

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

**Estudo de FEF1, uma F-box do complexo SCF envolvida
com a proliferação celular no pistilo de *Nicotiana
tabacum* L.**

Luis Fernando Roberto

Ribeirão Preto

2015

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

**Estudo de FEF1, uma F-box do complexo SCF envolvida
com a proliferação celular no pistilo de *Nicotiana
tabacum* L.**

Luis Fernando Roberto

**Dissertação apresentada ao
departamento de Genética
da Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto como
parte das exigências para a
obtenção do título de mestre
em Ciências.**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman

Ribeirão Preto - SP

2015

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

Roberto, Luis Fernando

Estudo de FEF1, uma F-box do complexo SCF envolvida com a proliferação celular no pistilo de *Nicotiana tabacum* L.

Luis Fernando Roberto – Ribeirão Preto, 2015.

128 p.

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, Brasil.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman.

1. F-box. 2. Complexo SCF. 3. Estigma/Estilete. 4. Ovário. 5. Pistilo. 6. Proliferação celular. 7. TCP. 8. *Nicotiana tabacum*.

“Os reis deixaram aqui suas coroas e cetros;

Os heróis, suas armas.

Mas os grandes espíritos,

Cuja glória estava neles e não em coisas externas,

Levaram com eles sua grandeza.”

(Arthur Schopenhauer)

Agradecimentos

Eu só tenho a agradecer...

À profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman, por toda a paciência, dedicação e orientação. Poucas frases aqui não podem expressar toda a minha gratidão pela oportunidade em fazer parte do LBMP e por tudo o que você fez por mim. Agradeço e levo comigo todo o aprendizado para a vida.

Ao departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por todo o suporte e estrutura que me permitiram desenvolver o projeto.

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto pela disponibilização da estrutura para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de estudos que me permitiu dedicar-me exclusivamente a este trabalho (processo 130477/2013-3).

À CAPES, FAPESP e ao CNPq, por todo o auxílio financeiro disponibilizado para o desenvolvimento das pesquisas em nosso laboratório.

Ao prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, por disponibilizar o uso de microscópio de fluorescência e estrutura de seu laboratório.

Ao prof. Dr. Luis Lamberti Pinto da Silva, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela confiança em disponibilizar o uso do eletroporador e da estrutura de seu laboratório.

Ao prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, por disponibilizar o uso do micrótomo e estrutura de seu laboratório.

Ao prof. Dr. Roy Edward Larson e ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela utilização do microscópio confocal.

Ao prof. Dr. Ademilson Panunto Castelo, pela ajuda com as dúvidas sobre expressão e purificação proteica.

Ao prof. Dr. Emerson Ricardo Pansarin, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, pela disponibilização de reagentes e da estrutura de seu laboratório.

À Dra. Ludmila Mickeliunas Pansarin, por toda a ajuda com as técnicas de preparação de tecidos e análises histológicas.

Ao técnico Amauri Ramos Pinhal, por toda a ajuda com as preparações histológicas.

À Elizabete Rosa Milani pela ajuda com o uso do microscópio confocal e obtenção das fotos.

Ao Dr. José Ricardo Barosela e ao Dr. Michael dos Santos Brito, pela ajuda com a análise dos ovários.

À Dra. Andréa Carla Quiapim, técnica do nosso laboratório e grande colega nos trabalhos. Obrigado pela amizade, por todo o auxílio com os trabalhos e sequenciamentos, pelos almoços na copinha e por repetir a porção dos bolos de chocolate, aliviando qualquer sensação de culpa que eu tivesse por comê-los.

Ao técnico Paulo Rosa Junior, pela amizade, pela ajuda com a organização do laboratório e principalmente por nunca esquecer a autoclave ligada.

À Lígia, querida veterana que escapuliu da vida acadêmica na base do casório! Agradeço por toda a ajuda com as dúvidas de experimentos, almoços no bandeirão e principalmente pela amizade que se consolidou no laboratório.

Ao Pedro, querido calouro que tive o prazer de conhecer melhor no laboratório. Agradeço por toda a ajuda e discussões de experimentos, sem as quais a minha experiência no mestrado teria sido muito menos rica. Agradeço

especialmente pela amizade e espero que a minha ex-cama dure pelo menos até o fim do seu doutorado!

À Greice, por toda a ajuda com os experimentos, conversas, risadas, pimenta da sogra e principalmente pela amizade.

À Hebréia Oliveira Almeida, pela introdução ao mundo de trabalhos com proteína, pelos almoços, pelas conversas e principalmente pela amizade.

Ao Edward José Strini, pela amizade e convivência e por toda a ajuda com experimentos e dúvidas conceituais e práticas!

Ao Vitor Pinoti, pelos almoços na copinha regados à frango com batata-doce. Agradeço pela amizade e por lembrar-me repetidamente que eu não tinha decorado o significado de "TCP". Pelo menos durante a escrita da dissertação eu consegui!

À Francine Pessotti e ao Danilo Sasso Augusto, colegas de laboratório que sempre tornaram a convivência e rotina de trabalhos agradável e tranquila. Obrigado pela amizade.

Aos meus grandes amigos e companheiros de graduação. Canjica, Cenoia, Fumaça, Frango, Gameta, Garçom, Ket, Loba, Luigi, Mestre, Mixirica, Mulan, Pupa, Tênia, Toba, Úlcera e Zuado. Aqui encerro meu tempo na USP de Ribeirão Preto. A amizade continua forte, apesar da distância.

Especialmente à Isabela Lamante Scotton, que apesar de indignar-se com minhas idas ao laboratório em finais de semana à noite, obviamente porque uma solução precisava ser trocada, assentia e me esperava para sairmos. Mais do que uma grande companheira, você é minha melhor amiga e minha maior inspiração.

Aos meus pais e a minha irmã. Tudo começa com vocês e vocês são peça chave e indispensável em tudo que eu faço. Tenho que agradecer por tudo que veio antes deste trabalho e por tudo que virá depois. Obrigado por sempre pensarem em mim e no que me faz feliz.

Sumário

Abreviaturas	I
Resumo	II
Abstract	IV
1. Introdução	1
1.1 As Angiospermas e a importância das flores	1
1.2 Sinalização por ubiquitinação	3
1.3 Proteínas F-box e a degradação pelo proteassomo	4
1.4 FEF1 e o desenvolvimento da flor de <i>Nicotiana tabacum</i>	6
1.5 Os fatores de transcrição TCP	8
2. Objetivos	11
3. Material e Métodos	12
3.1 Material Vegetal	12
3.1.1 Esterilização superficial das sementes e cultivo	12
3.1.2 Coleta e fixação do material biológico.....	13
3.1.3 Preparação do material histológico	14
3.1.4 Análise histológica	16
3.1.5 Medições dos pistilos	19
3.2 Produção das construções gênicas	20
3.2.1 Adição de sítios attB.....	21
3.2.2 Reações BP	22
3.2.3 Reações LR.....	22
3.3 Construções gênicas produzidas	24
3.3.1 Recombinações LR múltiplas	25
3.3.2 Recombinações LR simples	26
3.4 Manipulação de <i>Escherichia coli</i>	26
3.4.1 Preparo de <i>E. coli</i> eletrocompetentes	26
3.4.2 Transformação de <i>E. coli</i> competentes.....	27
3.4.3 Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	27
3.4.4 Digestão com enzimas de restrição.....	28
3.4.5 Limpeza com fenol/clorofórmio.....	29

3.5	Análise de fragmentos de DNA por eletroforese	29
3.6	Reações de sequenciamento	31
3.7	Manipulação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
3.7.1	Preparo de <i>A. tumefaciens</i> eletrocompetentes	32
3.7.2	Transformação de <i>A. tumefaciens</i> eletrocompetentes	32
3.7.3	Extração do DNA plasmidial de <i>A. tumefaciens</i>	32
3.7.4	PCR de confirmação da presença do DNA plasmidial em <i>A. tumefaciens</i>	33
3.8	Screening de duplo-híbrido	34
3.8.1	Recuperação do DNA plasmidial de leveduras	34
3.8.2	Identificação dos possíveis parceiros de interação de FEF1	35
3.8.3	Preparo de células de <i>S. cerevisiae</i> competentes	36
3.8.4	Transformação de leveduras para confirmação de interações	36
3.8.5	Ensaio de duplo-híbrido para a confirmação de interações	37
3.9	Expressão transiente em <i>Nicotiana benthamiana</i> – Complementação da Fluorescência Bimolecular (BiFC)	38
3.10	Expressão heteróloga e análise de proteínas	39
3.10.1	Expressão heteróloga em <i>E. coli</i>	39
3.10.2	Extração de proteínas bacterianas através de lise celular	41
3.10.3	Análise de proteínas por SDS-PAGE	41
3.10.4	Análise por Western Blot	42
3.10.5	Purificação de proteínas por cromatografia de afinidade	43
3.11	Meios de cultura e soluções	44
3.12	Antibióticos usados	45
4.	Resultados	47
4.1	Análise fenotípica das plantas transgênicas	47
4.1.1	Análise fenotípica macroscópica do pistilo	47
4.1.2	Análise histológica do pistilo	53
4.2	Estudo das interações proteicas com FEF1	63
4.2.1	Ensaio de duplo-híbrido em leveduras	63
4.2.2	Obtenção das construções para BiFC	65

4.2.3 Confirmação da interação entre FEF1 e SKP1 por BiFC.....	71
4.3 Expressão heteróloga da proteína His-FEF1.....	72
4.4 Expressão heteróloga da proteína His-NtTCP11.....	75
5. Discussão	81
5.1 FEF1 interage com SKP1 de <i>Nicotiana tabacum</i>	81
5.2 Alterações fenotípicas no pistilo das plantas transgênicas.....	82
5.3 Parceiros de interação de FEF1	86
5.4 Expressão das proteínas 6xHis-FEF1 e 6xHis-TCP	92
6. Conclusões	94
7. Referências Bibliográficas	95
Anexos	101

Abreviaturas

AD (*A*ctivation *D*omain – domínio de ativação do fator de transcrição GAL4)

atm (atmosferas, unidade de medida de pressão)

DBD (*D*N*A* *B*inding *D*omain – domínio de ligação ao DNA de GAL4)

BiFC (*B*imolecular *F*luorescence *C*omplementation)

CDS (*C*oding *s*equ*e*nce – sequência codificadora de uma proteína)

FEF1 (*F*lower *E*xpressed *F*-box 1)

GFP (*G*reen *F*luorescent *P*rotein)

hGFP (*h*ead *G*reen *F*luorescent *P*rotein – fragmento N-terminal da GFP)

His (Histidina)

LB (Luria-Bertani – meio de cultura para bactérias)

Leu (Leucina)

MS (Murashige & Skoog – meio de cultura para plantas)

NCBI (*N*ational *C*enter for *B*io*t*echnology *I*nformation)

OD₆₀₀ (*O*ptical *D*ensity, absorvância a 600 nm)

p35S (Promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor)

pb (pares de bases)

PCR (*P*olymerase *C*hain *R*eaction, reação em cadeia da polimerase)

rpm (rotações por minuto)

SCF (*S*KP1, *C*UL1, *F*-box)

SD (*S*ynthetic *D*efined – meio de cultura para leveduras)

SDS-PAGE (*S*odium *D*odecyl *S*ulfate – *P*olyacrylamide *G*el *E*lectrophoresis)

TCP (*T*EOSINTE *B*RANCHED 1, *C*YCLOIDEA, *P*ROLIFERATING *C*ELL *F*ACTOR)

tGFP (*t*ail *G*reen *F*luorescent *P*rotein – fragmento C-terminal da GFP)

Trp (Tryptofano)

Estudo de FEF1, uma F-box do complexo SCF envolvida com a proliferação celular no pistilo de *Nicotiana tabacum* L.

Resumo

O desenvolvimento dos órgãos vegetativos e florais das angiospermas depende da ação combinada e finamente regulada de eventos de proliferação e expansão celular. Estudar os genes envolvidos com a regulação destes processos permite ampliar nossa compreensão sobre o desenvolvimento da flor, de seus diferentes órgãos, do processo reprodutivo como um todo, além de permitir produzir modificações de interesse econômico. Um gene codificando uma proteína da família F-box foi identificado na biblioteca TOBEST de cDNAs de estigma/estilete de *N. tabacum* (Quiapim et al., 2009; Abbad, 2012). A maioria das proteínas F-box pertence ao complexo SCF (formado principalmente pelas proteínas SKP1, CUL1 e F-box), participando da marcação de proteínas alvo para a degradação pela via ubiquitina-proteassomo. O gene identificado no TOBEST demonstrou expressão preferencial nos órgãos florais e foi denominado FEF1 (*Flower Expressed F-box 1*). Plantas de silenciamento e superexpressão deste gene indicaram alterações no tamanho dos órgãos florais, incluindo o pistilo, foco principal de estudo em nosso laboratório (Abbad, 2012). O *screening* de duplo-híbrido de uma biblioteca de cDNAs de estigma/estilete de *N. tabacum* identificou a interação com uma SKP1, indicando que a FEF1 poderia atuar junto ao complexo SCF (Abbad, 2012). No presente trabalho foram realizadas análises macroscópicas e microscópicas em pistilos de plantas transgênicas da geração T1, que permitiram: 1) verificar a estabilidade dos transgenes e das alterações fenotípicas na descendência; 2) quantificar e analisar estatisticamente as alterações de tamanho do pistilo; e 3) verificar as alterações em nível celular, que resultaram nas alterações do tamanho do pistilo, ocorridas nas plantas transgênicas. As plantas de silenciamento apresentaram redução estatisticamente significativa do comprimento de pistilos e da largura dos ovários. As análises histológicas permitiram verificar que ocorreu a redução da proliferação celular na zona

secretória do estigma e no parênquima do ovário destas plantas. Por outro lado, as plantas de superexpressão demonstraram aumento estatisticamente significativo do comprimento dos pistilos e da largura de estigmas e ovários. Nestas plantas, foi verificado o aumento do número de células na zona secretória do estigma e parênquima do ovário. A interação entre FEF1 e a SKP1 foi confirmada em experimento de BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*), corroborando a participação dessa F-box no complexo SCF. A interação entre estas proteínas ocorre no citoplasma das células vegetais, indicando que este é o local de atuação de FEF1. A participação no complexo SCF confere a essa F-box o papel de seleção dos alvos a serem poliubiquitinados pelo complexo. A análise de candidatos do *screening* revelou três novos parceiros de interação de FEF1, todos fatores de transcrição da classe I da família TCP, relacionados com a regulação da proliferação celular. Estas proteínas são candidatas à degradação no proteassomo, sinalizada pela marcação promovida pelo complexo SCF^{FEF1}. Deste modo, propomos que a FEF1 desempenhe uma função na regulação do desenvolvimento e do tamanho final dos órgãos florais, mais especificamente do pistilo, através da regulação dos níveis de fatores de transcrição, como as TCPs aqui encontradas, envolvidas com o controle da proliferação celular.

Palavras-chave: 1. F-box. 2. Complexo SCF. 3. Estigma/Estilete. 4. Ovário. 5. Pistilo. 6. Proliferação celular. 7. TCP. 8. *Nicotiana tabacum*.

Study of FEF1, an SCF complex F-box involved with cell proliferation in the pistil of *Nicotiana tabacum* L.

Abstract

Angiosperms vegetative and flowering organs development depends on a combined influence of finely regulated events of cell proliferation and expansion. The study of genes involved with the regulation of these processes allows the expansion of our knowledge about the flower and its organs development, of the reproductive process and allows the production of modifications of economic interest. One gene coding for an F-box family protein was identified in the TOBEST stigma/style cDNA library of *N. tabacum* (Quiapim et al., 2009; Abbad, 2012). The majority of F-box proteins belong to the SCF (mainly composed of the SKP1, CUL1 and F-box proteins) complex, participating in the signalization of target proteins for degradation through the ubiquitin-proteasome pathway. The gene identified on TOBEST presented preferential expression on the floral organs and was named *FEF1* (*Flower Expressed F-box 1*). Transgenic plants silencing and overexpressing this gene indicated alteration of the floral organs, including the pistil, the main focus of study in our laboratory (Abbad, 2012). A yeast two-hybrid screening of a *N. tabacum* stigma/style cDNA library revealed the interaction with a SKP1 protein, indicating that FEF1 possibly functions with the SCF complex (Abbad, 2012). In the present work macroscopic and microscopic analysis of the pistils of T1 generation of transgenic plants were performed, which allowed us to: 1) Confirm the transgene and phenotypic stability through generations; 2) Quantify and statistically analyze the size alterations on the pistils; 3) Analyze the cellular modifications that produced the pistils size alterations observed in the transgenic plants. The plants silencing FEF1 presented a statistically significant reduction of the pistil length and ovary width. Histological analysis allowed the observation that a reduction in cell proliferation occurred in the secretory zone of the stigma and in the ovary parenchyma. On the other hand,

overexpression plants presented statistically significant enlargement of pistil length and of stigma and ovary width. In these plants it was observed an increase in cell number in the stigma secretory zone and ovary parenchyma. The interaction between FEF1 and SKP1 was confirmed on a BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation), reinforcing the participation of this F-box protein in the SCF complex. The interaction between these proteins was observed to occur in the cytoplasm of plant cells, indicating that this is the cellular compartment of FEF1 action. The participation in the SCF complex confers this F-box the role of selecting targets for polyubiquitination by the complex. The analysis of candidates of the screening revealed three new interaction partners of FEF1, all of them transcription factors of the class I TCP family, related to the regulation of cell proliferation. These proteins are candidates for degradation by the proteasome, signaled by the polyubiquitination promoted by the SCF^{FEF1} complex. We propose that FEF1 has a role in the regulation of the development and final size of the floral organs, particularly the pistil, by regulation the levels of transcription factors like the TCPs here revealed, involved with the control of cell proliferation.

Key-words: 1. F-box. 2. SCF complex. 3. Stigma/Style. 4. Ovary. 5. Pistil. 6. Cell proliferation. 7. TCP. 8. *Nicotiana tabacum*.

1. Introdução

1.1 As Angiospermas e a importância das flores

As angiospermas são o grupo mais diverso de plantas terrestres, conquistando dominância global por volta de 90 milhões de anos atrás. O sucesso obtido pelas angiospermas é atribuído principalmente a características anatômicas (como os elementos de vaso e elementos de tubo crivado nos tecidos vasculares) e químicas (como as toxinas de defesa contra herbívoros e doenças causadas por fungos ou bactérias) especializadas. Uma dessas características, que parece ter sido fundamental para o sucesso na competição com outros grupos de plantas, foi o surgimento da flor. Esta estrutura reprodutiva reúne os órgãos produtores de gametas e é exclusiva da Divisão Angiospermae (Raven, 1996).

A flor é dividida nos verticilos estéreis, cálice (conjunto das sépalas) e corola (conjunto das pétalas), e em verticilos férteis, o androceu e o gineceu. O androceu das flores é o conjunto de órgãos masculinos, composto por filete e antera. O gineceu é o conjunto de órgãos femininos da planta, formado pela reunião dos pistilos, os quais são subdivididos em ovário, estilete e estigma (Raven, 1996). A especialização desses verticilos ao longo do tempo evolutivo parece ter sido fundamental para o sucesso adaptativo observado nas plantas com flores. Essa especialização permitiu a associação com animais polinizadores devido à atração destes por características de cor, forma ou substâncias químicas presentes nas sépalas, pétalas ou nos elementos do androceu e gineceu (Taiz & Zaiger, 2004). Estas associações facilitaram a ocupação dos mais diversos ambientes graças ao aumento da polinização cruzada, a qual permitiu maior variabilidade genética na formação do zigoto das angiospermas (Raven, 1996). O surgimento da flor, portanto, foi muito importante para o surgimento da diversidade de angiospermas que existe atualmente.

O pistilo efetua a discriminação dos grãos de pólen que chegam até o estigma, selecionando os compatíveis com a planta (Cornish et al., 1988). Estigma e estilete efetuem o reconhecimento e permitem a hidratação e

germinação de grãos de pólen compatíveis, os quais emitem um tubo polínico que cresce em direção aos óvulos contidos no ovário (Quiapim et al., 2009).

O desenvolvimento dos tecidos da flor depende de uma primeira etapa de intensa proliferação celular, seguida por uma etapa de expansão celular direcionada, gerando a forma final do órgão (Irish, 2010). Deste modo, o desenvolvimento da flor depende do ajuste fino da regulação de genes relacionados com proliferação e dos relacionados com expansão celular.

No Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP), o foco de estudo são os genes relacionados com o desenvolvimento e determinação de tecidos do pistilo e a angiosperma utilizada para isso é a planta modelo *Nicotiana tabacum*. Conhecida popularmente como tabaco, essa angiosperma pertence à família Solanaceae e é um alotetraplóide, derivado da hibridação de duas espécies de plantas: *Nicotiana sylvestris*, como parental materno, e *Nicotiana tomentosiformis*, como parental paterno (Yukawa et al., 2006). *N. tabacum* é um modelo de estudo interessante por alguns motivos: apresenta ciclo de vida relativamente curto em comparação a outras espécies (4-5 meses), aclimata-se bem ao ambiente tropical, apresenta facilidade de seu cultivo *in vitro* e possui protocolos bem estabelecidos de transformação genética. É um modelo especialmente interessante para o estudo do desenvolvimento floral e reprodução, pois possui flores grandes, com órgãos florais facilmente identificáveis. Além disso, o desenvolvimento da flor já foi bem descrito por Koltunow e colaboradores (1990), sendo divididos em 12 estádios.

Para identificar e caracterizar genes relacionados com o desenvolvimento do pistilo foi construída uma biblioteca de cDNAs de estigma/estilete de *Nicotiana tabacum* no LBMP, a qual permitiu, após o sequenciamento dos cDNAs, a criação do banco de dados TOBEST (*Tobacco Expressed Sequence Tags*) (Quiapim et al., 2009). Com a criação deste banco, alguns genes passaram a ser foco de interesse para o Laboratório, entre eles um gene que codifica uma proteína F-box, de expressão preferencial nos órgãos florais (Abbad, 2012). As proteínas F-box têm ganhado destaque no estudo de biologia molecular de plantas devido à sua participação nas vias de ubiquitinação e consequente

degradação de proteínas pelo proteassomo 26S (Chen & Hellmann, 2013). A via ubiquitina-proteassomo parece ter sido essencial para as plantas, possivelmente devido ao modo de vida sésil, permitindo um ajuste rápido e flexível às variações de condições fisiológicas e ambientais (Chen & Hellmann, 2013).

1.2 Sinalização por ubiquitinação

A ubiquitinação é um processo de adição de moléculas de ubiquitina a um substrato proteico. A proteína ubiquitina é associada ao substrato pela formação de uma ligação covalente entre o grupo terminal carboxila da ubiquitina e um grupo amina de um aminoácido lisina do substrato (Vucic et al., 2011). O processo de ligação da ubiquitina depende, no entanto, de uma cascata enzimática que inclui a ação de três enzimas: E1, enzimas ativadoras de ubiquitina, E2 enzimas conjugadoras e E3, enzimas de ligação de ubiquitina (Vierstra, 2009; Vucic et al., 2011; Mocciaro & Rape, 2012).

Substratos proteicos podem sofrer diferentes processos de ubiquitinação, os quais diferem pelo número de moléculas de ubiquitina que são associadas ao substrato, além da estrutura final formada. A adição de uma molécula única de ubiquitina produz uma proteína mono-ubiquitinada, porém a mono-ubiquitinação de diferentes resíduos de lisina do substrato proteico torna-o multi-mono-ubiquitinado. Por outro lado, quando moléculas de ubiquitina se ligam formando uma cadeia única, ligada a uma lisina do substrato, essa proteína torna-se poliubiquitinada (Kulathu & Komander, 2012). A proteína ubiquitina apresenta sete resíduos de lisina, sendo a cadeia de poliubiquitina formada pela ligação de cada nova ubiquitina a qualquer um destes resíduos da última proteína ligada à cadeia nascente (Mocciaro & Rape, 2012).

A estrutura formada durante a ubiquitinação determina o destino que a proteína terá no meio intracelular. Proteínas mono ou multi-mono-ubiquitinadas podem participar da regulação de uma gama diversa de processos (indução ou repressão gênica, endocitose, entre outros) (Vucic et al., 2011; Mocciaro & Rape, 2012). As proteínas poliubiquitinadas, por sua vez,

podem variar de destino dependendo da estrutura da cadeia de ubiquitina formada (Verhelst et al., 2011; Mocciaro & Rape, 2012). Cadeias formadas pela ligação de moléculas de ubiquitina pelo resíduo de lisina de número 11 ou 48 sinalizam a degradação do substrato, enquanto a ligação pelo resíduo de lisina 63 pode sinalizar a formação de complexos ou atuar na ativação de quinases (Mocciaro & Rape, 2012). A grande maioria dos processos de poliubiquitinação, entretanto, destina as proteínas à degradação em pequenas cadeias de oligopeptídeos no proteassomo 26s (Verhelst et al., 2011; Mocciaro & Rape, 2012).

1.3 Proteínas F-box e a degradação pelo proteassomo

F-box é uma família de proteínas que apresentam um domínio conservado na região amino-terminal que funciona como um sítio de ligação com outras proteínas (Kipreos & Pagano, 2000; Xu et al., 2009). A grande maioria das F-box foi descrita como sendo integrante do complexo SCF (composto pelas proteínas *SKP1*, *CUL1*, *F-box* e uma *Rbx1*) (Skowyra et al., 1997; Chen & Hellmann, 2013). Este pertence à classe de enzimas de ligação que efetuam a poliubiquitinação de determinados substratos proteicos. Complexos SCF somente realizam poliubiquitinação pela ligação de uma ubiquitina ao resíduo de lisina 48 de uma ubiquitina já ligada ao substrato (Mocciaro & Rape, 2012). As cadeias formadas por este tipo de ligação sinalizam substratos para a degradação proteica pelo proteassomo 26s (Vucic et al., Mocciaro & Rape, 2012). As proteínas F-box se ligam à proteína SKP1 (*S PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 1*) por seu domínio F-box, enquanto domínios contidos próximo à terminação carboxila podem auxiliar no reconhecimento de substratos (Kipreos & Pagano, 2000). Deste modo, são as F-box que determinam a especificidade de ligação ao substrato, determinando quais serão as proteínas poliubiquitinadas pelo complexo SCF e degradadas pelo proteassomo, regulando assim a atividade dessas.

A poliubiquitinação do substrato pelas enzimas de ligação de ubiquitina é um importante mecanismo de regulação pós-traducional da atividade de

proteínas. Essa regulação se mostra importante para a desativação de proteínas sintetizadas erroneamente ou que se tornaram biologicamente inativas, mas pode também ser parte da regulação de processos celulares, devido à degradação dos substratos envolvidos neles (Vierstra, 2009). Em plantas, os representantes da via ubiquitina-proteassomo constituem por volta de 5% do genoma total, sendo os componentes da classe E3 os mais abundantes, com até mais de 1000 genes (Chen & Hellmann, 2013; del Pozo & Manzano, 2014). Essa representatividade indica a enorme importância desta via de regulação nas redes de interação proteica no ambiente intracelular. Atualmente é atribuída a essa diversidade o envolvimento com respostas rápidas a variações ambientais e na regulação de processos envolvidos com o desenvolvimento dos tecidos das plantas (Vierstra, 2009; Chen & Hellmann, 2013).

Um exemplo interessante é o da F-box SKP2A de *Arabidopsis thaliana*. Alguns trabalhos (del Pozo et al., 2002; del Pozo et al., 2006) demonstraram que este componente do complexo SCF^{SKP2A} é responsável pelo reconhecimento dos fatores de transcrição E2FC (*E2-promoter binding fator C*) e DPB (*Dimerization partner B*). Estes fatores são repressores da expressão de genes da fase S do ciclo celular, impedindo a transição entre as fases G1 e S. Os autores demonstraram que a degradação de E2FC e DPB, mediada por SCF^{SKP2A}, permite a transcrição de genes da fase S do ciclo, garantindo a sua continuidade (del Pozo et al., 2002; del Pozo et al., 2006).

O envolvimento de proteínas F-box com a regulação das respostas à auxina também é um exemplo interessante da participação no ciclo celular. A proteína TIR1 (*TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1*) é uma F-box que se liga aos repressores transcricionais Aux/IAA, os quais se dimerizam com ARFs (*AUXIN RESPONSE FACTOR*), quando os níveis de auxina são baixos (del Pozo & Manzano, 2014). Os dímeros Aux/IAA-ARF se ligam aos promotores de genes responsivos à auxina, reprimindo sua transcrição. Quando os níveis de auxina aumentam no ambiente intracelular, as proteínas TIR1 e Aux/IAA interagem, funcionando como receptores de auxina (Dharmasiri et al., 2005; Kepinski & Leyser, 2005; Tan et al., 2007). Em seguida, a poliubiquitinação de

Aux/IAA por um complexo SCF^{TIR1} permite que os níveis desse repressor sejam drasticamente reduzidos, garantindo a formação de homodímeros de ARF, os quais promovem a transcrição de genes responsivos à auxina (del Pozo & Manzano, 2014). As variações nos níveis de auxina regulam a expressão de genes em diferentes fases do ciclo celular, deste modo TIR1 funciona como um importante co-receptor envolvido na mediação das respostas a este hormônio (del Pozo & Manzano, 2014).

A importância do complexo SCF, assim como especificamente a das F-box, torna-se, então, mais clara. A degradação de proteínas evita o acúmulo destas nas células e pode definir a ocorrência de processos chave como, por exemplo, a transição de fase no ciclo celular, já que a degradação de ciclinas que atuam em uma fase permite à célula entrar em uma nova fase (Kipreos & Pagano, 2000). Com o objetivo de estudar uma das F-box descobertas no banco de dados TOBEST de *Nicotiana tabacum*, um projeto foi iniciado por Abbad (2012), para verificar qual é o envolvimento dessa proteína com o desenvolvimento floral nessa espécie.

1.4 FEF1 e o desenvolvimento da flor de *Nicotiana tabacum*

No seu trabalho de mestrado, a Ms. Samantha Vieira Abbad designou como S/S_F-box (Stigma/Styl_e_F-box) a proteína F-box de *Nicotiana tabacum*, correspondendo ao clone 085H05, identificado na biblioteca TOBEST de cDNAs de estigmas/estiletos desta espécie. Durante os experimentos de caracterização inicial do gene correspondente, foi demonstrado que a expressão de S/S_F-box ocorre preferencialmente nos órgãos florais (Abbad, 2012). Como a denominação inicialmente sugerida para o gene em questão pode prover uma ideia errônea de expressão preferencial em estigma/estilete, propomos aqui a mudança do nome deste gene. Desta forma, no presente trabalho renomeamos S/S_F-box para FEF1 (Flower Expressed F-box 1), para refletir a sua expressão preferencial nos diferentes órgãos florais. Abbad (2012) também estudou o padrão de expressão de FEF1 durante os 12 estádios de desenvolvimento do estigma/estilete (Koltunow et al., 1990), encontrando maiores níveis de

expressão nos estádios mais tardios de desenvolvimento. Estes dados levaram Abbad (2012) à inferência de uma possível função importante no desenvolvimento dos órgãos florais e, especialmente, nos estádios tardios de desenvolvimento do pistilo.

Abbad (2012) desenvolveu plantas transgênicas de superexpressão e silenciamento (por RNAi) do gene correspondente à F-box. Para isso discos foliares de *N. tabacum* selvagens do cultivar *Petit Havana* SR1 foram usados para transformações com *Agrobacterium tumefaciens* da cepa C58C1RifR (pGV2260). Para a produção das plantas de superexpressão da F-box as plantas foram infectadas por *A. tumefaciens* carregando a construção no vetor pK7WG2 (Anexo 6.6). Este vetor permitiu a transferência do T-DNA das bactérias para as plantas transformadas, contendo a sequência codificante da FEF1 sob regulação do promotor viral p35S. Os transgênicos de silenciamento foram criados usando *A. tumefaciens* contendo a construção no vetor pK7GWIWG2 (Anexo 6.7) para a transformação. Um fragmento da sequência codificante de FEF1 foi inserido neste vetor, sendo uma sequência específica para esta F-box, evitando a alteração da função de outras F-box. A transcrição da sequência inserida no vetor forma um grampo de RNA, o qual desencadeia o processo de silenciamento gênico pós-transcricional nos alvos, neste caso o RNA mensageiro referente ao gene *FEF1*.

Em seu projeto de mestrado, Abbad (2012) observou um aumento do tamanho de ovários, estigmas e estiletos de plantas de superexpressão do gene *FEF1* e diminuição dessas estruturas em plantas de silenciamento desse gene. Essas observações fenotípicas iniciais apontam para uma aparente correlação dessa F-box com o desenvolvimento e crescimento do pistilo. No entanto, nenhuma quantificação das alterações de tamanho foi realizada para comprovação dessas observações fenotípicas. A análise detalhada das modificações a nível macroscópico e celular permitiria melhor compreender qual o papel de FEF1 durante o desenvolvimento do pistilo.

Com o intuito de estabelecer hipóteses que explicassem como a F-box pode causar alterações de tamanho, foi realizado o *screening* de uma biblioteca

de cDNAs de estigma/estilete de *N. tabacum*, clonados no sistema de duplo-híbrido em leveduras, tendo a proteína FEF1 como isca (Abbad, 2012). Ainda durante este trabalho, Abbad (2012) confirmou a interação entre FEF1 e três parceiros: SKP1 de *N. tabacum* (GenBank®: AY702087.1), uma proteína pertencente ao complexo SCF; VOZ1 (*v*ascular *p*lant *o*ne *z*inc *f*inger *p*rotein 1), um fator de transcrição, provável ortólogo de AT1G28520.1 de *Arabidopsis thaliana*; e SIP1 (*s*b-interacting *p*rotein 1) de *N. tabacum* (GenBank: AB072391.1), também um fator de transcrição. Estes resultados indicam que FEF1 codifica uma proteína F-box pertencente ao complexo SCF, envolvendo-se com o reconhecimento de proteínas que serão sinalizadas para a degradação no proteassomo. Além disso, a interação com VOZ1 e SIP1, fatores de transcrição que foram associados com a regulação da proliferação celular (Kitakura et al., 2002; Mimida et al., 2011), aponta o envolvimento de FEF1 com este processo (Abbad, 2012). Outra proteína encontrada como um possível parceiro de interação de FEF1 no *screening* da biblioteca foi o clone 2D6, um fator de transcrição da família TCP, que apresenta como ortólogo a TCP11 de *Solanum lycopersicum*. A interação entre esta proteína e FEF1, entretanto, não foi confirmada por Abbad (2012). As proteínas TCP também apresentam papéis na regulação da proliferação celular, como já descrito na literatura (Martín-Trillo & Cubas, 2010), ganhando atenção no presente trabalho.

1.5 Os fatores de transcrição TCP

A denominação *TCP* deriva dos primeiros genes desta família que foram descritos: *TEOSINTE BRANCHED 1*, *CYCLOIDEA* E *PROLIFERATING CELL FACTOR 1* (Martín-Trillo & Cubas, 2010). As proteínas TCP são fatores de transcrição exclusivos de plantas, agrupados em uma família de mesmo nome. Com base em um domínio conservado responsável pela interação com o DNA, estas proteínas podem ser classificadas em uma de duas classes existentes. A função prevista para as duas classes de genes TCP é tida como oposta, sendo as proteínas pertencentes à classe I relacionadas com a proliferação celular e o crescimento, enquanto as da classe II teriam papel na repressão desses

processos (Li et al., 2005; Martín-Trillo & Cubas, 2010). Essa proposta de oposição funcional entre as classes foi desenvolvida por Li e colaboradores (2005), os quais trabalharam com uma TCP da classe I. Os autores deste trabalho verificaram a ligação *in vivo* da TCP20 de *A. thaliana* a uma sequência consenso no promotor da ciclina *CYCB1;1*, do fator *PCNA* (*proliferating cell nuclear antigen*) e de três genes de proteínas ribossomais. Os autores demonstraram que a sequência consenso encontrada é responsável pela promoção da expressão destes genes. Li e colaboradores (2005) apontaram que a mesma sequência consenso ocorre em metade dos genes que codificam proteínas ribossomais. Além disso, proteínas TCP da classe II possuem sítios de ligação ao DNA muito semelhantes e que não são mutuamente excludentes com o da classe I. A regulação positiva dos marcadores de atividade do ciclo celular e de genes de biossíntese de ribossomos, assim como a passividade de ligação às mesmas sequências consenso, levou à proposição de que TCPs da classe I promovem a proliferação celular, enquanto as da classe II a inibem (Li et al., 2005). Segundo este trabalho as duas classes de TCPs poderiam apresentar grande sobreposição nos alvos de regulação, desempenhando funções opostas em diferentes etapas do desenvolvimento dos órgãos da planta.

