proteínas pela via Ubiquitina-proteassoma

Existem diversos motivos pelos quais proteínas intracelulares precisam ser destruídas. Elas podem estar mal dobradas, serem defeituosas, causando danos à célula, ou a sua quebra pode ser necessária para a formação, por exemplo, de hormônios e outras moléculas. Mais um motivo, talvez um dos mais importantes, seja porque determinadas proteínas precisam ter a sua concentração regulada adequadamente ao longo da vida da célula, inclusive em situações de estresse, dependendo da fase em que esta se encontra (Hua & Vierstra, 2011; Varshavsky, 2012).

Esta fina regulação assegura, por exemplo, que a célula passe pelos estágios do ciclo celular de maneira que os tecidos e órgãos da planta se desenvolvam e cresçam corretamente. Existem muitos alvos de degradação que participam do ciclo celular, como, por exemplo, ciclinas, kinases dependentes de ciclinas (cdk) ou, então, fatores de transcrição que promovem a progressão da célula no ciclo celular (Kipreos & Pagano, 2000; Hershko, 2005; Hua & Vierstra, 2011). Alguns destes fatores de transcrição podem ser responsáveis pela regulação transcricional dos genes de identidade meristemática e de identidade floral.

Uma das principais vias de proteólise intracelular em eucariotos é a via da ubiquitina-proteassoma, através da qual moléculas de uma proteína chamada ubiquitina são adicionadas à proteína-alvo, a qual é enviada à organela proteassoma 26S, onde ocorre a proteólise (Palma *et al.*, 2002). Esta via compreende três tipos de enzimas ou complexos enzimáticos e começa com a formação de uma ligação tiol-éster entre a porção carboxi-terminal da ubiquitina e um resíduo de cisteína da enzima ativadora da ubiquitina (E1). Ativada, a ubiquitina é, novamente, transferida para um resíduo de cisteína da enzima conjugadora da ubiquitina (E2), através de uma ligação tiol-éster. A E2 interage com uma ligase de proteínas (E3), já acoplada ao seu substrato-alvo. A partir desta interação entre E2 e E3, as moléculas de ubiquitina se aproximam do substrato, e são transferidas a este por uma ligação isopeptídica (Hellmann & Estelle, 2002; Hershko, 2005; Hua & Vierstra, 2011; Skaar *et al.*, 2013). Uma cadeia de poliubiquitina é formada através de ligações entre resíduos de lisina desta molécula e, assim, a proteína poliubiquitinada é reconhecida pelo proteassoma 26S e, então, degradada. Após a degradação, as moléculas de ubiquitina são recicladas (del Pozo & Estelle, 2000, Hua & Vierstra, 2011).

Não existe uma variedade muito grande de enzimas E1 e E2, sendo estas enzimas mais conservadas, ao contrário das enzimas E3, cuja variedade é abundante entre os eucariotos. Essa variação se deve ao fato de que as enzimas E3 representam o componente específico da via ubiquitina-proteassoma, já que são estas as responsáveis por reconhecer os diferentes substratos que devem ser degradados (Hellmann & Estelle, 2002; Skaar *et al.*, 2013). As enzimas E3 são divididas em dois grupos: aquelas que possuem um domínio do tipo HECT e as que possuem um domínio do tipo RING. As E3 mais estudadas pertencem ao grupo RING e este, por sua vez, também é dividido em subgrupos, dentre os quais podemos citar o tipo SCF, um dos mais importantes e conhecidos (Deshaies & Joazeiro, 2009, Hua & Vierstra, 2011).

O complexo enzimático E3 do tipo SCF é composto por 4 subunidades, sendo elas as proteínas SKP1 (S-phase kinase-associated protein 1), CUL1 (cullin 1), RBX1 (RING-box) e uma F-box. A RBX1 é o componente que liga todo o complexo E3 ao E2, ao passo que a CUL1 liga a RBX1 à SKP1, que, por sua vez, interage com a proteína F-box. Por fim, a F-box é a responsável pela ligação da E3 com a proteína-alvo (del Pozo & Estelle, 2000, Hua & Vierstra, 2011). Este complexo é representado na Figura 2.

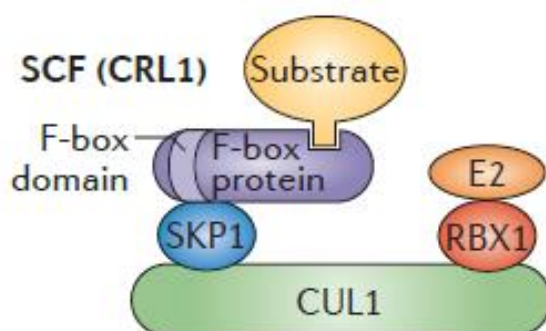


Figura 2: Representação do complexo SCF, contendo as proteínas F-box, SKP1 (S-phase kinase-associated protein 1), CUL (cullin) e RBX1 (RING-box 1). A figura mostra este complexo ligado ao substrato alvo e à enzima E2 (modificado de Skaar *et al.*, 2013).

1.5. FEF1 (Flower-Expressed F-box1)

Como já citado anteriormente, o LBMP estuda o desenvolvimento do pistilo de *Nicotiana tabacum L.* O gene que codifica a proteína FEF1 (Flower-Expressed F-box1) foi encontrado como sendo expresso preferencialmente em flores de *N. tabacum* (Abbad, 2012) e corresponde ao clone 085H05 presente no banco de dados TOBEST (Quiapim *et al.*, 2009). No trabalho de mestrado da bióloga Samantha Vieira Abbad (2012) no LBMP verificou-se que a expressão deste gene, de maneira geral, é crescente ao longo dos 12 estádios de desenvolvimento de *N. tabacum* (descritos por Koltunow *et al.*, 1990), tendo sua maior expressão no último estágio (antese). Além disso, foram produzidas plantas transgênicas de *N. tabacum* de silenciamento e de superexpressão do gene FEF1. Nestes estudos foi observado que as plantas que superexpressavam este gene apresentavam, de maneira geral, estiletes mais longos e ovários e estigmas maiores quando em comparação com plantas selvagens. Já no caso do silenciamento do gene, realizado através da técnica de RNA de interferência, notou-se em algumas plantas uma

diminuição do tamanho de estigmas, estiletes e ovários. Em ambos tipos de transgênicos houve a formação de frutos, após a realização de polinizações controladas. O estudo mais detalhado dos fenótipos das plantas transgênicas de superexpressão e silenciamento está sendo continuado no projeto de mestrado do aluno Luís Fernando Roberto (LBMP).

A FEF1 é uma proteína F-box, pois apresenta o domínio F-box característico desta família. O nome deste grupo foi dado por Bai *et al.* (1996), devido a descoberta da presença do domínio F-box na ciclina F. Estas proteínas não foram encontradas em procariotos, porém em eucariotos elas se encontram amplamente distribuídas, estando presentes em plantas, animais e em fungos. Só em *Arabidopsis thaliana* já foram descobertos quase 700 genes que possivelmente codificam proteínas com este domínio, um número muito maior do que o encontrado em humanos, leveduras ou *Drosophila*, levando a crer que as plantas tiveram uma evolução de SCF muito mais complexa do que os outros grupos (Gagne *et al.*, 2002).

O domínio F-box possui aproximadamente 50 resíduos e representa um sítio de interação proteína-proteína. Este se encontra geralmente localizado na porção amino-terminal da proteína e é a região responsável por se ligar à proteína SKP1, ao passo que a porção carboxi-terminal apresenta outros sítios, como por exemplo, dedos de zinco ou domínios de ciclinas, os quais são responsáveis por fazer a ponte com os substratos (Kipreos & Pagano, 2000). Esta porção (carboxi-terminal) normalmente apresenta repetições WD40 (Trp-Asp) ou LRR (*leucine rich repeats*) ou *Kelch*, os quais reconhecem sítios específicos nas proteínas-alvo (del Pozo & Estelle, 2000).

As proteínas da família F-box reconhecem seus alvos a partir de um estímulo e podem se ligar a curtas regiões destes alvos, chamadas de *degrons*. Os *degrons* geralmente são fosforilados para que ocorra o seu reconhecimento pela F-box, mas podem também sofrer outros tipos de modificação ou, então, nenhuma. Em alguns casos o reconhecimento dos alvos pela F-box necessita de co-fatores ou, então, pode ocorrer pela ligação desta proteína a domínios conservados presentes nos substratos (Skaar *et al.*, 2013).

