SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

FÁBIO OMETTO DIAS

"Rpb4: uma subunidade não muito convencional da RNA polimerase II – estudos em cana-de-açúcar"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) FÁBIO OMETTO DIAS e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Vegetal e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira
Co-Orientador: Profa. Dra. Agustine Gentile

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

D543r

Dias, Fábio Ometto
Rpb4: uma subunidade não muito convencional da RNA polimerase II – estudos em cana-de-açúcar / Fábio Ometto Dias. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Marcelo Menossi Teixeira, Agustina Gentile
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Rpb4. 2. Cana-de-açúcar. 3. RNA polimerase II. 4. Estresse. I. Teixeira, Marcelo Menossi, 1968- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Rpb4: a non conventional RNA polimerase II subunit – sugarcane studies.
Palavras-chave em inglês: Rpb4; Sugarcane; RNA polymerase II; Stress.
Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento.
Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.
Banca examinadora: Marcelo Menossi Teixeira, Márcio José da Silva, Celso Eduardo Benedetti.
Data da defesa: 24/02/2011.
Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 24 de fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira (Orientador)

Assinatura

Prof. Dr. Márcio José da Silva

Assinatura

Prof. Dr. Celso Benedetti

Assinatura

Prof. Dr. Jorg Kobarg

Assinatura

Dr. Fernando Moreira Simabuco

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPQ pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao professor Marcelo Menossi pela paciência e orientação;

À Dra. Agustina Gentile pelos ensinamentos, seriedade, amizade e carinho;

À Eduardo Kyota pela ajuda com os ensaios de proteínas;

Aos amigos de laboratório Sandra Camargo, Rafael Tavares e Kevin Padilla pela ajuda com protocolos e experimentos.

Àqueles que de forma indireta me auxiliaram, sempre me animando quando estava cansado ou indisposto: meus pais, Antonio Dias de Jesus e Angela Maria Ometto Dias; à minha namorada, Akina Sakamori; aos meus amigos de faculdade Marco Antonio T. Marinho, Annelize Z. B. Aragão, Igor Cesarino, Guilherme C. de M. Serrano; meu mestre de artes marciais Shidoshi Frederico J. de Souza e os Senseis Celso O. Kaminishikawahara, Evandro Sandrin, Leandro C. Faria e Liane K. Satake Faria.

“A falha é a chave do sucesso;

cada erro nos ensina algo.”

Morihei Ueshiba, *A Arte da Paz*, 1992

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

Figura 1. Arquitetura da RNA pol II com suas 12 subunidades.....14

Resultados

Figura 2. - Alinhamento de sequências de proteínas homólogas de ScRpb4 de cana-de-açúcar.....33

Figura 3. - Alinhamento de sequências de proteínas de planta homólogas de ScRpb4 de cana-de-açúcar.....34

Figura 4. - Gel de eletroforese da PCR do gene *ScRpb4*.....35

Figura 5. - Digestão para comprovação da inserção do gene ScRpb4 no plasmídio pGEM-T easy..... 36

Figura 6. - Digestão da construção pGEX-4T-1::Rpb4 com *BamHI* e *XhoI*.....37

Figura 7. - Digestão da construção pET-28a::Rpb4 para comprovar a inserção do gene no plasmídio.....37

Figura 8. Expressão da construção pGEX-4T-1::*Rpb4* um gel SDS-PAGE 15%.....39

Figura 9. Expressão da pGEX-4T-1::*Rpb4* em um gel SDS-PAGE 15%.....40

Figura 10. Expressão da pET-28a::*Rpb4* em um gel SDS-PAGE 15%.....41

Figura 11. Expressão em larga escala de pGEX-4T-1::*Rpb4* em pLysS durante 6 h a 30 ºC.....42

Figura 12. Expressão em larga escala de pET-28a::*Rpb4* em pRil durante 4 h a 37 ºC.....43

Figura 13. Expressão do gene *ScRpb4* de cana-de-açúcar em diferentes tecidos e condições.....44