Diversos autores reportaram grande redundância funcional dentre TCPs pertencentes à mesma classe (Hervé et al., 2009; Steiner et al., 2012a; Aguilar-Martínez & Sinha, 2013; Parapunova et al., 2014). Essa redundância dificulta o estudo da função destes fatores de transcrição por análises fenotípicas de plantas transgênicas *knock-out* para um, ou em alguns casos até mais genes da família (Martín-Trillo & Cubas, 2010; Aguilar-Martínez & Sinha, 2013). Uma nova técnica de repressão da função de fator de transcrição permitiu contornar este problema. Hiratsu e colaboradores (2003) desenvolveram uma técnica denominada CRES-T (*chimeric repressor silencing technology*), na qual um fator de transcrição quimérico tem sua atividade anulada por estar fusionado a um peptídeo repressor. Os autores fusionaram a sequência codificante de vários fatores de transcrição ao pequeno domínio EAR (*ERF-associated amphiphilic repression*) da classe II de proteínas ERF (*Ethylene-responsive element-binding*

factor). Cada construção foi transformada em *Arabidopsis thaliana* e as plantas transgênicas demonstraram modificação da função dos fatores de transcrição, tornando-se repressores dominantes dos alvos que regulam (Hiratsu et al., 2003). Deste modo o uso de CRES-T permite a produção de plantas transgênicas com fenótipo de perda de função mesmo em condições de grande redundância funcional. Por este motivo, esta técnica tem ganhado interesse em trabalhos com a família TCP, permitindo analisar o papel de cada membro da classe (Hervé et al., 2009; Kieffer et al., 2011; Aguilar-Martínez & Sinha, 2013).

O papel desempenhado pelas proteínas TCP da classe II foi mais bem esclarecido do que o da classe I, apresentando integrantes inibidores da proliferação celular em diversos órgãos (Crawford et al., 2004; Koyama et al., 2007). As funções de TCPs da classe I, por outro lado, permanecem menos claras. A redundância funcional e funções aparentemente paradoxais para alguns dos membros dessa classe são fatores que interferem com o consenso na função destes fatores de transcrição (Kieffer et al., 2011; Li et al., 2011; Steiner, 2012a; Steiner, 2012b).

O conjunto de dados obtido por Abbad (2012), sobre as modificações fenotípicas promovidas pela alteração na expressão de FEF1, indica que esta proteína pode se relacionar com a regulação da proliferação celular na flor. Esta função pode ser desempenhada através de sua interação com os fatores de transcrição encontrados pela autora no *screening* da biblioteca de duplo-híbrido, inclusive a proteína TCP. Aprofundar o conhecimento sobre o modo de atuação da proteína FEF1 pode contribuir para o entendimento dos fatores envolvidos com o desenvolvimento e a determinação do tamanho dos órgãos da flor.

2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi ampliar o conhecimento sobre a proteína FEF1, da família F-box, e melhor caracterizar o seu papel no desenvolvimento do pistilo de *Nicotiana tabacum*. Para isso, os seguintes objetivos específicos foram perseguidos:

- Verificação da estabilidade dos transgenes (silenciamento e superexpressão de FEF1) e das alterações fenotípicas nos descendentes (geração T1 de transgênicos);
- Quantificação e análise estatística das alterações de tamanho do pistilo;
- Realização de análises histológicas para verificar, em nível celular, a base das alterações de tamanho do pistilo, ocorridas nas plantas transgênicas.
- Confirmação da interação entre FEF1 e a SKP1 de *N. tabacum* e verificação da sua localização subcelular, por experimento de BiFC;
- Ampliar o conhecimento dos parceiros de interação de FEF1 através da continuação da análise do *screening* de duplo-híbrido, iniciado por Abbad (2012), e reteste dos candidatos identificados.

3. Material e Métodos

3.1 Material Vegetal

3.1.1 Esterilização superficial das sementes e cultivo

Neste trabalho foram utilizadas plantas de *Nicotiana tabacum* do cultivar Petit Havana SR1 e plantas de *Nicotiana benthamiana*. A primeira fase do cultivo das plantas de *N. tabacum* foi realizada *in vitro* e, para isso, foi feita a esterilização superficial das sementes, segundo o seguinte protocolo: lavagem por 1 minuto em etanol 70%, diluído a partir de etanol absoluto (*Merck*); lavagem em água destilada por 1 minuto; lavagem em vórtex por 40 minutos em água sanitária 5-7,5%, diluída a partir da água sanitária (10-15% *Sigma-Aldrich*) em água destilada; lavagem em vórtex por 20 minutos em água sanitária 5-7,5%, diluída a partir da água sanitária (10-15% *Sigma-Aldrich*) em água destilada; seis lavagens em água destilada abundante. Em seguida, as sementes foram deixadas secando por 24 horas em placas de Petri esterilizadas, com papel filtro autoclavado.

As sementes do cultivar SR1 (controle) foram germinadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) sólido (a composição deste e dos outros meios de cultura utilizados neste trabalho está descrita no item 3.11), sendo as transgênicas colocadas no meio MS sólido contendo canamicina (concentração final 200µg/mL), para a seleção da presença do transgene. As plântulas foram mantidas em câmara de germinação com temperatura (26°C) e luminosidade (12 horas de luz e 12 horas de escuro) controladas. Depois de germinarem e crescerem até aproximadamente 5 cm, as plântulas foram transferidas para saquinhos com substrato Bioplant® e continuaram sendo cultivadas em câmara de germinação com condições controladas de temperatura (22°C), umidade (55%) e luminosidade (12 horas de luz e 12 horas de escuro). Após crescerem até aproximadamente 20 cm, as plantas foram transferidas para vasos de 10 kg contendo o mesmo substrato e cultivadas em casa de vegetação com irrigação controlada.

As plantas de *N. benthamiana* usadas para os experimentos de BiFC foram cultivadas diretamente no substrato Bioplant®, sendo cultivadas em

câmara de germinação com condições controladas de temperatura (22°C), umidade (55%) e luminosidade (12 horas de luz e 12 horas de escuro). Após 6-10 semanas a partir da sementeira, foram utilizadas para os experimentos.

3.1.2 Coleta e fixação do material biológico

Flores do estágio 10 de desenvolvimento floral (Koltunow et al., 1990) foram utilizadas para a obtenção de pistilos que serviram para comparação histológica entre os grupos controle e de transgênicos (superexpressão e silenciamento) de FEF1. O estágio 10 foi escolhido por representar um dos estágios finais de desenvolvimento da flor, nos quais Abbad (2012) relatou ser muito evidente a diferença fenotípica entre os transgênicos. As flores, coletadas para a fixação dos tecidos do pistilo, foram colocadas em água imediatamente após a excisão das plantas, para evitar que bolhas se formassem nos tecidos vasculares. Após a separação do pistilo do resto dos verticilos florais, esse era colocado na solução fixadora: 2% glutaraldeído (*Sigma-Aldrich*), 1% paraformaldeído (*Synth*), 2% sacarose (*Sigma-Aldrich*), 0,05% cloreto de cálcio (*Sigma-Aldrich*), 0,1% Tween 20 (*Synth*), 100mM tampão MOPS (*Sigma-Aldrich*) pH7,0. Dentro do fixador estigma e ovário foram excisados para serem fixados na mesma solução com o auxílio de uma bomba à vácuo (*Bio-Rad*). Aplicou-se uma pressão de aproximadamente 15 mmHg por 24 horas. Após a retirada do fixador, os materiais foram lavados duas vezes em uma solução do tampão MOPS (100mM) pH7,0, Tween 20 (0,1%), cloreto de cálcio (0,05%) e sacarose (2%) para retirar todo o fixador. Em seguida, os órgãos foram lavados duas vezes em tampão MOPS 100mM pH7,0, por 30 minutos na primeira e 1 hora na segunda lavagem. Após a fixação, os órgãos foram transferidos para uma bateria de etanol diluído em água milli-Q, com soluções de concentração crescente (10%, 20%, 30%, 40%, 50% e 60%), sendo mantidos por 30 minutos em cada solução. Ao final, os materiais foram transferidos para uma solução de etanol 70%, na qual foram armazenados. Nesta solução de estoque, os materiais foram guardados em geladeira a 4°C, para posterior inclusão em Paraplast™ (*Fisher Scientific*) e microtomia.

3.1.3 Preparação do material histológico

O material previamente fixado e estocado em etanol 70% foi submetido a uma bateria de desidratação com álcool butílico terciário puro (*Synth*), para posterior inclusão em Paraplast. Este protocolo foi gentilmente cedido pela Dra. Ludmila Mickeliunas Pansarin. As trocas entre as soluções ocorreram sem intervalos entre elas, sendo os órgãos passados de uma solução para a seguinte da bateria. A composição das soluções usadas está na tabela 3.1. Os órgãos ficaram por 12 horas na solução I, sendo em seguida passados para a solução II, ficando nesta por 24 horas. Após este período, ficaram por 12 horas em cada uma das soluções: III, IV, V, VI, VII e VIII. Todas as etapas anteriores foram realizadas à temperatura ambiente. Após, os materiais foram colocados em frascos contendo Paraplast sólido e álcool butílico terciário puro, na proporção de 1 volume de álcool butílico puro para três de Paraplast. Os frascos foram colocados em estufa a 60°C e cobertos com papel alumínio para evitar evaporação do álcool butílico. Assim que o Paraplast fundiu, o papel alumínio foi retirado e os frascos foram agitados para a evaporação do álcool butílico, ficando os órgãos por mais 12 horas nesta solução, a 60°C. Em seguida, três trocas de Paraplast foram realizadas a 60°C, ficando os materiais em cada nova solução por 12 horas.

Tabela 3.1. Soluções usadas na bateria de desidratação com álcool butílico terciário.

Solução	Composição
I	10% álcool butílico terciário, 38% etanol e 52% água destilada.
II	20% álcool butílico terciário, 47,5% etanol e 32,5% água destilada.
III	35% álcool butílico, 47,5% etanol e 17,5% água destilada.
IV	55% álcool butílico, 42,75% etanol e 2,25% água destilada.
V	75% álcool butílico, 25% etanol.
VI	Álcool butílico terciário puro
VII	Álcool butílico terciário puro
VIII	Álcool butílico terciário puro

Ao término da inclusão em Paraplast, os órgãos foram emblocados no mesmo, usando formas de papel. A microtomia foi realizada em micrótomo rotativo (*American Optical Corporation* - modelo 820), sendo os materiais seccionados a 8 μ m de espessura. Os cortes obtidos foram dispostos em lâminas cobertas com solução de albumina preparada com clara de ovos e glicerol para a adesão à lâmina. Após 24h secando, em estufa a 37°C, as lâminas foram submetidas à coloração para posterior análise por microscopia de luz.

A coloração das lâminas foi feita utilizando o corante azul de toluidina, um corante básico que se liga às moléculas de celulose e lignina das células vegetais, permitindo delimitar células em microscopia de luz. A diafanização e reidratação dos tecidos nas lâminas seguiu o seguinte protocolo: xilol puro I (20 minutos), xilol puro II (20 minutos), xilol + Etanol absoluto 1:1 (20 minutos), etanol absoluto (2 minutos), etanol 90% (2 minutos), etanol 80% (2 minutos), etanol 70% (2 minutos), etanol 60% (2 minutos), etanol 50% (2 minutos) e água destilada (2 minutos). Em seguida, os cortes foram imersos no corante azul de toluidina 0,05%, ficando de 4-5 minutos neste. Após a coloração, os tecidos foram desidratados, passando rapidamente (aproximadamente de 5 a 10

segundos) em cada uma das soluções de concentração crescente de etanol: 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%. Em seguida as lâminas ficaram 1 minuto em xilol + etanol absoluto (1:1) e, posteriormente, 10 minutos em uma primeira solução de xilol puro e mais 10 minutos em outra. Após essa bateria de coloração, as lâminas foram retiradas do xilol e montadas com Entellan (*Merck*) e lamínula.

As lâminas foram analisadas em microscópio (*Zeiss - Axiolab*) e os cortes selecionados foram analisados com o auxílio do *software ImageJ*. Utilizando esse software, regiões inteiras e células dos tecidos puderam ser medidas. Essas medições foram analisadas estatisticamente com o programa *STATISTICA 7.0*.

3.1.4 Análise histológica

Os órgãos preparados para microscopia foram visualizados em microscópio óptico (microscópio *Zeiss Axiolab*) e estereomicroscópio (*Leica MDG34*) e as imagens utilizadas para medições de área foram obtidas com os *softwares AxioVision 4.8 (Zeiss)* e *LAS V3.7 (Leica)*. Todas as análises e medições de área foram feitas com o programa *ImageJ*.

Para a delimitação de uma região similar entre os diferentes exemplares de estigma, escolhemos para a análise uma secção que apresentasse tecido vascular dos dois lados do tecido transmissor. Nos estigmas foram realizadas medições da área da zona secretória e de áreas individuais de 30 células deste tecido, ilustradas na figura 3.1. Para a padronização da região da zona secretória em que as células seriam medidas, traçamos duas retas em todos os estigmas: uma primeira reta paralela à parede do estilete (na cor verde na Figura 3.1B) e uma segunda perpendicular à primeira (azul na Figura 3.1B), de 300 μm de comprimento.

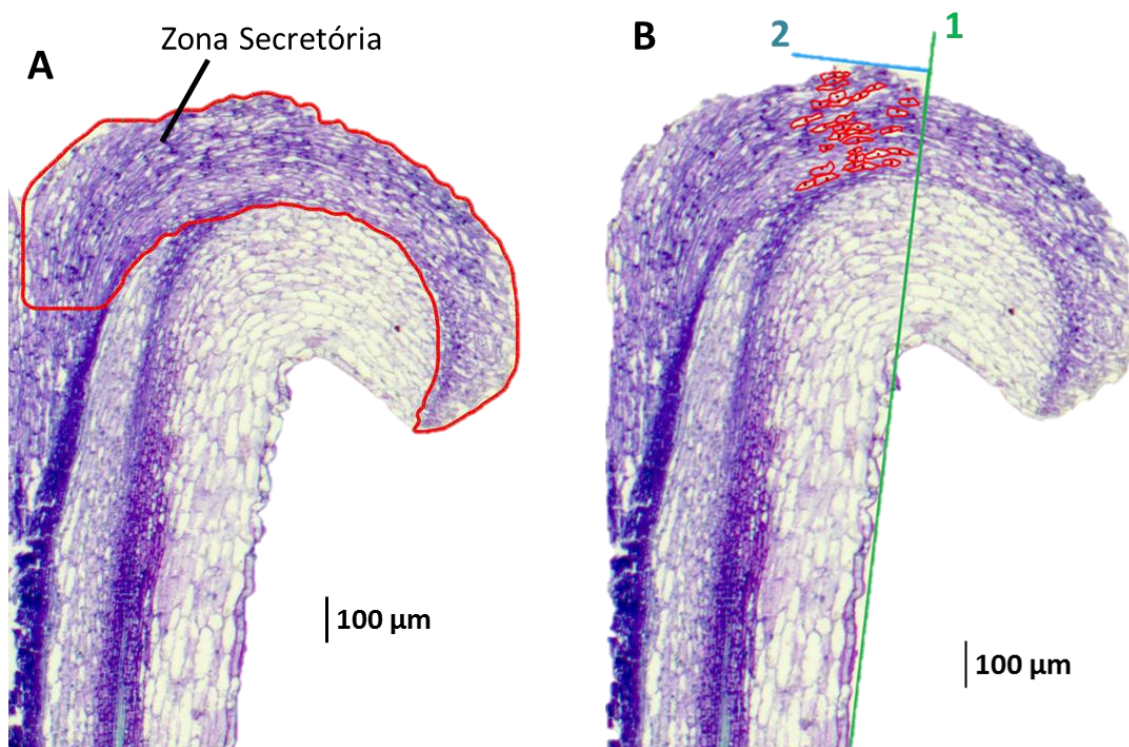


Figura 3.1. Exemplo do modo como as medições foram realizadas na zona secretória do estigma. A) Medição de área da zona secretória. B) Medições da área individual de 30 células na zona secretória. As retas 1 (verde) e 2 (azul) serviram como referência para padronização do local.

Medições da área individual de 30 células parenquimáticas também foram efetuadas no estigma, na região subjacente à zona secretória. A figura 3.2 na página seguinte demonstra o local de medição.



Figura 3.2. Exemplo do local de medições das áreas individuais de 30 células no parênquima dos estigmas.

Para a delimitação de uma região similar entre os diferentes exemplares de ovários, escolhemos para a análise uma secção que apresentasse tecido vascular da base até o mais próximo possível do ápice. Nos ovários foram realizadas medições de área total e de área individual de 30 células parenquimáticas. A figura 3.3 na página seguinte ilustra a padronização realizada para as medições. Para medição da área (Figura 3.3A), foi traçada uma linha na base da placenta, delimitando o ovário inteiro. Para a delimitação de uma região semelhante entre os diferentes ovários (Figura 3.3B) foi traçada uma reta (rosa) na base da placenta, a partir da qual uma segunda linha (amarela) de 1000 μm paralela à parede da placenta foi feita; em seguida uma terceira reta (vermelha) de 700 μm , perpendicular à segunda foi traçada, a partir da qual uma quarta reta perpendicular delimitou a região das medições.

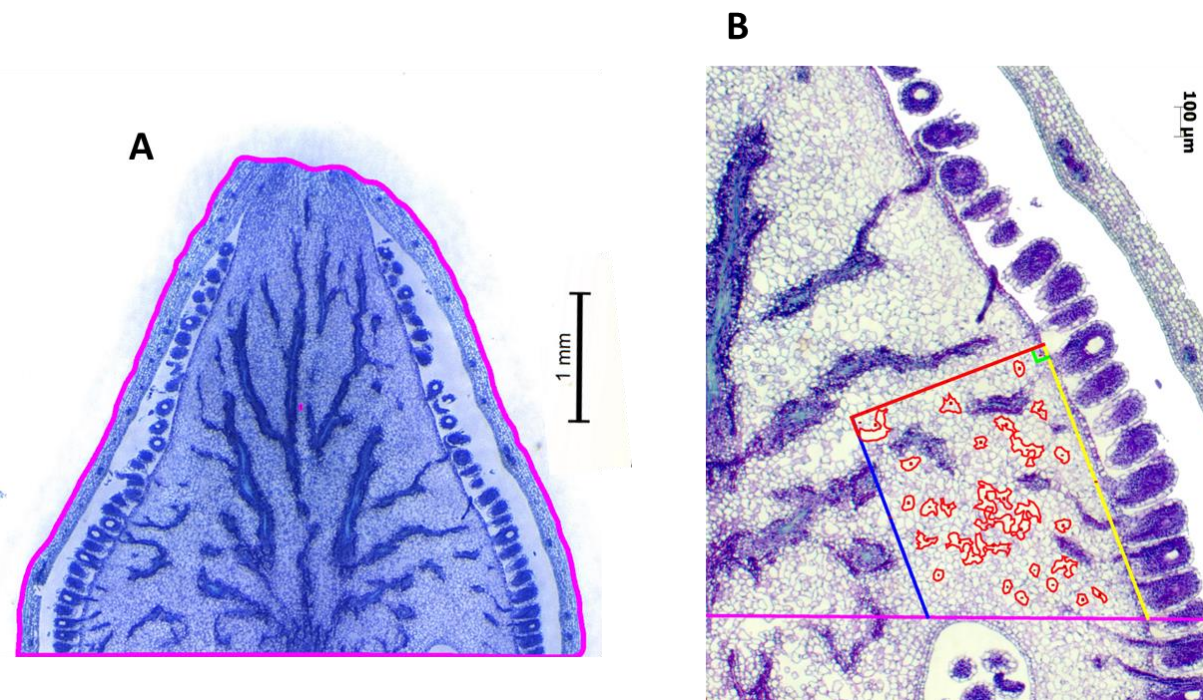


Figura 3.3. Exemplo dos modos de medição de área realizados nos ovários. A) Medição da área total do ovário. B) Delimitação de região e medição de 30 células no parênquima do ovário. As retas traçadas serviram como forma de padronização do local de análise entre os diferentes ovários analisados (descrição no texto).

3.1.5 Medições dos pistilos

Foram feitas medidas do pistilo - comprimento dos pistilos, largura dos estigmas e largura dos ovários - de flores no estágio 11 de desenvolvimento floral (Koltunow et al., 1990), para a realização de comparações estatísticas que nos permitissem inferir, com confiabilidade, que mudanças ocorreram nos transgênicos. As medidas foram feitas com auxílio de um paquímetro (Digimes), utilizando flores no estágio 11 de desenvolvimento como ilustrado na figura 3.4, na próxima página.

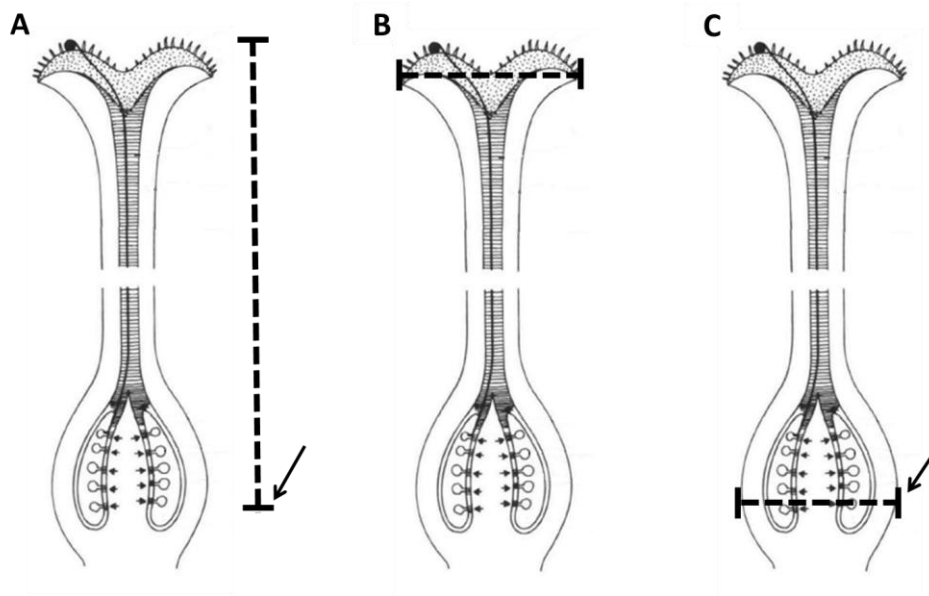


Figura 3.4: Ilustrações das medições realizadas em regiões do pistilo. A) Medição do comprimento do pistilo, indo do ápice do estigma à base do ovário, ao nível dos nectários florais. A seta indica este nível. B) Medição da largura do estigma. C) Medição da largura do ovário, realizada na base, imediatamente acima dos nectários florais

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística no programa STATISTICA 7.0. Para a plotagem e construção de gráficos foi usado o programa Excel (Microsoft).

3.2 Produção das construções gênicas

As construções gênicas foram produzidas em vetores adequados do sistema Gateway® de recombinação (*Invitrogen*). Este sistema é baseado em reações de recombinação sítio-específica que ocorrem naturalmente no fago λ . Sequências de DNA, contendo sítios de recombinação (denominados att), podem ser transferidas para vetores contendo sítios compatíveis para a reação (Karimi et al., 2002). A primeira reação de recombinação do sistema é a reação BP, na qual ocorre recombinação de sítios denominados attB1 e attB2, que flanqueiam a sequência de DNA a ser inserida em um vetor de entrada) contendo os sítios attP1 e attP2. Após a reação BP (attB1 X attP1; attB2 X attP2), os sítios de recombinação que flanqueiam o DNA de interesse, dentro do vetor de entrada, passam a ser chamados de attL1 e attL2. Com uma nova reação de

recombinação, denominada LR, a sequência de interesse pode ser transferida, do vetor de entrada, para outros vetores do sistema, denominados vetores de destino. Os sítios attL1 e attL2, que flanqueiam o DNA de interesse, recombinam com os sítios attR1 e attR2 presentes nos vetores de destino (attL1 X attR1; attL2 X attR2). Deste modo, pode-se recombinar o DNA de interesse para vetores que apresentam qualidades específicas para o experimento desejado.

3.2.1 Adição de sítios attB

Para que uma sequência gênica seja inserida em um vetor de entrada é necessário que esta possua os sítios de recombinação attB1 e attB2. Esses sítios possuem tamanho de 31pb e 30pb, respectivamente. Em nosso laboratório, já existem *primers* para inserção de ambos os sítios, contendo a sequência completa de cada um. No presente estudo, foram necessárias duas reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para que obtivéssemos cada um dos fragmentos de DNA de interesse contendo os sítios attB. Estas foram: uma PCR1, realizada com um par de *primers* específicos, que cobrem parte da sequência de interesse e parte dos sítios attB, e uma PCR2 utilizando os *primers* BP (com as sequências completas de cada sítio). Os primers utilizados estão apresentados na tabela 3.2.

As reações de PCR1 foram realizadas com 10ng de DNA molde, 1µL de dNTPs (10mM), 2µL de *primer* senso (5 pmoles/µL), 2µL de *primer* antisenso (5 pmoles/µL), 0,5µL de enzima *Phusion® High Fidelity DNA Polimerase* (BioLabs), 10µL de 5X *Buffer* HF (tampão da enzima) e água deionizada autoclavada em quantidade suficiente para completar 50µL de volume final. Os parâmetros da reação foram: um passo inicial de desnaturação a 98°C por 30 segundos, passando para 30 ciclos de 10 segundos a 98°C (desnaturação), 30 segundos à temperatura de pareamento (58°C para as PCRs de SKP1, descrita no item 3.3.1 e 57,5°C para as da TCP, descrita no item 3.3.2), 40 segundos a 72°C (extensão) e um passo final de 72°C por 10 minutos. Em seguida, 50µL de cada reação foram aplicados em gel de agarose (ultrapura - *Invitrogen*) 1%, corado com brometo de

etídio (1 ng/mL). Após eletroforese, os fragmentos de tamanho esperado foram recortados e purificados com o *Gene Jet Gel Extraction Kit* (Fermentas), seguindo as instruções do fabricante.

Após determinar a concentração das amostras de DNA em *NanoDrop*TM 1000 (*Thermo Scientific*), foram realizadas as reações de PCR2, tendo como DNA molde os produtos purificados das PCRs1. As reações foram realizadas como descrito para a PCR1, somente modificando a temperatura de pareamento dos *primers* para 57°C em todas as reações. Em seguida, o produto das PCRs foi aplicado em gel de agarose e, após eletroforese, purificado da mesma maneira como descrito anteriormente. O DNA purificado foi quantificado em *NanoDrop* para as reações de recombinação BP.

3.2.2 Reações BP

Os fragmentos, obtidos da amplificação por PCR1 e 2, foram inseridos no vetor pDONRTM221 (vetor de entrada do Sistema Gateway, apresentado no anexo 6.1), por meio de reações BP. Estas foram realizadas com o *Gateway*[®] BP *Clonase*[®] *Enzyme Mix* (*Invitrogen*). Nestas reações foram utilizadas 180 ng de inserto, 100 ng do vetor pDONR221, 2 µL de 5X BP *Clonase Reaction Buffer* (*Invitrogen*), 1 µL de *Gateway BP clonase Enzyme Mix* (*Invitrogen*) e água milli-Q estéril suficiente para completar 10 µL de volume final. A reação foi mantida a temperatura ambiente por aproximadamente 16 horas. Após esse período, foi adicionado 1 µL de proteinase K (2µg/ µL) e a reação foi mantida por 10 minutos em banho-maria a 37°C, para inativação do *mix* de enzimas da BP *Clonase*.

3.2.3 Reações LR

As reações LR, de recombinação simples, consistiram na transferência de um fragmento contido em um vetor pDONR221, para um vetor de expressão específico. Para este tipo de reação foi utilizada a enzima *LR Clonase*[®] II (*Invitrogen*). Recombinações para sítio simples foram feitas com a adição de 150 ng da construção no vetor de entrada, 150 ng de vetor de destino, 1 µL de LR

Clonase II (Invitrogen) e água deionizada estéril para completar 5 μL de volume final. A mistura foi mantida por aproximadamente 16 horas a temperatura ambiente. Após esse período, 1 μL de proteinase K foi adicionado (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e a reação foi mantida por 10 minutos em banho-maria a 37°C, para inativação da enzima.

No caso de LR para sítios múltiplos, ocorre a recombinação de três insertos, contidos em diferentes vetores de entrada, em um único vetor de expressão. Os fragmentos entram no vetor de expressão de acordo com os sítios de recombinação que apresentam, os quais são compatíveis com sítios específicos do vetor de destino. Os fragmentos ficam adjacentes no vetor de destino e, deste modo, a recombinação múltipla gera uma sequência cuja ordem pode ser planejada. Esse tipo de reação foi utilizada somente para as construções com fusão dos fragmentos *tail* e a *head* da proteína verde-fluorescente (GFP). A reação foi feita com a adição de 60ng de cada um dos três vetores de entrada, 90ng de vetor de destino, 2 μL de LR *Clonase® II Plus* e água milli-Q estéril para um volume final de 10 μL . A mistura foi incubada a temperatura ambiente por aproximadamente 16 horas. Após esse período, 1 μL de proteinase K (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foi adicionado e a reação foi mantida por 10 minutos em banho-maria a 37°C, para inativação da enzima.

3.3 Construções gênicas produzidas

A tabela 3.2 apresenta os *primers* que serviram para as amplificações usadas nas construções gênicas. Em seguida, estão descritos os procedimentos para a criação das construções utilizadas.

Tabela 3.2: Primers utilizados para as amplificações das sequências de interesse. As PCR1 garantiram a inserção de parte dos sítios attB1 e attB2, enquanto a etapa de PCR2, completou estes sítios, permitindo a entrada no sistema Gateway®. A parte sublinhada dos primers é específica de cada primer, enquanto a não sublinhada corresponde aos sítios attB.

PCR	Amplificação	Primers	Sequência 5'
PCR 1	SKP1 sem códon de terminação	SKP1-2A2Rv_ss	AAGCTGGGGT <u>CCTCAAATGCCCAAGCATTC</u>
		SKP1-2A2FW	GCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGT <u>CCTCCTCAAAGATGATC</u>
	SKP1 com códon de terminação	SKP1-2A2Rv_cs	AAGCTGGGGT <u>CTCACTCAAATGCCCAAGCA</u> TTC
		TCP2D6_FW	GCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGG <u>AACTCTCTGATTTACAAAAC</u>
	TCP sem códon de terminação	TCP2D6RV_cs	AAGCTGGGGT <u>CTTACTGGGAGTTGTTTGGA</u> TCATC
		Todos	BP1
BP2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG TC		

Para a obtenção das construções utilizadas no experimento de BiFC (*Bimolecular fluorescence complementation*), foram necessárias construções em

vetores de entrada contendo o promotor viral 35S, a *tag* do fragmento N-terminal de GFP e a *tag* do fragmento C-terminal de GFP.

3.3.1 Recombinações LR múltiplas

- *FEF1* em fusão com tGFP (*tail* GFP)

Para a obtenção da construção de *FEF1* utilizada para o experimento de BiFC, foi realizada uma reação LR múltipla com os seguintes componentes: a sequência codificante de *FEF1*, sem códon de terminação de tradução, presente no vetor de entrada pDONR221 (Abbad, 2012); o promotor viral 35S em um vetor de entrada (clone pEN-L4-2-R1, <http://gateway.psb.ugent.be/>); a sequência codificante da porção tGFP (clone pEN-R2-cGFP-L3, contendo a *tail* GFP, que codifica aminoácidos 156 a 239 da GFP) e o vetor pH7m34GW (anexo 6.5). Estes 3 últimos clones foram gentilmente cedidos pelo Dr. Lieven De Veylder (VIB, *Universiteit Gent* - Bélgica, <http://gateway.psb.ugent.be/>). Deste modo, a construção pH7m34GW-P35S::*FEF1*-tGFP foi obtida.

- *SKP1* em fusão com hGFP (*head* GFP)

Para os experimentos de BiFC a construção de *SKP1* em fusão com um fragmento *head* da GFP foi necessária. Para isso uma reação LR múltipla foi realizada, utilizando a construção contendo a sequência codificante de *SKP1*, sem códon de terminação, no vetor de entrada pDONR221 e outros dois clones em vetores de entrada: um contendo o promotor viral 35S (pEN-L4-2-R1) e outro contendo a sequência de hGFP (clone pEN-R2-nGFP-L3, contendo a *head* GFP, que codifica os aminoácidos 1 a 155 da GFP), cedidos clone cedido pelo Dr. Lieven De Veylder do VIB, *Universiteit Gent* - Bélgica). A LR múltipla permitiu a recombinação da *SKP1* sem o códon de terminação para o vetor pH7m34GW de destino, inserindo, na ordem: o promotor 35S, a CDS da *SKP1* e o fragmento hGFP.

3.3.2 Recombinações LR simples

- *FEF1* no vetor pDESTTM17

Para expressão de FEF1 em células de *E. coli*, foi realizada uma reação LR de recombinação simples, utilizando a construção de FEF1 completa (contendo códon de terminação) em um vetor de entrada pDONR221. O vetor de destino utilizado foi o pDEST17, cujo mapa pode ser visualizado no anexo 6.2.

- NtTCP11 no vetor pDEST17

Para expressão de NtTCP11 em células de *E. coli*, a sequência codificante da NtTCP11, encontrada por Abbad (2012) no *screening*, foi amplificada a partir de cDNA (gentilmente cedido pelo Dr. Edward José Strini) sintetizado a partir de RNA de estigmas/estiletos, coletados dos estádios 1-11 de desenvolvimento floral. A CDS completa foi inserida em no vetor pDONR221 de entrada no sistema Gateway® por reação BP e recombinada para o vetor pDEST17 de expressão, por meio de uma reação LR simples.

3.4 Manipulação de *Escherichia coli*

3.4.1 Preparo de *E. coli* eletrocompetentes

Toda a manipulação das células foi realizada em ambiente estéril de fluxo laminar. Células de *E. coli* da cepa DH10B foram estriadas, a partir de um estoque em glicerol, em meio LB sólido e incubadas a 37°C por 16-20 horas. Uma colônia isolada foi inoculada em meio LB líquido e incubada a 37°C e 220 rpm por 16-20 horas. No final desse período, 1 mL da cultura foi transferido para um Erlenmeyer contendo 200 mL de meio LB líquido, incubado a 37°C e 220 rpm de agitação, até a cultura atingir absorvância a 600 nm entre 0,5 e 0,8. A cultura foi mantida no gelo por 30 minutos sendo transferida, em seguida, para quatro tubos de 50 mL, os quais foram centrifugados por 10 minutos a 4°C, na velocidade de 1100 x g (centrifuga *Eppendorf* modelo 5810R). O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuspenso em 200 mL de água Milli-Q (*Millipore*) estéril e gelada. Os tubos foram centrifugados novamente por 10 minutos a 1100 x g, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 100 mL de água Milli-Q estéril, sendo novamente centrifugado nas mesmas condições, por 10 minutos. Após descartar o

sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso em 10 mL de glicerol 10% estéril, e os tubos foram centrifugados nas mesmas condições da centrifugação anterior. O sobrenadante foi descartado e todo o precipitado foi ressuspenso em 1 mL de glicerol 10 %, sendo dividido em alíquotas de 40 µL, as quais foram estocadas a -80°C até o momento do uso.