1.6. Possíveis candidatos à interação com FEF-1

O estudo de interações entre diversos tipos de proteínas é muito importante, pois essas interações são essenciais para que a maioria dos processos celulares ocorra, como, por exemplo, a síntese de DNA, a tradução do RNA mensageiro, ativação transcricional, entre outros (Gietz *et al.*, 1997). Levando-se em conta os resultados discutidos acima (Abbad, 2012) e o papel das proteínas F-box na proteólise intracelular, especula-se que a proteína codificada pelo gene FEF1 desempenhe um papel importante no desenvolvimento do pistilo, ao menos na determinação do tamanho final do estigma, estilete e ovário. Portanto, torna-se essencial a busca e identificação de candidatos que interajam com esta proteína, para tentar elucidar os processos através dos quais a FEF1, juntamente com seus parceiros, influencia no desenvolvimento do pistilo de *N. tabacum*.

No trabalho de mestrado da bióloga Samantha Abbad foi realizado, ainda, um *screening* de duplo híbrido para tentar identificar possíveis parceiros de interação de FEF1. Este experimento permitiu identificar 192 candidatos, dos quais foram confirmados, através de re-teste, os seguintes parceiros de FEF1: a proteína SKP1, a qual faz parte do complexo SCF, e os fatores de transcrição VOZ1 e SIP1. Já no trabalho de mestrado do aluno Luis Fernando Roberto (em andamento no LBMP), foram encontradas, como parceiros de FEF1, duas proteínas TCP diferentes, além da comprovação da interação de FEF1 com SKP1, através de experimento de BiFC (*Bimolecular fluorescence complementation*).

1.7. Ensaios de Duplo Híbrido

Para testar a interação entre as proteínas de interesse, utilizou-se o sistema de duplo híbrido em levedura (*Yeast Two Hybrid* - Y2H). Este sistema, originalmente criado por Fields e Song (1989), tem como objetivo a análise de interação entre uma proteína de interesse (isca) com outras proteínas (presas), individualmente, através de um ensaio realizado em *Saccharomyces cerevisiae*. Neste ensaio, a sequência codificadora da isca é fusionada ao domínio de ligação ao DNA (*DNA binding domain* - DBD) do fator de transcrição GAL4, o qual é responsável pela ativação da transcrição de genes repórteres, presentes em linhagens próprias para Y2H. Ao mesmo tempo, a

sequência codificadora da presa é fusionada ao domínio de ativação (*Activation domain* - AD) deste mesmo fator de transcrição (Soellick & Uhrig, 2001; Auerbach & Stagljar, 2005). Ambas as construções são inseridas em *Saccharomyces cerevisiae* através de transformação por choque térmico.

Assim, entende-se que se ambas as proteínas, isca e presa, interagirem, aproximando-se uma da outra, ocorrerá também uma aproximação dos dois domínios (DBD e AD) do fator de transcrição, reconstituindo-o. Portanto, uma vez reconstituído o fator de transcrição GAL4, o gene repórter será expresso (Auerbach & Stagljar, 2005). Assim, é possível observar a expressão do gene repórter, por exemplo, o gene HIS3, através do crescimento de leveduras transformadas, com ambas as construções de interesse, em um meio seletivo sem histidina.

2. Objetivos

Para estudar como a proteína FEF1 (Flower-Expressed F-box 1) regula o desenvolvimento e o tamanho final do pistilo de *N. tabacum*, foi feito o *screening* de uma biblioteca de cDNAs de estigmas/estiletos, clonados em vetor do sistema de duplo-híbrido em levedura (Y2H) (Abbad, 2012). O objetivo do presente trabalho é identificar novos parceiros de interação com a FEF1, prováveis alvos de degradação pelo proteossoma. Para esta finalidade, foram realizados os seguintes experimentos:

- 1) Extrair DNA plasmidial de cada uma das colônias de leveduras que cresceram em meio seletivo (sem Histidina) – candidatos do *screening*
- 2) Transformar *E. coli* com os plasmídeos obtidos no item 1
- 3) Analisar os padrões de digestão dos plasmídeos de 6 colônias de bactérias (para cada colônia de levedura original) e escolher clones para o sequenciamento
- 4) Sequenciar e identificar os candidatos à interação, por análises de bioinformática (Blast).
- 5) Re-testar os plasmídeos correspondendo aos candidatos promissores, por re-transformação de leveduras e plaqueamento em meio seletivo (sem Histidina).

Ao final do trabalho, pretende-se elaborar hipóteses sobre os processos biológicos nos quais a FEF1 atua.

3. Material e Métodos

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

O DNA plasmidial foi extraído de colônias de leveduras, estocadas em placas de 96 poços, oriundas do *screening* original (Abbad, 2012). Para a extração foi utilizado o kit Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep. Primeiramente, o precipitado celular foi ressuspensionado em 150 µL da solução I, e a mistura foi transferida para um microtubo. A seguir, foram adicionados 2 µL da enzima Zimolase. A mistura foi homogeneizada em um vortex, por alguns segundos, e, então, incubada a 37°C em banho-maria por 30 minutos. Foram adicionados 150 µL da solução II e a mistura foi novamente homogeneizada invertendo o tubo algumas vezes. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução III do kit e o tubo foi centrifugado na velocidade máxima (14.000rpm, microcentrífuga Eppendorf 5415 C) durante 2 minutos. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e transferido para um novo tubo. Após esta transferência, foram adicionados 400 µL de isopropanol e o tubo foi invertido algumas vezes para homogeneizar. O tubo foi, então, centrifugado na velocidade máxima (14.000rpm) por 8 minutos e o sobrenadante foi removido com pipeta. Foi feita nova centrifugação por 5 seg. para remover o sobrenadante residual, também com pipeta. O precipitado foi ressuspensionado em 35 µL de água deionizada estéril.

3.2. Transformação de *E. coli* eletrocompetentes

Para a transformação de células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B foi utilizada uma alíquota de células (40 µL) por cada transformação, as quais estavam armazenadas a -80°C. As células foram descongeladas em gelo, e foram adicionados 5 µL do DNA de interesse às células. Essa mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 10 mm (BioRad) previamente resfriada em gelo. O conjunto foi, então, submetido a um pulso elétrico de 1,8 kV, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω durante 5 segundos no eletroporador GenePulse II (BioRad). Logo após, 1 mL de meio LB líquido sem antibióticos foi adicionado para recuperar as células na cubeta, e este volume foi transferido para um tubo de ensaio. Em seguida, as células foram incubadas

a 37°C e 200 rpm durante 40 minutos. Após esta etapa, 200-500 µL da cultura foram plaqueados em meio LB sólido complementado com o antibiótico ampicilina, a uma concentração de 100 µg/mL, no caso de células transformadas com plasmídeos pDEST22, pois este apresenta marcador de seleção para ampicilina. A placa foi incubada a 37°C por 16-20 h (*overnight*).

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

A extração de DNA plasmidial de *E. coli* foi realizada através de dois métodos diferentes. Um com lisozima, o qual foi utilizado para a finalidade de sequenciamento. O segundo foi a utilização de um kit comercial, o GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas Lifesciences), utilizado para obter um DNA de melhor qualidade para utilizar em transformações de levedura. A extração com o kit foi realizada segundo as instruções do fabricante.

Em ambos os métodos, a etapa inicial consistiu no crescimento das colônias de bactérias em meio LB líquido, suplementado com antibióticos de seleção adequados, no caso, ampicilina, sendo a cultura incubada a 37°C por 16-20 h e 200 rpm. Cada colônia foi obtida de uma placa resultante de transformação por eletroporação. Para culturas de interesse, foram preparados estoque em glicerol 50 %, os quais foram mantidos a -80°C.

No método de extração por lisozima, um volume de 1,5 mL de cultura foi centrifugado a 13.200 rpm por 2 min a temperatura ambiente (T.A.) (microcentrífuga Eppendorf 5415 C). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o processo foi repetido uma vez. Depois de descartar o sobrenadante, o precipitado de células foi ressuspensionado em 175 µL de tampão TES [Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0; sacarose 15%]. Em seguida, foram adicionados 20 µL de lisozima (25 mg/µL) gentilmente para que não houvesse a liberação de DNA genômico, e a mistura ficou incubada por 10 min a T.A. e, a seguir, em banho-maria a 73°C por 15 min. O tubo foi centrifugado a 13.200 rpm por 15 min para a separação dos debrís celulares. Após a centrifugação, o sobrenadante, contendo os plasmídeos, foi transferido para um novo tubo, onde houve a adição de 20 µL de acetato de sódio 3 M e 400 µL de etanol 100%. A mistura foi homogeneizada invertendo-se o tubo 5 vezes e foi incubada a -80°C por 15 min ou a -20°C por uma hora e, em seguida, o tubo foi centrifugado a 13.200 durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi feita uma lavagem com 250 µL de etanol 70 %

gelado, girando o tubo. O tubo foi novamente centrifugado a 13.200 rpm por 2 minutos e o sobrenadante descartado. Os tubos abertos foram mantidos em T.A. até a evaporação total do etanol, e o precipitado de DNA foi ressuspenso com 50 µL de água deionizada estéril. As preparações contendo os plasmídeos foram armazenadas a -20°C.