Figura 14. - Confirmação da construção pGEM-T easy::Rpb4 digerida com as enzimas *BamHI* e *SphI*.....45

Figura 15. - Digestão para obtenção do fragmento GFP.....46

Figura 16. - Digestão para a abertura do vetor da expressão pRT-104 com as enzimas *BamHI* e *XbaI*.....47

Figura 17. - Localização subcelular de ScRpb4 em epiderme de células de cebola.....48

Figura 18. - Gel de eletroforese da PCR da orientação do gene *Rpb4* no plasmídio pGEM-T easy e Orientação do gene no plasmídio.....49

Figura 19. - Digestão da mini-prep sem RNAse da construção pGEM-T easy::Rpb4.....50

Figura 20. Hibridização *in situ* de cortes transversais da folha matura.....53

Figura 21. Hibridização *in situ* de cortes longitudinais da inflorescência de cana-de-açúcar.....53

ABREVIAÇÕES

ABA: Ácido Abcísico

AMP: Ampicilina

cDNA: DNA complementar

CLOR: Cloranfenicol

CTD: Domínio Carbóxi-Terminal

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

GST: Glutationa S-Transferase

HS: Choque de calor

IPTG: Isopropil-β-D-Tio-Galactosídeo

KAN: Kanamicina

kDa: Kilodaltons

LB: Caldo de Lisogênio

MD: Megadaltons

MEJA: Metil Jasmonato

mM: miliMolar

mRNA: RNA mensageiro

PCR: Reação de Polimerase em Cadeia

PPM: Padrão de Peso Molecular

RNA: Ácido Ribonucleico

RNA Pol II: RNA Polimerase II

rRNA: RNA ribossômico

Rpb4: Quarta maior subunidade da RNA Pol II

SDS-PAGE: Eletroforese de Gel de Acrilamida - Dodecil Sulfato de Sódio

snRNA: RNA de Pequenos nucleotídeos

SUCEST: Programa de Seqüenciamento de Etiquetas de Expressão em Cana-de-Açúcar

TF: Fator de Transcrição

X-Gal: X-Galactosidase

ÍNDICE

I. Resumo.....8

II. Abstract.....10

III. Introdução.....12

IV. Justificativa do Trabalho.....17

V. Objetivos.....18

VI. Materiais e Métodos.....19

VII. Resultados.....31

VIII. Discussão.....54

IX. Conclusões.....59

X. Bibliografia.....61

XI. Anexo I. Ilustrações.....65

XII. Anexo II: Manuscrito.....– em PDF

RESUMO

A transcrição é um evento crucial para a expressão gênica, sendo que a RNA polimerase II tem um papel destacado: são suas subunidades que interagem entre si e com os fatores de transcrição (TFs), formando um complexo que sintetiza o transcrito primário a partir da molécula de DNA. Entender como as subunidades funcionam e interagem entre si e com os TFs é um ponto fundamental para entender as bases da expressão gênica. Uma subunidade intrigante é a quarta maior subunidade, Rpb4, que juntamente com a Rpb7, a sétima maior subunidade, forma um heterodímero localizado em uma região à parte do *core* enzimático. Em situações de crescimento ótimo, Rpb4 encontra-se pouco associada com Rpb7. Porém, em situações de estresse a ligação das subunidades é de suma importância para a viabilidade celular.

Esta tese faz a primeira caracterização do gene *ScRpb4* de cana-de-açúcar, que codifica uma proteína homóloga à proteína correspondente à quarta maior subunidade da RNA Pol II de plantas . A proteína ScRpb4 foi expressa em *Eschericchia coli* e os resultados indicam que os maiores níveis foram observados com a construção baseada em pET-28a à 37 °C, induzidas por 4 horas com IPTG. A expressão do gene *ScRpb4* foi uniforme em diferentes tecidos e condições, possuindo um ligeiro aumento da expressão na folha imatura, gema lateral, raiz e flor. Na hibridização *in situ* verificou-se que os transcritos foram encontrados na zona periférica do sistema vascular de folhas e no meristema apical das inflorescências, mostrando que *ScRpb4* é expresso em tecidos imaturos com ativa divisão celular. A localização subcelular revelou que ScRpb4 está presente tanto no núcleo quanto no citoplasma, fato similar ao previamente reportado em leveduras. Todos os resultados

encontrados estão de acordo com o provável papel de Rpb4 como parte da maquinaria transcricional, e trazem novos dados para essa subunidade em plantas.