3.4.2 Transformação de *E. coli* competentes

Para introdução de DNA exógeno em bactérias por eletroporação, uma alíquota de células eletrocompetentes foi incubada no gelo até descongelar completamente. Em fluxo laminar, 1-2 µl de DNA plasmidial foram adicionados ao tubo contendo 40 µl de células DH10B eletrocompetentes. As células foram, então, transferidas para o fundo de uma cubeta de eletroporação estéril de 0,1 cm (*BioAgency*), previamente gelada. Após secar a parte metálica da cubeta com papel absorvente, esta foi inserida no eletroporador (Gene Pulser® II, *Bio-Rad*), regulado para as seguintes condições: resistência 200 ohms, capacitância 25 µF e voltagem de 1,8 Kv. Imediatamente após, foi aplicado o choque elétrico por aproximadamente 5 segundos. Após o choque, foi adicionado 1 mL de meio LB líquido na cubeta e todo o conteúdo foi transferido para um tubo de ensaio estéril. A cultura foi incubada a 37°C com agitação (200 rpm), por 1 hora. Em seguida, 200-500 µl da cultura foram distribuídos uniformemente, com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada, em placas contendo meio LB sólido adicionado do antibiótico apropriado para a seleção do plasmídeo. As placas foram incubadas por 16-20 horas a 37°C. Após esse período, colônias isoladas foram selecionadas e inoculadas em 5 mL de meio LB líquido com antibiótico adequado. Os inóculos foram mantidos *overnight* a 37°C sob agitação de 200 rpm, para crescimento e posterior extração de DNA plasmidial.

3.4.3 Extração de DNA plasmidial de *E. coli*

Após 16-20 horas de crescimento dos inóculos descritos no item anterior, foi feito um estoque em glicerol de cada cultura utilizando-se 500µl da suspensão bacteriana e 500µl de glicerol 50% estéril, para uma concentração

final de 25% glicerol. Estes estoques foram armazenados a -80°C , possibilitando a recuperação de cada clone após a checagem das colônias positivas. Para a extração do DNA plasmidial, dois métodos foram usados: lisozima e extração com o kit comercial *GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)*.

Para a extração com lisozima, as culturas foram transferidas para tubos de 1,5 mL e centrifugadas a $16000 \times g$ (centrífuga *Eppendorf 5415D*) por 2 minutos. O precipitado de células de cada tubo foi totalmente ressuscitado em 175 μL de tampão TES (10mM de Tris-HCl, pH 8,0, 1mM de EDTA, pH 8,0 e 15% Sacarose) e misturado, delicadamente, com 20 μL de lisozima (10 mg/mL). A preparação foi mantida à temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, incubada em banho-maria a 73°C por 15 minutos. Em seguida, os tubos foram submetidos a uma centrifugação a $16000 \times g$ por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e a ele foram acrescentados 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol absoluto. A precipitação foi feita por 20 minutos a -80°C e, em seguida, centrifugada por 15 minutos a $16000 \times g$. O precipitado de DNA foi lavado com etanol 70% e, após secagem, ressuscitado em 50 μL de água Milli-Q estéril e estocado a -20°C .

Extrações feitas com lisozima foram usadas principalmente para checagem de construções com enzimas de restrição. Já as extrações de kit serviram para transformações de leveduras e reações de sequenciamento. Estas foram feitas seguindo as especificações do fabricante.

3.4.4 Digestão com enzimas de restrição

As construções foram checadas por meio de digestão com endonucleases de restrição. As digestões foram planejadas utilizando a ferramenta *NEBCutter V2.0* (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>). Para cada digestão, foram escolhidas enzimas que possuíam sítios de clivagem dentro da sequência do inserto e também na sequência do vetor. Todas as digestões foram realizadas com enzimas da *New England BioLabs*, tampão adequado para cada enzima de restrição, RNase, *Bovine Serum Albumine* (quando necessário) e DNA plasmidial

(pelo menos 1µg). Em seguida, o padrão de digestão do DNA foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1%. Os DNAs plasmidiais que apresentavam o padrão esperado foram submetidos a sequenciamento antes da utilização em experimentos.

3.4.5 Limpeza com fenol/clorofórmio

Amostras de DNA plasmidial extraído de *E. coli* pelo método da lisozima, que requeriam certo grau de pureza (para sequenciamento, transformação em leveduras, clonagem em vetores, entre outros), foram purificadas utilizando fenol/clorofórmio. Para isso, o volume das amostras foi ajustado para 200µL com água Milli-Q estéril. Em cada amostra, foi adicionado 1 volume de fenol tamponado (pH8.0) e a mistura foi agitada em vórtex. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 16000 x g (centrífuga *Eppendorf* 5415D) por 2 minutos. Ao final da centrifugação, duas fases foram formadas, sendo a fase superior recuperada e transferida para novo tubo de 1,5 mL. A ela foram adicionados 200µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e agitou-se em vórtex. Centrifugou-se por 2 minutos a 16000 x g e a fase superior foi novamente recuperada e transferida para novo tubo. Para precipitação do DNA, foram adicionados 0,1 volume de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol absoluto. Os tubos foram mantidos em freezer -80°C por 20 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 16000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500µL de etanol 70%. As amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 16000 x g, os sobrenadantes foram descartados e os tubos foram deixados abertos para secagem do etanol. O DNA foi ressuscitado em 20µL de água milli-Q estéril e as amostras purificadas foram quantificadas em *NanoDrop*TM.

3.5 Análise de fragmentos de DNA por eletroforese

DNAs plasmidiais digeridos e produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, preparado com tampão TBE 0,5X (Solução estoque 5X: 54 g Tris base; 27,5 g ácido bórico; 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8.0).

adicionado de 0,5 µg/mL de brometo de etídeo (Sambrook et al., 1989). O brometo de etídeo é um agente intercalante de DNA que permite a visualização de bandas após a eletroforese, quando o gel é exposto à luz ultravioleta. Os géis foram submetidos à eletroforese em TBE 0,5X. As amostras de DNA foram preparadas adicionando 1µL de tampão de carregamento (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol e 15% ficol tipo 400-DL) para cada 5µL de amostra. A voltagem utilizada (aproximadamente 100 volts) e o tempo das corridas variaram de acordo com o tamanho do gel, tamanho da cuba usada e tamanho dos fragmentos de DNA esperados. A análise do tamanho dos fragmentos de DNA foi realizada com base na migração dos fragmentos de tamanho conhecido do Marcador de Peso Molecular 1 kb Plus DNA Ladder (*Invitrogen*). Após a eletroforese, os géis foram visualizados em transiluminador (luz ultravioleta), fotografados em fotodocumentador *Kodak Gel Logic 100 Imaging System* (Kodak) e as imagens foram capturadas com o *software* que acompanha o equipamento.

3.6 Reações de sequenciamento

Os sequenciamentos de DNA deste trabalho foram realizados pela Dra. Andréa Carla Quiapim, utilizando o equipamento ABI 3100 da *Applied Biosystems*. Todos os *primers* usados nos sequenciamentos estão apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. *Primers* utilizados nas reações de sequenciamento de DNA deste trabalho.

Construção	<i>Primers</i>	Sequência 5'-3'
pDONR221-SKP1	M13-FW	GTAAAACGACGGCCAGT
pDONR221-TCP	M13-RV	CAGGAAACAGCTATGAC
pH7m34GW- P35S::FEF1-tGFP	Prom35S-FW	ATGACGCACAATCCCCTACTATCC
	Seq-tGFP	GTGTTCTGCTGGTAGTGGTCCG
	Term35S-RV	CCCTATAAGAACCCTAATTCCC
pH7m34GW- P35S::SKP1-hGFP	Prom35S-FW	ATGACGCACAATCCCCTACTATCC
	Seq-hGFP	CAGCTTGCCGTAGGTGGCATC
	Term35S-RV	CCCTATAAGAACCCTAATTCCC
pDEST TM 22- Insertos	P22-32-RV	AGCCGACAACCTTGATTTCGAGAC

3.7 Manipulação de *Agrobacterium tumefaciens*

A bactéria *A. tumefaciens* foi utilizada para a transformação genética de células vegetais. Esta estratégia foi utilizada para experimentos de BiFC, pela expressão transiente de proteínas em *N. benthamiana*, explicada em um tópico posterior. O preparo de colônias de *A. tumefaciens* carregando uma construção de interesse envolveu os procedimentos que serão descritos nos tópicos a seguir.

3.7.1 Preparo de *A. tumefaciens* eletrocompetentes

Células de *A. tumefaciens* da cepa C58C1RifR (pGV2260), do estoque em glicerol, foram estriadas em uma placa contendo meio MAS sólido, a qual foi incubada a 28°C por 48 h. Uma colônia isolada foi inoculada em meio LB 2X líquido e incubada a 28°C, a 150 rpm por 16-20 h. A cultura foi, então, centrifugada a 9900 x g (centrífuga *Eppendorf* 5810R) a 4°C por 1 minuto, e o sobrenadante descartado. O precipitado celular foi ressuscitado em 500 µL de ácido 4-(2-hidroxietil)-ácido-1-piperazina-etanossulfônico (HEPES) 1 mM e centrifugado novamente nas mesmas condições da anterior. Esse processo foi repetido duas vezes. Após descartar o sobrenadante, as células foram ressuscitadas em 200 µL de glicerol 10 %, e o volume final foi dividido em alíquotas de 40 µL, sendo estocadas a -80°C até o momento do uso.

3.7.2 Transformação de *A. tumefaciens* eletrocompetentes

A transformação de *A. tumefaciens* é semelhante à de *E. coli* descrita no item 3.4.2, sendo realizada também por eletroporação. Somente diferem o tempo de recuperação após a eletroporação (sendo de 4 horas ao invés de 1 hora) e o período e a temperatura de incubação em meio sólido, sendo de 48h e 28°C respectivamente, para as agrobactérias.

3.7.3 Extração do DNA plasmidial de *A. tumefaciens*

Uma colônia foi inoculada em meio LB, suplementado com antibióticos para seleção do plasmídeo de interesse, incubada por 24 horas a 28°C, com agitação de 150 rpm. Após o crescimento, foi feito um estoque semipermanente em glicerol 25%, o qual foi armazenado a -80°C. Inicialmente, um volume de 1,5 mL de cultura foi submetido à centrifugação por 2 minutos a 13300 x g (centrífuga *Eppendorf* 5415 C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuscitado em 1 mL de Tampão I [NaCl 0,2 M em Tris-EDTA]. Foi realizada nova centrifugação por 2 minutos nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e o processo repetido mais uma vez. Depois de descartar o sobrenadante novamente, o precipitado foi ressuscitado em 200

μL de Tampão I e foram acrescentados 200 μL de Solução I [NaOH 0,2 N; dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%]. A mistura foi homogeneizada e mantida em gelo por 15 minutos. Foram adicionados 150 μL de acetato de potássio 3M (pH5,2) gelado, homogeneizando manualmente e novamente mantendo em gelo por 30 minutos. No final desse período, o tubo foi centrifugado por 5 minutos a 13300 x g para separar os *debris* celulares do DNA plasmidial. O sobrenadante foi transferido a um novo tubo, onde foi acrescido de 2 volumes de etanol, sendo em seguida mantido a -20°C por no mínimo 1 hora, para ocorrer a precipitação do DNA. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 13300 x g por 30 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 400 μL de etanol 70% e centrifugado novamente por 2 minutos nas mesmas condições anteriores. Depois de descartado o etanol, o tubo ficou aberto à temperatura ambiente, até a evaporação total do etanol residual. O precipitado foi ressuscitado em 40 μL de água deionizada esterilizada.

3.7.4 PCR de confirmação da presença do DNA plasmidial em *A. tumefaciens*

Com o intuito de checar se as colônias de *A. tumefaciens* selecionadas possuíam a construção de interesse, o DNA plasmidial extraído destas colônias foi utilizado como molde para reações de PCR. Nestas reações, preferencialmente foram utilizados um *primer* interno (dentro da região do fragmento de interesse) e um *primer* externo, que parecia na sequência do respectivo vetor de expressão. As PCRs foram feitas com 1 μL de DNA plasmidial, 5 μL de tampão de reação 5X (*Biotools*), 2 μL de MgCl₂ 50 mM, 1 μL de *primer* senso e 1 μL de *primer* antisenso (5 μM cada), 1 μL de dNTPs 10 mM, 1 μL da enzima *Biotools DNA Polymerase* (1U/μL) e quantidade suficiente de água deionizada estéril para completar o volume final de 50 μL. O programa estabelecido foi: um passo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, passando para 34 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 1 minuto para o pareamento dos *primers* (a temperatura variou de acordo com a construção) e 72°C por 1 minuto (extensão). Após os ciclos, a reação foi submetida a 72°C por

10 minutos, para uma etapa de extensão final. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para análise dos fragmentos obtidos. O conjunto dos *primers* utilizado em cada reação está relacionado na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. *Primers* utilizados nas PCRs de *A. tumefaciens*.

Construção	<i>Primers</i>	Sequência 5'-3'
pH7m34GW- P35S::SKP1-hGFP	Prom35S-FW	ATGACGCACAATCCCCTACTATCC
	Term35S	CCCTATAAGAACCCTAATTCCC
pH7m34GW- P35S::FEF1-tGFP	Prom35S-FW	ATGACGCACAATCCCCTACTATCC
	S/S_F-box-Rv- qPCR	AGAATCAGCCCTCACAGGAAGTCT

3.8 *Screening* de duplo-híbrido

Objetivando revelar possíveis parceiros de interação com FEF1, foi dada continuidade ao *screening* da biblioteca de duplo-híbrido começado por Abbad (2012), utilizando a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* 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). Esta cepa apresenta como genes repórteres *HIS3* (que codifica uma enzima envolvida na biossíntese de histidina), *ADE2* (uma enzima que catalisa via a biossíntese de purinas) e *lacZ* (que codifica uma enzima que metaboliza galactose), sob regulação de promotores ativados pelo fator de transcrição GAL4. Os tópicos contidos neste item descrevem os passos necessários para a identificação dos possíveis parceiros e testes de confirmação de interação.

3.8.1 Recuperação do DNA plasmidial de leveduras

Para identificar os possíveis parceiros de interação, o primeiro passo foi realizar a extração do DNA plasmidial de colônias de leveduras, que haviam

crescido em meio seletivo durante o *screening*, e foram precipitadas e estocadas em placas de 96 poços, no freezer -20°C . Para isso, células precipitadas de colônias da primeira placa do *screening*, foram ressuspensas em 100 μL de solução SDS 3% e NaOH 0,2 N, sendo transferidas para tubos de 1,5 mL. Estas foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos, com ocasionais inversões. Foram adicionados 500 μL de TE [Tris-HCl 10mM (pH 7,5); EDTA 1mM], misturando por inversões. Em seguida, adicionou-se 60 μL de acetato de sódio 3M, invertendo os tubos para homogeneização e 600 μL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico foram acrescentados (25:24:1), agitando os tubos em vórtex por 2 minutos. Os tubos foram centrifugados a 16000 x g (centrífuga *Eppendorf* 5415D) por 2 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, sendo novamente adicionados 600 μL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. Em seguida, uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Foram adicionados 650 μL de isopropanol gelado, misturando por inversão e, a seguir, os tubos foram incubados a -20°C por pelo menos 20 minutos. Após esse período, uma nova centrifugação foi realizada a 16000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi lavado com etanol 70%, com uma centrifugação nas mesmas condições, com posterior descarte do sobrenadante. Após a secagem do etanol residual, o precipitado foi ressuspensado em 10 μL de água Milli-Q autoclavada e armazenado a -20°C .

3.8.2 Identificação dos possíveis parceiros de interação de FEF1

Células de *E. coli* da cepa DH10B foram transformadas por eletroporação com as amostras recuperadas por extração de DNA plasmidial de leveduras. As bactérias foram cultivadas em meio LB sólido contendo antibiótico adequado para a seleção das colônias que continham o plasmídeo pDEST22 (Anexo 6.3), com os possíveis parceiros de interação de FEF1. Após crescerem a 37°C , seis colônias de cada transformação foram incubadas por 16-20 horas em meio LB líquido com antibiótico adequado, à mesma temperatura. O DNA plasmidial foi extraído e as amostras foram submetidas a digestões com a enzima BsrGI

overnight. Em seguida, adicionou-se tampão de carregamento e as amostras digeridas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%. Os clones selecionados foram enviados para sequenciamento para identificação do inserto apresentado.

3.8.3 Preparo de células de *S. cerevisiae* competentes

Células em estoque da cepa de leveduras PJ69-4a foram estriadas em placa de Petri contendo meio YPAD sólido, sendo incubadas a 30°C por 48 horas. Dessa placa, foi selecionada uma colônia isolada que foi inoculada em 50 mL de meio YPAD líquido e incubada *overnight* a 30°C e 200 rpm. Na manhã seguinte, ao atingir $OD_{600} \geq 1,5$, um volume suficiente foi transferido para um erlenmeyer contendo 300 mL de meio YPAD líquido, para alcançar uma OD_{600} entre 0,2 e 0,3. A mistura foi incubada a 30°C e 200 rpm, até atingir OD_{600} entre 0,4 e 0,6. Atingida essa absorvância, a cultura foi dividida em 6 tubos de 50 mL e as células foram centrifugadas a 1250 x g (centrífuga *Eppendorf* 5810R), por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o precipitado celular de cada tubo foi ressuscitado em 5 mL de água deionizada esterilizada. Em seguida, as soluções foram divididas em dois tubos de 50 mL, que foram novamente centrifugados durante 5 minutos nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 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)]. Foram feitas alíquotas de 50 µL das células competentes, sendo usadas imediatamente para as transformações.

3.8.4 Transformação de leveduras para confirmação de interações

Com o intuito de verificar interações entre a proteína FEF1 e as proteínas candidatas, recuperadas do *screening*, foram executados re-testes de confirmação em leveduras. Para isso leveduras competentes foram transformadas pelo método do choque-térmico. Nas transformações, a 50 µL de células de levedura competentes foram adicionados 5 µL de carreador de DNA

fresco (50 µg de esperma de salmão sonificado) e o DNA de interesse (500 ng de cada construção), misturando gentilmente. Foram adicionados 300 µL de 40% PEG-3350 (polietilenoglicol - Merck) / 1X Acetato de lítio / 1X TE estéril, misturando o conteúdo. Os tubos foram incubados a 30°C por 30 minutos em banho maria e, em seguida, transferidos para outro banho, a 42°C por 15 minutos para o choque-térmico. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 7000 x g (centrífuga Eppendorf 5415D) por 30 segundos. O sobrenadante foi removido e o precipitado de células foi ressuscitado em 200 µL de solução NaCl 0,9%. Cada suspensão foi distribuída em meio de cultura SD com adição de solução Drop Out contendo todos os aminoácidos exceto leucina (leu) e triptofano (trp), para a seleção das leveduras efetivamente transformadas com os 2 plasmídeos. Esta seleção é feita, pois o plasmídeo pDESTTM32 (Anexo 6.4) possui o gene *LEU2*, para biossíntese de leucina e o pDEST22 apresenta o gene *TRP1*, para biossíntese de triptofano. As transformações foram mantidas a 30°C por aproximadamente 48 horas e, após o crescimento das colônias, foram inoculadas em meio seletivo SD-leu-trp líquido e utilizadas para o re-teste em meio adequado.

3.8.5 Ensaio de duplo-híbrido para a confirmação de interações

O ensaio de duplo-híbrido em leveduras (*Yeast Two-Hybrid*) foi utilizado para verificar a interação entre proteínas. Neste experimento foram usadas as construções de FEF1 no vetor pDEST32 e os clones recuperados do *screening* da biblioteca de duplo-híbrido (Abbad, 2012), contidos no pDEST22. Os vetores pDEST32 e pDEST22 permitem a fusão das proteínas, respectivamente, ao domínio de ligação ao DNA (DBD - *DNA Binding Domain*) e ao domínio de ativação da RNA polimerase (AD - *Activation Domain*) do fator de transcrição Gal4. Nos ensaios foram utilizados três controles de interação (*kit ProQuestTM Two-Hybrid System, Invitrogen*), além de controles de auto-ativação. Os controles de interação do kit consistem na proteína de rato Krev1 associada ao DBD e três versões do domínio de associação à ras da proteína Ras ligadas ao AD. As três versões do domínio de associação à ras apresentam diferentes afinidades

pela Krev1, fornecendo três tipos de controles: a sequência selvagem da proteína fornece um controle de interação forte; a sequência com uma mutação na posição I77 para T77, que altera parcialmente a interação, serve de controle para interações fracas, e a sequência com uma mutação na posição L65 para P65, inativa a interação, servindo como controle negativo. Os controles de auto-ativação consistiram de leveduras co-transformadas com uma construção e o vetor complementar do sistema vazio, para testar se ocorreria ativação do sistema quando somente uma das proteínas era expressa. Também foram incluídos controles de leveduras contendo os vetores pDEST32 e pDEST22 vazios.

Uma colônia oriunda de cada transformação, incluindo os controles, foi inoculada em meio SD-leu-trp líquido, e os inóculos foram incubados por 24 horas a 30°C e 200 rpm. Após a incubação, foi medida a OD₆₀₀ de cada cultura, e estas foram diluídas para uma OD₆₀₀ de 0,2 em meio SD-leu-trp para um volume de 250 µL. Essas diluições foram feitas em placas de 96 poços (GREINER), na linha A. Nas linhas C, E, G e H foram feitas diluições consecutivas de 1:5, resultando em OD₆₀₀ de 0,04; 0,008; 0,0016 e 0,00032, respectivamente. O conteúdo das placas foi replicado em placas de Petri contendo diferentes meios de cultura para avaliar as interações. O meio SD-leu-trp foi utilizado como controle para o crescimento das leveduras. A placa contendo o meio SD-leu-trp-his (sem os aminoácidos leucina, triptofano e histidina), serviu para o ensaio, permitindo avaliar se a transcrição do gene repórter *HIS3* estava sendo ativada. Caso as leveduras crescessem neste meio sem histidina, é possível assumir que ocorreu a aproximação dos domínios do fator de transcrição GAL4, graças à interação entre as proteínas testadas.

3.9 Expressão transiente em *Nicotiana benthamiana* - Complementação da Fluorescência Bimolecular (BiFC)

A expressão transiente de proteínas em folhas de *N. benthamiana* foi utilizada na realização de ensaios de interação entre proteínas por BiFC. Para tal, foram inoculadas colônias de *A. tumefaciens* transformadas com as

construções de interesse (descritas nos itens 3.3.1 e 3.3.3), em meio 5 mL LB complementado com antibióticos e cultivadas por 24 horas, a 28°C e 150 rpm de agitação. No final desse período, cada cultura foi centrifugada a 6000 x g, por 2 minutos (centrífuga *Eppendorf* 5415D). O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuspensionado em 500 µL de tampão [ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico (MES) 10 mM; MgCl₂ 10 mM]. O processo foi repetido e, após o descarte do sobrenadante, o precipitado celular foi novamente ressuspensionado em 500 µL do mesmo tampão. Nesse ponto, a OD₆₀₀ das células foi medida e, em seguida, a solução de células para a infiltração foi preparada, efetuando-se a mistura das culturas, cada uma contendo uma das construções do experimento (hGFP e tGFP) e diluição em tampão [MES 10 mM; MgCl₂ 10 mM] para absorvância de aproximadamente 0,6 (0,3 de cada cultura), sendo por fim adicionada acetoseringona para concentração de 100 µM.

Para a infiltração, pequenas incisões foram feitas na superfície abaxial de folhas de *N. benthamiana* com a ponta de uma ponteira P-10, através das quais a solução de células foi infiltrada, usando uma seringa de 1 mL estéril. As plantas foram deixadas a temperatura ambiente e expostas à luz natural por 48 a 72 horas. Após esse período, as folhas infiltradas foram seccionadas em quadrados de aproximadamente 0,5 X 0,5 cm e colocadas em placas de Petri com tampão PBS 1X (tampão salina - fosfato de fabricação comercial LGC), até o momento da visualização.

A visualização foi realizada em microscópio confocal (*Leica* SP5 na FMRP-USP). Para a visualização da GFP, a excitação foi feita com laser de argônio, no comprimento de onda de 488 nm e a captura foi feita no intervalo entre 495-550nm. A escala foi colocada utilizando o *software ImageJ*.

3.10 Expressão heteróloga e análise de proteínas

3.10.1 Expressão heteróloga em *E. coli*

A expressão de proteínas heterólogas foi feita nas cepas de *E. coli* BL21(DE3)Rosetta e BL21-CodonPlus(DE3)-RP. Para a expressão em BL21(DE3)Rosetta, as bactérias foram transformadas por eletroporação com a

construção de interesse, plaqueadas em meio LB sólido suplementado com os antibióticos adequados e incubadas a 37 °C por 20 h. Em seguida, uma colônia isolada foi inoculada em meio LB líquido suplementado com os mesmos antibióticos e a cultura foi incubada novamente a 37 °C e 220 rpm durante 20 h. No final desse período, uma alíquota de 3 mL da cultura foi transferida para um Erlenmeyer contendo 300 mL de meio LB líquido, suplementado com cloranfenicol e ampicilina, sendo feito em duplicata (dois Erlenmeyers de 300mL). As culturas foram incubadas a 37°C e 220 rpm até atingirem OD₆₀₀ entre 0,4 e 0,6. No momento em que a absorbância alcançou este intervalo, foi adicionado o indutor de expressão Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para concentração final de 0,1 mM em cada um dos Erlenmeyers. A partir de então, a expressão foi feita em duas condições distintas: um Erlenmeyer foi incubado a 37°C sob agitação de 220 rpm, e o outro a 28°C, sob agitação de 150 rpm. Antes dessa incubação, foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada uma das culturas, chamadas de tempo zero (t₀), a qual serviu como controle da expressão. Alíquotas de 100 mL foram retiradas após uma, duas e quatro horas de indução e mantidas em gelo. Posteriormente, as seis alíquotas foram centrifugadas a 9900 x g (centrífuga *Eppendorf* 5810R) a 4°C por 10 minutos, para a precipitação das células. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente, e as células foram armazenadas a -20°C para posterior lise celular.

A expressão em BL21-CodonPlus(DE3)-RP seguiu o mesmo panorama geral, simplesmente mudando as condições e horários de expressão. Após transformação, foi feito um inóculo de uma colônia e, depois de 20 horas em incubação a 37°C a 220 rpm, 3 mL de cultura foram transferidos para dois Erlenmeyers com 300 mL de LB cada, sendo incubados até as culturas alcançarem a OD₆₀₀ de 0,4 a 0,6. Neste momento, a indução da expressão foi realizada com IPTG e, após coleta do tempo zero, as culturas foram incubadas a 20°C com agitação de 150 rpm e 28°C com a mesma agitação. Após 4 horas, um volume de 50 mL de cada cultura foi coletado, centrifugado por 10 minutos a 4°C e 9900 x g, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado celular congelado a -20°C. O resto da cultura permaneceu em incubação por mais 16

horas. Após este período, toda a cultura foi recuperada e centrifugada por 10 minutos a 4°C e 9900 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado congelado a -20°C para posterior lise.

3.10.2 Extração de proteínas bacterianas através de lise celular

Para a extração das proteínas expressas, os precipitados celulares foram ressuspensos em 5 mL de tampão de lise [Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 100 mM; lisozima 0,5 %; glicerol 1 %; imidazol 20 mM; inibidor de proteases 0,5 %] e incubados em gelo durante 30 minutos. Ainda dentro do gelo, as células foram submetidas à sonicação com 6 pulsos de 30 s a 30 % de potência (100 % = 400 W) e intervalos de 1 minuto entre cada pulso (*Branson Sonifier™ S-450 Digital Ultrasonic Cell Disruptor/Homogenizer, Fisher Scientific*). Em seguida, o lisado foi centrifugado por 30 minutos a 9900 x g (centrífuga *Eppendorf 5810R*) à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi transferido a um novo tubo e o precipitado foi ressuspensado em 5 mL de tampão de lise. O material foi preferencialmente armazenado em gelo, na geladeira, quando a utilização fosse ocorrer poucos dias após a obtenção. Entretanto para armazenamentos mais longos do que alguns poucos dias, foi estocado a -20°C até o momento do uso.

3.10.3 Análise de proteínas por SDS-PAGE

As proteínas obtidas na expressão heteróloga em *E. coli* foram submetidas à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Os géis foram montados no suporte adequado para espessura final de 1 mm. O gel de empacotamento (superior) apresenta a seguinte composição: Bis-acrilamida 3 %; de Tris 100 mM, pH 6,8; SDS 0,09 %; persulfato de amônio 0,09 %; e Tetrametiletilenodiamina (TEMED) 0,09 %, diluídos em água deionizada estéril. O gel de separação (inferior) foi feito com Bis-acrilamida 12,5 %; Tris 400 mM, pH 8,8; SDS 0,1 %; persulfato de amônio 0,05 %; e TEMED 0,05%.

O gel de separação foi feito primeiro e aplicado no suporte. A adição de isopropanol acima do gel permitiu que este não sofresse desnivelamento. Após

a polimerização do gel de separação, o isopropanol foi removido e o gel de empacotamento foi aplicado. O pente para a formação dos poços de amostra foi colocado logo em seguida. Após a polimerização do gel de empacotamento, o cassete foi montado e colocado na cuba de eletroforese contendo o tampão de corrida [Tris-base 25 mM; SDS 0,05 %; glicina 0,2 M] e, só então, o pente foi removido.

As amostras foram preparadas a partir do tampão de amostra 4X [Tris-HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 4 %; glicerol 10 %; azul de bromofenol 0,2 %; β -mercaptoetanol 4 %], para uma concentração final 1X. A mistura foi incubada a 100 °C por 5 minutos para a desnaturação das proteínas. As amostras foram, então, aplicadas com o auxílio de uma micropipeta, e os poços sem amostras foram preenchidos com tampão de amostra 1X. O marcador utilizado foi o *LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare)*.

A eletroforese ocorreu em duas fases. A fase inicial, de empacotamento, foi de 30 minutos a 60V, seguida da fase de separação por 2-2,5 h a 100V. Em seguida, os géis foram retirados cuidadosamente dos suportes de eletroforese e colocados em solução fixadora (metanol 50%, ácido acético glacial 10%, água destilada 40%) e corados em solução corante (metanol 25 %; ácido acético 5 %; Coomassie Blue R-250 0,2 %) *overnight*. Após corados, os géis foram incubados em solução de ácido acético 5% para evitar que crescessem fungos.

3.10.4 Análise por Western Blot

A transferência das bandas das proteínas separadas 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*). Após a corrida eletroforética, o gel foi incubado por 30 minutos em um recipiente contendo o tampão de transferência (Tris-HCl 25mM, pH 8,3; glicina 192mM e 20% de metanol) previamente gelado, juntamente com todos os acessórios da transferência, incluindo a membrana, as esponjas e os papéis de filtro. A transferência foi realizada por 1 hora e 15 minutos à 100V. Após a transferência, a membrana foi

corada com Ponceau por 3 minutos com o intuito de verificar a eficiência da transferência das bandas do gel para a membrana. Em seguida, a membrana foi lavada em água destilada para a retirada do Ponceau e colocada em solução de bloqueio, contendo leite em pó desnatado 5% em tampão TBS (Tris-HCl 20mM, pH 7,5; NaCl 150mM; Tween 0,05%) *overnight* a 4 °C. Após este período, a membrana foi submetida a três lavagens de 10 minutos em tampão TBS. Em seguida, foi efetuada a incubação em 15 mL de solução de bloqueio contendo o anticorpo primário, por 2 horas à temperatura ambiente. Após esta incubação, foram efetuadas três lavagens de 10 minutos cada com o tampão TBS e, a seguir, uma incubação de 1 hora em 15 mL da solução de bloqueio contendo o anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Após esta incubação, a membrana foi lavada três vezes por 10 minutos com tampão TBS e, a seguir, submetida ao procedimento de revelação. Para revelação com peroxidase, foram preparadas as soluções: Solução 1: 1 mL de Tris/HCl 1M pH 8,5, 100µL luminol 250mM, 44 µL “p-coumaric acid” 90mM, 8,85 mL água destilada; solução2: 6 µL água oxigenada 30%, 1 mL Tris/HCl 1M pH 8,5, 9 mL de água destilada. Em uma sala escura, as duas soluções foram misturadas sobre a membrana e deixadas sobre ela por aproximadamente 2 minutos, descartando as soluções em seguida. A membrana foi envolvida em um plástico e colocada dentro de um cassete de autoradiografia, no qual foi colocado um filme que foi posteriormente revelado utilizando soluções reveladora e fixadora (Kodak).

3.10.5 Purificação de proteínas por cromatografia de afinidade

As amostras selecionadas da expressão em *E. coli* foram purificadas utilizando uma resina de níquel (*Ni Sepharose High Performance GE Healthcare Life Sciences*) para cromatografia de afinidade das proteínas contendo a *tag* de histidina. Para isso, 1 mL de resina foi usado para cada 10 mL de amostra a ser purificada. A resina foi lavada em 5 volumes de água deionizada estéril e, em seguida, empacotada com o auxílio de uma bomba peristáltica (*GE Healthcare Life Sciences*); toda a cromatografia foi realizada com um fluxo de 0,5 mL/min. Após o empacotamento, foi efetuada uma lavagem com 5 volumes do tampão

de lise sem glicerol. Em seguida, a amostra foi aplicada e o produto, composto pelas proteínas que não se ligaram à coluna, foi coletado. A seguir, a resina foi lavada com mais 5 volumes de tampão de lise sem glicerol. Após esta lavagem, os ligantes foram eluídos com 5 volumes do tampão de eluição [Tris-HCl 20 mM, pH = 8; NaCl 500 mM; imidazol 350 mM; inibidor de proteases 0,5 %], sendo coletadas as frações de purificação de 500 µL.

3.11 Meios de cultura e soluções

Todos os meios de cultura foram autoclavados (autoclave vertical 415 – Fanem) por 20 minutos a 1 atm de pressão, para a esterilização.

Meio LB (*Luria-Bertani*) para bactérias: 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% de NaCl em água deionizada. O pH foi corrigido para 7,3 com NaOH 3 M. Para a preparação sólida, foi adicionado ágar bacteriológico a 1 %.

Meio MS para plantas (Murashige & Skoog, 1962): 0,44% de meio MS (*Sigma-Aldrich*), contendo os sais e as vitaminas, 3% de sacarose e 0,05% de tampão MES em água deionizada. O pH do meio foi ajustado para 5,8 com KOH 4 N. Para o meio sólido foi acrescentado 0,7% de ágar (DIFCO) para cada litro de meio líquido.

Meio MAS (*Minimum A Sucrose*): 50 mL de meio 5X A; 2,5 mL de sacarose 20% (esterilizada por filtração); 0,5 mL de MgSO₄ 20% (autoclavado); 0,125 mL de tiamina (10mg/mL - esterilizada por filtração). O volume foi completado para 245 mL com água destilada autoclavada contendo 3 g de ágar bacteriológico.

Meio YPAD (*Yeast extract, Peptone, Adenine, Dextrose*) para leveduras: 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de dextrose e 0,02% de sulfato de adenina em água deionizada. O pH foi ajustado para 6 com HCl 4N. Para a obtenção do meio sólido foi acrescido 2% ágar (DIFCO).

Meio SD (*Synthetic Defined*) para leveduras: 0,7% de base nitrogenada para leveduras sem aminoácidos (Difco) e 2% dextrose. O pH foi ajustado para 5,8 com H₂SO₄. Ao meio já autoclavado, foi adicionada a solução *Dropout* estéril adequada para a seleção intencionada. Para obtenção do meio sólido foi adicionado 2% de ágar (DIFCO).

Solução Dropout de aminoácidos 10X completo para meio SD: hemissulfato de L-Adenina 200 mg/L, L-Arginina HCl 200 mg/L, L-Histidina HCl monoidratada 200 mg/L, L-Isoleucina 300 mg/L, L-Leucina 1000 mg/L, L-Lisina HCl 300 mg/L, L-Metionina 200 mg/L, L-Fenilalanina 500 mg/L, L-Treonina 2000 mg/L, L-Triptofano 200 mg/L, L-Tirosina 300 mg/L, L-Uracila 200 mg/L, L-Valina 1500 mg/L. A solução foi autoclavada e estocada a 4°C. A solução foi adicionada para concentração 1X nos meios de cultura. Para meios seletivos SD-leu-trp (sem leucina e triptofano) ou SD-leu-trp-his (sem leucina, triptofano e histidina) foram usadas soluções *dropout* feitas sem adição destes aminoácidos.