3.4. Digestão com enzimas de restrição

As construções presentes nos plasmídeos, obtidos através da extração de DNA plasmidial, foram checadas através de digestão com a enzima de restrição BsrGI, seguida por eletroforese em gel de agarose. As digestões foram planejadas utilizando a ferramenta online NEBCutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>, New England BioLabs), o qual indica sítios de restrição de diversas enzimas para a sequência de interesse. A enzima BsrGI foi escolhida pois possui cliva o plasmídeo pDEST22 de modo a excisar o inserto de interesse. As digestões foram feitas em um volume de 20 µL, sendo 2 µL do tampão Neb2, 0,2 µL de RNase, 0,2 µL de *Bovine Serum Albumine* (BSA), 0,25 µL da enzima, 5 µL do DNA a ser digerido e água deionizada estéril em q. s. p 20 µL. As reações foram feitas a 37°C por 16-20 h. Os produtos da digestão foram analisados logo em seguida ou, então, armazenados a -20°C.

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

Os géis de agarose foram feitos para a observação dos padrões de bandas resultantes de DNA plasmidial digerido com a enzima BsrGI. As análises foram feitas através de eletroforese em gel de agarose 1 % (w/v) em tampão TBE a uma concentração final 0,5X [Solução estoque 5X - Tris-base 50 mM; ácido bórico 50 mM; EDTA 2 mM, pH 8,0].

A mistura [TBE 0,5X; agarose 1%] foi aquecida em forno micro-ondas para a dissolução da agarose. Após dissolvida, ela foi ligeiramente resfriada e acrescida de brometo de etídeo, um agente intercalante de DNA, em concentração final de 0,5 µg/mL. Após esta etapa, a mistura foi colocada em um molde para gel de agarose com um pente para a formação de poços onde foram aplicadas as amostras. Após a

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

Terminada a eletroforese, o gel foi retirado da cuba e transferido ao equipamento Kodak Gel Logic 100 Imaging System (Kodak), que possui um sistema de emissão de luz UV acoplado a uma câmera, ligado a um computador. As imagens foram obtidas através do software que acompanha o sistema.

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

O volume inicial da solução foi completado com água deionizada esterilizada q.s.p. 200 μ L. Foram adicionados 4 μ L de solução de RNase (10 μ g/ μ L), e a mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por 30 min. Depois, foram adicionados 200 μ L de fenol tamponado em pH 8,0 (Invitrogen), e a mistura foi homogeneizada em vortex e centrifugada por 3 min a 13.200 rpm em T.A. (microcentrífuga Eppendorf 5415 C). O sobrenadante foi removido e transferido para um novo tubo, no qual foi adicionado 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1. O tubo foi agitado no vortex e centrifugado nas mesmas condições anteriores. A fase superior da mistura foi novamente removida e transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol gelado. A mistura foi mantida por 15 min a -80°C para ocorrer a precipitação do DNA plasmidial. Em seguida, o tubo foi centrifugado por 15 min a 13.200 rpm, T.A. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 400 μ L de etanol 70 %, sofrendo nova centrifugação por 3 min nas mesmas condições da anterior. O sobrenadante foi novamente descartado e o tubo aberto ficou em T.A. até a evaporação total do etanol. O precipitado foi ressuspendido em 50 μ L de água deionizada estéril.

3.7. Sequenciamentos de DNA

Após a limpeza com fenol-clorofórmio, os DNAs de interesse foram sequenciados. Os sequenciamentos foram feitos pela Dr^a. Andréa Carla Quiapim, utilizando o sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems). O primer utilizado para os sequenciamentos foi o DEST22-AD502-Fw (TATAACGCGTTTGGAACTACT).

3.8. Preparo de células de *Saccharomyces cerevisiae* competentes

Células em estoque da cepa de leveduras PJ69-4a ([MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ] – James et al., 1996) foram estriadas, com uma alça de platina, em uma placa de Petri contendo meio YPAD sólido, e incubadas a 30°C por 48 h. Dessa placa, foi selecionada uma colônia isolada que foi colocada em 1 mL de meio YPAD líquido e, depois, agitada. Este volume foi inoculado em um *Erlenmeyer* com 50 mL de meio YPAD líquido com dextrose e incubado *overnight* a 30°C e 200 rpm. Na manhã seguinte, a cultura foi deixada em incubação até atingir DO600 \geq 1,5. Após atingir esse valor, a cultura foi diluída em um *Erlenmeyer* contendo 300 mL de meio YPAD líquido para que a cultura atingisse a DO600 em um intervalo de 0,2 a 0,3. Posteriormente, a mistura foi incubada a 30°C e 200 rpm até atingir DO600 entre 0,4 a 0,6. Ao atingir essa absorbância, a cultura foi dividida em 6 tubos Falcon e as células foram centrifugadas a 1000 x g (centrífuga Eppendorf 5810R) por 5 minutos a 20°C. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o precipitado celular de cada tubo foi ressuscitado em 5 mL de água deionizada esterilizada. Ao final desse processo, o conteúdo dos 6 tubos foi transferido para um único tubo, o qual foi centrifugado novamente durante 5 minutos nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em cada tubo com 1,5 mL da solução [TE 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 1 mM); LiAc 1X (acetato de lítio 100 mM; TE 0,5X)] recém preparada. Estas células foram usadas para transformação logo após o seu preparo e não foram armazenadas.

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

Para cada transformação, foram adicionados em um microtubo 500 ng de cada um dos dois plasmídeos de interesse, 0,1 mg de DNA carreador (DNA de esperma de salmão 10 ng/mL previamente fervido durante 10 minutos) e 100 µL de células competentes recém preparadas. A mistura foi homogeneizada em vortex. Após esta etapa, foram adicionados 600 µL de solução de PEG/LiAc [TE 1X; LiAc 1X; Polietileno-glicol-3350 (PEG-3350) 40 %] à mistura, que foi vortexada novamente. O tubo foi incubado a 30°C, 200 rpm por 30 minutos e, após esse período, adicionou-se 70 µL de DMSO e misturou-se invertendo o tubo. O tubo foi, então, incubado em banho-maria a 42°C por 15 minutos. Após esta etapa, o tubo foi centrifugado a 13.200 rpm por 5 segundos a T.A. (microcentrífuga Eppendorf 5415 D). O sobrenadante foi cuidadosamente removido e o precipitado celular foi ressuspensionado em 500 µL de água deionizada estéril. A solução contendo as células transformadas foi centrifugada por 1 minuto a 13.200 rpm e após este tempo, o sobrenadante foi removido e o precipitado ressuspensionado em 500 µL de meio SD apropriado (com histidina). Os tubos foram incubados por 16-20 h a 30°C em um homogeneizador para recuperação das células.

3.10. Ensaio de duplo-híbrido em leveduras

O ensaio de duplo-híbrido foi utilizado para checar interações entre as proteínas analisadas nesse trabalho. Para esta finalidade, foram feitas construções das sequências codificadoras dessas proteínas em ambos os vetores pDEST32 e pDEST22. Para cada experimento, foram feitas placas contendo quatro controles de interação, sendo dois positivos e dois negativos (kit ProQuest™ Two-Hybrid System, Invitrogen), controles de auto-ativação para cada uma das proteínas, e três ensaios de interação entre as proteínas de interesse.

Os controles de interação do kit consistem na proteína de rato Krev1, associada ao domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição GAL4, e três versões do domínio de associação à ras, da proteína RalGDS, ligados ao domínio de ativação do fator de transcrição GAL4. Estes controles recebem o nome de “Wt” para a sequência selvagem da proteína, que apresenta interação forte com Krev1, “M1” para uma mutação na

posição I77 para T77, que altera parcialmente a interação, servindo de controle para interações médias, e “M2” para uma mutação na posição L65 para P65, que inativa a interação e serve, portanto, como controle negativo. Além do controle negativo do kit, foi utilizado como controle negativo o pDEST32 vazio com pDEST22 vazio, para testar se havia auto-ativação do sistema sem a presença das proteínas.

Em cada placa, foram feitos 2 repetições biológicas dos controles de auto-ativação para cada uma das proteínas, tanto a “isca” como as “presas”, ou seja, de cada placa resultante da transformação, foram utilizadas 2 colônias. Foram feitos 3 ensaios de interação proteína-proteína com 3 repetições biológicas de cada um, ou seja, de cada placa resultante da transformação, foram utilizadas 3 colônias. Para os ensaios de interação, as leveduras foram transformadas com os dois vetores contendo as sequências codificadoras das proteínas a serem analisadas. A tabela abaixo apresenta as construções utilizadas para transformar leveduras no ensaio de duplo-híbrido.