Palavras-chave: RNA polimerase II, Rpb4, cana-de-açúcar, estresse.

ABSTRACT

Transcription is a crucial event for gene expression, whereas RNA Polymerase II plays an important role: its subunits interacts with each other and with the transcription factors (TFs) form a complex that synthesizes the primary transcript from the DNA molecule. Understanding how the subunits work and interact among themselves and with the TFs is a key point to understand the basis of gene expression.

An interesting subunit is the fourth largest subunit, Rpb4, which together with Rpb7, the seventh largest subunit, forms a heterodimer located away from the enzymatic core. In yeast, in situations of optimal conditions, Rpb4 is often associated with Rpb7, but in non-optimal conditions, the association of the subunits is critical for cell viability. Our work does the first characterization of the ScRpb4 gene from sugarcane, which encodes a homologous protein to the proteins corresponding to the fourth largest subunit of the RNA Polymerase II from plants. The ScRpb4 protein was expressed in *Eschericchia coli* and results indicate that the highest levels of expression was observed with the construction based on pET-28a at 37 °C, induced with IPTG for 4 hours. *ScRpb4* gene expression was uniform in different tissues and conditions, with a slightly higher expression in immature leaf, lateral bud, root and flowers. In situ hybridization showed that the *ScRpb4* transcripts were found at the periphery of the vascular system in leaves and in the apical meristem of inflorescence, showing that ScRpb4 is expressed in immature tissues with active cell division. The subcellular localization revealed that ScRpb4 functions in nucleus and cytoplasm, similarly to previous reports found in yeast. All the results found are in agreement with the alleged role of the ScRpb4 as a part of the transcriptional machine and

provide new data of this subunit in plants.

Key-words: RNA polimerase II, Rpb4, sugarcane, stress.

INTRODUÇÃO

RNA polimerase II

Dentre os três tipos de RNA polimerase, a RNA polimerase II (pol II) é a mais bem estudada e é responsável pela transcrição de mRNA e pequenos RNAs nucleares (snRNA) nas células eucarióticas. A transcrição pela pol II é o primeiro passo para a expressão gênica e é um ponto crítico da regulação celular. Ela é recrutada até promotores específicos no exato momento da transcrição por uma maquinaria extremamente complexa, sendo alvo para muitos caminhos de transdução de sinais e um ponto de controle para a diferenciação celular durante o desenvolvimento (Cramer 2001). Ela contém 12 subunidades em eucariotos, denominadas de Rpb1 até Rpb12, com uma massa total de 0.5 MD. A polimerase mais bem estudada é a da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Nela foi descoberto que a quarta e a sétima maiores subunidades (Rpb4 e Rpb7) formam um heterodímero, que é independente do complexo formado pelas outras 10 subunidades, onde está localizada a parte principal das estruturas da pol II e o sítio catalítico (Woychik 1989). Esse heterodímero também é observado na RNA polimerase de Arquea, em que RpoE e RpoF, que são os homólogos de Rpb4 e Rpb7 respectivamente, interagem entre si, comprovando que essa formação do heterodímero é conservada (Armache 2003).

O heterodímero Rpb4/7 localiza-se em uma região estratégica (Figura 1), a qual se encontra próxima ao local de saída do transcrito primário e adjacente à região de ligação do CTD (*Carboxi-Terminal Domain*). Nessa região ligam-se outras proteínas necessárias para a transcrição, sendo o local onde ocorre a fosforilação/desfosforilação necessária para o início/fim da transcrição (Armache 2003).