3.12 Antibióticos Usados

Para preparação dos antibióticos, estes foram dissolvidos em água deionizada, sendo as soluções esterilizadas por filtração. As soluções foram armazenadas a -20°C. As concentrações dos antibióticos utilizados para seleção em bactérias, de cada um dos vetores usados para as construções deste trabalho, estão apresentadas na Tabela 3.5 na próxima página.

Tabela 3.5. Antibióticos utilizados e suas respectivas concentrações para a seleção de *E. coli* e *A. tumefaciens*, em relação ao vetor em que a construção foi feita.

Vetor	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>
pDONR221	Canamicina - 50 µg/mL	-
pDEST22	Ampicilina - 100 µg/mL	-
pDEST32	Gentamicina - 5 µg/mL	-
pDEST17	Ampicilina - 100 µg/mL	-
pH7m34GW	Spectinomicina - 50 µg/mL	Spectinomicina - 100 µg/mL
	Streptomicina - 12,5 µg/mL	Streptomicina - 300 µg/mL

4. Resultados

4.1 Análise fenotípica das plantas transgênicas

Com o intuito de melhor caracterizar o fenótipo de plantas transgênicas de silenciamento e superexpressão da F-box FEF1, plantas da geração T1 dos transgênicos (T0) gerados por Abbad (2012) foram cultivadas. Baseando-se em Abbad (2012), foram escolhidas plantas de três eventos independentes de transgenia de cada uma das condições, silenciamento e superexpressão. Foram escolhidas linhagens que estavam entre as que mais modificaram o nível de expressão de FEF1 no estigma/estilete na geração T0. Todas as plantas utilizadas no presente trabalho foram cultivadas a partir de sementes produzidas por autopolinização de plantas da geração inicial T0. Após uma seleção inicial das plantas em meio com antibiótico, adequado para a sobrevivência somente dos transgênicos, estes foram transferidos para terra e cultivados em casa de vegetação, onde seu fenótipo foi analisado.

4.1.1 Análise fenotípica macroscópica do pistilo

Buscando analisar as características fenotípicas exclusivas das plantas transgênicas, testes estatísticos foram efetuados com medições obtidas de estruturas do pistilo das plantas transgênicas da geração T1. Para estas análises foram usadas plantas de três eventos independentes de silenciamento (23.3, 33.1 e 34.1) e dois independentes de superexpressão (65.1 e 66.2) de FEF1, pois as plantas do evento 5.2 de superexpressão foram perdidas por motivo de doença. Para a realização dos testes estatísticos, as medições das plantas dos diferentes eventos de cada condição (silenciamento ou superexpressão) foram unificadas. As plantas transgênicas de superexpressão, assim como as de silenciamento, apresentam níveis de expressão de FEF1 diferentes entre si. Entretanto, a análise estatística realizada aqui buscava responder quais foram as alterações produzidas nas estruturas do pistilo em resposta à mudança da expressão de FEF1, ou seja, verificar qual o efeito do silenciamento e da superexpressão dessa F-box.

As medições foram efetuadas com o auxílio de um paquímetro, sendo usadas somente flores do estágio 11 de desenvolvimento floral (Koltunow et al., 1990), de somente um indivíduo de cada evento de transgenia. Os pistilos foram medidos no comprimento total, indo da base do ovário (acima dos nectários florais) até o ápice do estigma (Figura 4.1A). Os estigmas tiveram sua largura medida perpendicularmente à cicatriz de fusão dos carpelos (Figura 4.4A). Ovários tiveram sua largura medida na altura dos nectários florais, perpendicularmente à cicatriz de fusão dos carpelos (Figura 4.5A). Para as plantas de silenciamento 99 medições de cada estrutura foram obtidas, sendo 33 de cada evento independente de transgenia. Para as plantas de superexpressão 58 medições foram obtidas, sendo 33 do evento 65.1 e 25 do evento 66.2. Para as plantas controle 33 medições foram efetuadas. As análises foram feitas utilizando um teste ANOVA para análise das variâncias, seguido por um teste de Tukey para a comparação entre as médias. São apresentados também os valores de desvio padrão da média, como representação da variação que foi observada dentro da amostra.

A análise do comprimento total do pistilo demonstrou diferença significativa entre a média das plantas de silenciamento e o controle SR1, com nível de significância $p < 0,05$. As plantas de silenciamento apresentaram média do comprimento do pistilo menor (37,943 mm; $n=99$) do que as plantas controle (38,808 mm; $n=33$). Diferença também foi encontrada entre as plantas de superexpressão e SR1, com $p < 0,01$, essas apresentaram média do comprimento do pistilo maior (41,886 mm; $n=58$) do que as plantas controle (Figura 4.1B).

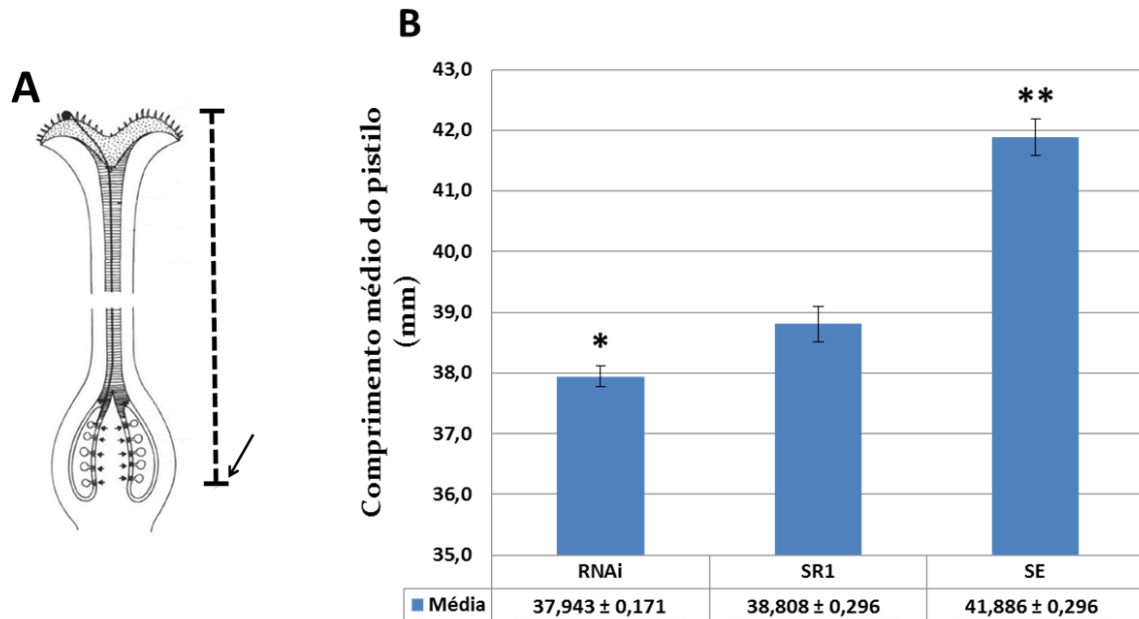


Figura 4.1. A) Ilustração do modo como foram feitas as medições do comprimento do pistilo. A seta indica o nível dos nectários florais (imagem modificada de Muthugapatti et al., 1990). B) Comparação entre as médias do comprimento dos pistilos de plantas de silenciamento (RNAi) e superexpressão (SE) de FEF1 e do controle (SR1). Número de pistilos medidos (n): RNAi=99, SE=58, SR1=33. As barras indicam o desvio padrão da média. *Diferença significativa do controle SR1, com nível de significância $p < 0,05$. **Difere significativamente de SR1, com $p < 0,01$.

O resultado encontrado para o comprimento do pistilo é coerente com as alterações que Abbad (2012) observou, demonstrando a estabilidade do fenótipo nas plantas da geração T1 e comprovando as alterações propostas pela autora. As Figuras 4.2 e 4.3 ilustram flores dos eventos de silenciamento e superexpressão de FEF1 que demonstraram as alterações que melhor caracterizam o fenótipo aqui relatado.

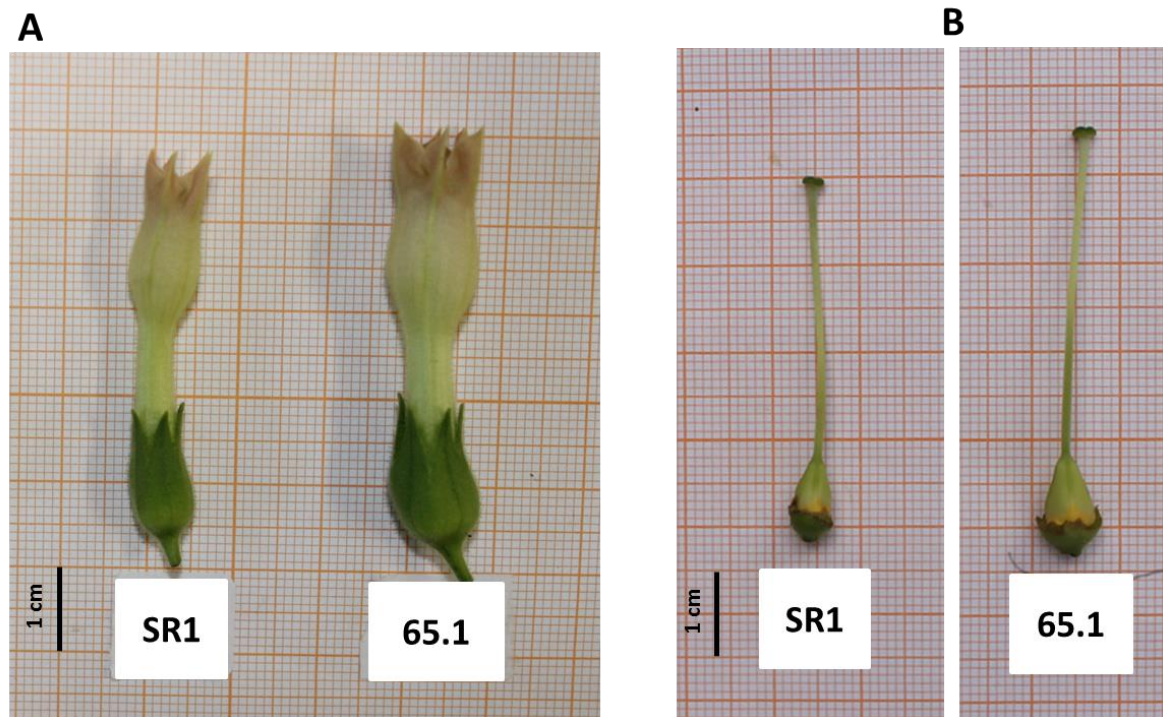


Figura 4.2. A) Flor de uma planta da geração T1 do evento 65.1 de superexpressão de FEF1, em comparação ao controle SR1. B) Pistilo de uma flor do mesmo indivíduo deste evento de transgenia. Todas as flores estão no estágio 10 de desenvolvimento.

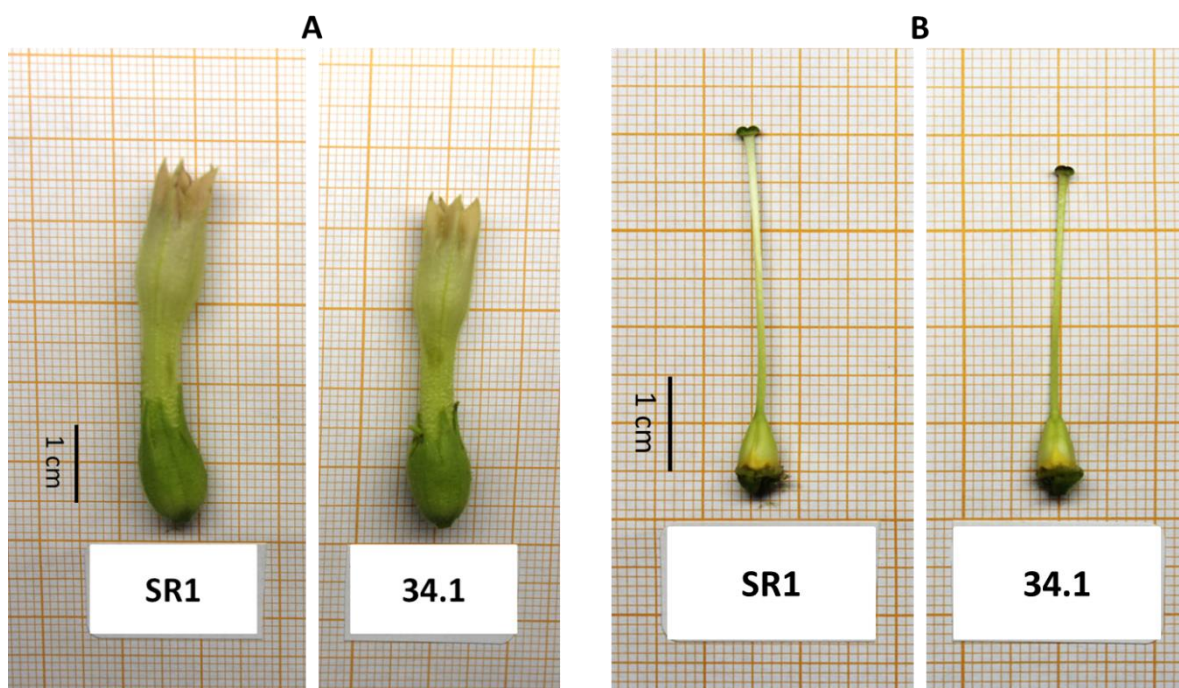


Figura 4.3. A) Flor de uma planta da geração T1 do evento 34.1 de silenciamento de FEF1, em comparação ao controle SR1. B) Pistilo de uma flor do mesmo indivíduo deste evento de transgenia. Todas as flores estão no estágio 10 de desenvolvimento.

A comparação das médias da largura dos estigmas revelou diferença significativa das plantas de superexpressão em relação ao controle SR1, com nível de significância de $p < 0,01$ no teste Tukey (Figura 4.4B). As plantas de superexpressão apresentaram largura média do estigma (2,553 mm, $n=58$) maior do que plantas controle (2,369 mm, $n=33$), indicando que a superexpressão deste gene promoveu aumento do tamanho deste órgão. As plantas de silenciamento, por outro lado, não demonstraram diferença significativa da largura média dos estigmas (2,338 mm, $n=99$) para a média do controle SR1.

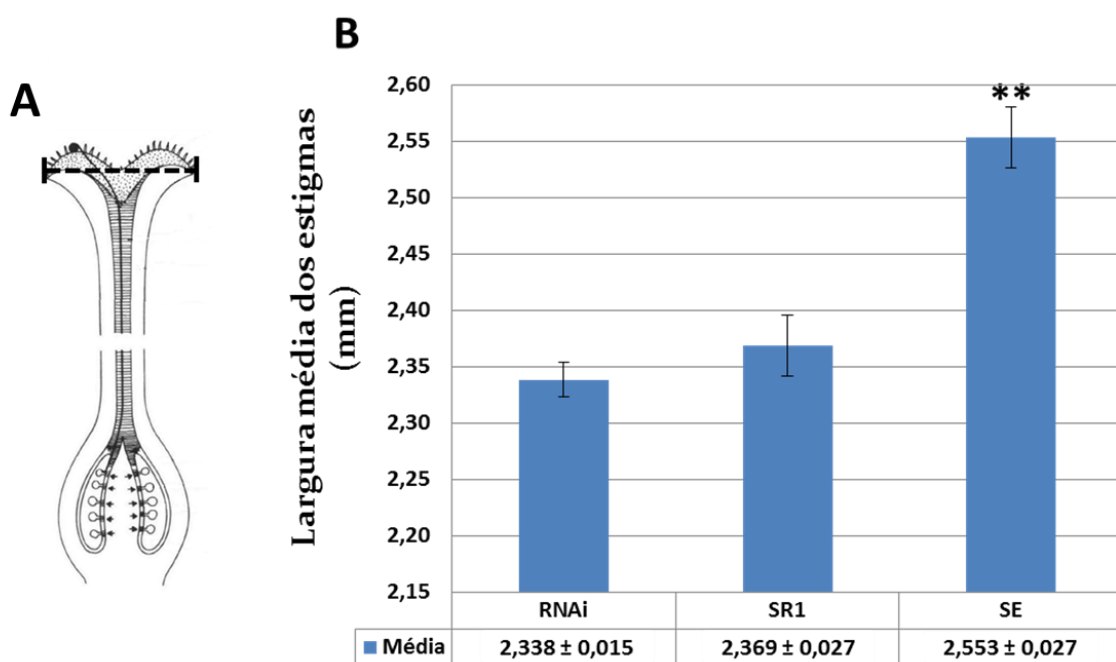


Figura 4.4. A) Ilustração do modo como foram feitas as medições da largura do estigma (imagem modificada de Muthugapatti et al., 1990). B) Comparação entre a largura média do estigma de plantas de silenciamento (RNAi) e superexpressão (SE) de FEF1 e do controle (SR1). As barras indicam o desvio padrão da média. *Difere significativamente do controle SR1, com nível de significância $p < 0,01$.

A comparação da largura média dos ovários revelou diferença significativa em relação ao controle SR1, tanto para as plantas de silenciamento quanto para as de superexpressão de FEF1, com nível de significância de $p < 0,01$ nos testes de Tukey. As plantas de silenciamento e as de superexpressão

apresentaram largura média do ovário menor (3,622 mm, n=99) e maior (5,171 mm, n=58), respectivamente, que o controle SR1 (4,325 mm, n=33) (Figura 4.5B).

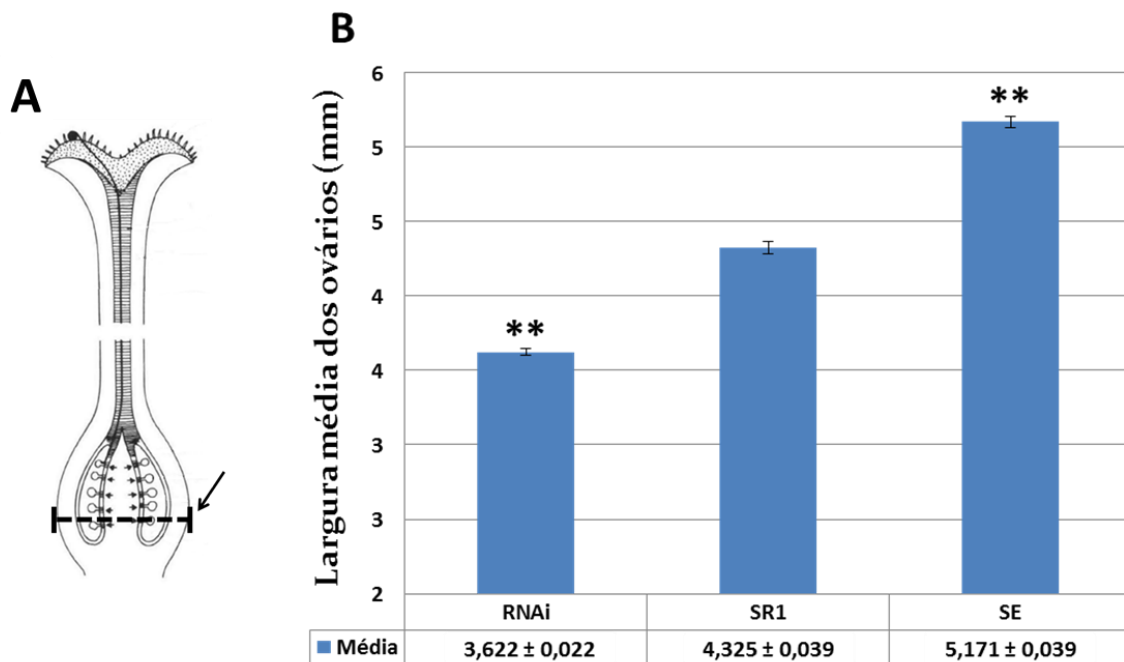


Figura 4.5. A) Ilustração do modo como foram feitas as medições da largura do ovário. A seta indica o nível dos nectários florais (imagem modificada de Muthugapatti et al., 1990). B) Comparação entre a largura média do ovário de plantas de silenciamento (RNAi) e superexpressão (SE) de FEF1 e do controle (SR1). As barras indicam o desvio padrão da média. **Difere significativamente do controle SR1, com nível de significância $p < 0,01$.

Na figura 4.6 estão ilustrados detalhes dos ovários das mesmas plantas demonstradas nas Figuras 4.2 e 4.3. Como foi demonstrado com as análises estatísticas, o silenciamento de FEF1 causou a redução desse órgão, enquanto a superexpressão promoveu o aumento de tamanho do mesmo.

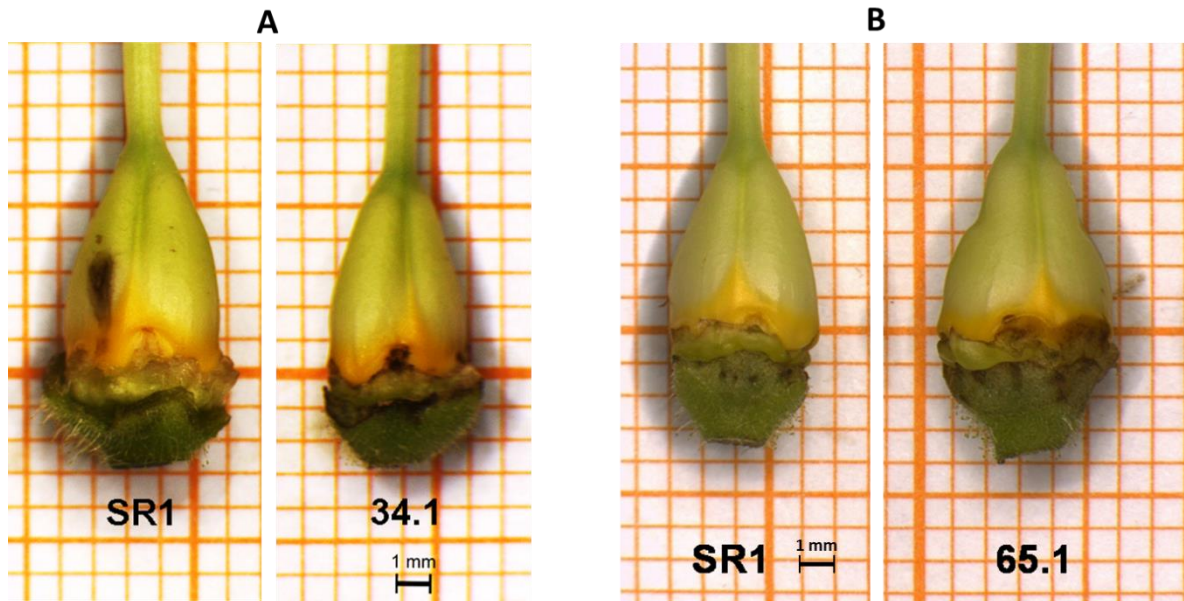


Figura 4.6. A) Ovário de uma planta da geração T1 do evento 34.1 de silenciamento de FEF1, em comparação ao controle SR1. B) Ovário de uma planta da geração T1 do evento 65.1 de superexpressão de FEF1, em comparação ao controle SR1. Todas as flores estão no estágio 10 de desenvolvimento.

As análises estatísticas comprovaram alterações do pistilo das plantas transgênicas em comprimento, além de largura de ovário e estigma. Estes dados indicam a participação de FEF1 na regulação do tamanho de estruturas do pistilo de *N. tabacum*.

4.1.2 Análise histológica do pistilo

Com o objetivo de elucidar a natureza das modificações demonstradas nas estruturas do pistilo das plantas transgênicas, estigmas e ovários foram preparados para a análise por microscopia óptica. Os tecidos fixados e seccionados foram obtidos das mesmas plantas usadas nas medições mencionadas na seção 4.1.1, sendo todos pertencentes a pistilos do estágio 10 de desenvolvimento floral. Foram utilizados dois estigmas e dois ovários de cada planta, sendo seccionados no eixo longitudinal, perpendicularmente à cicatriz de fusão dos carpelos. Só foi incluído um ovário do evento de superexpressão 5.2, pois todos os outros tecidos preparados da planta deste evento ficaram com

qualidade muito ruim. A partir da preparação completa dos órgãos, uma secção foi escolhida para medições de área de células e de regiões dos órgãos.

Para a delimitação de uma região similar entre os diferentes exemplares de estigma, foi escolhida para a análise uma secção que apresentasse tecido vascular dos dois lados do tecido transmissor. No pistilo de tabaco os feixes vasculares estão localizados somente em uma pequena região central dentro do parênquima, servindo como uma boa referência da região de análise. A Figura 4.7, na página seguinte, traz as secções utilizadas para as medições de cada um dos estigmas das plantas de silenciamento, ao lado de dois estigmas do controle SR1. A Figura 4.8 apresenta as secções utilizadas das plantas de superexpressão, também ao lado dos estigmas de SR1.

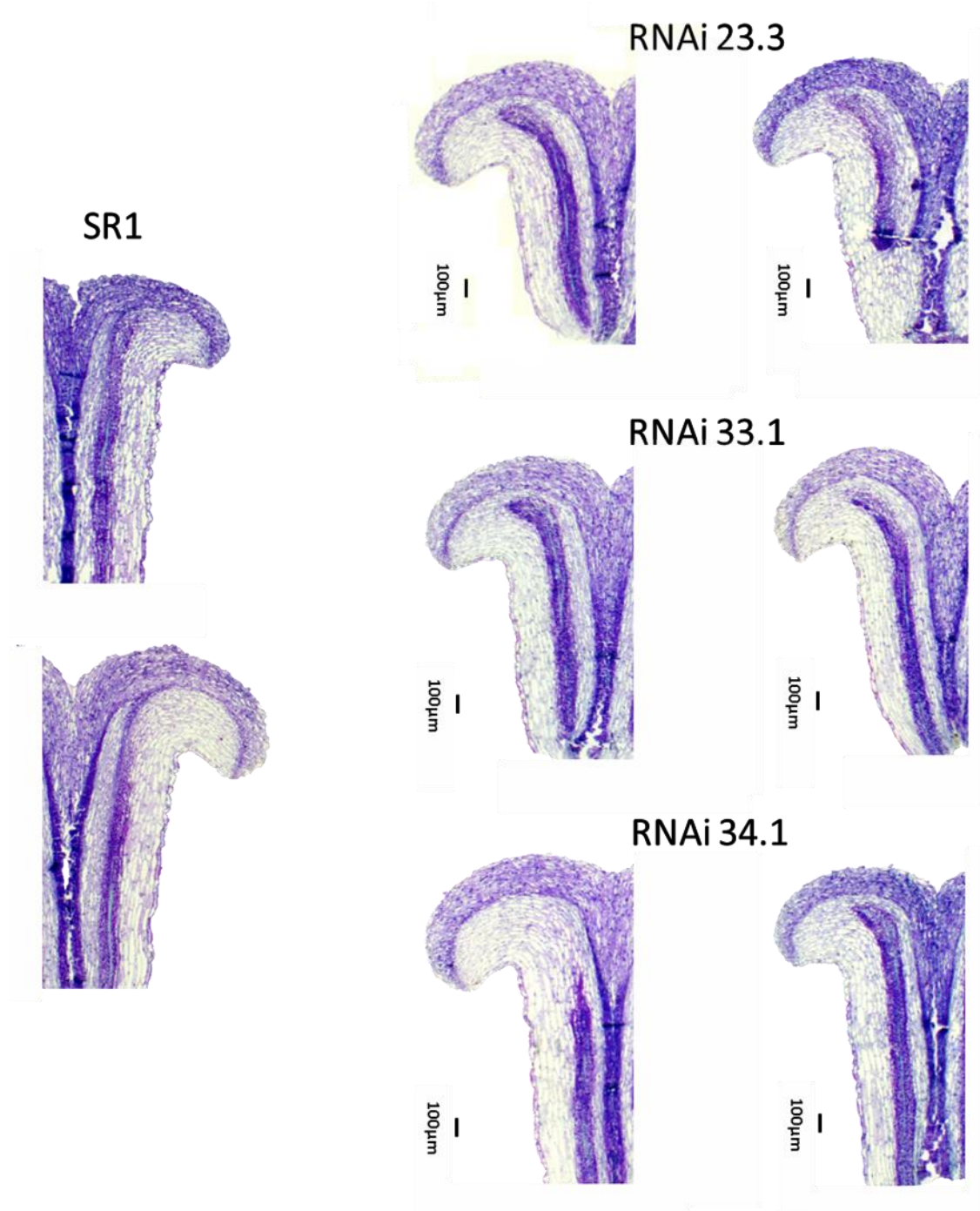


Figura 4.7. Secções estigmáticas selecionadas para as análises histológicas de cada uma das plantas de silenciamento (RNAi) de FEF1 e do controle (SR1), coradas com azul de toluidina. Cada secção é proveniente de um estigma, sendo que os pertencentes ao mesmo evento transgênico foram obtidos de um mesmo indivíduo.

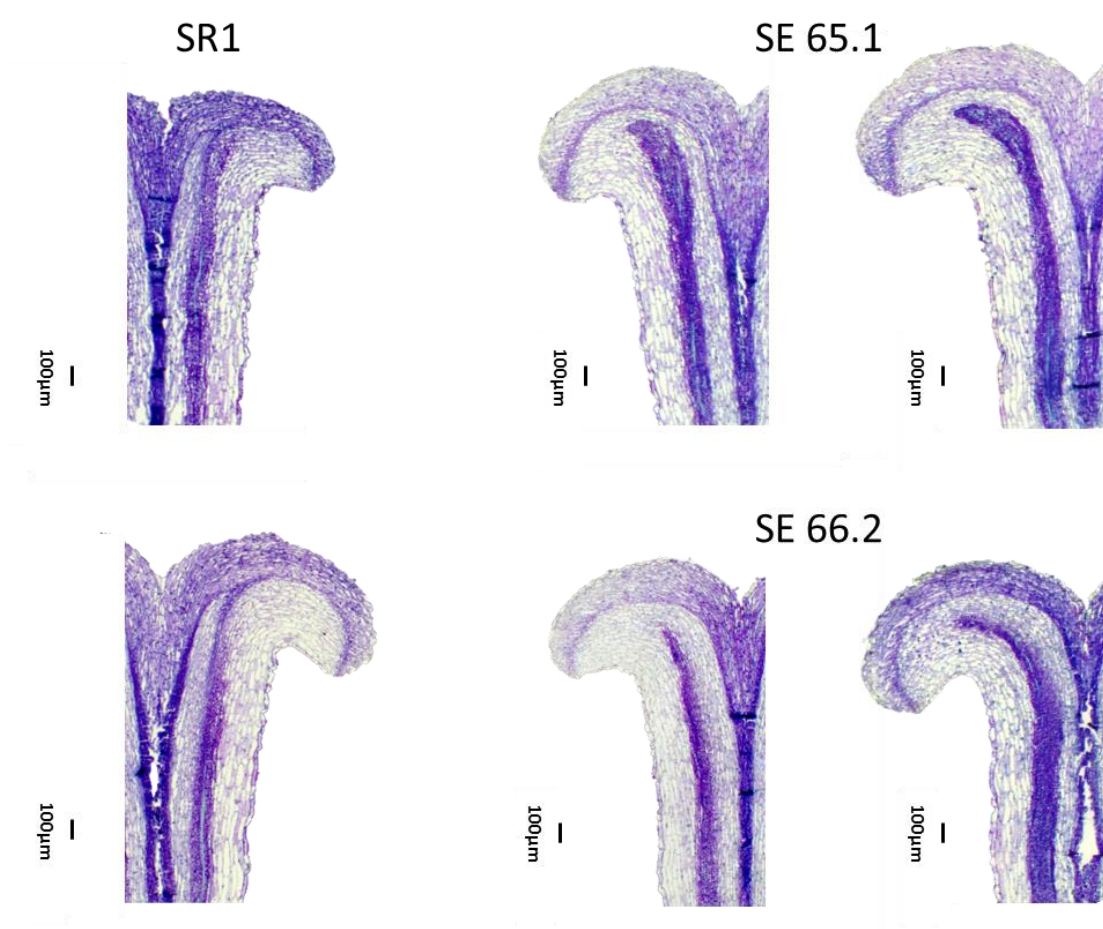


Figura 4.8: Secções estigmáticas selecionadas para as análises histológicas de cada uma das plantas de superexpressão (SE) de FEF1 e do controle (SR1), coradas com azul de toluidina. Cada secção é proveniente de um estigma, sendo que os pertencentes ao mesmo evento transgênico foram obtidos de um mesmo indivíduo.

Para uma estimativa do número de células na zona secretória de cada estigma foi utilizada a medida da área total da zona secretória, dividindo-a pela soma da área de 30 células medidas nesta região do estigma correspondente (Figura 3.1A e B). As estimativas obtidas estão presentes na Tabela 1 do anexo 1.

Com as estimativas obtidas de cada estigma foi feita uma média do número de células na zona secretória para cada condição de expressão de FEF1, dividindo a soma do número de células de todos os estigmas de cada uma, pelo número de estigmas do grupo. A média de células na zona secretória das plantas de silenciamento foi de 481 células, em comparação com 559 para o controle SR1. Essa média indica a redução no número de células na zona

secretória do estigma das plantas de silenciamento de FEF1. As plantas de superexpressão, por outro lado, apresentaram média de 762 células na zona secretória do estigma, apontando um aumento na proliferação celular neste tecido, em relação ao controle SR1. Estes dados indicam uma relação entre os níveis de expressão da F-box FEF1 e a taxa de proliferação celular na zona secretória do estigma, apontando o envolvimento desta proteína com a regulação desse processo.

Do mesmo modo que as análises estatísticas macroscópicas, as análises estatísticas histológicas foram analisadas em conjunto, segundo a condição de expressão de FEF1. Os dados das diferentes plantas de silenciamento foram considerados como um único grupo, bem como as plantas de superexpressão e o controle. Com isso foi possível verificar quais alterações o silenciamento ou superexpressão de FEF1 produziu, a nível celular. O teste estatístico usado para a comparação entre os grupos foi o teste de Kruskal-Wallis e foram apresentados os valores de erro padrão como estimativa da imprecisão associada às médias.

A Figura 4.9B apresenta a comparação das áreas médias das células na zona secretória dos estigmas (Figura 4.9A). O silenciamento de FEF1 nas plantas RNAi causou um aumento da área das células na zona secretória do estigma ($576,206 \mu\text{m}^2$, $n=180$) em relação às plantas controle ($475,858 \mu\text{m}^2$, $n=60$), com nível de significância de $p<0,01$ no teste H de Kruskal-Wallis. A superexpressão, por outro lado, não provocou modificação do tamanho das células nesse tecido.