	Construções utilizadas	Descrição das construções
Controles do Kit	pEXPT TM 32-Krev1 x pEXPT TM 22-RalGDS-wt	Controle de interação forte
	pEXPT TM 32-Krev1 x pEXPT TM 22-RalGDS-m1	Controle de interação fraca
	pEXPT TM 32-Krev1 x pEXPT TM 22-RalGDS-m2	Controle negativo
Controle de auto-ativação do sistema	pDEST TM 32 vazio x pDEST TM 22 vazio	Controle negativo
Controle de auto-ativação das construções	pEXPT TM 32-FEF1 x pDEST TM 22 vazio	Controle de auto-ativação da isca
	pDEST TM 32 vazio x pEXPT TM 22-SIP1- <i>like</i>	Controle de auto-ativação de SIP1- <i>like</i>
	pDEST TM 32 vazio x pEXPT TM 22- <i>storekeeper</i>	Controle de auto-ativação de <i>storekeeper</i>
	pDEST TM 32 vazio x pEXPT TM 22-MOB1- <i>like</i>	Controle de auto-ativação de MOB1- <i>like</i>
Ensaio de interação	pDEST TM 32-FEF1 x pEXPT TM 22-SIP1- <i>like</i>	Ensaio de interação entre FEF1 e SIP1- <i>like</i>
	pDEST TM 32-FEF1 x pEXPT TM 22- <i>storekeeper</i>	Ensaio de interação entre FEF1 e <i>storekeeper</i>
	pDEST TM 32-FEF1 x pEXPT TM 22-MOB1- <i>like</i>	Ensaio de interação entre FEF1 e MOB1- <i>like</i>

Após realizadas as transformações, 3 colônias de cada placa de transformação das interações, 2 colônias de cada placa referente às autoativações e uma colônia de cada placa referente aos controles positivos e negativos, foram inoculadas em meio SD –Leu –Trp líquido. Estes inóculos foram incubados por 16-20 h a 30 °C e 200 rpm. Após a incubação, foi medida a DO600 de cada cultura, e as mesmas foram diluídas para uma DO600 de 0,2 em meio SD –Leu –Trp para um volume final de 250 µL. Essas diluições foram feitas em microplacas de 96 poços, na linha A e na linha E. Nos primeiros 2 poços da linha A (A1-A2) foram colocados os controles positivos do kit. Os poços A3 e 6 foram deixados vazios. Nos poços A4 e A5 foram colocados, respectivamente, o controle negativo do kit e o controle de autoativação do sistema (pDEST32 vazio com pDEST32 vazio). Nos poços de A7 a A12 foram colocados as repetições de cada um dos controles de autoativação das “presas”. Já as duas repetições do controle de autoativação da “isca” foram colocadas nos poços E1 e E2. O poço E3 foi deixado vazio. As três repetições de cada um dos ensaios de interação entre as proteínas de interesse foram colocados nos poços de E4 a E12. Na linha C foi feita uma diluição da linha A de 1:5, resultando em DO600 de 0,04. Na linha G foi feita uma diluição da linha E de 1:5, resultando em DO600 de 0,04 também. Foram montadas duas placas, uma com meio SD-Leu-Trp, para atuar como controle de crescimento das leveduras, e uma com meio SD-Leu-Trp-His, para testar as interações. O conteúdo das microplacas foi replicado nas placas de Petri com um replicador de 96 pinos.

Foram utilizadas placas de Petri de 15 cm de diâmetro. Depois de replicadas as culturas, as placas foram incubadas a 30°C durante 48 h. Após esse período, elas foram fotografadas e deixadas sobre a bancada para verificar o crescimento ou não de novas colônias, que possivelmente apresentariam uma interação mais fraca.

3.11. pDEST32 e pDEST22

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

3.12. Meios de cultura utilizados

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

3.12.1. Meio LB (Luria-Bertani)

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

3.12.2. Meio SD (*Synthetic Dropout*)

O meio SD foi feito com 6,7 % de *Yeast nitrogen base* (Difco) sem aminoácidos em água deionizada. Para o meio sólido, foi adicionado ágar a uma concentração de 2%. O pH foi ajustado para 5,8. Após esterilizado, foi acrescentado 2% de dextrose estéril. Logo antes de ser utilizado, no meio -Leu-Trp foi adicionada a solução de *Dropout*, a uma concentração de 10%, contendo todos os aminoácidos (Arginina, Histidina, Isoleucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Treonina, Tirosina e Uracila) –Leucina-Triptofano. No meio –Leu-Trp-His foi adicionada a solução de *Dropout*, também a uma concentração de 10%, contendo todos os aminoácidos, exceto Leucina, Triptofano e Histidina.

3.12.3. Meio YPAD (*Yeast extract, Peptone, Adenine, Dextrose*)

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

4. Resultados

4.1. Análise das colônias do *screening* de Y2H

No presente trabalho foi extraído o DNA plasmidial de um total de 34 colônias de levedura, positivas do *screening* de duplo híbrido da aluna de mestrado Samantha Vieira Abbad, sendo 26 colônias da placa 1 (colônias que cresceram após 72h e 96h) e 8 colônias da placa 3 (colônias que cresceram após 120h), como pode ser observado na tabela abaixo. Na identificação das colônias, o primeiro número é referente ao número da placa de *screening*, a letra é referente à linha e o segundo número refere-se à coluna em que cada colônia se encontra na placa de 96 poços, onde estão estocadas as colônias de levedura do *screening*.

	Nº total	Posição das colônias na placa
Placa 1 (72/96h) Poços analisados	26	1F6; 1A8; 1B8; 1C8; 1D8; 1E8, 1G8; 1H8; 1A9; 1B9; 1D9; 1E9; 1F9; 1G9; 1A10; 1C10; 1E10; 1G10; 1H10; 1A11; 1B11; 1C11; 1D11; 1A12; 1D12; 1E12
Placa 3 (120h) Poços analisados	8	3H10; 3C11; 3D11; 3E11; 3F11; 3G11; 3H11; 3A12

4.2. Obtenção de *E. coli* contendo os plasmídeos das presas

Bactérias *E. coli* foram transformadas com o DNA extraído de cada uma das 34 colônias de levedura, para que plasmídeos diferentes, que pudessem estar dentro de um único clone positivo de levedura, fossem separados. Das 34 transformações, 29 foram bem sucedidas e resultaram no crescimento de pelo menos uma colônia isolada. Das colônias que cresceram, foram realizados 135 inóculos, procurando inocular, sempre que disponível, pelo menos 6 colônias de cada placa de transformação. Destes, cresceram 130 inóculos, dos quais foi extraído o DNA plasmidial.

Placa 1 (72/96h)		
Transformações realizadas com sucesso	21	1F6; 1A8; 1B8; 1C8; 1D8; 1E8, 1G8; 1A9; 1B9; 1D9; 1E9; 1F9; 1G9; 1C10; 1E10; 1G10; 1H10; 1A11; 1B11; 1C11; 1D11
Colônias de <i>E. coli</i> inoculadas	93	1F6.1-6; 1A8.1-3; 1B8.1; 1C8.1-6; 1D8.1-6; 1E8.1-6; 1G8.1-6; 1A9.1-6; 1B9.1-5; 1D9.1-3; 1E9.1-2; 1F9.1-6; 1G9.1-6; 1C10.1-6; 1E10.1; 1G10.1-6; 1H10.1-3; 1A11.1-2; 1B11.1-6; 1C11.1-2; 1D11.1-5
Número de mini-preps realizadas	89	1F6(6); 1A8(3); 1B8(1); 1C8(5); 1D8(6); 1E8(6), 1G8(6); 1A9(4); 1B9(4); 1D9(3); 1E9(2); 1F9(6); 1G9(6); 1C10(6); 1E10(1); 1G10(6); 1H10(3); 1A11(2); 1B11(6); 1C11(2); 1D11(5)
Placa 3 (120h)		
Transformações realizadas com sucesso	8	3H10; 3C11; 3D11; 3E11; 3F11; 3G11; 3H11; 3A12
Colônias de <i>E. coli</i> inoculadas	42	3H10.1; 3C11.1-6; 3D11.1-6; 3E11.1-6; 3F11.1-6; 3G11.1-6; 3H11.1-6; 3A12.1-6
Número de mini-preps realizadas	41	3H10(6); 3C11(6); 3D11(6); 3E11(6); 3F11(5); 3G11(6); 3H11(6); 3A12(6)

4.3 Análise dos padrões de bandas encontrados

O DNA plasmidial, extraído das colônias de bactérias, foi posteriormente digerido com a enzima de restrição BsrGI. Esta enzima cliva o plasmídeo pDEST22, quando vazio, em quatro sítios de restrição. Porém a inserção do cDNA da presa, através de reação de recombinação, exclui um destes sítios, restando apenas três. Isto resulta no aparecimento de três bandas, duas com tamanho conhecido (6015 pb e 1090pb) e uma banda de tamanho desconhecido, referente ao inserto (cDNA da presa). Os produtos das digestões foram analisados por eletroforese em géis de agarose. Cada grupo de digestões era referente às colônias de *E. coli*, as quais eram relativas a apenas uma colônia de levedura original da placa do *screening*, ou seja, resultantes de uma única transformação de leveduras. Portanto, dentro de cada grupo de digestões, foi selecionado pelo menos um clone para análises posteriores. No caso de existirem 2 ou mais clones com padrões de bandas distintos, ou seja, diferentes cDNAs dentro de uma única colônia de levedura do *screening*, estes também foram selecionados.