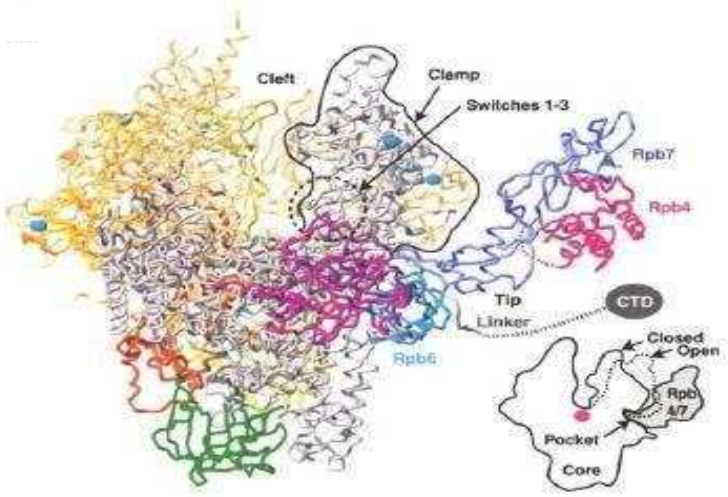

Figura 1. Arquitetura da RNA pol II com suas 12 subunidades. O heterodímero Rpb4/7 encontra-se afastado do *core* enzimático, formado pela outras 10 subunidades (Armache 2003).

A maioria dos estudos acerca dessa subunidade foi feita na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, na qual se verificou que o complexo Rpb4/7 mantém uma relação de associação/dissociação com o *core* enzimático. Essa relação, em parte, é devida a frágil ligação que acontece entre o heterodímero e a pol II: ela se dá apenas por um contato principal, parcialmente hidrofóbico e muito conservado entre os eucariotos, no qual a Rpb7 interage com o *pocket* da pol II, formado por três regiões da Rpb1, uma da Rpb2 e uma da Rpb6 (Sheffer 1999 e Armache 2003). Outro fator que influencia nessa relação instável é a condição ambiental; *in vivo* Rpb4 e Rpb7 contribuem de maneira diferencial para a função do heterodímero. Estudos demonstraram que Rpb7 é uma proteína essencial (McKune 1993), enquanto que Rpb4 é dispensável diante de condições ótimas de crescimento para a célula, sendo essencial sob condições adversas, tais como estresse devido à temperatura (acima de 30ºC e abaixo de 12ºC), presença de etanol e falta de

nutrientes (Choder 1993, Sheffer 1999, Pillai 2001 e Farago 2003). Porém, foi verificado que estresse oxidativo, estresse osmótico e falta de nitrogênio não são condições para que a presença dessa proteína seja essencial. Assim como a região de contato de Rpb7 e o core enzimático, a região de contato de Rpb4 e Rpb7 também é muito conservada em eucariotos (Armache 2003), sendo possível a complementação parcial de leveduras nocauteadas para o gene de Rpb4 com o homólogo de humanos hsRPB4 (Khazak 1998).

O homólogo de *Drosophila melanogaster* é diferente de outros homólogos, pois o mRNA é produzido por splicing diferencial de um gene que também codifica um adaptador de proteína, chamada ADA-2 (Muratoglu et al. 2003). Isso corrobora a ideia de que a regulação que envolve Rpb4/7 pode variar entre diferentes organismos (Larkin and Guilfoyle 1998.

Até o momento, três são as explicações passíveis de se fazer em relação à presença da Rpb4 no complexo pol II, sendo que uma não exclui a outra: (i) Rpb4 aumenta o papel essencial da Rpb7; (ii) sob condições de estresse, os poucos genes transcritos pela Rpb4 são requeridos para a sobrevivência celular, enquanto que em situações ótimas eles não são necessários para essa sobrevivência; (iii) essa subunidade interage com proteínas específicas durante o estresse e/ou medeia algumas funções essenciais sob adversidade, durante os processos de transcrição ou até pós-transcricionais (Choder 2004).