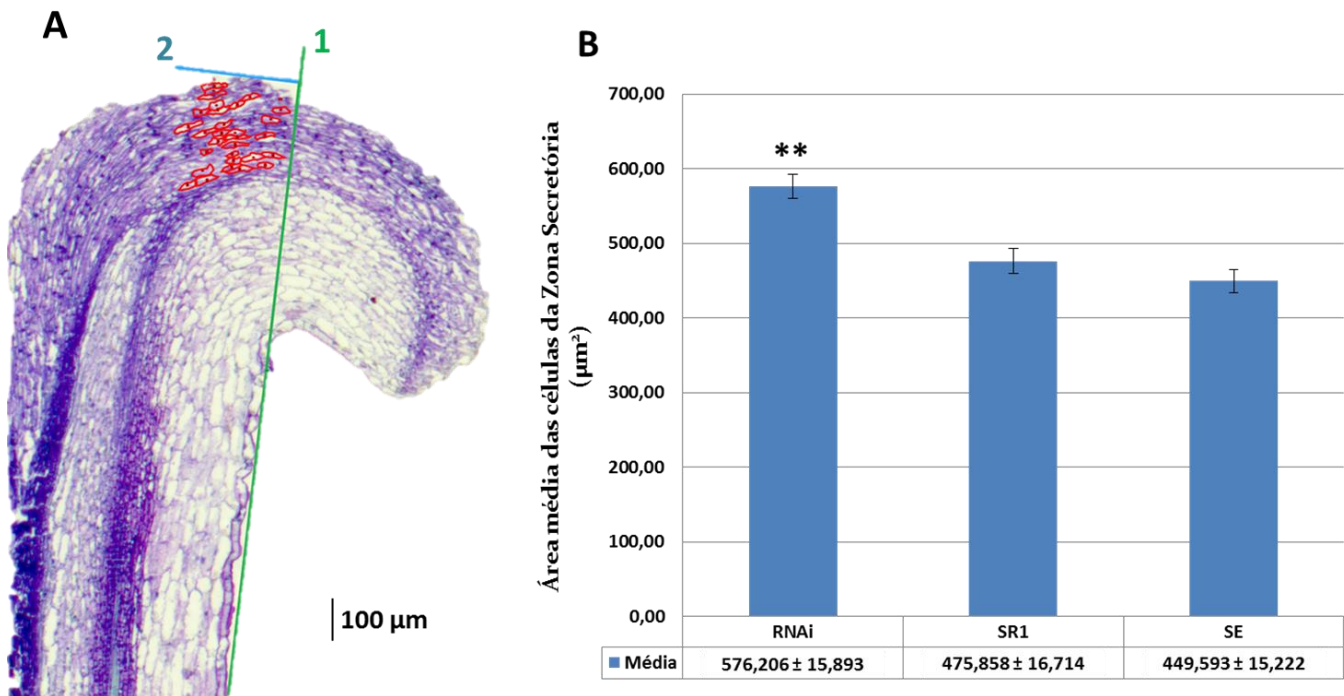


Figura 4.9. A) Exemplo da delimitação da área de 30 células em um dos exemplares de estigma. As retas 1 e 2 foram usadas como forma de delimitação do local de análise, explicado no item 3.1.4. B) Comparação entre as médias das áreas das células na zona secretória do estigma de plantas de silenciamento (RNAi) e superexpressão (SE) de FEF1 e do controle (SR1). Número de células medidas (n): RNAi=180, SE=120, SR1=60. As barras indicam o erro padrão da amostra. *Diferença significativa do controle SR1, com nível de significância $p < 0,01$.

Com o intuito de verificar se modificações haviam ocorrido nas células do parênquima do estigma, foram efetuadas medições de área também neste tecido, logo abaixo da zona secretória (Figura 4.10A). A Figura 4.10B ilustra as médias de cada condição de expressão de FEF1. Não foi obtida diferença significativa no teste H de Kruskal-Wallis para esta comparação, indicando que este tecido não sofreu alteração nas condições de silenciamento e superexpressão de FEF1.

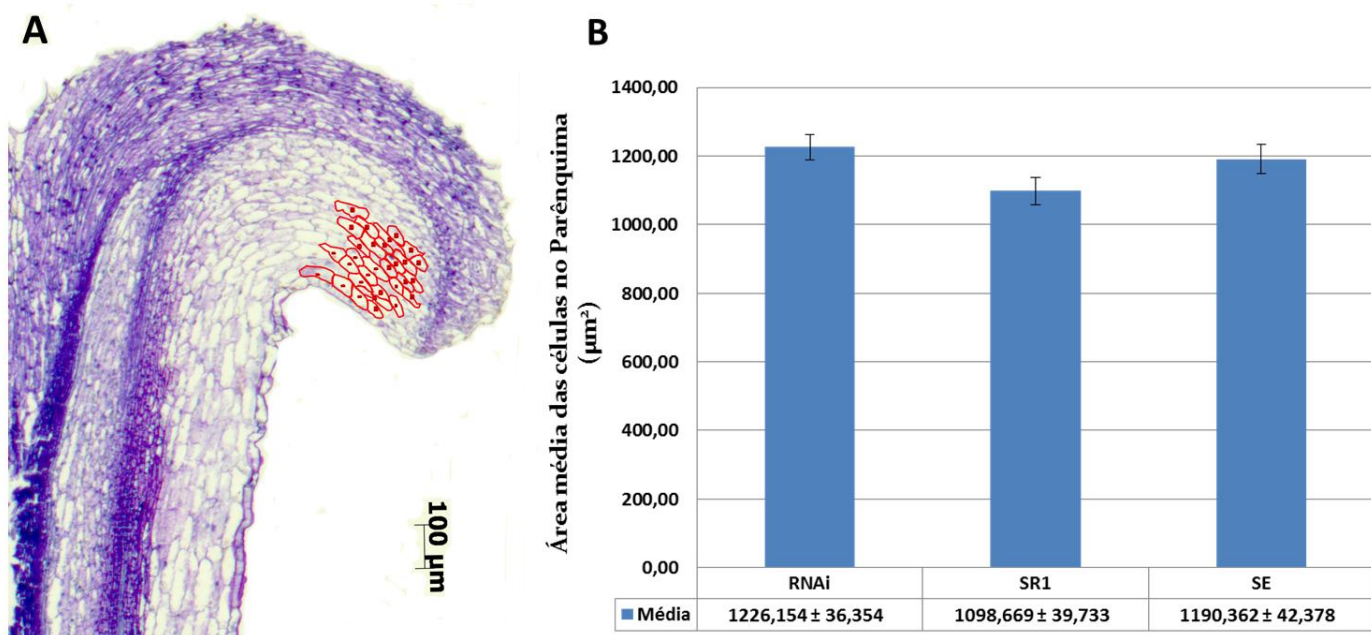


Figura 4.10. A) Exemplo da delimitação da área de 30 células no parênquima de um dos exemplares de estigma. B) Médias das áreas das células no parênquima do estigma de plantas de silenciamento (RNAi) e superexpressão (SE) de FEF1 e do controle (SR1). Número de células medidas (n): RNAi=180, SE=120, SR1=60. As barras indicam o erro padrão da amostra.

As imagens utilizadas para medições de células nos ovários estão demonstradas nas Figuras 4.11 e 4.12 a seguir. Para a delimitação de uma região similar entre os diferentes exemplares de ovários, foi escolhida para a análise uma secção que apresentasse tecido vascular na base, estendendo-se o mais próximo possível do ápice. No pistilo de tabaco esse tecido se encontra somente em uma pequena região central dentro do parênquima, servindo como uma boa referência.

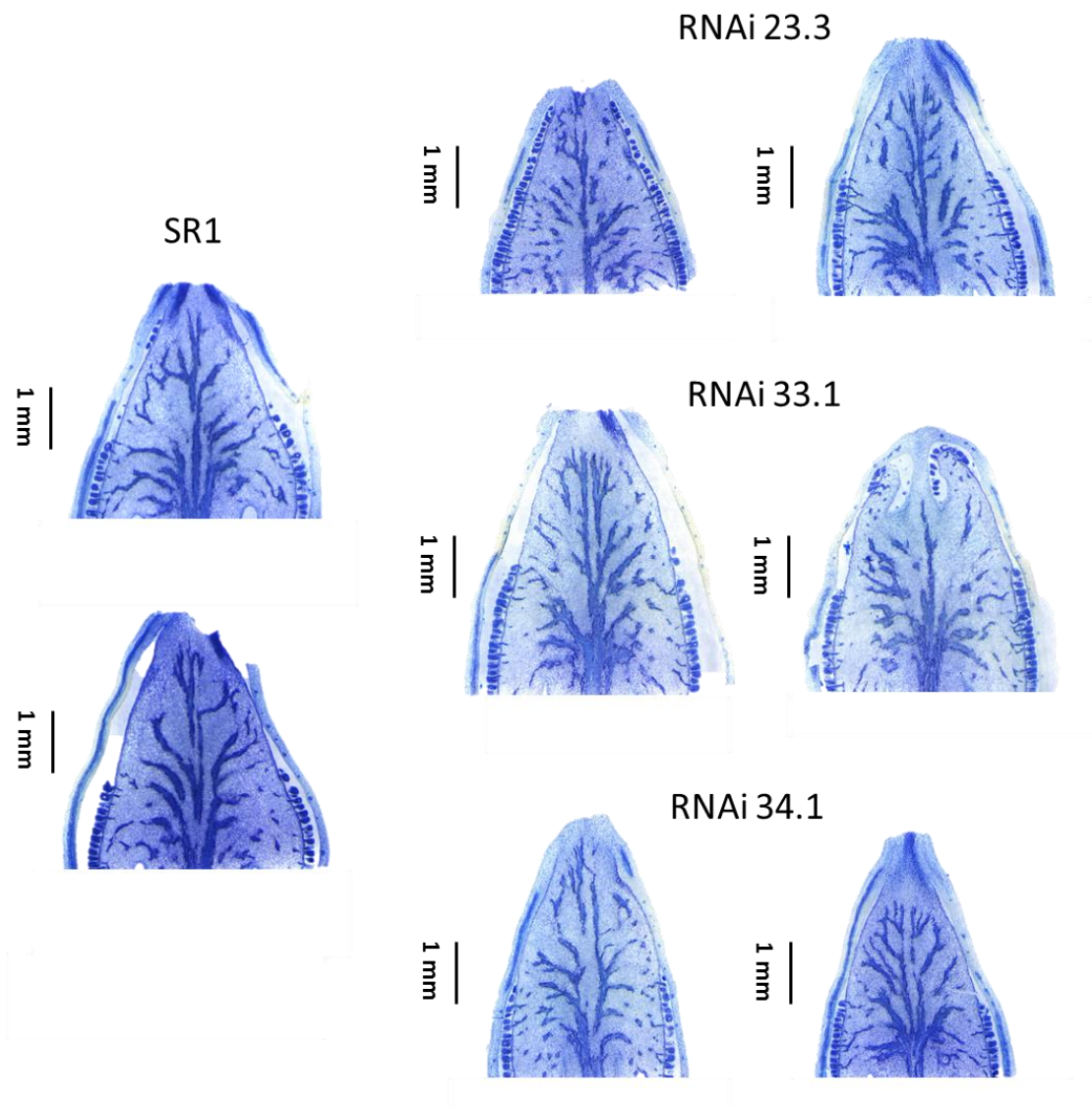


Figura 4.11: Secções de ovários selecionadas para as análises histológicas de cada uma das plantas de silenciamento de FEF1, coradas com azul de toluidina. Os dois ovários de cada linhagem de silenciamento foram obtidos de um mesmo indivíduo.

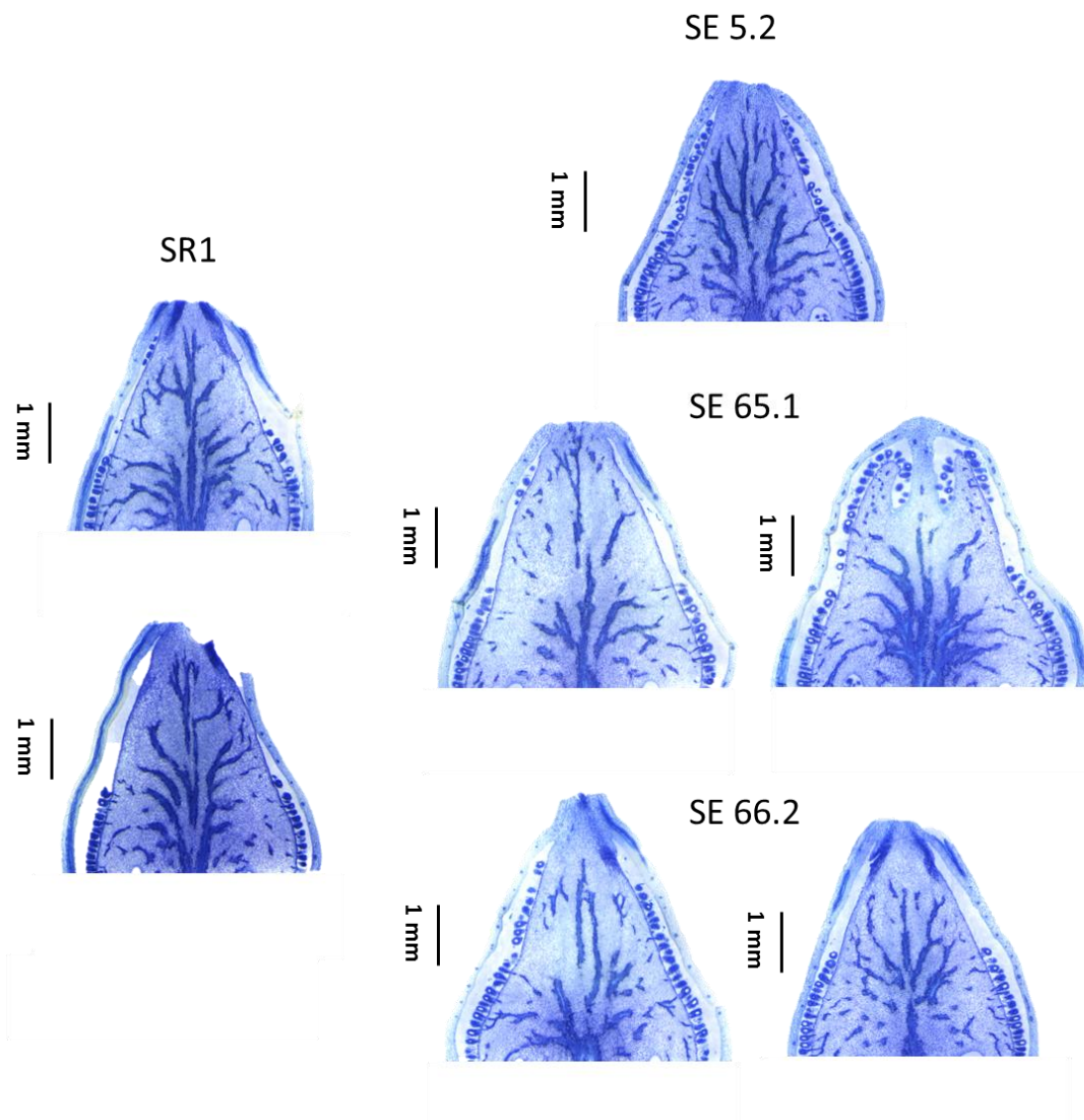


Figura 4.12: Secções de ovários selecionadas para as análises histológicas de cada uma das plantas de superexpressão de FEF1, coradas com azul de toluidina. Os dois ovários de cada linhagem de superexpressão foram obtidos de um mesmo indivíduo.

Para uma estimativa do número de células em cada ovário foram utilizadas as medidas de área total do ovário, dividindo-a pela soma da área das 30 células medidas no parênquima do ovário correspondente (Figura 3.3). As estimativas obtidas estão presentes na tabela 2 do anexo 2 e a partir delas foi calculada a média para as plantas de silenciamento, controle e superexpressão. A média do número de células no parênquima das plantas de silenciamento foi de 5933 células, enquanto para SR1 foi de 6253 e para as plantas de superexpressão foi de 6510. Estes dados indicam que o silenciamento de FEF1

promoveu a redução da proliferação celular no parênquima dos ovários das plantas transgênicas, enquanto a superexpressão dessa F-box causou um aumento da proliferação.

A análise da média da área das células parenquimáticas do ovário de plantas das diferentes condições de expressão de FEF1 permitiu a obtenção da Figura 4.13B abaixo (a Figura 4.13A ilustra as medições). As plantas de superexpressão (área média das células: 2140,45 μm^2 , n=150) diferiram do controle SR1 (área média: 1860,803 μm^2 , n=60), em teste de Kruskal-Wallis com nível de significância $p < 0,01$. A superexpressão de FEF1 causou um aumento da área das células do tecido parenquimático do ovário dessas plantas.

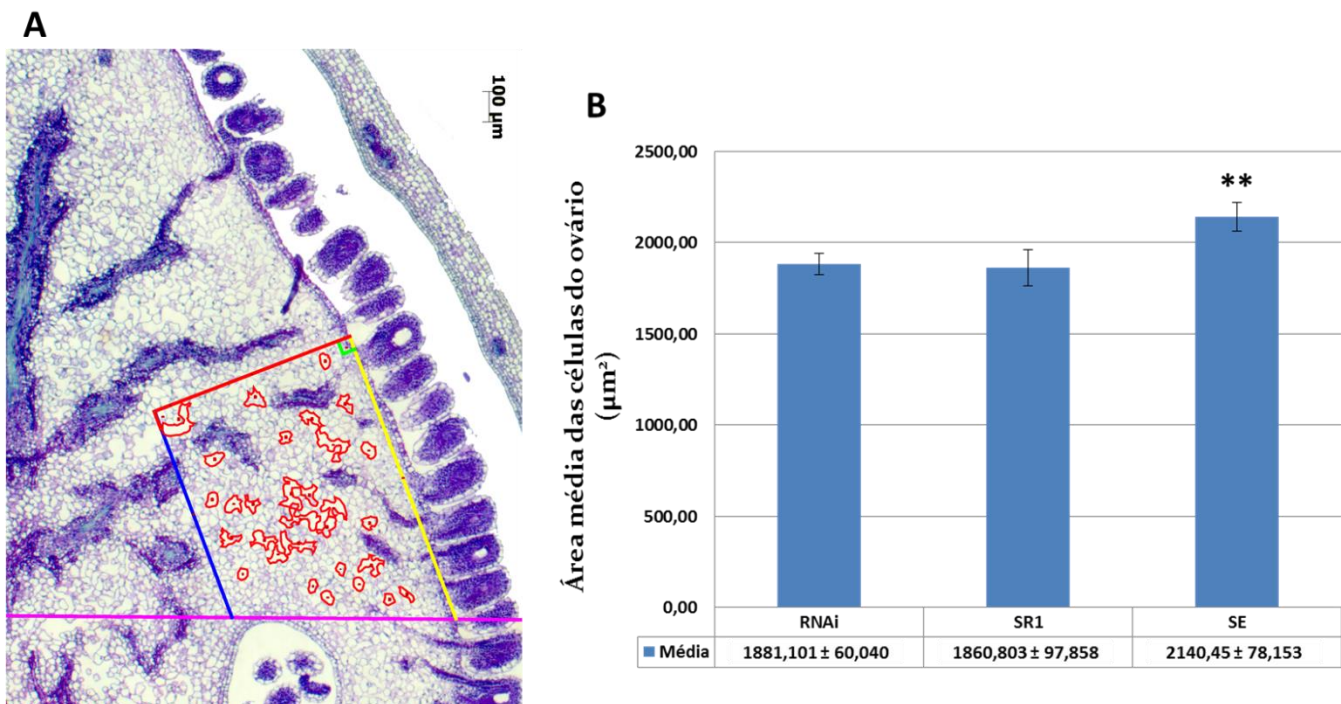


Figura 4.13. A) Exemplo da delimitação da área de 30 células em um dos exemplares de ovário. As retas de diferentes cores foram usadas como forma de delimitação do local de análise. B) Comparação entre as médias das áreas das células parenquimáticas de plantas de silenciamento (RNAi) e superexpressão (SE) de FEF1 e do controle (SR1). Número de células medidas (n): RNAi=180, SE=150, SR1=60. As barras indicam o erro padrão da amostra.

**Diferença significativa do controle SR1, com nível de significância $p < 0,01$.

4.2 Estudo das interações proteicas com FEF1

4.2.1 Ensaio de duplo-híbrido em leveduras

Com o intuito de identificar os parceiros de interação de FEF1 e assim melhor compreender como ocorre sua participação no desenvolvimento do pistilo, o *screening* de duplo-híbrido iniciado por Abbad (2012) foi continuado. Colônias de leveduras da cepa PJ69-4a das placas originais, feitas por Abbad (2012), tiveram o DNA plasmidial extraído e introduzido em *E. coli* da cepa DH10B. A transformação em *E. coli* permite avaliar se existiam múltiplos plasmídeos na colônia de levedura, já que essas bactérias incorporam apenas um plasmídeo. Para cada transformação com DNA plasmidial de leveduras, seis colônias de bactérias foram selecionadas para extração do DNA plasmidial e análise do padrão de digestão com a enzima de restrição BsrGI. A digestão com esta enzima cliva as bordas do inserto presente no plasmídeo pDEST22, permitindo a liberação desse. Desse modo, foi possível avaliar quantos padrões diferentes derivaram de cada colônia de levedura, sendo os dessemelhantes enviados para sequenciamento. A Figura 4.14 ilustra um gel de eletroforese contendo 18 amostras de DNA plasmidial de *E. coli* transformadas com DNA plasmidial de três colônias de leveduras do *screening*. Nesta, as canaletas de 1 a 6 representam seis colônias de *E. coli* transformadas com o DNA plasmidial extraído de uma única colônia de levedura, que pode receber diversos plasmídeos distintos simultaneamente. Nota-se que a canaleta 5 apresenta um padrão de bandas diferente das outras derivadas desta transformação. Deste modo, das seis primeiras canaletas, foi escolhida uma amostra entre as colônias 1, 2, 3, 4 e 6; assim como a colônia 5, as quais foram sequenciadas. As seqüências obtidas foram submetidas à análise pelo programa *tblastx* nos bancos de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e TAIR (*The Arabidopsis Information Resource* - <http://www.arabidopsis.org/>) para identificação dos cDNAs contidos nas amostras (possíveis parceiros de interação).

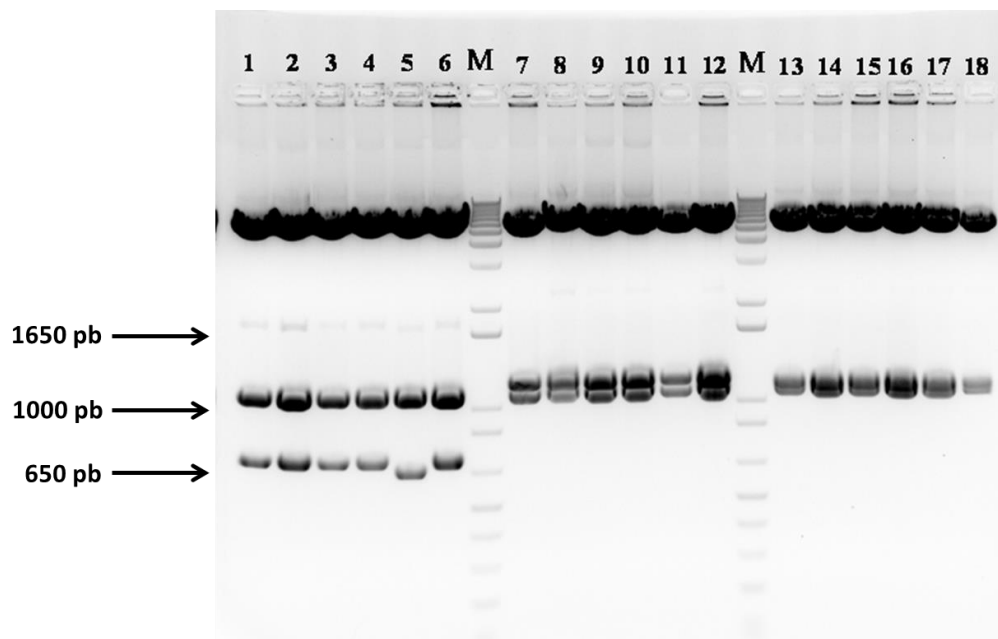


Figura 4.14: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo contendo digestões de DNA plasmidial recuperado das colônias de DH10B. As canaletas 1-6 representam colônias de DH10B transformadas com DNA plasmidial de um clone de levedura. Canaletas 7-12 correspondem às colônias obtidas da transformação com DNA plasmidial de outro clone. O mesmo vale para as canaletas 13-18 (M = marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder - *Invitrogen*).

A tabela completa apresentando todos os clones recuperados do *screening* durante a realização deste trabalho está no Anexo 3. Estes clones representam possíveis parceiros de interação com FEF1, pois a interação precisa ser confirmada por re-teste em leveduras para certificação de que, dentre os outros que estavam na colônia de levedura original, o de interesse é o responsável pela ativação do sistema. Clones interessantes foram encontrados, dentre os quais se destacaram fatores de transcrição com similaridade (possíveis ortólogos) aos codificados por genes da família TCP em tomate, batata e *A. thaliana*. Os clones relativos aos putativos ortólogos de TCP11 (clone 2D6 - anexo 3), TCP13 (clone 3H1) e TCP15 (clone 3A6) de *Solanum lycopersicum* foram escolhidos para re-teste em leveduras, para a verificação da interação.

Para cada ensaio, a construção contendo a CDS de FEF1, fusionada ao domínio de ligação ao DNA (DBD) do fator de transcrição GAL4, foi transformada em leveduras, juntamente com cada uma das TCPs fusionadas ao

domínio de ativação (AD) do fator de transcrição GAL4. O gene *HIS3*, que codifica uma enzima envolvida com a biossíntese de histidina é o repórter utilizado para o ensaio, pois sua expressão é regulada pelo fator de transcrição GAL4. Deste modo o gene *HIS3* só é expresso caso as proteínas híbridas, fusionadas ao DBD e AD interajam, restaurando a atividade de GAL4. As leveduras foram colocadas em meio seletivo SD-leu-trp-his (sem adição dos aminoácidos leucina, triptofano e histidina) para o teste das interações. A Figura 4.15 traz os resultados obtidos, confirmando a interação entre FEF1 e as três TCPs encontradas. Testes de auto-ativação também foram realizados, demonstrando que leveduras contendo somente a construção de FEF1 ou a das TCPs não ativam o sistema quando o vetor complementar está vazio.

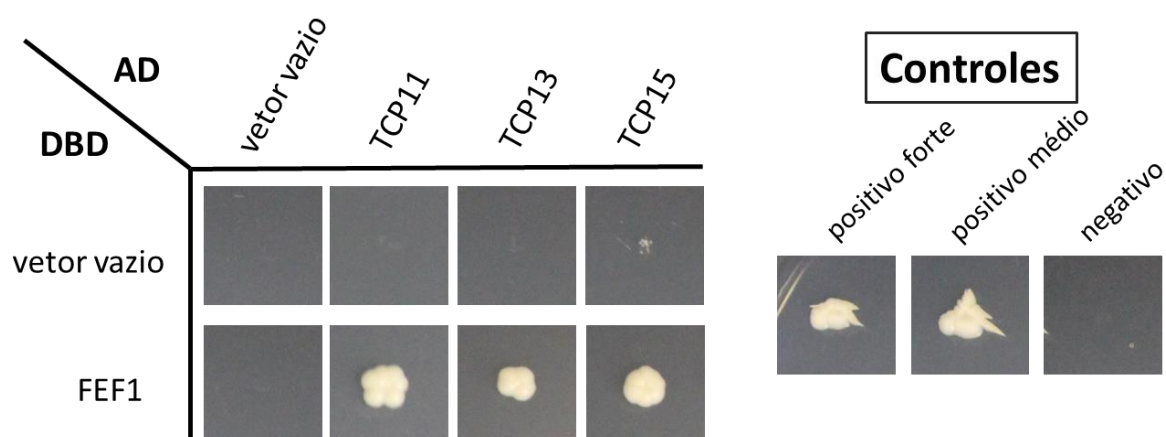


Figura 4.15. Ensaio de duplo-híbrido em leveduras das interações entre FEF1 e TCPs recuperadas do *screening* com FEF1. As imagens demonstram as leveduras crescendo em condição seletiva (SD-leu-trp-his) para interação, confirmando a interação entre FEF1 e as três TCPs encontradas. Os números das TCPs remetem aos ortólogos de *S. lycopersicum*.

4.2.2 Obtenção das construções para BiFC

FEF1-tGFP

Para a obtenção da construção para BiFC, foi utilizada uma construção previamente feita por Abbad em nosso laboratório, contendo a sequência codificante de FEF1, sem o códon de terminação de tradução, em um vetor de entrada do sistema *Gateway*®. Uma reação LR múltipla permitiu a recombinação do promotor 35S, FEF1 e tGFP no vetor pH7m34GW (Anexo 6.5).

O produto da reação foi transformado em *E. coli* DH10B e o DNA plasmidial de 5 colônias obtidas foi extraído e analisado por eletroforese após digestão enzimática. A confirmação da construção desejada foi realizada por digestão com a enzima de restrição BanII, cujo resultado pode ser verificado na Figura 4.16.

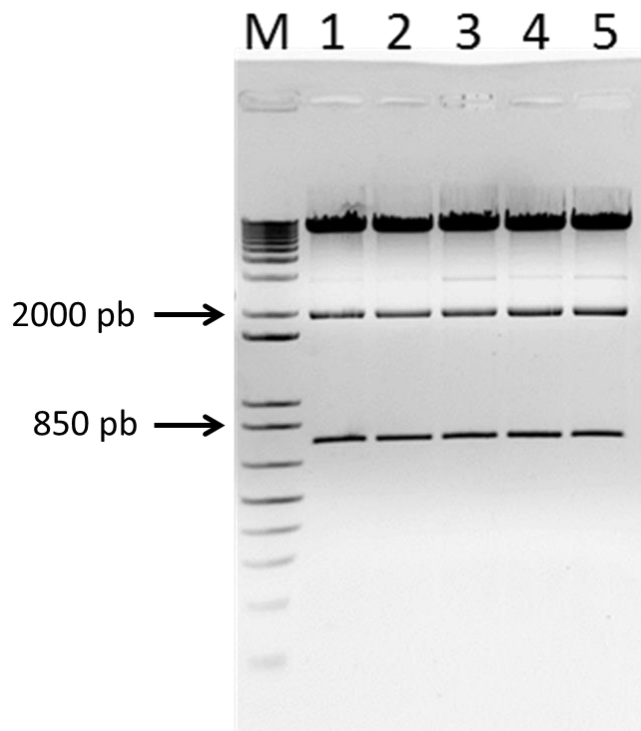


Figura 4.16. Confirmação da construção pH7m34GW-P35S::FEF1-tGFP por digestão enzimática com BanII e posterior eletroforese. Os fragmentos esperados, de aproximadamente 8500pb, 2200pb e 800pb, foram observados em todas as colônias. M. Marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Todas as colônias apresentaram o padrão esperado e o DNA plasmidial da colônia número 1 foi analisado por sequenciamento, para garantir que continha o promotor, a CDS de FEF1 e o fragmento C-terminal da GFP, em fase de leitura correta. Em seguida, foi utilizado para transformação em células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*.

Após a transformação por eletroporação, 8 colônias de *A. tumefaciens* foram selecionadas e tiveram seu DNA plasmidial extraído e checado por PCR. A confirmação por PCR serve para garantir que o plasmídeo contendo a

sequência de interesse realmente foi inserido nas agrobactérias. Neste caso, foram usados os primers Prom35S e FEF1-Rv-qPCR, para pareamento na sequência do promotor e na CDS de FEF1, respectivamente. O gel de eletroforese, confirmando a presença da construção FEF1-tGFP, está na Figura 4.17. A colônia número 3 foi escolhida para os experimentos de BiFC.

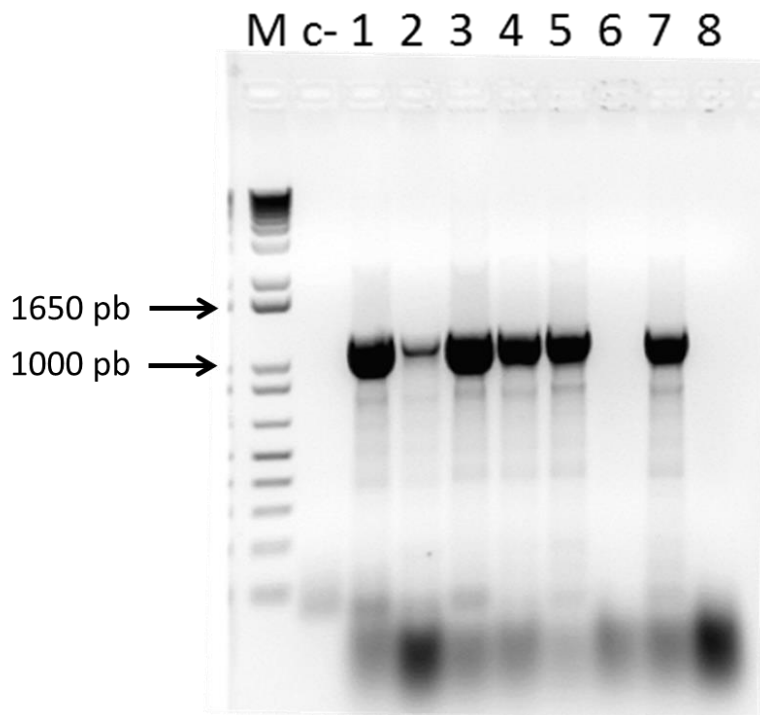


Figura 4.17. Confirmação da presença da construção pH7m34GW-P35S::FEF1-tGFP em *A. tumefaciens*, por PCR. O *amplicon* de aproximadamente 1200pb foi observado nas colônias 1, 2, 3, 4, 5 e 7. M. Marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder. c- Controle negativo da PCR, sem adição de DNA plasmidial. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

SKP1-hGFP

Para amplificação da sequência codificante da SKP1, sem o códon de terminação de tradução, foi utilizado como molde um clone recuperado do *screening* de duplo-híbrido iniciado por Abbad (2012). O clone foi analisado com o programa *tblastx* no site do NCBI e a integridade da sequência codificante dessa proteína foi confirmada. Os passos de PCR1 e PCR2, para inserção dos sítios attB, descritos no item 3.2.1, podem ser verificados na Figura 4.18 a seguir. O fragmento esperado na PCR1 seria de 480 pares de bases para a SKP1 sem o

códon de terminação (SKP1ss). Na mesma figura está apresentada a amplificação da SKP1 com o códon de terminação (SKP1cs), a qual foi efetuada para outros experimentos, que não foram do escopo do presente trabalho.

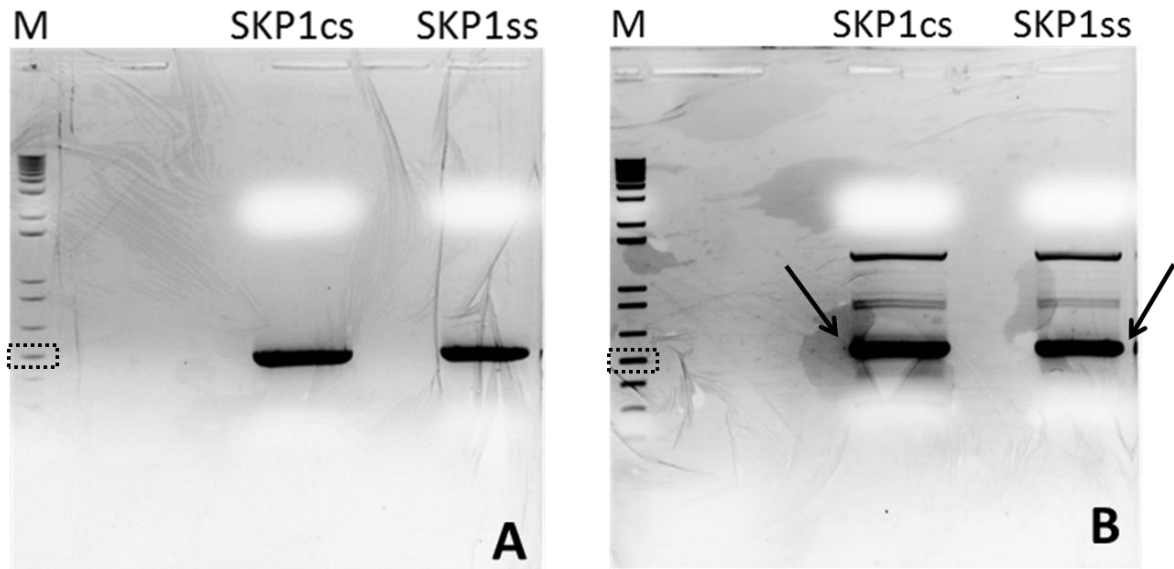


Figura 4.18. Amplificação da CDS da SKP1 de *Nicotiana tabacum* contendo os sítios attB1 e attB2 nas bordas. A banda contida no retângulo pontilhado representa a de 500pb do marcador. A) Eletroforese da PCR1 da SKP1 com o códon de terminação (SKP1cs) e sem este (SKP1ss). B) Eletroforese da PCR2 da SKP1, as bandas recortadas do gel estão indicadas pelas setas. M. Marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder. Géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo.

Os produtos da PCR2 foram recortados do gel, purificados e, em seguida, submetidos à reação BP (item 3.2.2), para clonagem no pDONR221. O produto da BP foi transformado em *E. coli* DH10B e 8 colônias foram selecionadas para extração do DNA plasmidial. O DNA obtido foi analisado por digestão com a enzima de restrição EcoRV e duas bandas eram esperadas: uma de 2542 e outra de 483 pares de bases (480 no caso da sequência sem o códon de terminação) (Figura 4.19). Após a recombinação no vetor pDONR221 de entrada no sistema *Gateway*®, a construção passou a ser denominada pENTRY-SKP1.