Das 131 digestões realizadas, apareceram 39 clones que apresentavam padrões distintos de bandas e, portanto, poderiam representar clones distintos. Abaixo estão apenas as figuras dos géis referentes aos clones que foram selecionados para o re-teste.

Na Figura 3 está mostrado um destes géis, no qual estão presentes as digestões referentes aos clones de *E. coli* relativas às colônias de levedura 1E10 e 1G10. Como houve apenas uma única colônia de *E. coli* após a transformação com o DNA plasmidial extraído do clone de levedura 1E10, há apenas uma digestão e, portanto, um padrão de bandas, o qual foi selecionado para sequenciamento. Já a transformação de *E. coli* com o DNA plasmidial do clone de levedura 1G10 resultou diversas colônias, sendo que 6 delas foram usadas para inóculos, extração de DNA plasmidial e análise de digestão enzimática. Estas 6 digestões apresentaram um único padrão de bandas e, portanto, apenas um clone foi selecionado para sequenciamento, o clone 1G10.3.

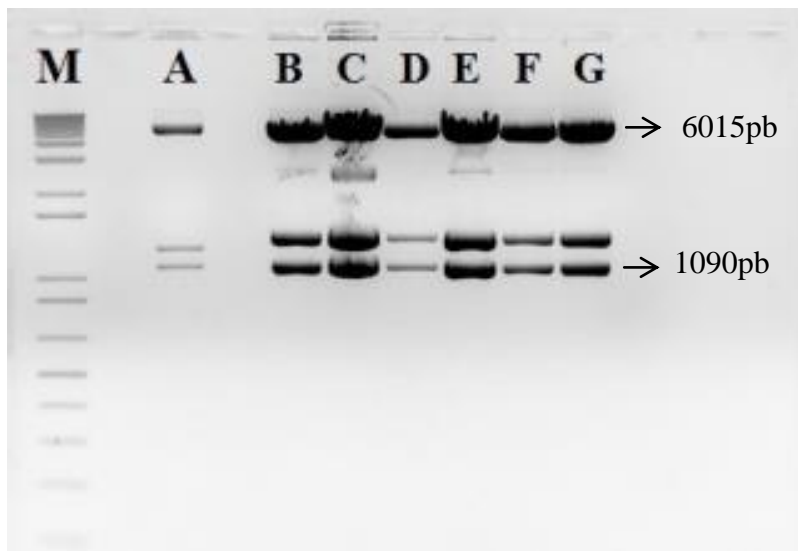


Figura 3: Análise dos DNAs plasmidiais digeridos com a enzima BsrGI, para visualização dos padrões de bandas dos diferentes clones. A- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 1E10.1 de *E. coli*. B- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 1G10.1 de *E. coli*. C- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 1G10.2 de *E. coli*. D- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 1G10.3 de *E. coli*. E- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 1G10.4 de *E. coli*. F- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 1G10.5 de *E. coli*. G- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 1G10.6 de *E. coli*. M representa o Marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder Invitrogen®. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Na Figura 4 estão representadas as digestões referentes aos clones de *E. coli* relativas às colônias de levedura 3G11 e 3F11. A transformação de *E. coli* com o DNA plasmidial extraído do clone de levedura 3G11 permitiu a obtenção de 6 inóculos e, portanto, em 6 digestões enzimáticas, porém 3 delas não apresentaram o padrão de digestão correto com a enzima BsrGI. As 3 que apresentaram o padrão esperado de digestão apresentaram bandas de mesmo tamanho e, portanto, apenas um dos clones foi

selecionado para sequenciamento, o clone 3G11.1. Já a transformação de *E. coli* com os plasmídeos encontrados no clone de levedura 3F11 resultou em 6 inóculos e, portanto, em 6 digestões enzimáticas. Estas 6 digestões apresentaram 2 diferentes padrões de bandas, representados pelos clones 3F11.1 e 3F11.5, os quais foram selecionados para sequenciamento. A digestão referente ao clone 3F11.6 não apresentou um terceiro padrão de banda além dos esperados, portanto não foi selecionado para sequenciamento.

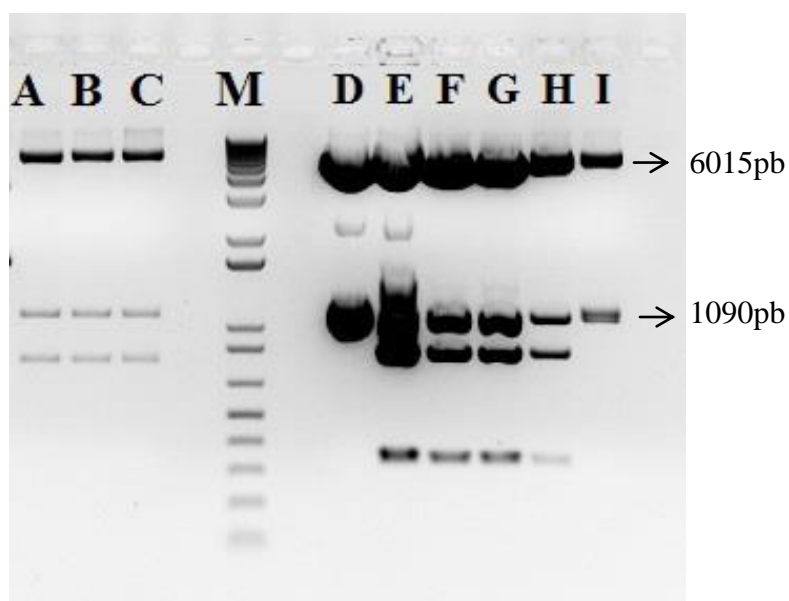


Figura 4: Análise dos DNAs plasmidiais digeridos com a enzima BsrGI, para visualização dos padrões de bandas dos diferentes clones. A- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 3G11.1 de *E. coli*. B- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 3G11.2 de *E. coli*. C- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 3G11.3 de *E. coli*. D- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 3F11.1 de *E. coli*. E- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 3F11.2 de *E. coli*. F- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 3F11.3 de *E. coli*. G- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 3F11.4 de *E. coli*. H- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 3F11.5 de *E. coli*. I- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 3F11.6 de *E. coli*. M representa o Marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder Invitrogen®. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Na Figura 5 estão representadas as digestões referentes aos clones de *E. coli* relativas às colônias de levedura 3A12 e 3H11. A transformação de *E. coli* com os plasmídeos encontrados no clone de levedura 3A12 resultou em 6 inóculos e, portanto, em 6 digestões, as quais apresentaram 3 padrões distintos de digestão, representados pelos clones 3A12.1, 3A12.5 e 3A12.6, os quais foram selecionados para sequenciamento. Já a transformação de *E. coli* com os plasmídeos encontrados no clone de levedura 3H11 resultou em 5 inóculos e, portanto, em 5 digestões. Estas digestões

apresentaram apenas um padrão de banda, representado pelo clone 3H11.5, o qual foi selecionado para sequenciamento.



Figura 5: Análise dos DNAs plasmidiais digeridos com a enzima BsrGI, para visualização dos padrões de bandas dos diferentes clones. A- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 3A12.1 de *E. coli*. B- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 3A12.2 de *E. coli*. C- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 3A12.3 de *E. coli*. D- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 3A12.4 de *E. coli*. E- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 3A12.5 de *E. coli*. F- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 3A12.6 de *E. coli*. G- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 3H11.1 de *E. coli*. H- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 3H11.2 de *E. coli*. I- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 3H11.3 de *E. coli*. J- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 3H11.4 de *E. coli*. K- digestão do DNA plasmidial extraído do clone 3H11.5 de *E. coli*. M representa o Marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder Invitrogen®. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

4.4. Identificação dos putativos parceiros de interação da FEF1

Após a seleção dos clones de interesse, os cDNAs correspondentes foram sequenciados uma vez cada, na direção *forward*, a partir de uma região anterior ao sítio de recombinação dos plasmídeos, de modo que possibilitasse a sua identificação. Estas sequências foram analisadas a partir da busca por similaridades com o programa TBLASTX nos bancos de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e TAIR (*The Arabidopsis Information Resource* - www.arabidopsis.org/). Este programa traduz a sequência de nucleotídeos em aminoácidos, nas seis fases de leitura possíveis. Por fim, estas sequências são

comparadas com outras sequências de nucleotídeos também traduzidas em todas as seis fases de leitura possíveis, as quais estão armazenadas nestes bancos de dados.