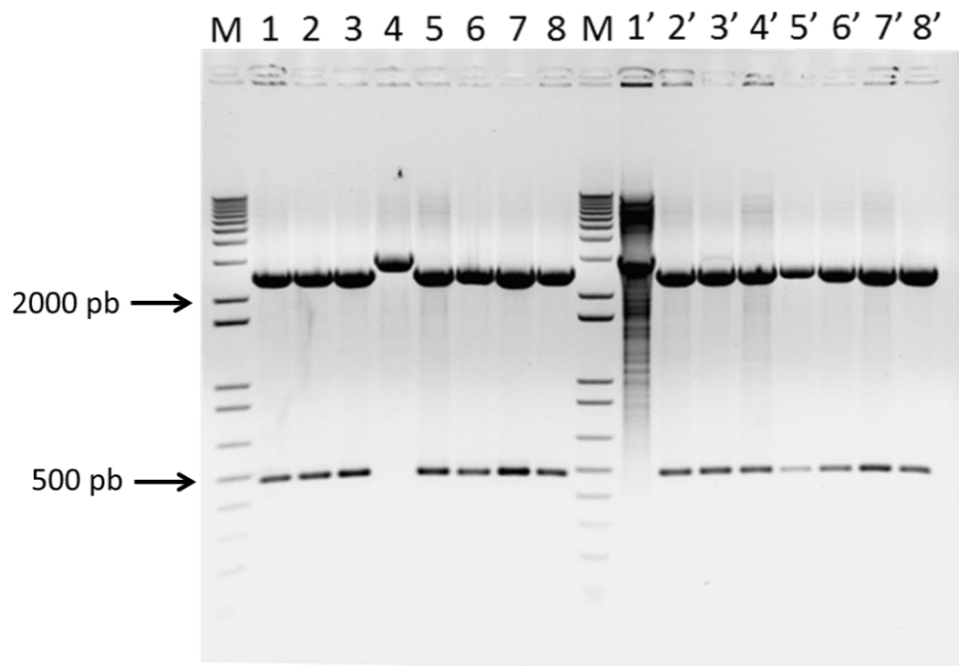


Figura 4.19. Confirmação das construções pENTRY-SKP1cs e pENTRY-SKP1ss por digestão enzimática. Os números de 1 a 8 representam as colônias transformadas com a construção com o códon de terminação e 1' a 8' sem este códon. M. Marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

As colônias 1 a 3, 5 a 8 e 2' a 8' apresentaram os padrões de digestão esperados. O DNA plasmidial da colônia 2' foi usado, então, para a reação LR de recombinação múltipla da CDS da SKP1, sem o códon de terminação, no vetor de destino pH7m34GW, junto ao promotor 35S e o fragmento hGFP. O produto da LR foi transformado em *E. coli* DH10B e apenas duas colônias foram obtidas. Ambas tiveram o DNA plasmidial extraído e checado por digestão com a enzima de restrição BanII. Na digestão com BanII, três fragmentos seriam esperados, com tamanhos aproximados de 8500, 1400 e 1200 pares de base. A Figura 4.20 apresenta o resultado da eletroforese em gel de agarose das amostras digeridas.

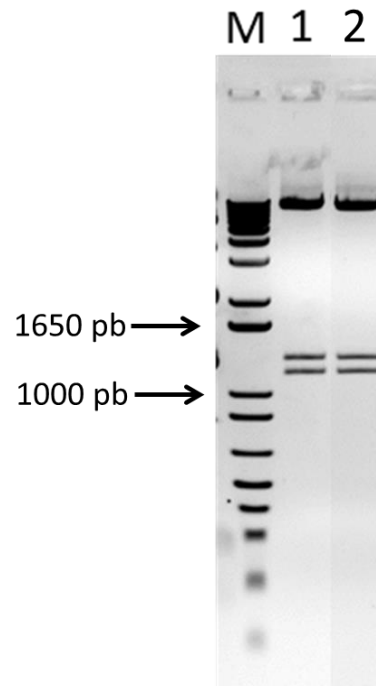


Figura 4.20. Confirmação da construção pH7m34GW-P35S::SKP1ss-hGFP por digestão enzimática. 1 e 2 são digestões com a enzima BanII do DNA plasmidial das colônias de *E. coli*. M. Marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Os padrões observados para a digestão com a enzima BanII são coerentes com o que era esperado. O sequenciamento da construção a partir do DNA plasmidial da colônia 1 confirmou o sucesso em sua obtenção, sendo a construção utilizada para a transformação em *A. tumefaciens*.

Seis colônias obtidas foram escolhidas para a extração do DNA plasmidial e checagem por PCR. Os primers utilizados para a reação foram Prom35S e Term35S (Tabela 3.4), os quais pareiam nas sequências do promotor 35S e do terminador 35S, abrangendo todo o inserto contido no vetor. Essa reação deveria produzir um fragmento de amplificação de aproximadamente 1500 pares de bases. A Figura 4.21 traz o resultado da PCR dessas extrações de DNA plasmidial.

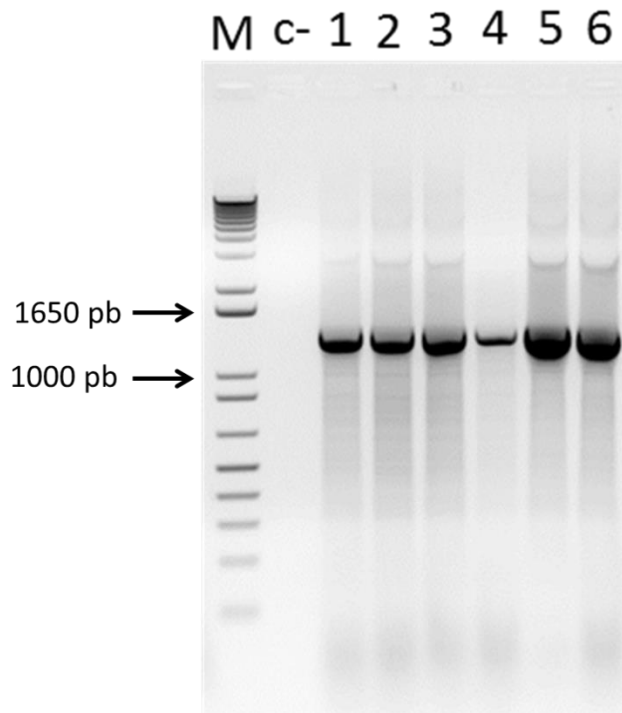


Figura 4.21. Confirmação da construção pH7m34GW-P35S::SKP1-hGFP em *A. tumefaciens* por PCR. O *amplicon* de aproximadamente 1500pb foi observado em todas as colônias. M. Marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder. c- Controle negativo da PCR, sem adição de DNA plasmidial. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Todas as colônias de *A. tumefaciens* testadas apresentaram o padrão esperado e a colônia 4 foi escolhida para a os experimentos de BiFC.

4.2.3 Confirmação da interação entre FEF1 e SKP1 por BiFC

Com a intenção de confirmar a interação entre as proteínas FEF1 e SKP1, identificada e testada em experimento de duplo-híbrido (Abbad, 2012), um experimento de BiFC foi realizado. Folhas de indivíduos de *N. benthamiana* foram co-infiltrados com colônias de *A. tumefaciens* carregando as construções de FEF1-tGFP e SKP1-hGFP no vetor pH7m34GW, descritas na seção anterior. Após aproximadamente 48 horas, fragmentos foliares foram observados em microscópio confocal (Figura 4.22).

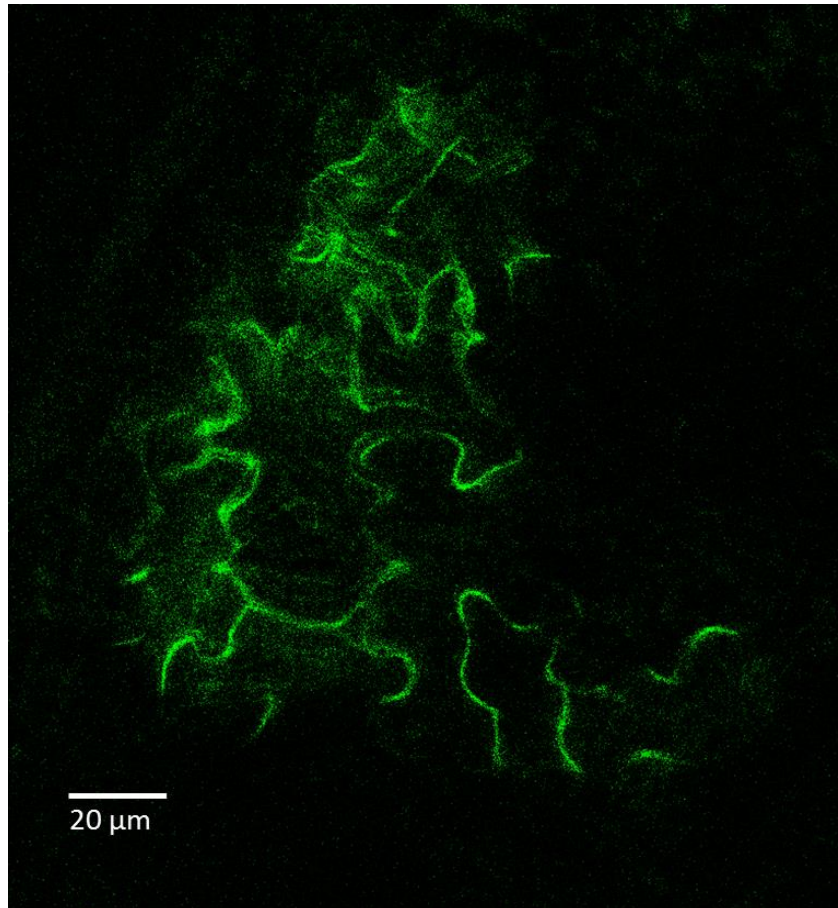


Figura 4.22: Restauração da fluorescência da proteína GFP, devido à interação entre FEF1-tGFP e SKP1-hGFP. Células da epiderme foliar de *N. benthamiana*, expressando as duas proteínas, apresentam fluorescência somente no citoplasma, indicando que este é o local da interação entre elas. Imagem obtida usando o microscópio confocal *Leica SP5*.

A restauração da fluorescência da GFP, nas células da epiderme foliar expressando FEF1-tGFP e SKP1-hGFP, confirma a interação entre essas proteínas. Pode-se observar que o sinal está presente apenas no citoplasma das células, indicando que a interação entre as proteínas ocorre somente nesta região.

4.3 Expressão heteróloga da proteína His-FEF1

Com o intuito de realizar experimentos de interações entre proteínas, a F-box FEF1 foi expressa em *E. coli*. Para isso foi utilizada a construção da sequência codificante dessa F-box no vetor de expressão pDEST17, previamente feita e confirmada por Abbad (2012). O vetor pDEST17 possui uma sequência

para codificação de seis aminoácidos histidina, os quais são expressos na posição N-terminal da proteína cuja CDS foi inserida. Deste modo, a proteína híbrida pode ser analisada por *Western blotting* com uso de anticorpo anti-Histidina e a proteína pode ser submetida à purificação por cromatografia de afinidade.

A construção pDEST17-FEF1 foi transformada na cepa de expressão BL21(DE3) Rosetta. A indução da expressão foi realizada em duas condições: a 37°C e agitação de 220 rpm e 28°C com agitação de 150 rpm. Frações das culturas foram coletadas em diferentes momentos após a indução da expressão, para verificar em qual horário a proteína estaria sendo produzida em maior quantidade. O material recuperado após a lise das células da cultura foi analisado por SDS-PAGE e *Western blotting* (Figura 4.23). A banda esperada seria de aproximadamente 48 kDa e pode-se observar que, apesar da maior quantidade ter sido observada em condição desnaturante (majoritariamente no *pellet* em ambas as temperaturas), FEF1 também foi observada no sobrenadante a 37°C. As amostras foram congeladas a -20°C até o momento do uso.

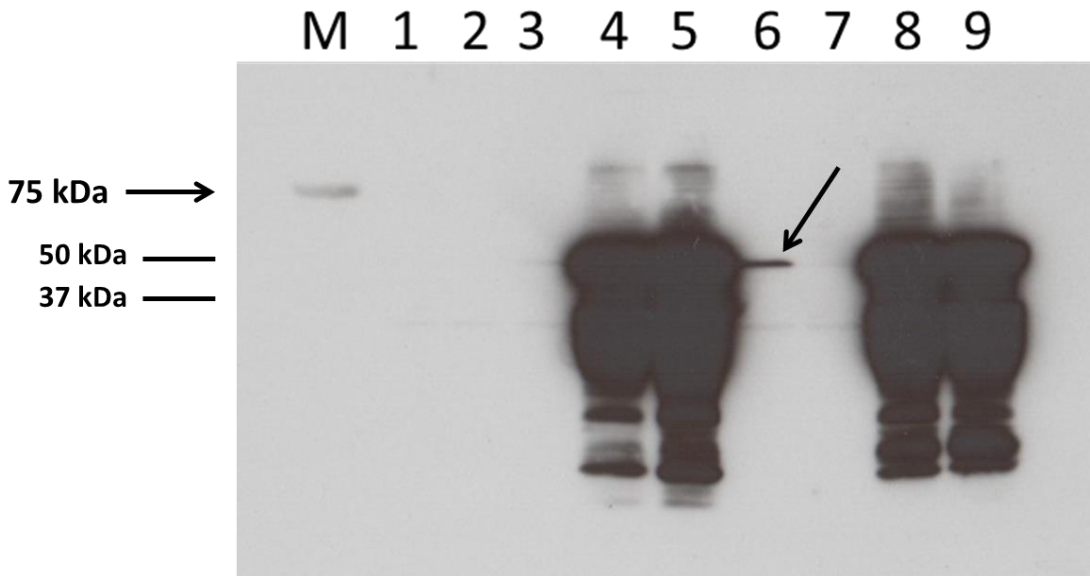


Figura 4.23: *Western blotting* da SDS-PAGE das diferentes condições de expressão de FEF1. A banda mais intensa no marcador é de 75 kDa. 1 = tempo zero, início da expressão; 2 = sobrenadante 28°C 2h de expressão; 3 = sobrenadante 28°C 4h; 4 = *pellet* 28°C 2h; 5 = *pellet* 28°C 4h; 6 = sobrenadante 37°C 2h; 7 = sobrenadante 37°C 4h; 8 = *pellet* 37°C 2h; 9 = *pellet* 37°C 4h. Pode-se observar a expressão no sobrenadante a 37°C com 2 horas de expressão, na canaleta 6, indicada pela seta. M. Marcador de *Western Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*.

A presença da proteína no *pellet* indica que nesta condição ela pode estar presa ao *debris* celular, apresentando dobramento incorreto e, até mesmo, formando agregados em corpos de inclusão. Deste modo, foi escolhida a amostra recuperada do sobrenadante a 37°C, com duas horas de expressão, para ser purificada. A amostra foi purificada com o auxílio de uma coluna de Níquel, entretanto, a análise por SDS-PAGE e western revelou que a proteína His-FEF1 não estava presente nas frações da purificação (Figura 4.24). É possível que a proteína tenha sofrido degradação decorrente do congelamento e isso pode ter comprometido sua integridade.

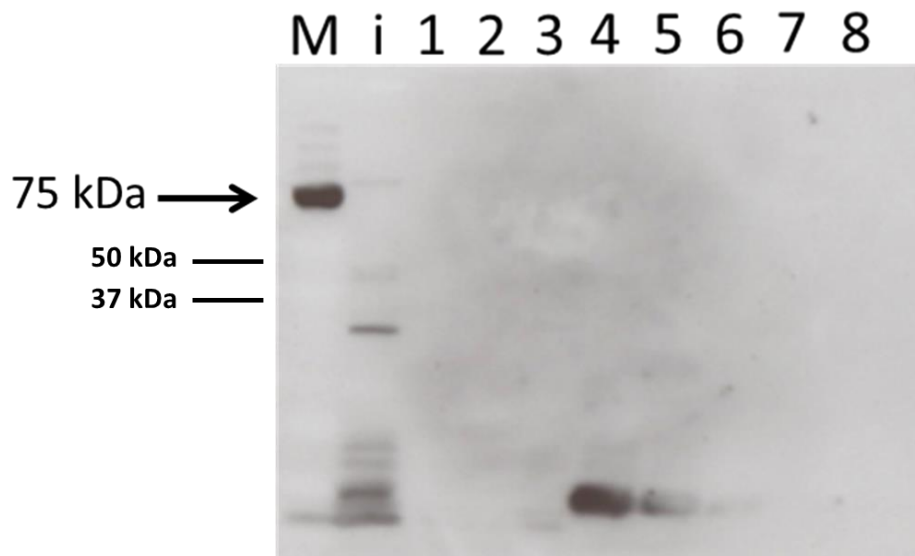


Figura 4.24. *Western blotting* do SDS-PAGE efetuado para as frações coletadas da purificação do sobrenadante com 2 horas de expressão a 28°C da FEF1. “i” é o input e as canaletas 1 a 8 apresentam as oito primeiras frações da eluição. M. Marcador de *Western Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*.

4.4 Expressão heteróloga da proteína His-NtTCP11

A proteína NtTCP11, referente ao clone 2D6 do *screening* de duplo-híbrido, teve essa designação adotada usando como referência o respectivo ortólogo de *S. lycopersicum*, TCP11. A sequência codificante de NtTCP11 foi amplificada a partir de cDNAs de estigma/estilete de *N. tabacum* (Anexo 4). Isso foi necessário, pois foi verificado, por sequenciamento, que o clone 2D6 não continha a sequência codificante completa da proteína. Para isso, foram desenhados primers específicos para a sequência codificante, descritos no item 3.3. O Anexo 5 apresenta o alinhamento entre o fragmento contido em 2D6 e a sequência codificante completa amplificada e sequenciada. Utilizando as sequências dessa TCP em *S. lycopersicum* e *N. benthamiana* como referência, era esperado um fragmento de amplificação de aproximadamente 1600 pares de bases. A Figura 4.25 demonstra as etapas de PCR para amplificação e inserção dos sítios attB para entrada no sistema *Gateway®*. A PCR2 apresentou contaminações, entretanto a banda mais alta, apontada pela seta, foi excisada por apresentar altura coerente com a esperada.

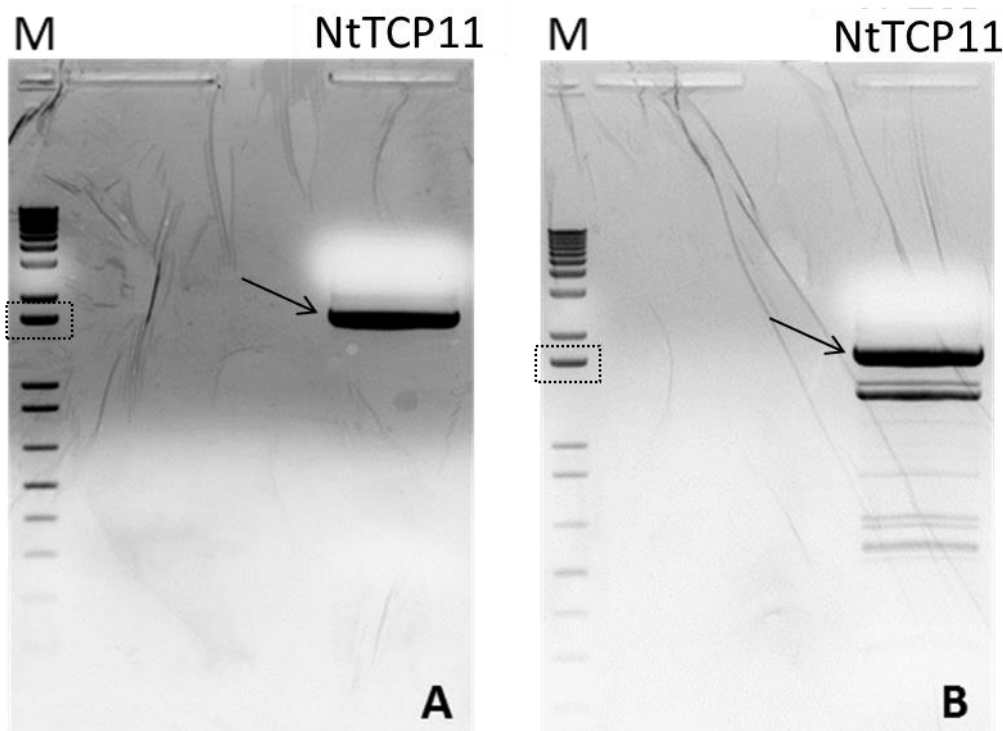


Figura 4.25. Amplificação da CDS completa da NtTCP11 de *N. tabacum* com inserção dos sítios attB1 e attB2 flanqueando as extremidades N e C-terminal. A) Eletroforese da PCR1 da NtTCP11. B) Eletroforese da PCR2 da NtTCP11; contaminações afetaram a PCR, mas a banda excisada para purificação foi facilmente distinguível, com altura aproximada de 1650pb, apontada pela seta. No retângulo pontilhado está destacada a banda de 1650 pares de bases do marcador. M. Marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder. Géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo.

Após a excisão e purificação da banda da PCR2, a mesma foi submetida à purificação e a amostra recuperada foi submetida à reação BP para recombinação no vetor pDONR221 e entrada no sistema Gateway®. O produto da reação foi transformado em *E. coli* DH10B e seis colônias foram escolhidas para extração do DNA plasmidial para checagem da construção. A checagem foi feita com a enzima de restrição BsrGI, enzima que cliva os sítios attL1 e attL2 do vetor de entrada contendo um inserto, liberando-o. Deste modo eram esperadas duas bandas: uma com aproximadamente 2500 e outra com 1600 pares de bases. A Figura 4.26 apresenta a análise por eletroforese das digestões. A construção foi denominada pENTRY-NtTCP11.

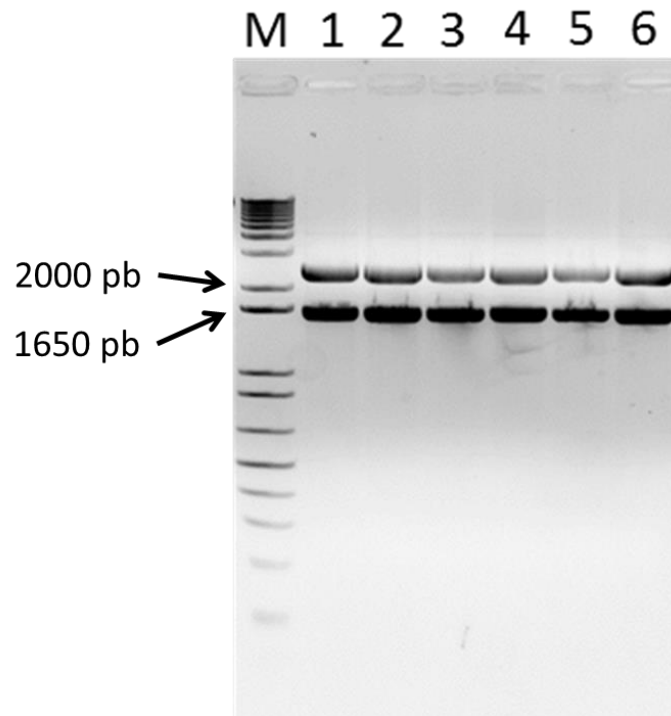


Figura 4.26. Confirmação da construção pENTRY-NtTCP11 por digestão enzimática. Os fragmentos esperados foram observados em todas as amostras. M. Marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Todas as colônias escolhidas apresentaram o padrão esperado segundo a predição feita com as sequências de solanáceas. O DNA plasmidial da colônia 1 foi sequenciado para a confirmação da integridade da sequência e, em seguida, usado na reação LR de recombinação para o vetor de destino pDEST17. O produto da LR foi transformado em *E. coli* DH10B e seis colônias foram escolhidas para extração do DNA plasmidial e checagem da construção por digestão com as enzimas de restrição BsrGI e EcoRI. Para as digestões com BsrGI (liberação do inserto) era esperado um fragmento de aproximadamente 1600 pares de bases e um de aproximadamente 5000 pares de bases. Para as digestões com EcoRI, era esperado um fragmento com aproximadamente 600 e outro com 6000 pares de base (Figura 4.27).

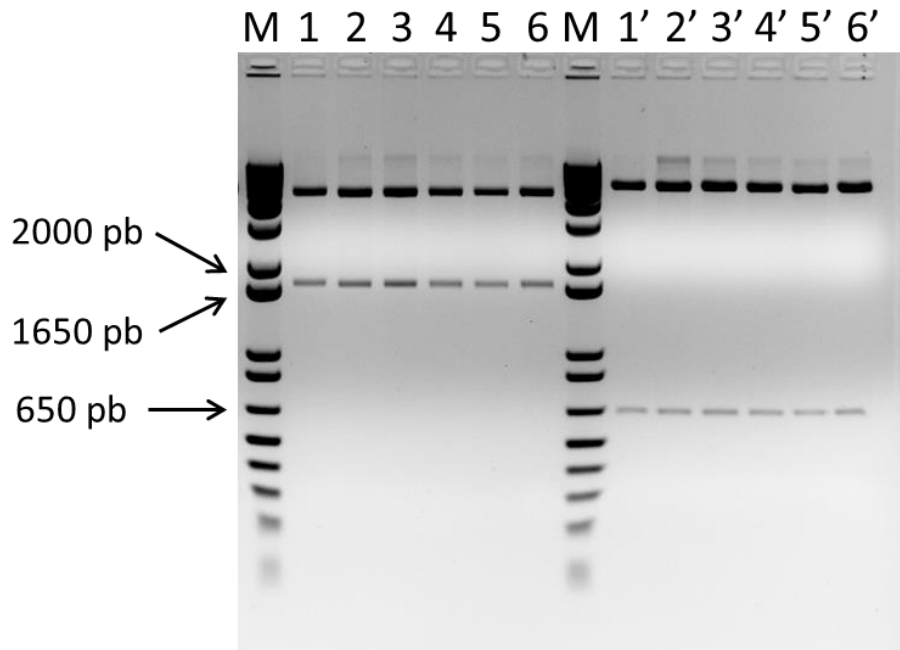


Figura 4.27. Confirmação da construção pDEST17-NtTCP11 por digestão enzimática. 1 a 6 indicam as digestões dos DNAs plasmidiais extraídos das colônias de *E. coli*, usando a enzima BsrGI. 1' a 6' indicam as digestões destes mesmos DNAs com a enzima EcoRI. Os fragmentos esperados foram observados em todas as amostras. M. Marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Após a confirmação, o DNA plasmidial da colônia 1 foi utilizado para transformação na cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RP de *E. coli* e a expressão foi realizada em duas condições: 28°C e 20°C, ambas com agitação de 150 rpm. Amostras das culturas foram coletadas com 4 horas e 20 horas de expressão e analisadas por SDS-PAGE e *Western blotting* (Figura 4.28), para determinação do melhor período para a expressão da proteína recombinante. O tamanho esperado da proteína His-NtTCP11 seria de aproximadamente 66 kDa, a qual foi observada no sobrenadante nos dois horários de coleta, na expressão a 20°C, e com 4 horas a 28°C.

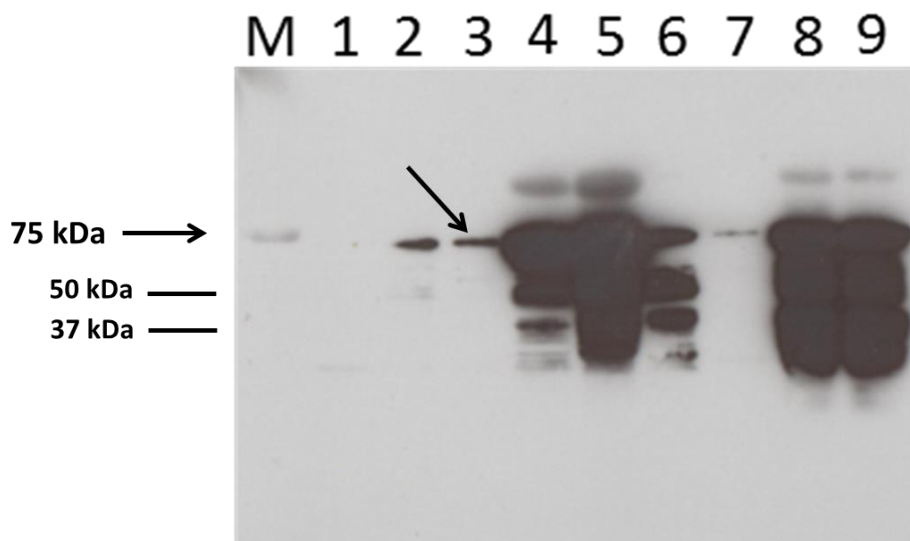


Figura 4.28. *Western blotting* das diferentes condições de expressão da NtTCP11 em BL21-CodonPlus(DE3)-RP. 1 = tempo zero, início da indução; 2 = sobrenadante 20°C 4h de expressão; 3 = sobrenadante 20°C 20h; 4 = *pellet* 20°C 4h; 5 = *pellet* 20°C 20h; 6 = sobrenadante 28°C 4h; 7 = 28°C 20h; 8 = *pellet* 28°C 4h; 9 = *pellet* 28°C 20h. Pode-se observar a expressão no sobrenadante a 20°C com 4 e 20 horas e com 4 horas a 28°C. A seta indica a banda relativa à amostra selecionada para purificação. M. Marcador de *Western Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*.

A condição de 20 horas a 20°C foi escolhida para a purificação por apresentar a maior quantidade de cultura coletada com proteína solúvel (no sobrenadante). A purificação foi realizada utilizando coluna de níquel e as frações obtidas foram submetidas à análise por SDS-PAGE e *Western blotting* (Figura 4.29). A His-NtTCP11 aparece no *input* do experimento e se ligou a coluna, sendo eluída principalmente entre as frações 4 e 6.

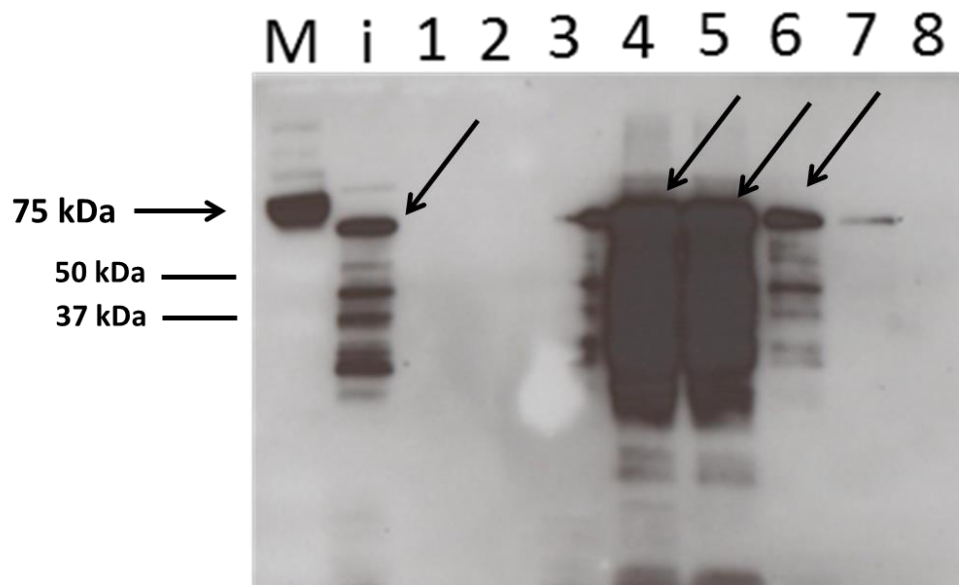


Figura 4.29. *Western blotting* das frações recuperadas da purificação da NtTCP11 expressa em BL21-CodonPlus(DE3)-RP. i = *input*; 1 a 8 são as 8 primeiras frações eluídas na purificação. As setas indicam a banda relativa à His-NtTCP11 no input e nas frações. A proteína foi purificada com sucesso, aparentemente sendo eluída principalmente nas frações 4, 5 e 6. M. Marcador de *Western Precision Plus Protein*TM Dual Color Standards.

5. Discussão

5.1 FEF1 interage com SKP1 de *Nicotiana tabacum*

O resultado obtido por BiFC (Figura 4.22) confirma a interação entre as proteínas FEF1 e SKP1 e fortalece a hipótese da atuação dessa F-box junto ao complexo SCF, atuando como o elemento que confere especificidade ao reconhecimento de alvos para poliubiquitinação. O reconhecimento de proteínas e consequente poliubiquitinação pelo complexo SCF é responsável pela degradação das mesmas no proteassomo 26S, colocando a F-box em um papel crucial de regulação proteica (Kipreos & Pagano, 2000; Chen & Hellmann, 2013; del Pozo e Manzano, 2014). Deste modo, os parceiros recuperados no *screening* de duplo-híbrido são possíveis alvos de degradação dependente de FEF1, a qual regula o *turnover* dessas proteínas.

A localização observada para a interação FEF1-SKP1, somente no citoplasma, é condizente com dados sobre outras F-box. O proteassomo 26S, responsável pela degradação de proteínas poliubiquitinadas ocorre tanto no núcleo quanto no citoplasma das células vegetais (Vierstra, 2009). Kuroda e colaboradores (2012) demonstraram a variação entre o local de interação de algumas proteínas F-box e proteínas ASK (*SKP1-LIKE*) em experimentos de *BiFC* em protoplastos. Os autores encontraram diversos tipos de localização subcelular, como no núcleo, no citoplasma, em ambos ou mesmo em vacúolos e em cloroplastos. Kuroda et al. (2012) demonstraram também que, em alguns casos, a distribuição no citoplasma ocorria de forma irregular, concentrada em alguns pontos do citoplasma e em outros não. Este caso se assemelha ao resultado de *BiFC* obtido neste trabalho, demonstrando uma distribuição irregular da fluorescência na célula da folha de *N. benthamiana* (Figura 4.22). Deste modo, a ligação de FEF1 a substratos e sinalização para a poliubiquitinação deve ocorrer no citoplasma.

Os complexos SCF representam a maior classe de enzimas de ligação de ubiquitina. Em plantas, essa diversidade se mostra especialmente significativa e importante para a regulação de uma gama diversa de processos. Atualmente é estimado que pouco mais de 1300 genes do genoma do modelo *A. thaliana*

estejam relacionados com a via de degradação ubiquitina-proteassomo, sendo que destes 694 são preditos genes F-box (Vierstra, 2003; Chen & Hellmann, 2014). As proteínas F-box estão relacionadas com funções diversas junto ao complexo SCF, por exemplo, a regulação da proliferação celular, o controle da senescência, a regulação do florescimento, além da sinalização das respostas a diversos hormônios vegetais (del Pozo et al., 2002; Chen & Hellmann, 2014). Além disso, a via da ubiquitina-proteassomo representa um modo interessante de regulação da atividade de proteínas, por ser um processo irreversível e altamente preciso, que garante a perda total da função de uma proteína (del Pozo & Manzano, 2014).

5.2 Alterações fenotípicas no pistilo das plantas transgênicas

No presente trabalho foi possível verificar que as características das plantas de silenciamento e superexpressão de FEF1, inicialmente relatadas na geração T0 (Abbad, 2012), se mostraram estáveis e capazes de serem transmitidas para a geração seguinte (T1). Estas características puderam ser, inclusive, sujeitas a análises estatísticas. Foram verificados efeitos claramente opostos nos fenótipos das duas condições de expressão (silenciamento e superexpressão), demonstrando um papel crítico da proteína FEF1 na determinação do tamanho final das estruturas do pistilo.