Os *top hits*, ou seja, os resultados com maior cobertura de sequência, maior identidade de aminoácidos entre as sequências e menor e-value (probabilidade de que a similaridade ocorra ao acaso), foram considerados como resultados relevantes e foram anotados. Porém algumas sequências apresentaram similaridades extremamente baixas ou nenhuma similaridade significativa (e-value maior que e-05) no banco de dados. Os resultados obtidos estão descritos na tabela a seguir.

Colônia de levedura	Clone de <i>E. coli</i>	<i>Top hits</i> no NCBI	<i>Top hits</i> no TAIR
1F6	1F6.1	Rattus norvegicus ral guanine nucleotide dissociation stimulator (Ralgds), transcript variant X3, mRNA	Nenhuma correspondência
	1F6.3	Sequenciamento Ruim	Sequenciamento Ruim
	1F6.4	Petunia x hybrida SKP1-like protein 4 (PSK4) mRNA, complete cds	ARABIDOPSIS SKP1 HOMOLOGUE 1, ASK1, ATSKP1, S PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 1, SKP1, SKP1A, UFO INTERACTING PROTEIN 1, UIP1
	1F6.5	Solanum lycopersicum uncharacterized LOC101264258, transcript variant 1 (LOC101264258), mRNA	cyclin-related
1A8	1A8.2	Solanum tuberosum transcription factor VOZ1-like (LOC102585134), mRNA	ATVOZ1, VASCULAR PLANT ONE ZINC FINGER PROTEIN, VOZ1
1D8	1D8.1	Petunia x hybrida SKP1-like protein 4 (PSK4) mRNA, complete cds	SKP1, ASK1, ATSKP1, SKP1A, UIP1
1E8	1E8.3	Nicotiana tabacum cultivar Samsun NN SKP1 (SKP1) mRNA, complete cds	SKP1, ASK1, ATSKP1, SKP1A, UIP1
1G8	1G8.1	Petunia x hybrida SKP1-like protein 4 (PSK4) mRNA, complete cds	ASK2, SKP1B E3 ubiquitin ligase
1A9	1A9.1	N. tabacum mRNA for aquaporin 1	GAMMA-TIP, TIP1;1, GAMMA-TIP1
1B9	1B9.2	PREDICTED: Solanum tuberosum pollen-specific protein C13-like (LOC102594254), mRNA	SAH7 Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein

	1B9.4	PREDICTED: Solanum tuberosum protein SPIRAL1-like 1-like (LOC102587138), mRNA	SP1L1 SPIRAL1-like1
	1B9.5	Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL1019DD11, HTC in leaf (score baixo)	unknown protein
1D9	1D9.1	PREDICTED: Solanum tuberosum uncharacterized LOC102590724 (LOC102590724), transcript variant X1, mRNA	URT1, UTP:RNA URIDYLYLTRANSFERASE 1
1E9	1E9.1	PREDICTED: Solanum tuberosum uncharacterized LOC102590724 (LOC102590724), transcript variant X1, mRNA	gypsy-like retrotransposon family (Athila)
1F9	1F9.5	Solanum pennellii chromosome ch01, complete genome	ATTCP11, TCP DOMAIN PROTEIN 11, TCP11
1G9	1G9.6	PREDICTED: Solanum tuberosum uncharacterized LOC102590724 (LOC102590724), transcript variant X1, mRNA	URT1, UTP:RNA URIDYLYLTRANSFERASE 1
1H10	1H10.3	PREDICTED: Solanum tuberosum transcription factor VOZ1-like (LOC102585134), mRNA	ATVOZ1, VASCULAR PLANT ONE ZINC FINGER PROTEIN, VOZ1
1A11	1A11.1	Petunia x hybrida SKP1-like protein 4 (PSK4) mRNA, complete cds	ARABIDOPSIS SKP-LIKE 2, ASK2, SKP1B
1B11	1B11.1	PREDICTED: Solanum tuberosum transcription factor TCP7-like (LOC102605188), mRNA	ATTCP11, TCP DOMAIN PROTEIN 11, TCP11
	1B11.5	Nicotiana tabacum NtLTP1 gene for lipid transfer protein, complete cds	IAA18, INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 18
1C11	1C11.2	Nicotiana tabacum cultivar Samsun NN SKP1 (SKP1) mRNA, complete cds	ARABIDOPSIS SKP-LIKE 2, ASK2, SKP1B

1D11	1D11.1	Sequenciamento Ruim	Sequenciamento Ruim
1C10	1C10.1	TCP14 de tomate	TCP7
1E10	1E10.1	TCP14 de tomate	TCP7
1G10	1G10.3	Solanum tuberosum uncharacterized LOC102590724 (LOC102590724), transcript variant X1, mRNA (Semelhante à SIP1)	AT3G58630.1 sequence-specific DNA binding transcription factors
3F11	3F11.1	Solanum tuberosum 40S ribosomal protein SA-like (LOC102601057), mRNA	40S RIBOSOMAL PROTEIN SA, AP40, P40, RP40, RPSAA
	3F11.5	Solanum lycopersicum 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase-like (LOC101250617), mRNA	ATMS2, METHIONINE SYNTHASE 2, MS2
3G11	3G11.1	Nicotiana tabacum cultivar Samsun NN SKP1 (SKP1) mRNA, complete cds	ARABIDOPSIS SKP1 HOMOLOGUE 1, ASK1, ATSKP1, S PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 1, SKP1, SKP1A, UFO INTERACTING PROTEIN 1, UIP1
3H11	3H11.5	Nicotiana tabacum cultivar Samsun NN SKP1 (SKP1) mRNA, complete cds	ARABIDOPSIS SKP1 HOMOLOGUE 1, ASK1, ATSKP1, S PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 1, SKP1, SKP1A, UFO INTERACTING PROTEIN 1, UIP1
3A12	3A12.1	Solanum lycopersicum MOB kinase activator-like 1-like (LOC101260752), mRNA	MOB1-LIKE
	3A12.5	N.tabacum tts-1 mRNA	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein

	3A12.6	Oryza sativa mRNA for phosphatidylinositol synthase	DNA-binding storekeeper protein-related transcriptional regulator
3H10	3H10.1	SKP1	SKP1
3C11	3C11.3	Nicotiana attenuata isolate SAMS 140 SAMS synthase mRNA, complete cds	SAM1, SAM-1, MAT1, AtSAM1 S-adenosylmethionine synthetase 1
3D11	3D11.3	Solanum lycopersicum dehydroquinase synthase (LOC544273), mRNA/	3-dehydroquinase synthase, putative
3E11	3E11.3	PREDICTED: Solanum tuberosum probable serine/threonine-protein kinase kinX-like (LOC102593458), transcript variant X1, mRNA	PHD finger family protein

4.5 Reteste das interações através de ensaio de duplo híbrido

Após a identificação das sequências codificadoras de possíveis parceiros de interação de FEF1, três destes candidatos foram selecionados para a realização de um reteste par-a-par, em condições isoladas para confirmar se as interações entre estas proteínas realmente ocorrem. As proteínas escolhidas para o reteste foram consideradas de maior interesse devido ao seu possível papel relacionado à regulação da transcrição gênica ou ao ciclo celular. Além disso, foi dada preferência a novos possíveis candidatos que ainda não haviam sido analisados nos trabalhos de mestrado dos biólogos Samantha Vieira Abbad (2012) e Luis Fernando Roberto (projeto em andamento). Nestes trabalhos anteriores, foi feita a confirmação da interação da FEF1 com as proteínas: SKP1, VOZ1, SIP1 e as TCPs.

Os candidatos escolhidos para o presente trabalho foram uma *SIP1-like* (referente ao clone de *E. coli* 1G10.3), uma *MOB1-like* (referente ao clone de *E. coli* 3A12.1) e uma *storekeeper* (referente ao clone de *E. coli* 3A12.6). As duas últimas proteínas foram encontradas em clones de *E. coli* diferentes, porém que vieram de uma

mesma colônia de leveduras da placa 3 do *screening* (3A12), o que indica que provavelmente apenas uma destas interações hipotéticas é real.