A redução da quantidade da proteína FEF1, nas plantas de silenciamento, provocou alterações na proliferação celular e no tamanho de estruturas do pistilo destas plantas. A análise microscópica dos tecidos deste órgão permitiu verificar a redução do número de células na zona secretória do estigma e aumento da área das mesmas (Figura 4.9B), em relação ao controle SR1. O silenciamento de *FEF1* causou a inibição da proliferação celular na zona secretória, evento que, provavelmente, promoveu um fenômeno de compensação através do aumento da área das células, tornando o estigma de tamanho semelhante ao controle SR1 (Figura 4.4B). A compensação é um fenômeno relacionado com a manutenção do tamanho final dos órgãos das plantas, permitindo que ocorra uma coordenação entre proliferação e expansão

celular, ajustando o crescimento de um órgão ao “programa” genético pré-determinado (Anastasiou & Lenhard, 2007; Delgado-Benarroch et al., 2009; Horiguchi & Tsukaya, 2011). Pouco é conhecido sobre os mecanismos subjacentes à compensação, entretanto, até o momento só foram comprovados exemplos de alterações na proliferação desencadeando mecanismos de expansão celular, não o contrário (Szécsi et al., 2006; Horiguchi et al., 2011; Horiguchi & Tsukaya, 2011). Não foram observadas modificações nas células da região parenquimática do estigma (Figura 4.10), indicando que as alterações de proliferação celular ocorreram na zona secretória. Esse conjunto de dados aponta o envolvimento de FEF1 na regulação da proliferação celular na zona secretória do estigma, possivelmente atuando junto ao complexo SCF na degradação de proteínas envolvidas com a regulação da proliferação.

Os ovários das plantas de silenciamento apresentaram redução da largura (Figura 4.5B) sem alteração do tamanho das células do parênquima (Figura 4.13B), em relação às plantas controle. A estimativa do número médio de células no parênquima dos ovários das plantas de silenciamento (5933) foi menor que a das plantas controle (6253), indicando que a proliferação celular neste tecido também foi alterada. O parênquima é um tecido com funções diversas, envolvendo-se com sustentação, fotossíntese e reserva, além de secreção de nutrientes como o amido e água (Raven, 1996). No presente trabalho, foram efetuadas medições do parênquima subjacente à placenta dos ovários. A placenta é um órgão que tem um papel importante na nutrição dos óvulos e determinante na viabilidade dos óvulos em formação (Cucinotta et al., 2014). A atividade do tecido placentário está diretamente relacionada com a quantidade de óvulos formados e, conseqüentemente, a de sementes (Bartrina et al., 2011; Cucinotta et al., 2014). Acreditamos, por este motivo, que as modificações observadas podem estar relacionadas com mudanças em outros tecidos que não foram avaliados, como por exemplo, na produção de óvulos. O ovário é um tecido mais complexo que o estigma e a padronização para a microtomia, bem como para a delimitação de uma região semelhante para as análises tornam-se difíceis. Por este motivo, não foi possível realizar análises

dos óvulos dessas plantas. Entretanto, fica evidente a diferença entre os ovários dessas plantas e as plantas controle (Figura 4.6A), indicando uma relação entre a atividade de FEF1 e a determinação do tamanho deste órgão.

A superexpressão de *FEF1* provocou alterações na proliferação celular e no tamanho das estruturas do pistilo das plantas transgênicas. Os estigmas apresentaram um aumento da largura (Figura 4.4B), sem apresentarem modificações quanto às áreas das células (Figuras 4.9B e 4.10B), tanto da zona secretória quanto do tecido parenquimático. A média estimada do número de células na zona secretória foi de 762, mostrando-se maior do que o controle SR1, com 559 células. Estes dados apontam o aumento da proliferação celular nestes estigmas. A estimativa do número de células realizada indica que o local em que essa proliferação foi intensificada foi a zona secretória dos estigmas.

Os ovários das plantas de superexpressão demonstraram aumento da largura (Figura 4.5B) e expansão da área das células do parênquima (Figura 4.13B). A média de células estimada no ovário destas plantas (6510 células) também se mostrou maior do que o controle SR1 (6253). O aumento do número e área de células do parênquima é interessante devido à função de suporte e nutrição deste tecido. Essa alteração na atividade do parênquima da placenta indica possíveis alterações também em tecidos diretamente envolvidos com a reprodução, como os óvulos.

Bartrina e colaboradores (2011) demonstraram o importante papel que o hormônio vegetal citocinina tem no desenvolvimento do pistilo, promovendo aumento da atividade dos meristemas florais, do gineceu, da placenta e número de óvulos. Seria interessante avaliar o papel da sinalização desse hormônio nas plantas transgênicas silenciando ou superexpressando *FEF1*, para verificar se existe envolvimento entre a função desta F-box e os níveis de citocinina.

Os resultados obtidos para o fenótipo das plantas transgênicas indicam que *FEF1* têm um papel importante na determinação do tamanho das estruturas do pistilo, participando da regulação da proliferação celular em seus tecidos. Um exemplo interessante de proteína F-box que participa da regulação do ciclo celular é o da F-box *SKP2A* de *Arabidopsis thaliana*. Esta proteína é componente

de um complexo SCF que sinaliza a degradação dos fatores de transcrição E2FC (*E2-promoter binding factor C*) e DPB (*Dimerization partner B*) (del Pozo & Manzano, 2014). Estes fatores se dimerizam durante a fase G1 do ciclo celular, impedindo a expressão de genes da fase S e interrompendo a continuidade do ciclo. A degradação de E2FC e DPB pelo proteassomo permite a expressão dos genes da fase S e a continuidade do ciclo celular (del Pozo et al., 2002; del Pozo et al., 2006). Acreditamos que FEF1 tenha um papel semelhante na regulação da proliferação celular nos órgãos florais, envolvendo-se com a degradação de fatores de transcrição que inibem a proliferação em tecidos do pistilo. Sob essa ótica, a alteração dos níveis de FEF1 sendo produzida explicaria, então, o fenótipo observado nas plantas transgênicas. A diminuição da atividade de FEF1 em plantas de silenciamento teria causado um aumento da quantidade de fatores de transcrição que inibem a proliferação celular no pistilo, promovendo a redução no número de células e tamanho total dos tecidos desse órgão. A superexpressão, por outro lado, promoveu o aumento da quantidade de FEF1 disponível para a formação de complexos SCF. Consequentemente, a sinalização para degradação de fatores de transcrição envolvidos com a inibição da proliferação celular foi intensificada, gerando aumento do número de células e aumento do tamanho total de tecidos do pistilo.

Dentre os possíveis responsáveis pela regulação da proliferação celular nos tecidos do pistilo, estão os fatores de transcrição SIP1 e VOZ1, de interação confirmada com FEF1 (Abbad, 2012). A proteína SIP1 de *N. tabacum* ainda tem sua função muito pouco estudada, entretanto, Kitakura e colaboradores (2002) demonstraram que essa proteína interage com a proteína causadora de tumor 6b, derivada do gene 6b, o qual é transferido junto com o T-DNA de *A. tumefaciens*. SIP1 interage com 6b e parece atuar conjuntamente no papel de intensificação da proliferação celular que esta proteína tumoral desempenha, levando os autores a proporem um papel de regulação da proliferação celular para SIP1. Mimida e colaboradores (2011) demonstraram que o fator de transcrição VOZ1 de *Mallus domestica* parece ter uma relação com a regulação da transição da fase vegetativa para a reprodutiva das plantas, interagindo com

FLOWERING LOCUS T (FT) 1 e 2. FT1 e FT2 são importantes reguladores da transição para a fase reprodutiva e sua interação com VOZ1 e TCPs 2 e 4 de *M. domestica* regula a proliferação e diferenciação celular nos tecidos da planta, entretanto o modo como se dá essa regulação ainda não é claro (Mimida et al., 2011).

No presente trabalho, as proteínas TCP, identificadas no *screening* da biblioteca de duplo-híbrido e com interação confirmada com FEF1, destacaram-se como os principais alvos que acreditamos estarem relacionados com a inibição da proliferação celular no pistilo.

5.3 Parceiros de interação de FEF1

Neste trabalho confirmamos a interação de FEF1 com três proteínas TCP recuperadas do *screening* da biblioteca de duplo-híbrido (Figura 4.15), iniciado por Abbad (2012). Esses três fatores de transcrição apresentam como ortólogos as proteínas TCP7 e TCP8 em *A. thaliana* e TCP11, TCP13 e TCP15 em *S. lycopersicum* (Anexo 3), todos pertencentes à classe I da família TCP. O envolvimento de proteínas da classe I da família TCP com a proliferação celular classicamente tem sido relacionado com a promoção da proliferação, em oposição ao suposto papel de inibição da proliferação celular por TCPs da classe II (Li et al., 2005; Martín-Trillo & Cubas, 2009).

Em um trabalho recente, foi demonstrado o papel das TCPs 14 e 15 de *A. thaliana*, em conjunto com a proteína SPINDLY (SPY), na promoção de respostas ao hormônio citocinina em folhas e flores (Steiner et al., 2012a). Plantas de superexpressão de AtTCP14 apresentaram aumento da expressão do gene *GUS*, quando construído sob regulação do promotor do marcador de ciclo celular *CYCB1;2*. Por outro lado, plantas mutantes *tcp14 tcp15* demonstraram drástica redução das respostas à citocinina em folhas e flores. Coerente com o papel esperado para este hormônio, os autores discutiram a importância dessas TCP nas respostas e aumento da sensibilidade à citocinina, participando da promoção da proliferação celular (Steiner et al., 2012a). Não obstante, plantas superexpressando AtTCP14 demonstraram inibição do alongamento da

inflorescência e do crescimento de pétalas e de folhas, demonstrando também um papel na inibição da proliferação celular. Portanto, é possível que, dependendo do tecido ou contexto celular, um mesmo fator de transcrição do tipo TCP possa atuar como promotor ou inibidor da proliferação celular.

Uma análise funcional de diversas proteínas da classe I da família TCP de *A. thaliana*, incluindo os ortólogos AtTCP7 e AtTCP8 foi realizada por Aguilar-Martínez e Sinha (2013). Estes autores verificaram grande aumento da expressão de marcadores importantes do ciclo celular (CYCA1;1 e CYCA2;3) em plantas transgênicas mutantes *tcp8 tcp15 tcp21 tcp22 tcp23*. Além disso, plantas transgênicas com construções de AtTCP7 e AtTCP23 fusionadas ao domínio de repressão de função SRDX apresentaram flores fechadas com pedicelos menores, pétalas menores e sépalas maiores e irregulares (Aguilar-Martínez & Sinha, 2013). Os autores sugeriram o envolvimento das proteínas TCP analisadas com a proliferação celular, isentando-se de atribuir em qual sentido isso ocorria.

Expandindo a divisão funcional clássica das classes de TCPs, trabalhos recentes têm demonstrado a atuação de proteínas TCP como reguladores positivos e negativos da proliferação celular, sugerindo serem “contexto-dependente” (Hervé et al., 2009; Kieffer et al., 2011). Hervé e colaboradores desenvolveram plantas transgênicas de *A. thaliana* expressando a TCP20 da classe I, em duas condições: fusionada ao domínio EAR repressor dominante (Hiratsu et al., 2003) ou ao domínio ativador VP16 (Parcy et al., 1998). Análises do transcriptoma das plantas AtTCP20::EAR demonstraram o enriquecimento de diferentes transcritos relacionados com proliferação, expansão celular e outros fatores de transcrição, dependendo do tecido analisado (Hervé et al., 2009). Kieffer e colaboradores (2011) apontaram uma aparente oposição no papel desempenhado pelas TCPs 14 e 15 de *A. thaliana*. Os autores demonstraram que estas TCPs atuam como repressoras da proliferação celular em folhas e flores em desenvolvimento, e como promotoras da proliferação em entrenós jovens (Kieffer et al., 2011) e em embriões em germinação (Tatematsu et al., 2008). Estes autores discutem que a função desempenhada por uma

proteína TCP provavelmente depende do tecido em que é expressa, da fase de desenvolvimento do indivíduo e dos parceiros de interação disponíveis no momento da expressão (Kieffer et al., 2011). Essas observações são muito interessantes não só por representarem funções aparentemente paradoxais, mas também por demonstrarem a importância de outros fatores na função desempenhada. Aguilar-Martínez e Sinha (2013) e Valsecchi et al. (2013) citam também a importância que a capacidade dessas proteínas, em formar homodímeros, heterodímeros e multímeros, tem na gama de funções que elas podem desempenhar. Em suma, todo o “ambiente de desenvolvimento” (Kieffer et al., 2011) é determinante, moldando a ação desses fatores de transcrição.

Acreditamos que as TCPs de *N. tabacum* encontradas aqui regulam a proliferação celular nos tecidos do pistilo, envolvendo-se com a regulação do tamanho final deste órgão. Como trabalhos recentes apontam (Hervé et al., 2009; Kieffer et al., 2011; Li et al., 2012), a determinação do papel das TCPs baseando-se em classes provavelmente é reducionista e não corresponde à complexidade das funções que as TCPs abrangem. A regulação dos níveis desses fatores de transcrição durante o desenvolvimento, permite que o pistilo se desenvolva, adquirindo número de células e tamanho final dentro de uma faixa determinada no genoma do indivíduo. A função de inibição da proliferação celular proposta aqui é condizente com dados de expressão dos ortólogos TCP11, TCP13 e TCP15 em *S. lycopersicum*. Estas proteínas apresentam altas taxas de expressão em tecidos em estágios avançados de diferenciação, como folhas, flores em antese, frutos no final do desenvolvimento e frutos completamente maduros (Parapunova et al., 2014). Tendo em vista que nestes tecidos a proliferação celular é drasticamente reduzida, as TCPs citadas podem exercer parte deste controle. A interação aqui confirmada entre FEF1 e NtTCP11, NtTCP13 e NtTCP15 fortalece a hipótese de que FEF1 é um regulador da atividade desses fatores de transcrição. Parte dessa regulação pode ser decorrente da degradação dessas proteínas TCP pelo proteassomo, após a poliubiquitinação destes fatores de transcrição sinalizada pela F-box FEF1.

Outra indicação da inter-relação entre FEF1 e as TCPs é a grande semelhança entre uma alteração fenotípica que observamos em plântulas dos transgênicos de superexpressão de FEF1, e plântulas TCP7-SRDX e TCP23-SRDX do trabalho de Aguilar-Martínez e Sinha (2013). As plântulas de superexpressão de FEF1 dos eventos independentes da geração T1, 5.2 e 66.2 (Figura 5.1E), apresentaram as primeiras folhas menores e curvadas nas margens. Este traço fenotípico foi observado também por Aguilar-Martínez e Sinha (2013), em plântulas de *A. thaliana* expressando as TCPs 7 e 23 fusionadas ao domínio repressor SRDX (Figura 5.1B e C). Após análises microscópicas, os autores apontaram que as alterações nas folhas eram decorrentes de alterações na proliferação celular. Acreditamos que processos diferentes estão relacionados com estes fenótipos semelhantes, não obstante, ambos relacionados com a perda de função das TCPs. No caso das plântulas expressando TCP7 e TCP23 fusionadas à SRDX, o domínio repressor promove a perda de função destes fatores de transcrição e conseqüentemente, também da regulação que exercem sobre a proliferação celular. Nas plantas de superexpressão de FEF1, o aumento nos níveis dessa F-box pode ter ampliado a poliubiquitinação de proteínas TCP, promovendo a degradação excessiva desses fatores de transcrição e causando também a alteração da regulação de proliferação. Uma análise mais detalhada poderia verificar as alterações que observamos nas folhas das plântulas de superexpressão de FEF1.

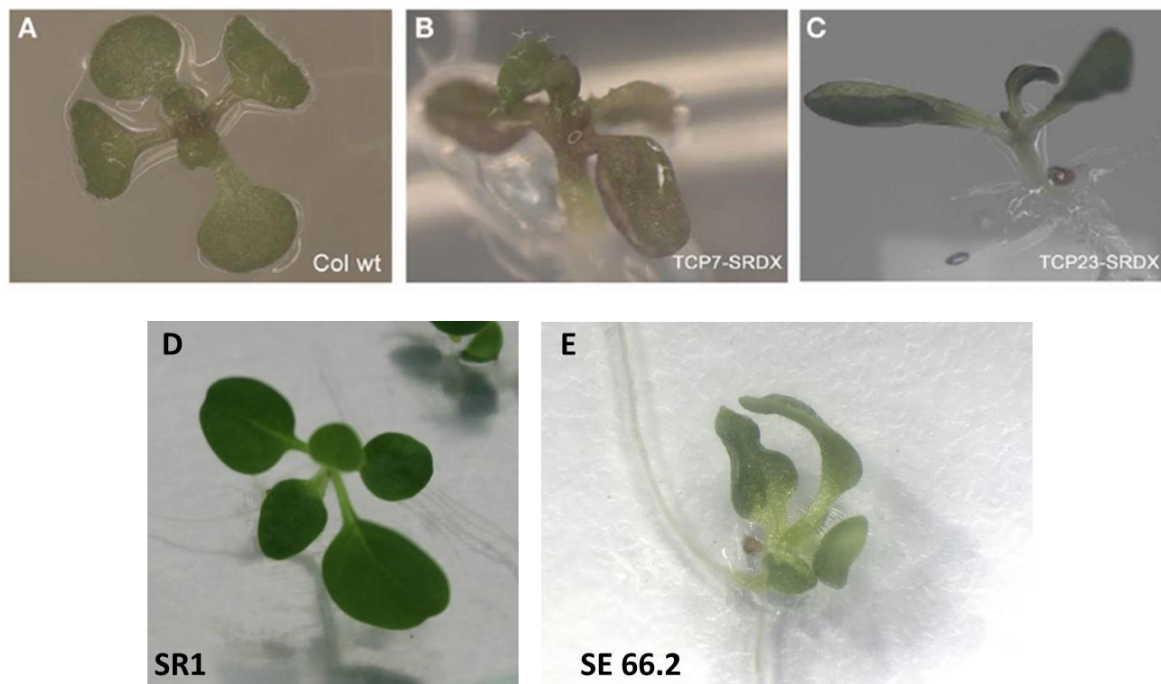


Figura 5.1. A-C: Fotos retiradas de Aguilar-Martínez e Sinha (2013). D-E: Imagens do presente trabalho. A) Plântula selvagem de *A. thaliana* do cultivar Columbia-0. B) Plântula transgênica expressando a TCP7 fusionada ao domínio SRDX. C) Plântula transgênica expressando a TCP23 fusionada ao domínio SRDX. D) Plântula selvagem de *N. tabacum* do cultivar Petit Havana SR1. E) Plântula transgênica superexpressando FEF1.

Abbad (2012) apontou uma redução no tamanho do filete dos estames das plantas de superexpressão de FEF1 na geração T0 dos transgênicos (Figura 5.2). Essa modificação possivelmente também decorreu da alteração na regulação da proliferação celular pelas proteínas TCP encontradas aqui. A flexibilidade de função que esses fatores de transcrição parecem ter (Kieffer et al., 2011; Li et al., 2012) corrobora uma possível atuação diferencial entre os estames e o pistilo. Essa diferença seria muito interessante por caracterizar uma variação na função dentre as diferentes estruturas que compõem a flor, demonstrando uma regulação fina e flexível do desenvolvimento deste órgão. Análises fenotípicas mais detalhadas dos estames seriam interessantes para elucidar essa questão. Estudos de expressão das proteínas NtTCP11, NtTCP13 e NtTCP15 nas diferentes estruturas da flor de *N. tabacum*, em seus diferentes estádios de desenvolvimento, também auxiliariam no esclarecimento das questões levantadas aqui.



Figura X. Imagem retirada de Abbad (2012). Flores de plantas controle (SR1) de *Nicotiana tabacum* e de diferentes eventos de superexpressão (5.2, 10.1, 65.1 e 66.2) no estágio 11 de desenvolvimento floral. Nota-se a redução do tamanho dos filetes dos estames nas plantas de superexpressão.

É interessante notar que a modificação na expressão da F-box FEF1 pode ter causado alterações que muitas vezes são de difícil obtenção, por análises individuais de mutações em fatores de transcrição. A redundância funcional dentro da família TCP, torna difícil a análise do papel de membros individuais dessa classe, muitas vezes tornando necessárias abordagens drásticas, como a construção de mutantes de até 5 genes da classe (Aguilar-Martínez & Sinha, 2013). Acreditamos que a modificação de FEF1 promoveu alterações que foram críticas para a atuação de algumas proteínas da classe I da família TCP, mostrando-se como uma interessante abordagem de estudo. A utilização de proteínas F-box para estudos funcionais pode ser uma estratégia inteligente para contornar casos de redundância funcional e para avaliar a regulação de diferentes substratos em processos do desenvolvimento das plantas.

Recentemente alguns autores têm demonstrado o envolvimento de proteínas TCPs de *A. thaliana* com a biossíntese e sinalização de hormônios vegetais. Tatematsu et al. (2008) demonstraram o papel de AtTCP14 como um

regulador do potencial de crescimento do embrião, em resposta aos estímulos hormonais de ácido abscísico e giberelinas. Guo e colaboradores (2010) apontaram a regulação da biossíntese de brassinosteróides realizada pela AtTCP1, a qual regula a expressão de uma enzima essencial na via de produção desse hormônio. Steiner e colaboradores (2012a) demonstraram o envolvimento de AtTCP14 e AtTCP15 nas respostas ao hormônio citocinina, regulando a proliferação celular em folhas e flores. Acreditamos que as TCPs de *N. tabacum*, identificadas no presente trabalho, podem realizar a regulação da proliferação celular através da participação em respostas hormonais. Futuras análises com as plantas transgênicas usadas aqui, verificando a sensibilidade destas à aplicação de hormônios, poderiam elucidar de que forma se dá a regulação pelas TCPs.

5.4 Expressão das proteínas 6xHis-FEF1 e 6xHis-TCP

A expressão das duas proteínas recombinantes em *E. coli* foi realizada com sucesso, como descrito nos itens 4.3 e 4.4. A presença das proteínas em frações do sobrenadante indica que elas se encontram, provavelmente, em estado biologicamente ativo. Proteínas em estado inativo formam agregados proteicos que podem ser na forma de corpos de inclusão, os quais são precipitados juntos com os restos celulares (Fink, 1998). Acreditamos que a grande quantidade de proteína nos *pellets* decorre exatamente da formação dos corpos de inclusão. A superexpressão de proteínas, sejam elas homólogas ou heterólogas ao sistema (eucarioto ou procarioto), podem produzir a formação de corpos de inclusão (Fink, 1998).

Em pelo menos uma condição de expressão, as proteínas foram expressas no sobrenadante, encontrando-se em estado solúvel. Acreditamos, entretanto, que seja possível otimizar a expressão de ambas, tendo em vista a pequena quantidade (quando comparada ao *pellet*) obtida no sobrenadante. Para aperfeiçoar a expressão das proteínas seria possível a utilização de concentrações mais baixas do agente indutor de expressão (IPTG), temperaturas de expressão menores ou mesmo um promotor gênico de expressão mais fraco. Todos estes exemplos poderiam auxiliar na redução da velocidade da expressão

das proteínas e permitindo o dobramento adequado e reduzindo a formação de agregados proteicos. Além disso, também é possível a utilização de outras cepas de expressão, *OrigamiTM(DE3)pLysS*, por exemplo, possui um ambiente citoplasmático oxidante que favorece a formação de pontes dissulfeto das proteínas (*Novagen*, 2004).

A proposta de estudar a interação entre as proteínas FEF1 e NtTCP11, produzidas de forma heteróloga, não pôde ser finalizada, já que a proteína His-FEF1 não foi recuperada na etapa de purificação. Isso pode ter ocorrido devido desnaturação da His-FEF1 existente, causada pelo congelamento e descongelamento, e comprometendo a estrutura original da proteína. A desnaturação decorre do stress promovido principalmente pela baixa temperatura e pela formação de cristais de gelo, os quais excluem a proteína durante o congelamento (Arakawa, et al. 2001). Essa exclusão submete a proteína à fase da amostra que ainda está líquida, a qual acaba ficando muito mais concentrada devido ao congelamento. A concentração dos sais na fase aquosa pode causar a perda da estabilidade da proteína, promovendo a perda da estrutura original da mesma (Arakawa, et al. 2001).

6. Conclusões

No presente trabalho, foi possível esclarecer o papel da F-box FEF1 no desenvolvimento do pistilo de *Nicotiana tabacum*. Esta proteína interage com a proteína SKP1, atuando junto ao complexo SCF e marcando alvos para a degradação proteica. Através dessa função, essa F-box atua na regulação da proliferação celular nos tecidos do pistilo, atuando inclusive sobre o tamanho final de órgãos do pistilo. Acreditamos que dentre os alvos de FEF1 estejam as proteínas NtTCP11, NtTCP13 e NtTCP15 encontradas aqui, sendo estas as responsáveis pela inibição da proliferação celular nos tecidos do pistilo. Análises subsequentes por outros métodos poderão confirmar a interação entre FEF1 e estas TCPs, verificando a presente hipótese. Estudos de natureza hormonal também poderão ajudar a desvendar quais mecanismos de sinalização estão envolvidos na regulação exercida por estes fatores de transcrição.

7. Referências Bibliográficas

- Abbad, S. V. Caracterização de um novo gene da família F-box expresso no pistilo de *Nicotiana tabacum* L. Dissertação (Mestrado em Genética) – Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2012.
- Aguilar-Martínez, J. A.; Sinha, N. Analysis of the role of Arabidopsis class I TCP genes AtTCP7, AtTCP8, AtTCP22, and AtTCP23 in leaf development. **Frontiers In Plant Science**, v. 4, p. 1-13, 2013.
- Anastasiou, E.; Lenhard, M. Growing up to one's standard. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 63-69, 2007.
- Arakawa, T.; Prestrelski, S. J.; Kenney, W. C.; Carpenter, J. F. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 307–326, 2001.
- Bartrina, I.; Otto, E.; Strnad, M.; Werner, T.; Schmülling, T. Cytokinin Regulates the Activity of Reproductive Meristems, Flower Organ Size, Ovule Formation, and Thus Seed Yield in Arabidopsis thaliana. **The Plant Cell**, v. 23, p. 69–80, 2011.
- Chen, L.; Hellmann, H. Plant E3 Ligases: Flexible Enzymes in a Sessile World. **Molecular Plant**, v. 6, p. 1388–1404, 2013.
- Cornish, E. C.; Anderson, M. A.; Clarke, A. E. MOLECULAR ASPECTS OF FERTILIZATION IN FLOWERING PLANTS. **Ann. Rev. Cell Biol.**, v. 4, p. 209-228, 1988.
- Crawford, B. C. W.; Nath, U.; Carpenter, R.; Coen, E. S. CINCINNATA Controls Both Cell Differentiation and Growth in Petal Lobes and Leaves of Antirrhinum. *Plant Physiology*, v. 135, p. 244-253, 2004.
- Cucinotta, M.; Colombo, L.; Roig-Villanova, I. Ovule development, a new model for lateral organ formation. **Frontiers In Plant Science**, v. 5, p. 1-12, 2014.
- Delgado-Benarroch, L.; Weiss, J.; Egea-Cortines, M. Floral organ size control: Interplay between organ identity, developmental compartments and

- compensation mechanisms. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, n. 9, p. 814-817, 2009.
- del Pozo, J. C.; Boniotti, M. B.; Gutierrez, C. Arabidopsis E2Fc Functions in Cell Division and Is Degraded by the Ubiquitin-SCF^{AtSKP2} Pathway in Response to Light. *The Plant Cell*, v. 14, p. 3057-3071, 2002.
- del Pozo, J. C.; Diaz-Trivino, S.; Cisneros, N.; Gutierrez, C. The Balance between Cell Division and Endoreplication Depends on E2FC-DPB, Transcription Factors Regulated by the Ubiquitin-SCFSKP2A Pathway in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 18, p. 2224-2235, 2006.
- del Pozo, J. C.; Manzano, C. Auxin and the ubiquitin pathway. Two players—one target: the cell cycle in action. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 10, p. 2617-2632, 2014.
- Dharmasiri, N.; Dharmasiri, S.; Estelle, M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. **Nature**, v. 435, n. 26, p. 441-445, 2005.
- Fink, A. L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. **Current Biology**, v. 3, p. R9-R23, 1998.
- Guo, Z.; Fujioka, S.; Blancaflor, E. B.; Miao, S.; Gou, X.; Lia, J. TCP1 Modulates Brassinosteroid Biosynthesis by Regulating the Expression of the Key Biosynthetic Gene DWARF4 in Arabidopsis thaliana. **The Plant Cell**, v. 22, p. 1161-1173, 2010.
- Hervé, C.; Dabos, P.; Bardet, C.; Jauneau, A.; Auriac, M. C.; Ramboer, A.; Lacout, F.; Tremousaygue, D. In Vivo Interference with AtTCP20 Function Induces Severe Plant Growth Alterations and Deregulates the Expression of Many Genes Important for Development. **Plant Physiology**, v. 149, p. 1462-1477, 2009.
- Hiratsu, K.; Matsui, K.; Koyama, T.; Ohme-Takagi, M. Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include EAR motif, a repression domain, in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 34, p. 733-739, 2003.
- Horiguchi, G.; Mollá-Morales, A.; Pérez-Pérez, J. M.; Kojima, K.; Robles, P.; Ponce, M. R.; Micol, J. L.; Tsukaya, H. Differential contributions of

- ribosomal protein genes to *Arabidopsis thaliana* leaf development. **The Plant Journal**, v. 65, p. 724–736, 2011.
- Horiguchi, G.; Tsukaya, H. Organ size regulation in plants: insights from compensation. **Frontiers In Plant Science**, v. 2, p. 1-6, 2011.
- Irish, V. F. The flowering of *Arabidopsis* flower development. **The Plant Journal**, v. 61, p. 1014-1028, 2010.
- Kepinski, S.; Leyser, O. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. **Nature**, v. 435, n. 26, p. 446-451, 2005.
- Kieffer, M.; Master, V.; Waites, R.; Davies, B. TCP14 and TCP15 affect internode length and leaf shape in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 68, p. 147–158, 2011.
- Kipreos, E. T.; Pagano, M. The F-box protein family. **Genome Biology**, v. 1, n. 5, p. 1-7, 2000.
- Kitakura, S.; Fujita, T.; Ueno, Y.; Terakura, S.; Wabiko, H.; Machida, Y. The Protein Encoded by Oncogene 6b from *Agrobacterium tumefaciens* Interacts with a Nuclear Protein of Tobacco. **The Plant Cell**, v. 14, p. 451–463, 2002.
- Koltunow, A. M.; Truettner, J.; Cox, K. H.; Wallroth, M.; Goldberg, R. B. Different Temporal and Spatial Gene Expression Patterns Occur during Anther Development. **The Plant Cell**, v. 2, p. 1201-1224, 1990.
- Koyama, T.; Furutani, M.; Tasaka, M.; Ohme-Takagi, M. TCP Transcription Factors Control the Morphology of Shoot Lateral Organs via Negative Regulation of the Expression of Boundary-Specific Genes in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 19, p. 473-484, 2007.
- Kulathu, Y.; Komander, D. Atypical ubiquitylation – the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. **Nature Reviews**, v. 13, p. 508-523, 2012.
- Kuroda, H.; Yanagawa, Y.; Takahashi, N.; Horii, Y.; Matsui, M. A Comprehensive Analysis of Interaction and Localization of *Arabidopsis* SKP1-LIKE (ASK) and F-Box (FBX) Proteins. **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1-

12, 2012.

- Li, C.; Potuschak, T.; Colón-Carmona, A.; Gutiérrez, R. A.; Doerner, P. Arabidopsis TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways. **PNAS**, v. 102, n. 36, p. 12978-12983, 2005.
- Li, Z.-Y.; Li, B.; Dong, A.-W. The Arabidopsis Transcription Factor AtTCP15 Regulates Endoreduplication by Modulating Expression of Key Cell-cycle Genes. **Molecular Plant**, v. 5, p. 270-280, 2012.
- Martín-Trillo, M.; Cubas, P. TCP genes: a family snapshot ten years later. **Cell**, v. 15, n. 1, p. 31-39, 2010.
- Mimida, N.; Kidou, S.-I.; Iwanami, H.; Moriya, S.; Abe, K.; Voogd, C.; Varkonyi-Gasic, E.; Kotoda, N. Apple FLOWERING LOCUS T proteins interact with transcription factors implicated in cell growth and organ development. **Tree Physiology**, v. 31, p. 555-566, 2011.
- Mocciaro, A.; Rape, M. Emerging regulatory mechanisms in ubiquitin-dependent cell cycle control. **Journal of Cell Science**, v. 125, p. 255-263, 2012.
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant**. V. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- Parapunova, V.; Busscher, M.; Busscher-Lange, J.; Lammers, M.; Karlova, R.; Bovy, A. G.; Angenent, G. C.; Maagd, R. A. Identification, cloning and characterization of the tomato TCP transcription factor family. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 157, p. 1-17, 2014.
- Parcy, F.; Nilsson, O.; Busch, M. A.; Lee, I.; Detlefweigel. A genetic framework for floral patterning. *Nature*, v. 395, n. 8, p. 561-566, 1998.
- Quiapim, A. C.; Brito, M. S.; Bernardes, L. A. S.; da Silva, I.; Malavazi, I.; Depaoli, H. C.; Molfetta-Machado, J. B.; Giuliatti, S.; Goldman, G. H.; Goldman, M. H. S. Analysis of the *Nicotiana tabacum* Stigma/Style Transcriptome Reveals Gene Expression Differences between Wet and Dry Stigma Species. **Plant Physiology**, v. 149, p. 1211-1230, 2009.

- Raven, H.P.; Evert, R.F.; Eichhorn, S.E. *Biologia Vegetal*. 5^a ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 1996.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning*. 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Estados Unidos, 1989.
- Skowyra, D.; Craig, K. L.; Tyers, M.; Elledge, S. J.; Harper, J. W. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell*, v. 91, p. 209-219, 1997.
- Steiner, E.; Efroni, I.; Gopalraj, M.; Saathoff, K.; Tseng, T.-S.; Kieffer, M.; Eshed, Y.; Olszewski, N.; Weissa, D. The Arabidopsis O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase SPINDLY Interacts with Class I TCPs to Facilitate Cytokinin Responses in Leaves and Flowers. *The Plant Cell*, v. 24, p. 96-108, 2012a.
- Steiner, E.; Yanai, O.; Efroni, I.; Ori, N.; Eshed, Y.; Weis, D. Class I TCPs modulate cytokinin-induced branching and meristematic activity in tomato. *Plant Signaling & Behavior*, v. 7, p. 807-810, 2012b.
- Szécsi, J.; Joly, C.; Bordji, K.; Varaud, E.; Cock, J. M.; Dumas, C.; Bendahmane, M. BIGPETALp,a bHLH transcription factor is involved in the control of Arabidopsis petal size. *European Molecular Biology Organization*, v. 25, p. 3912-3920, 2006.
- Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal*. 3^a Ed. Porto Alegre, Artmed. 722p, 2004.
- Tan, X.; Calderon-Villalobos, L. I. A.; Sharon, M.; Zheng, C.; Robinson, C. V.; Estelle, M.; Zheng, N. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*, v. 446, p. 640-645, 2007.
- Tatematsu, K.; Nakabayashi, K.; Kamiya, Y.; Nambara, E. Transcription factor AtTCP14 regulates embryonic growth potential during seed germination in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, v. 53, p. 42-52, 2008.
- Valsecchi, I.; Guittard-Crilat, E.; Maldiney, R.; Lignon, S.; Habricot, Y.; Lebrun, R.; Miginiac, E.; Ruelland, E.; Jeannette, E.; Lebreton, S. The intrinsically disordered C-terminal region of Arabidopsis thaliana TCP8 transcription factor acts both as a transactivation and self-assembly domain. *Molecular*

Byosistems, v. 9, p. 2282--2295, 2013.

Verhelst, K.; Carpentier, I.; Beyaert, R. Regulation of TNF-induced NF- κ B activation by different cytoplasmic ubiquitination events. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 22, p. 277-286, 2011.

Vierstra, R. D. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. **Natura Reviews**, v. 10, p. 385-397, 2009.

Vucic, D.; Dixit, V. M.; Wertz, I. E. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. **Nature Reviews**, v. 12, p. 439-452, 2011.

Xu, G.; Ma, H.; Nei, M.; Kong, H. Evolution of F-box genes in plants: Different modes of sequence divergence and their relationships with functional diversification. **PNAS**, v. 106, n. 3, p. 835-840, 2009.