A placa do ensaio de duplo-híbrido foi incubada por 96h a 30°C e, então, fotografada para observação de quais colônias cresceram. Na Figura 6 é possível observar que apenas as colônias de levedura referentes aos controles positivos wt e m1, às repetições da autoativação da presa referente à *SIP1-like* e às repetições biológicas da interação entre FEF1 e *SIP1-like* cresceram. Nenhuma outra colônia referente à autoativação cresceu, assim como as colônias referentes às outras interações. Devido à auto-ativação da presa referente à *SIP1-like*, foram feitas mais três placas com meio seletivo sem histidina e contendo 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) em concentrações de 1mM, 3 mM e 5 mM, respectivamente. Este composto dificulta a auto-ativação, pois é um inibidor competitivo do produto do gene repórter HIS3. Porém, após duas semanas, nestas placas não foi observado o crescimento de nenhuma colônia além dos controles positivos.

	wt	m1	--	00	m2	--	a1.1	a1.2	a2.1	a2.2	a3.1	a3.2
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
	a4.1	a4.2	--	1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3

Figura 6: Ensaio de Y2H para avaliar as interações entre a proteína FEF1 e os três candidatos escolhidos em meio seletivo, sem o aminoácido histidina. Wt representa o controle positivo de interação forte e m1, o controle positivo de interação fraca. M2 e 00 (pDEST32 vazio com pDEST22 vazio) são controles negativos. A1.1 e a1.2 são repetições biológicas referentes à autoativação de SIP1-like. A2.1 e a2.2 são repetições biológicas referentes à autoativação de MOB1-like. A3.1 e a3.2 são repetições biológicas referentes à autoativação da storekeeper. A4.1 e a4.2 são repetições biológicas referentes à autoativação de FEF1. Os poços 1.1, 1.2, 1.3 são repetições biológicas referentes à interação de FEF1 com SIP1-like. Os poços 2.1, 2.2, 2.3 são repetições biológicas referentes à interação de FEF1 com MOB1-like. Os poços 3.1, 3.2, 3.3 são repetições biológicas referentes à interação de FEF1 com a storekeeper. Na linha A estão os ensaios de wt, m1, 00, m2, a1.1, a1.2, a2.1, a2.2, a3.1 e a3.2 e na linha C, as suas respectivas diluições. Na linha E estão os ensaios de a4.1, a4.2, 1.1, 1.2, 1.3, 2.1, 2.2, 2.3, 3.1, 3.2 e 3.3 e na linha G, as suas respectivas diluições.

5. Discussão

Como observado no reteste, realizado par-a-par, da FEF1 com cada uma das candidatas à interação, além dos controles positivos wt e m1, apenas cinco colônias cresceram. Destas cinco, três são repetições biológicas referentes a uma mesma interação, a de FEF1 com a proteína SIP1-*like* e duas são repetições referentes ao teste de autoativação desta mesma presa. Portanto, este resultado positivo não é conclusivo, ou seja, não se pode afirmar que realmente ocorre a interação entre as duas proteínas em questão, já que nas três colônias que cresceram, referentes à interação, poderia estar ocorrendo apenas a autoativação pela SIP1-*like* (presa).

As colônias de leveduras referentes à MOB1-*like* e à *storekeeper* não cresceram na placa de reteste com o meio seletivo e as colônias referentes à SIP1-*like* também não cresceram nas placas com 3-aminotriazol. Portanto, até o presente momento, mais de duas semanas após a realização dos ensaios, as interações não puderam ser comprovadas. Porém pode ser que estas possíveis interações sejam muito fracas já que na placa de *screening* original elas cresceram após 120 horas. Estes experimentos poderão ser repetidos em condições que favoreçam interações fracas ou em outros experimentos que analisem a interação de proteínas, como BiFC, *pull-down* e/ou co-*immunoprecipitação*.

Seria interessante se pudesse ser observada a ocorrência de uma real interação entre FEF1 e as candidatas selecionadas, pois segundo a literatura estas proteínas estão relacionadas ao ciclo celular e à regulação da expressão gênica a nível transcricional, processos intimamente relacionados ao desenvolvimento dos órgãos florais.

A proteína SIP1-*like* foi identificada no banco de dados TAIR como estando envolvida na regulação da transcrição gênica em *Arabidopsis thaliana*, o que significa que esta proteína é provavelmente um fator de transcrição. Assim como SIP1, a proteína *storekeeper*, também é descrita na literatura como sendo um fator de transcrição, possuindo, portanto, propriedades de ligação ao DNA (Zourelidou *et al.*, 2002). Os fatores de transcrição são proteínas que apresentam um domínio que reconhece uma ou mais sequências específicas no DNA e podem interagir com outros fatores e com a própria RNA polimerase, regulando positivamente ou negativamente a transcrição de diversos genes. Esta regulação específica atua no controle do desenvolvimento, diferenciação, proliferação e crescimento celular. Portanto, além de determinar o destino de cada célula individualmente, em última instância os fatores de transcrição

influenciam fortemente no desenvolvimento de tecidos e órgãos de organismos multicelulares (Tijan & Maniatis, 1994; Latchman, 2008; Spitz & Furlong, 2012).

Em estudos com a batata (*Solanum tuberosum*), foi encontrado que a *storekeeper* se liga a uma sequência específica do DNA, chamada B-box, promovendo a expressão do gene responsável por codificar a patatina, uma proteína de armazenamento presente nestes tubérculos (Zourelidou *et al.*, 2002). Já em pesquisas realizadas utilizando-se *Nicotiana tabacum*, esta proteína teve sua função relacionada à repressão da floração e à ativação do crescimento vegetativo (Bömer *et al.*, 2011). Portanto uma futura comprovação da interação desta proteína com FEF1 seria interessante no estudo da reprodução de *N. tabacum*, pois significaria que em algum momento do desenvolvimento do pistilo a *storekeeper* é degradada pela via ubiquitina-proteassoma, permitindo a floração.

Por fim, a proteína *MOB1-like* tem uma ampla distribuição entre os eucariotos, sendo encontrada em todos os organismos cujo genoma foi sequenciado (Vitulo *et al.*, 2007). Em organismos unicelulares, como protozoários ciliados, esta proteína tem a essencial função de definir a polaridade da célula, dirigindo corretamente o plano de divisão celular (Tavares *et al.*, 2011). Esta proteína é relacionada, na literatura, à ativação de kinases da família NDR, as quais desempenham papel crucial em vias de crescimento, proliferação celular e apoptose (Hergovich *et al.*, 2006; Vitulo *et al.*, 2007). Assim como nos organismos citados acima, em plantas e leveduras, a *MOB1-like* também apresenta envolvimento em processos celulares como divisão, crescimento e correta progressão no ciclo celular (Luca *et al.*, 2001; Citterio *et al.*, 2005a; Citterio *et al.*, 2005b).

Em flores de *Arabidopsis thaliana*, a proteína *MOB1-like* foi encontrada em concentrações consideravelmente maiores do que em outros órgãos e foi verificado que está ligada aos processos de megasporogênese e desenvolvimento do saco embrionário (Marino, 2009). Quando o gene codificador desta proteína foi silenciado em *Arabidopsis*, foram obtidas flores menores, com o tamanho do pistilo e das anteras reduzido, assim como foi observada também uma redução na fertilidade e defeitos na esporogênese e gametogênese (Galla *et al.*, 2011). Este resultado se assemelha aos obtidos no trabalho de mestrado de Samantha V. Abbad (2012) e pelo aluno Luis Fernando Roberto (mestrado em andamento), já que o silenciamento de FEF1 também resultou em diminuição das flores e dos pistilos. Porém, isto indicaria que estas duas proteínas não interagem, já que se elas interagissem e a FEF1 levasse a *MOB1-like* para

degradação, o silenciamento de ambas teoricamente deveria resultar em fenótipos opostos.

A correta regulação e controle do ciclo celular, da saída da mitose e da citocinese são de extrema importância para o desenvolvimento de organismos multicelulares, assegurando o número e tamanho adequado das células de cada tecido, através da proliferação e crescimento celular (Vitulo *et al.*, 2007). Sendo assim, a confirmação da degradação de *MOB1-like*, através da interação positiva com FEF1, seria de grande valor para a elucidação da maneira como a proteólise intracelular influencia o desenvolvimento da flor e do pistilo.

Além dos ensaios de Y2H, existem outras ferramentas que possibilitam o estudo de interações entre proteínas e poderão ser utilizados como alternativa ao duplo-híbrido para o re-teste das interações pretendido neste trabalho. Um exemplo é o ensaio de BiFC (*Bimolecular fluorescence complementation*), em que duas proteínas de interesse são fusionadas, respectivamente, aos fragmentos amino-terminal e carboxi-terminal de uma proteína fluorescente. Estes fragmentos não apresentam fluorescência sozinhos, porém quando ocorre a interação entre as proteínas de interesse, a proteína fluorescente é reconstituída e emite fluorescência. Portanto, as interações podem ser confirmadas a partir da observação de fluorescência em equipamentos adequados (Kerppola, 2008; Kodama & Hu, 2012). Outra alternativa é o ensaio de *pull-down*, em que uma das proteínas de interesse é ligada a uma coluna e, então, é passado um extrato de proteínas contendo a outra proteína de interesse por essa coluna. Após sucessivas lavagens e liberação das proteínas da coluna, a presença de cada uma das candidatas à interação é feita com anticorpos específicos (Rédei, 2008).

6. Referências Bibliográficas

- ABBAD, S. V. (2012). Caracterização de um novo gene da família F-box expresso no pistilo de *Nicotiana tabacum* L. 144f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, Brasil.
- ALVAREZ-BUYLLA, E. R.; BENITEZ, M.; CORVERA- POIRÉ, A.; CADOR, A. C.; FOLTER, S.; BUEN, A. G.; GARAY-ARROYO, A.; GARCIA-PONCE, B.; JAIMES-MIRANDA, F.; PEREZ-RUIZ, R. V.; PINEYRO-NELSON, A.; SANCHEZ-CORRALEZ, Y. E. (2010). Flower Development. American Society of Plant Biologists. The Arabidopsis Book.
- AUERBACH, D.; STAGLJAR, I. (2005). Yeast Two-Hybrid Protein-Protein Interaction Networks. Protein Reviews. Volume 3: Proteomics and Protein-Protein Interactions: Biology, Chemistry, Bioinformatics and Drug Design.
- BAI, C.; SEN, P.; HOFMANN, K.; MA, L.; GOEBL, M.; HARPER, J. W.; ELLEDGE, S. J. (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*. 86:263-274.
- BELL, J.; HICKS, G. (1976). Transmitting tissue in the pistil of tobacco: light and electron microscopic observations. *Planta* 131: 187-200.
- BÖMER, M.; UHRIG, J. F.; JACH, G.; MULLER, K. J. (2011). Increased vegetative development and sturdiness of storekeeper-transgenic tobacco. *Central European Journal of Biology*. 6(3):342-351.
- CITTERIO, S.; ALBERTINI, E.; VAROTTO, S.; FELTRIN, E.; SOATTIN, M.; MARCONI, G.; SGORBATI, S.; LUCCHIN, M.; BARCACCIA, G. (2005a). Alfalfa Mob1-like genes are expressed in reproductive organs during meiosis and gametogenesis. *Plant Molecular Biology*. 58:789–807.
- CITTERIO, S.; PIATTI, S.; ALBERTINI, E.; AINA, R.; VAROTTO, S.; BARCACCIA, G. (2005b). Alfalfa Mob1-like proteins are involved in cell proliferation and are localized in the cell division plane during cytokinesis. *Experimental cell research* 312:1050–1064.
- COEN, E. S.; MEYEROWITZ, E. M. (1991). The War of The Whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*. 353:31-37.
- DESHAIES, R. J.; JOAZEIRO, C. A. P. (2002). RING Domain E3 Ubiquitin Ligases. *Annu. Rev. Biochem.* 78:399–434.
- FIELDS, S.; SONG, O-K. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-246.

- GAGNE, J. M.; DOWNES, B. P.; SHIU, S. H.; DURSKEI, A. M.; VIERSTRA, R. D. (2002). The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Plant Biology*. 99: 11519–11524
- GALLA, G.; ZENONI, S.; MARCONI, G.; MARINO, G.; BOTTON, A.; PINOSA, F.; CITTERIO, S.; RUPERTI, B.; PALME, K.; ALBERTINI, E.; PEZZOTTI, M.; MAU, M.; SHARBEL, T. F.; STORME, N. D.; GEELLEN, D.; BARCACCIA, D. (2011). Sporophytic and gametophytic functions of the cell cycle-associated Mob1 gene in Arabidopsis thaliana L. *Gene*. 484:1–12.
- GANAPATHI, T. R.; SUPRASANNA, P.; RAO, P. S.; BAPAT, V. A. (2004). Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)-A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. *Indian Journal of Biotechnology* 3: 171-184.
- GIETZ, R. D.; TRIGGS-RAINE, B.; ROBBINS, A.; GRAHAM, K. C.; WOODS, R. A. (1997). Identification of proteins that interact with a protein of interest: Applications of the yeasttwo-hybrid system. *Molecular and Cellular Biochemistry* 172: 67-79.
- HELMANN, H.; ESTELLE, M. (2002). Plant Development: Regulation by Protein Degradation. *Science*. 297: 793-797.
- HERGOVICH, A.; STEGERT, M. R.; SCHMITZ, D.; HEMMING, B. A. (2006). NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans. *Nature reviews | Molecular cell biology*. 7:253-264.
- HERSHKO, A. (2005). The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group. 12:1191–1197.
- HUA, Z.; VIERSTRA, R. D. (2011). The Cullin-RING Ubiquitin-Protein Ligases. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62:299–34.
- KERPPOLA, T. K. (2008). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys.* 37: 465–487
- KIPREOS, E. T.; PAGANO, M. (2000). The F-box protein family. *Genome Biology* 5: 3002.1-3002.7.
- KODAMA, Y.; HU, C. D. (2012). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): A 5-year update and future perspectives. *BioTechniques*. 53:285-298.
- KOLTUNOW, A. M.; TRUETTNER, J.; COX, K. H.; WALLROTH, M.; GOLDBERG, R. B. (1990). Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* 2: 1201-1224
- KOMEDA, Y. (2004). Genetic regulation of time to flower in arabidopsis thaliana. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:521–35.

LUCA, F. C.; MODY, M.; KURISCHKO, C.; ROOF, D. M.; GIDDINGS, D. H.; WINEY, M. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* Mob1p Is Required for Cytokinesis and Mitotic Exit. *Mol. Cell. Biol.* 21(20):6972.

MARINO, G. (2009). Functional analysis of Mob-like genes in *Arabidopsis thaliana*. Dissertação Ph.D. Università degli Studi di Milano – Bicocca. Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali. Corso di Dottorato di Ricerca in Biologia.

PALMA, J. M.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; MACCARTHY, I.; RIO, L. A. D. (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisome. *Plant Physiol. Biochem.* 40:521–530.

POZO, J. C.; ESTELLE, M. (2000). F-box proteins and protein degradation: An emerging theme in cellular regulation. *Plant Molecular Biology* 44: 123-128.

QUIAPIM, A. C.; BRITO, M. S.; BERNANDES, L. A. S.; DA SILVA, I.; MALAVAZI, I.; DEPAOLI, H.C.; MOLFETTA-MACHADO, J. B.; GIULIATTI, S.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H. S. (2009). Analysis of the *Nicotiana tabacum* stigma/style transcriptome reveals gene expression differences between wet and dry stigma species. *Plant Physiology* 149: 1211-1230.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. (1996). *Biologia Vegetal*. Ed. Guanabara Koogan 728p.

RÉDEI, G. P. (2008). *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics*. 3rd edition. Springer.

SKAAR, J. S.; PAGAN, J. K.; PAGANO, M. (2013). Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.

SOELLICK, T. R.; UHRIG, J. F. (2001). Development of an optimized interaction-mating protocol for large-scale yeast two-hybrid analyses. *Genome Biology*. 2(12):research0052.1–0052.7

SPITZ, F.; FURLONG, E. E. M. (2012). Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nature Reviews Genetics*.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2010). *Plant Physiology* 5th edition. Sinauer Assoc. Inc, Sunderland MA, USA.

TAVARES, A.; GONÇALVES, J.; FLORINDO, C.; TAVARES, A. A.; SOARES, H. (2011). Mob1: defining cell polarity for proper cell division. *Journal of Cell Science* 125:516–527.

THEISSEN, G.; SAEDLER, H. (2001). Floral quartets. *Plant biology. News and views. Nature*.

TIJAN, R.; MANIATIS, T. (1994). Transcriptional Activation: A Complex Puzzle with Few Easy Pieces. *Cell*. 77:5-8.

VAN HOOFF, L. (2011). Organismal Biology. Disponível em: http://bioweb.uwlax.edu/bio203/2011/vanhoof_logg/index.htm. Acesso em 30 de janeiro de 2013.

VARSHAVSKY, A. (2012). The Ubiquitin System, an Immense Realm. *Annu. Rev. Biochem.* 81:167–76.

VITULO, N.; VEZZI, A.; GALLA, G.; CITTERIO, S.; MARINO, G.; RUPERTI, B.; ZERMIANI, M.; ALBERTINI, E.; VALLE, G.; BARCACCIA, G. (2007). Characterization and Evolution of the Cell Cycle-Associated Mob Domain-Containing Proteins in Eukaryotes. *Evolutionary Bioinformatics.* 3:121–158.

WELLMER, F.; RIECHMANN, J. L. (2010). Gene networks controlling the initiation of flower development. *Cell Press.* 26: 519-527.

ZOURELIDOU, M.; TORRES-ZABALA, M.; SMITH, C.; BEVAN, M. W. (2002). Storekeeper defines a new class of plant-specific DNA-binding proteins and is a putative regulator of patatin expression. *The Plant Journal.* 30(4):489-497.