Yukawa, M.; Tsudzuki, T.; Sugiura, M. The chloroplast genome of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis*: complete sequencing confirms that the *Nicotiana sylvestris* progenitor is the maternal genome donor of *Nicotiana tabacum*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 275, n. 4, p. 367-373, 2006.

Anexos

Anexo 1. Dados dos estigmas analisados por microscopia. Estão plotadas as medições de área da zona secretória, soma das áreas das células e área média das mesmas. A estimativa do número total de células na zona secretória foi obtida através da divisão da área da zona secretória pela soma da área das 30 células mensuradas. As estimativas das plantas de cada condição (RNAi, SR1 e SE) foram somadas e divididas pelo número de exemplares, provendo a média do número de células para cada grupo: RNAi = 481; SR1 = 559; SE = 762.

Tabela 1	Área da Zona Secretória (μm^2)	Soma da área das (30) células (μm)	Área média das células (μm^2)	Estimativa do número de células na Zona Secretória
RNAi 23.3 Estigma 1	322180,18	22833,00	761,10	423
RNAi 23.3 Estigma 2	250898,61	13423,35	447,45	560
RNAi 33.1 Estigma 1	257016,66	18216,36	607,21	423
RNAi 33.1 Estigma 2	252316,55	16554,21	551,81	457
RNAi 34.1 Estigma 1	321378,31	22128,34	737,61	435
RNAi 34.1 Estigma 2	207065,28	10561,92	352,06	588
SR1 Estigma 1	194211,57	12823,85	427,46	454
SR1 Estigma 2	348981,25	15727,67	524,26	665
SE 65.1 Estigma 1	316413,39	15125,36	504,18	627
SE 65.1 Estigma 2	401676,96	11289,52	376,32	1067
SE 66.2 Estigma 1	287464,41	16429,68	547,66	524
SE 66.2 Estigma 2	308013,56	11106,65	370,22	831

Anexo 2. Dados dos ovários analisados por microscopia. Estão plotadas as medições de área dos ovários, soma das áreas das células e área média das mesmas. A estimativa do número total de células foi obtida através da divisão da área do ovário pela soma da área das células mensuradas. As estimativas das plantas de cada condição (RNAi, SR1 e SE) foram somadas e divididas pelo número de exemplares, provendo a média do número de células de cada grupo: RNAi = 5933; SR1 = 6253; SE = 6510.

Tabela 2	Área do Ovário (μm^2)	Soma da área das (30) células (μm)	Área média das células (μm^2)	Estimativa do número total de células
RNAi 23.3 Ovário 1	9260000	43983,73	1466,12	6315
RNAi 23.3 Ovário 2	11200000	43453,12	1448,43	7732
RNAi 33.1 Ovário 1	13670000	72736,23	2424,54	5638
RNAi 33.1 Ovário 2	12980000	60922,88	2030,76	6391
RNAi 34.1 Ovário 1	9820000	61915,59	2063,85	4758
RNAi 34.1 Ovário 2	8830000	55586,76	1852,89	4765
SR1 Ovário 1	11520000	54222,94	1807,43	6373
SR1 Ovário 2	11740000	57425,27	1914,17	6133
SE 5.2 Ovário 1	12060000	62126,81	2070,89	5823
SE 65.1 Ovário 1	15540000	56408,35	1880,27	8264
SE 65.1 Ovário 2	16410000	68290,37	2276,34	7208
SE 66.2 Ovário 1	13400000	67493,82	2249,79	5956
SE 66.2 Ovário 2	11790000	66748,19	2224,93	5299

Anexo 3. Tabela completa dos clones recuperados e sequenciados no presente trabalho, contendo os prováveis ortólogos nas espécies *Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum*.

*Recuperado por Abbad (2012) e re-testado para confirmação no presente trabalho.

Clone	(provável) Ortólogo em <i>A. thaliana</i>	(provável) Ortólogo em <i>S. lycopersicum</i>
3A6	TCP7 (AT5G23280)	TCP15 (NM_001246881.1)
3B3	Proteína Ribossomal (AT1G04480)	(AK325399.1)
*2D6	TCP8 (AT1G58100)	TCP11 (NM_001247902.1)
3D5	Fator de Transcrição de função desconhecida (AT3G58630)	-
3H1	TCP8 (AT1G58100)	TCP13 (NM_001247037.1)
6G2	TCP8 (AT1G58100)	TCP13 (NM_001247037.1)
5G3	SKP1(AT5G42190)	SKP1 (SGN-U581060)
5G4	SKP1(AT5G42190)	SKP1 (SGN-U581060)
7E2	SKP1 (AT5G42190)	SKP1 (SGN-U581060)
7G4	SKP1 (AT1G20140)	SKP1 (SGN-U580638)
6G4	Aldolase (AT5G03690)	Aldolase-like (SGN-U578572)
5F4	Metalotioneína (AT3G09390.1)	Metalotioneína (NM_001247117.1)
7A2	Proteína ribossomal P40 (AT1G72370)	P40-like (SGN-U578139)
7E1	Proteína ribossomal P40	P40-like
7F2	Pirofosforilase (AT1G01050)	Pirofosfatase solúvel inorgânica (SGN-U579269)
3B5	Peptídeo PR de defesa contra patógenos (AT1G61070.1)	<i>Flower specific thionin</i> (EF544390.1)

Anexo 4. Sequência de nucleotídeos da CDS e deduzida de aminoácidos de NtTCP11, amplificada neste trabalho. A sequência codificante completa apresenta 1608 pares de bases. Os códons de início (ATG) e fim (TAA) da tradução estão em negrito.

```

ATGgaactctctgatttacaaaacaacaataactaatagcactagtaaaacaaaacaacaac 60
  M E L S D L Q N N N T N S T S K Q N N N
aacaacaccgcccccttctcaacctctacaccaccagcatcagcaccagtatcagctactc 120
  N N T A P S Q P L H H Q H Q H Q Y Q L L
tcccaccactttcaacaacaacatggccgatcatcagctccttttatgacctctatctcc 180
  S H H F Q Q Q H G R S S A P F M T S I S
atccaaccttctgctccacctgggtctaactaattctgctagtcctactccgactgctgct 240
  I Q P S A P P G L T N S A S P T P T A A
actagtgttctccttcttcttctcctctcctactcctccacctccgcagcagcagccacct 300
  T S A S P S S S S P T P P P P Q Q Q P P
cacctagtggatgcttctcttctgctatagccactagatccgactccctgattgactcaaac 360
  H L V D A S L A I A T R S D S L I D S N
aagaaatctcagccccaacagcagcagctggcaatacaacaaacacaacctgtgcaacaa 420
  K K S Q P Q Q Q Q L A I Q Q T Q P V Q Q
cagcaacagctgcagacgcagcctccgaagaacaaaccaaggatcggcataccaaagtt 480
  Q Q Q L Q T Q P P K K Q T K D R H T K V
gacggggcagggggcggcgcatccgaatgccagccgcctgtgcagctagggttttcaattg 540
  D G R G R R I R M P A A C A A R V F Q L
actcgagaattaggccataagtccgacggagaaacatcgaatggctcttacatcaagcc 600
  T R E L G H K S D G E T I E W L L H Q A
gagccagctatcatcgctgccactggcaccggtaccatcccagccaacttttccactcta 660
  E P A I I A A A T G T G T I P A N F S T L
aacatatccctacgtagcagcggctccactctcggctcctcctcctcctcctcctcctcct 720
  N I S L R S S G S T L S A P P S K S A P
cattcgtttccataacgcttttagccctagccgctgctcaccatccgtctcatccttttgaa 780
  H S F H N A L A L A A A H H P S H P F E
gaaggatttcccacatgctagggtttcatcaaaaatcctcatcttctggcgccaaatcca 840
  E G F S H M L G F H Q N P H L L A P N P
atcgccgaatctatacaaggaggtgggtggcggtgttagtagcggagatgggtggtagga 900
  I A E S I Q G G G G G V S S G D G G G G
caagaggggaacggagaattaccttccgaagagatatcgagaagatttgttcaaagaggaa 960
  Q E G T E N Y L R K R Y R E D L F K E E
ggttcaagtaatccacaaggagaagcttctggaggatctagctcaccttctaataagcaa 1020
  G S S N P Q G E A S G G S S S P S N K Q
ttcaagggaaattcttcacaattgcctaaaccttcccaagaagctgtagctggaccatca 1080
  F K G N S S Q L P K P S Q E A V A G P S
gccagtatgcttccgcataactaatatgatgccagctactggtttggggcagtagcacca 1140
  A S M L R H T N M M P A T G L W A V A P
ccaccacaagtggaaacgactggcagcccttctggatgctgccagtcaccgctagcgggt 1200
  P P T S G T T G S P F W M L P V T A S G
agcggacagacggttgcctccgacccatggcaagcagcagcaggaactactacgctcagctc 1260
  S G Q T L S A P M A S T S G T T T L E S
caaatatggccttttccgatgggttagttcaaatacgatgcaagcaccggttgcaattcatg 1320
  Q I W P F P M G S S N T M Q A P L H F M
cctaggttttaataattccaacaaatcttgaatttcaaagtgggagaggaaatccattgcaa 1380
  P R F N I P T N L E F Q S G R G N P L Q
ctaggctcaatgttaatgcagcagcaacaacaccaacaacacatctcaacatcttggg 1440
  L G S M L M Q Q Q Q H Q Q Q P S Q H L G
ctgggaatgtctgaaagtaatttgggtatgtagcagcccttaatgcttattcaagaagt 1500
  L G M S E S N L G M L A A L N A Y S R S
ggtttgaatatgaattcagaccatcaaagtcactcattagaacatcatcagcaacatcaa 1560
  G L N M N S D H Q S H S L E H H Q Q H Q
cctcaacctgtggatagcgaagaggatgatccaaacaactcccagTAA 1608
  P Q P V D S E E D D P N N S Q -

```

Anexo 5. Alinhamento entre a sequência codificante (CDS) completa de NtTCP11, amplificada neste trabalho e o clone 2D6, recuperado do *screening* da biblioteca de duplo-híbrido. 2D6F representa o sequenciamento deste clone partindo do vetor pDEST22, demonstrando a falta de um fragmento de 106 pares de bases na região inicial do clone, em relação à CDS. 2D6R é proveniente do sequenciamento com um primer que parecia no final do clone, neste caso demonstrado a região 3' UTR (em *itálico*) derivada do RNAm que serviu como *template* deste clone, durante a construção da biblioteca. Os códons de início e fim da tradução estão marcados em **negrito**. Em cinza claro estão evidenciadas as regiões de pareamento dos *primers* usados na amplificação da CDS.

```

CDS  ATGgaactctctgatttacaaaacaacaataactaatagcactagtaaacaacaacaacaac
2D6  -----

CDS  aacaacaccgccccttctcaacctctacaccaccagcatcagcaccagtatcagctactc
2D6F -----agtatcagctactc
          |||

CDS  tcccaccactttcaacaacaacatggccgatcatcagctccttttatgacctctatctcc
2D6F tcccaccactttcaacaacaacatggccgatcatcagctccttttatgacctctatctcc
          |||

CDS  atccaaccttctgctccacctgggtctaactaattctgctagtcctactccgactgctgct
2D6F atccaaccttctgctccacctgggtctaactaattctgctagtcctactccgactgctgct
          |||

CDS  actagtgttctccttcttcttctcctactcctccacctccgcagcagcagccacct
2D6F actagtgttctccttcttcttctcctactcctccacctccgcagcagcagccacct
          |||

CDS  cacctagtggatgcttctcttgctatagccactagatccgactccctgattgactcaaac
2D6F cacctagtggatgcttctcttgctatagccactagatccgactccctgattgactcaaac
          |||

CDS  aagaaatctcagcccaaacagcagcagctggcaatacaacaacaacacacctgtgcaaaa
2D6F aagaaatctcagcccaaacagcagcagctggcaatacaacaacaacacacctgtgcaaaa
          |||

CDS  cagcaacagctgcagacgcagcctccgaagaaacaaccaaggatcggcatacacaagtt
2D6F cagcaacagctgcagacgcagcctccgaagaaacaaccaaggatcggcatacacaagtt
          |||

CDS  gacgggcgagggcgccatccgaatgccagccgctgtgcagctagggtttccaattg
2D6F gacgggcgagggcggc-----

CDS  actcgagaattaggccataagtccgacggagaaaccatcgaatggctcttacatcaagcc
2D6  -----

```


CDS gagccagctatcatcgctgccactggcaccggtagccatcccagccaacttttccactcta
 2D6 -----

CDS aacatatccctacgtagcagcggctccactctgtcggctcctccgtctaagtcagctcca
 2D6 -----

CDS cattcgtttcataacgcttttagccctagccgctgctcaccatccgtctcatccttttgaa
 2D6 -----

CDS gaaggattctcccacatgctagggtttcatcaaaatcctcatcttctggcgccaaatcca
 2D6 -----

CDS atcgccgaatctatacaaggaggtggtggcgggttagtagcggagatggtggtggagga
 2D6 -----

CDS caagagggaaacggagaattaccttcggaagagatatcgagaagatttgttcaaagaggaa
 2D6 -----

CDS ggttcaagtaatccacaaggagaagcttctggaggatctagctcaccttctaataagcaa
 2D6 -----

CDS ttcaagggaaattcttcacaattgcctaaaccttccaagaagctgtagctggaccatca
 2D6 -----

CDS gccagtatgcttcggcactaataatgatgccagctactggtttgtgggcagtagcacca
 2D6 -----

CDS ccaccacaagtggaacgactggcagcccttctggatgctgccagtcaccgctagcggg
 2D6 -----

CDS agcggacagacgttgtccgcacccatggcaagcagtcaggaactactacgctcgagtct
 2D6 -----

CDS caaatatggccttttccgatgggtagttcaaatacgatgcaagcaccgttgcatttcatg
 2D6 -----

CDS cctaggtttaatattccaacaaatcttgaatttcaaagtgggagaggaaatccattgcaa
 2D6 -----

CDS ctaggctcaatgttaatgcagcagcaacaacaccaacaacaacctctcaacatcttggg
 2D6R -----caacaacaacctctcaacatcttggg
 |||

CDS ctgggaatgtctgaaagtaatttgggtatgtagcagcccttaatgcttattcaagaagt
 2D6R ctgggaatgtctgaaagtaatttgggtatgtagcagcccttaatgcttattcaagaagt
 |||

CDS ggtttgaatatgaattcagaccatcaaagtcactcattagaacatcatcagcaacatcaa
 2D6R ggtttgaatatgaattcagaccatcaaagtcactcattagaacatcatcagcaacatcaa
 |||

```

CDS  cctcaacctgtggatagcgaagaggatgatccaaacaactcccagTAA-----
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2D6R cctcaacctgtggatagcgaagaggatgatccaaacaactcccagtaatagtttgaagta

CDS  -----
2D6R aatctatattattgattttaaatctctaaagtgtgatgagtgaagtgcttgaaagattc

CDS  -----
2D6R agttcatatgaatgaggatttcatggaagacagacagagaggtatatgttagttgtcatt

CDS  -----
2D6R tggttttgtctgtcattattaccttttttctgtttgtttctttctctttgagaaccttt

CDS  -----
2D6R tgctagagagttgtgaagaatttgaaatgtattttgttagttttggtcctttgggatatt

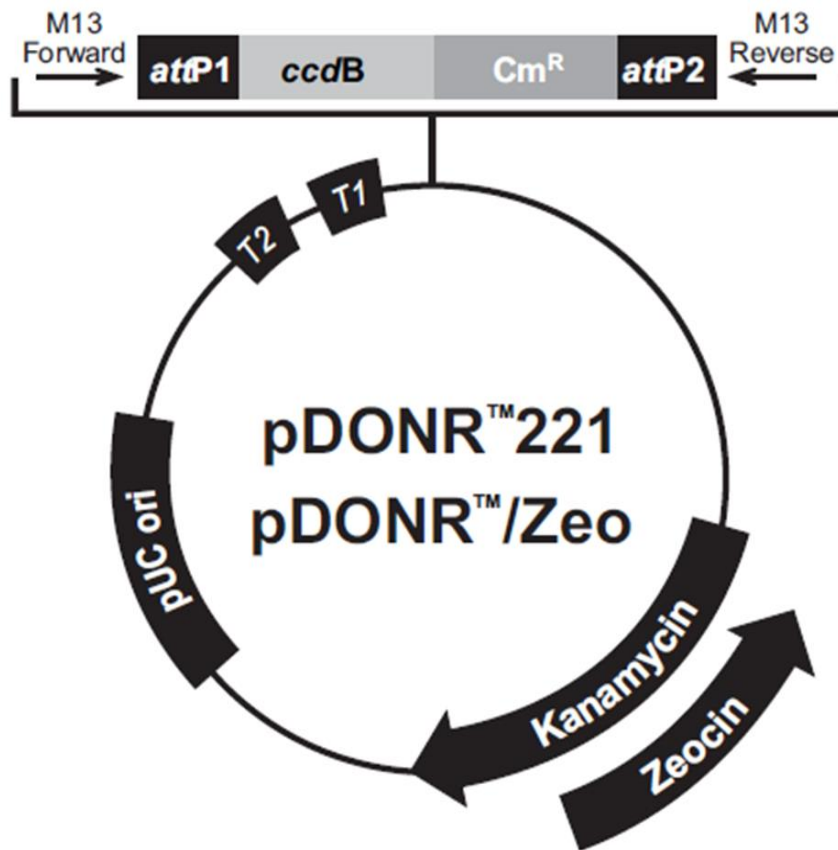
CDS  -----
2D6R agctaggactgaagagagagctttgtataggaggatataatttgtgtttagtatttttca

CDS  -----
2D6R aaagctcagcttgctgttgtgtgtatgagaaaaatgcaaaaacagtcaaaaaagaatata

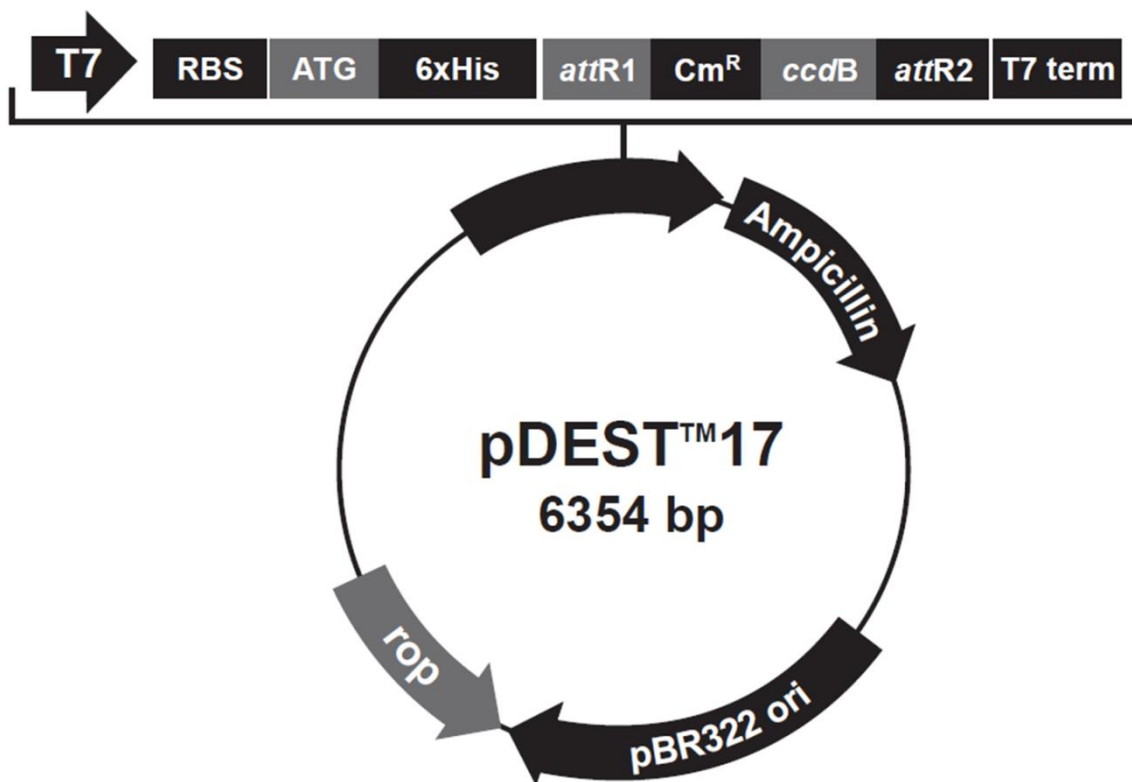
CDS  ---
2D6R gac

```

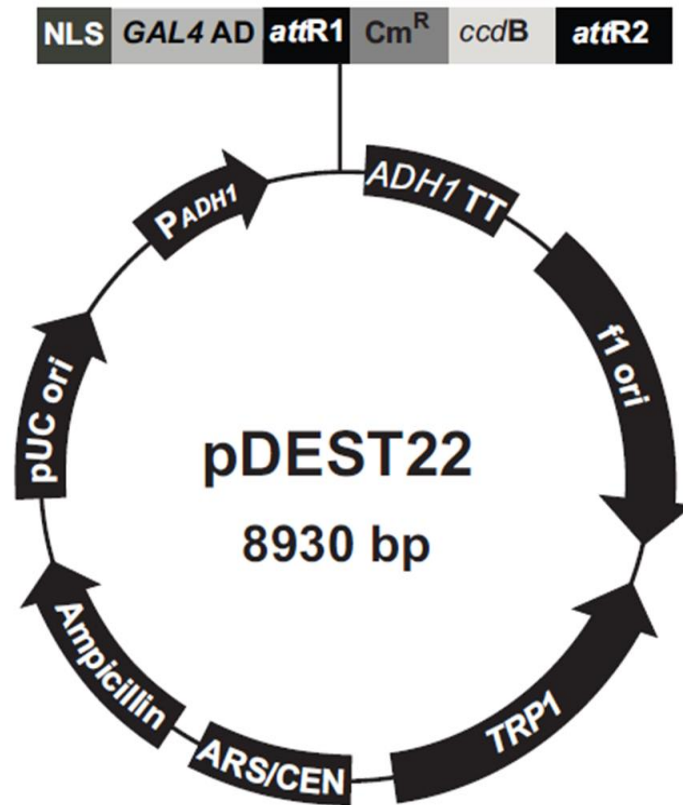
Anexo 6 – Vetores Utilizados



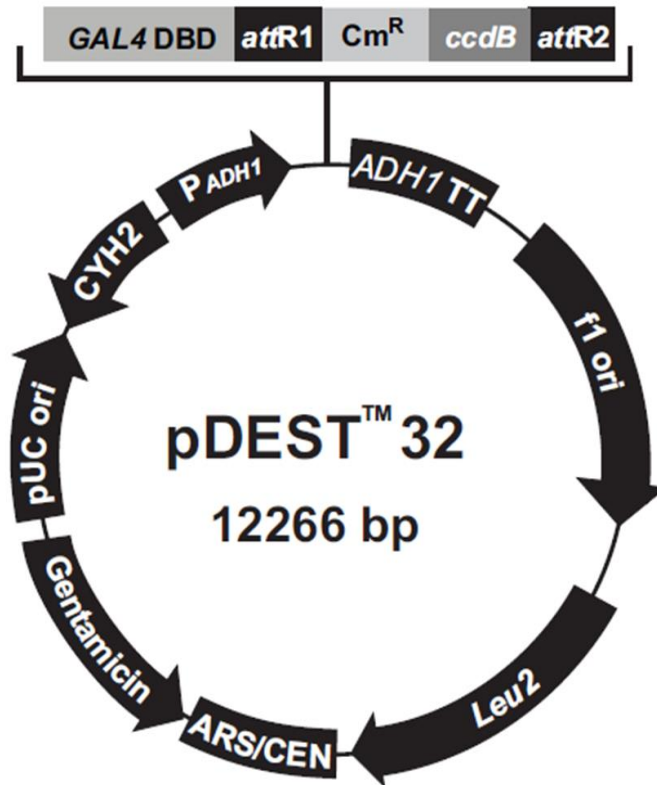
Anexo 6.1. Mapa do vetor pDONR™221 (Invitrogen) de entrada no sistema Gateway® de recombinação. O vetor apresenta o gene que confere resistência à canamicina para seleção em bactérias. Os sítios *attP1* e *attP2* flanqueiam o gene *ccdB* (que inibe o crescimento da maioria das linhagens de *E. coli*) e o gene de resistência ao cloranfenicol (*CmR*). Após reação BP, os genes *ccdB* e *CmR* são substituídos pelo inserto de interesse.



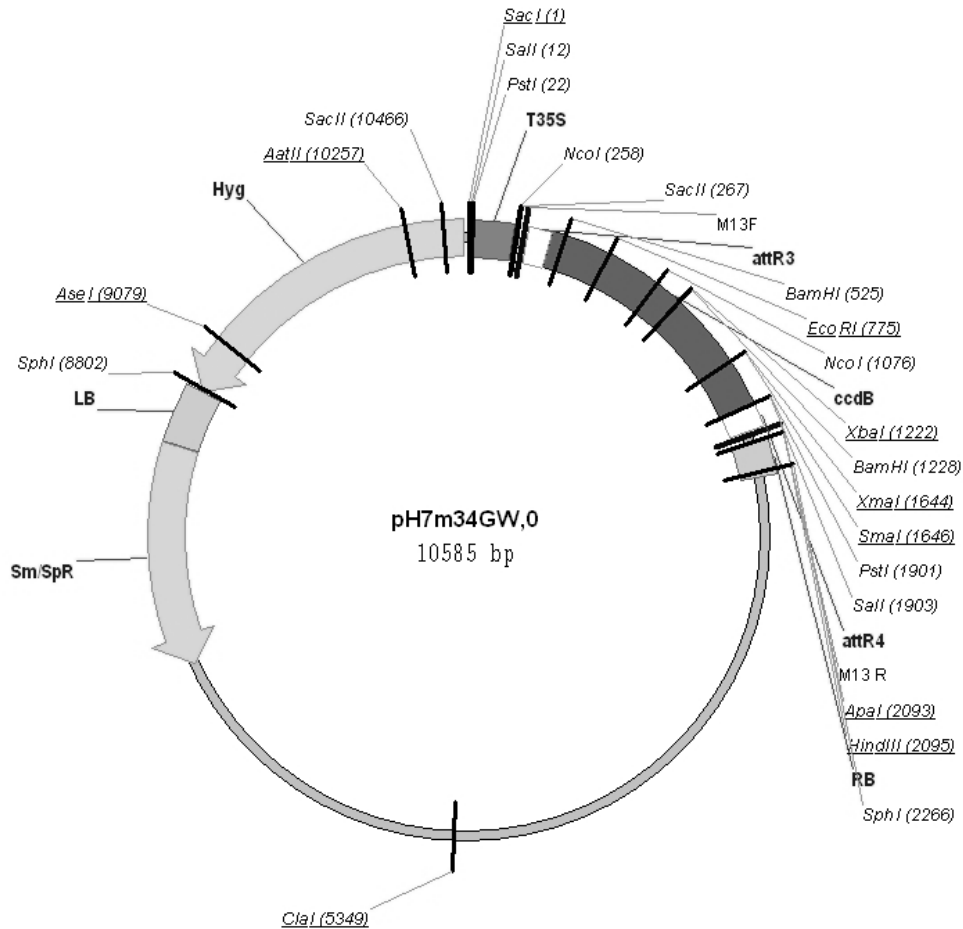
Anexo 6.2. Mapa do vetor pDEST™17 (*Invitrogen*) utilizado para a expressão heteróloga de proteínas em *Escherichia coli*. A proteína produzida sob indução de IPTG é expressa com a fusão de seis aminoácidos histidina em sua extremidade N-terminal. O vetor confere resistência à ampicilina nas células de bactérias. Os sítios attR1 e attR2 flanqueiam o gene de resistência à cloranfenicol (*CmR*) e *ccdB*.



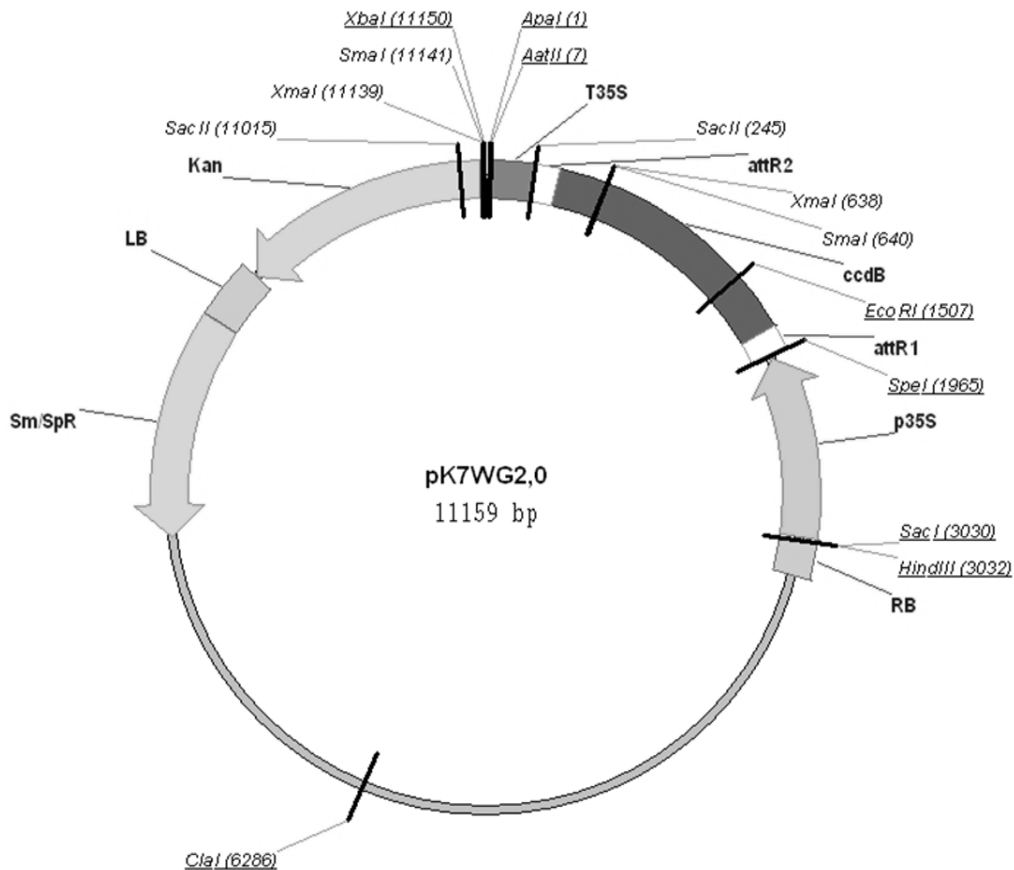
Anexo 6.3. Mapa do vetor pDESTTM22 (*Invitrogen*) utilizado para expressão em leveduras. A proteína recombinante é expressa apresentando o domínio AD do fator de transcrição Gal4 em sua extremidade N-terminal. O vetor confere resistência à ampicilina em células bacterianas. Em leveduras, codifica uma enzima da via de biossíntese do Triptofano (TRP1). Os sítios attR1 e attR2 flanqueiam o gene *ccdB* e o gene de resistência ao cloranfenicol (*CmR*).



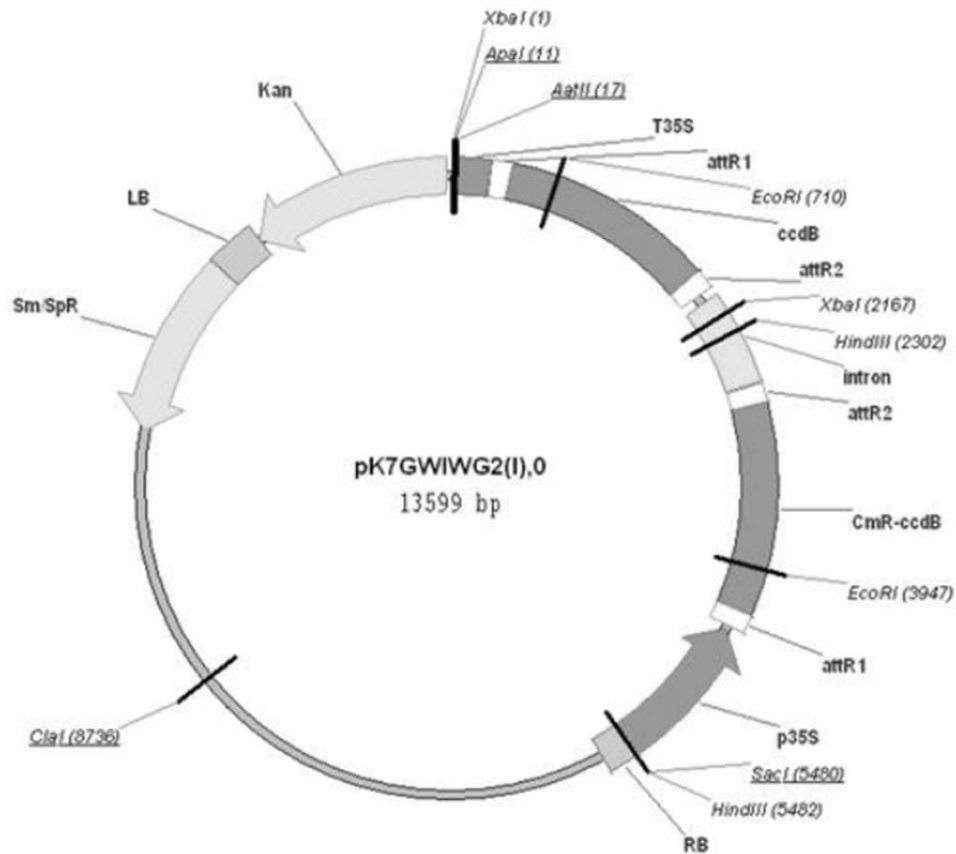
Anexo 6.4. Mapa do vetor pDEST™32 (*Invitrogen*) utilizado para expressão em leveduras. A proteína recombinante é expressa apresentando o domínio DBD do fator de transcrição Gal4 em sua extremidade N-terminal. O vetor confere resistência à gentamicina em células bacterianas. Em leveduras, codifica uma enzima da via de biossíntese da Leucina (LEU2). Os sítios attR1 e attR2 flanqueiam o gene *ccdB* e o gene de resistência ao cloranfenicol (*CmR*).



Anexo 6.5. Mapa do vetor pH7m34GW, utilizado para as construções provenientes de LR múltipla. O vetor possui as sequências LB e RB, que delimitam a sequência que é transferida para o genoma de plantas durante infecção com *A. tumefaciens*. O vetor confere resistência à estreptomicina e espectinomicina (Sm/SpR) para seleção em bactérias e à higromicina (Hyg) para seleção em células vegetais. Os sítios de recombinação flanqueiam o gene *ccdB*, que é substituído pelos fragmentos de interesse após reação LR. Fonte: <http://gateway.psb.ugent.be/>.



Anexo 6.6. Mapa do vetor pK7WG2, utilizado por Abbad (2012) para a superexpressão da sequência de FEF1. O vetor apresenta genes de resistência à estreptomicina e à espectinomicina (Sm/SpR) para seleção em bactérias, além do gene de resistência à canamicina (Kan) para a seleção em plantas. Os sítios de recombinação flanqueiam o gene *ccdB*, que é substituído pelo fragmentos de interesse após reação LR. Fonte: <http://gateway.psb.ugent.be/>.



Anexo 6.7. Mapa do vetor pK7WGIGW2(I), usado por Abbad (2012) na criação dos transgênicos de silenciamento de FEF1. O vetor possui um íntron clonado entre duas sequências de recombinação invertidas entre si. Essa configuração permite dois eventos independentes de recombinação, que geram a formação de um RNA em forma de “grampo”, o qual desencadeia o processo de silenciamento gênico pós-transcricional (Karimi et al., 2002). O vetor apresenta genes de resistência à estreptomicina e à espectinomicina (Sm/SpR) para seleção em bactérias, além do gene de resistência à canamicina (Kan) para a seleção em plantas. Os sítios de recombinação flanqueiam o gene *ccdB*, que é substituído pelo fragmentos de interesse após reação LR. Fonte: <http://gateway.psb.ugent.be/>.