A respeito dos processos pós-transcricionais, através de fusão com GFP (*Green Fluorescent Protein*), foi possível verificar a presença de Rpb4 tanto no núcleo – o que já era de se esperar – como no citoplasma – um local inusitado para uma subunidade da pol II – de *Sacchromyces cerevisiae* apenas durante estresse, provando novamente ser essencial para a sobrevivência celular (Farago 2003). Através de experimentos alterando a

temperatura, nos quais se observava a proteína Rpb4 fusionada com GFP, e através da hibridação *in situ*, os autores observaram que a presença dessa subunidade no citoplasma é essencial para o transporte pós-transcricional de mRNA poli-A e *Heat Shock* (HS) mRNA. Mais interessante é que a quantidade de moléculas dessa subunidade não se altera, sendo a mesma quando a célula cresce sob condições ideais, ou quando sob estresse; o que é alterado é o estado de agregação dela com a pol II – em condições ótimas há 20% de agregação e em condições não-ótimas quase 100% – e o local (núcleo ou citoplasma) que ela se encontra.

Em plantas, o único estudo a respeito dessa subunidade da pol II é um estudo de Larkin e Guilfoyle (1998), no qual os autores utilizam cDNA de *Arabidopsis* para verificar se há formação de um heterodímero entre o produto desse cDNA com o produto do cDNA de Rpb7 de *Arabidopsis*, previamente já caracterizado, e se esse heterodímero é estável ou não. Os autores obtiveram uma proteína de 139 aminoácidos e massa molecular de 15.9 kDa. Eles também verificaram que o complexo Rpb4/7 forma uma associação estável com a pol II, diferentemente do que ocorre com o mesmo complexo de leveduras. Outro experimento do mesmo estudo demonstra que é possível a formação de heterodímero entre Rpb4 de levedura e Rpb7 de *Arabidopsis* e vice-versa. Através desse resultado e da observação que a Rpb4 em leveduras possui 32 kDa e um motivo de 70 aminoácidos altamente carregados no centro dessa subunidade que está ausente tanto em humanos como na *Arabidopsis* do estudo, os autores sugerem que esse motivo não seja necessário para que ocorra a formação do heterodímero, pois ele é formado entre a levedura e a planta, mas que possivelmente ele seja responsável pela dissociação da pol II, não verificada nos outros organismos.

Outro ponto interessante é que mesmo em *Arabidopsis* há a presença de uma quantidade estequiometricamente maior de Rpb4 do que das outras subunidades, sugerindo que possa haver, também em plantas assim como verificado anteriormente em *S. cerevisiae*, uma função pós-transcricional da Rpb4.

A Rpb4 de cana-de-açúcar

Dentro do projeto de Data Mining do SUCEST (*Sugarcane EST Program*), foram identificados na cana-de-açúcar todos os componentes do sistema de transcrição mediado pela RNA Polimerase II com massa molecular abaixo de 50 kDa que apresentavam sequência nucleotídica completa (Leite et al., dados não publicados). No projeto "Three-dimensional structure of the eucaryotic transcription components identified in the FAPESP SUCEST program" o foco foram fatores que possuiam massa molecular abaixo de 30 kDa e que não tinham ainda sua estrutura tridimensional determinada em nenhuma espécie eucariótica. Atualmente foram determinadas as estruturas de levedura e humanos (acessos 2C35, 2B63, 1Y14, 1WCM e 1PQV no www.pdb.org), sendo que nenhuma estrutura de proteínas de planta foi determinada.

JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

A transcrição é um evento crucial para a expressão gênica, sendo que a RNA polimerase II tem um papel destacado nesse processo. Conhecer o papel isolado das subunidades ajuda a compreender o papel da própria polimerase em si, auxiliando na compreensão da transcrição em geral. Os estudos a respeito da quarta subunidade da RNA polimerase II indicam um papel primordial no que tange ao estresse, mostrando-se como um importante regulador da transcrição durante esse evento no qual todo tipo de ser vivo está sujeito. O cultivo de plantas é afetado por diversos estresses, que frequentemente reduzem a produtividade. Estudos sobre estresse em plantas vêm sendo realizados há muito tempo e em grande quantidade, porém estudos a respeito de propriedades das subunidades da RNA polimerase II ainda são escassos em plantas. Apenas um estudo foi realizado em *Arabidopsis* sobre a subunidade Rpb4, visando avaliar a formação de heterodímeros com a sétima maior subunidade, Rpb7. Tendo em vista o grande potencial da cana-de-açúcar, seria interessante que estudos a esse respeito fossem realizados nesse organismo, já que uma melhora nos mecanismos de proteção ao estresse causaria um melhor aproveitamento no campo, gerando consequentemente um maior rendimento na indústria.

OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo uma caracterização inicial da proteína Rpb4 da RNA Polimerase II em cana-de-açúcar, visando determinar através de diferentes técnicas seu comportamento e sua relação com o estresse. Especificamente, os objetivos foram:

(1) determinar as melhores condições de expressão da proteína recombinante em bactéria;

(2) avaliar a expressão em diferentes tecidos da cana-de-açúcar e em resposta a hormônios e estresses abióticos;

(3) determinar a localização subcelular da proteína; e

(4) definir o padrão espacial da acumulação dos transcritos do gene em tecidos de cana-de-açúcar.

MATERIAIS E MÉTODOS

Clonagem e Expressão de Rpb4 *em Diferentes Vetores de Expressão em E. coli.*

A construção originalmente disponível em nosso laboratório, baseada em pET101/D-TOPO, foi amplificada com o par de oligonucleotídeos especialmente desenhados (Anexo I, figura 1), contendo no *primer* direto o sítio de restrição para *BamHI* e no *primer* reverso para a enzima *XhoI* em uma reação de PCR de volume final 25 μL, contendo em sua reação DNA 1:10 do gene *Rpb4*, tampão 10x, $MgCl_2$ 50 mM, Taq DNA Polimerase, Primers *BamHI* e *XhoI* 5 μM, 4 dNTP 10 mM e água Milli-Q para completar o volume, com uma temperatura inicial de 94 ºC por 3 min e 30 ciclos de 94 ºC 30 seg, 60 ºC 1 min (temperatura de *anneling*), 72 ºC 2 min, e uma temperatura final de 72 ºC por 5 min.

Os fragmentos visualizados no gel (figura 4) foram recortados com um bisturi estéril em um aparelho de raios ultravioleta e purificados de acordo com o protocolo do kit GFX (Amersham Biosciences, EUA). Os fragmentos purificados foram primeiramente poliadenilados a 70 °C por 30 min em uma reação final de 10 μL com tampão 10x, $MgCl_2$ 25 mM, Taq DNA Polimerase, dATP 2 mM e água Milli-Q para completar o volume, e em seguida foi realizada a subclonagem no plasmídio pGEM-T easy (Promega, EUA - Anexo I, figura 2), de acordo com o protocolo do fabricante durante 60 min a temperatura ambiente.

Após a subclonagem foi conduzida uma transformação química de células competentes DH10B, misturando-se a subclonagem com um volume 4 vezes maior de tampão de transformação e deixando as células 30 min no gelo, 10 min a temperatura ambiente, e após a adição de 500 μL de meio de cultura LB líquido, as bactérias foram

incubadas a 37 ºC durante 50 min em uma estufa, sendo posteriormente plaqueadas em uma placa de Petri contendo meio de cultura LB sólido, antibiótico ampicilina (AMP) 50 mg/mL e um isômero da galactose, X-Gal 20 mg/mL o qual é responsável para selecionar entre colônias azuladas e brancas. As primeiras, as quais não foram transformadas com a construção de interesse, possuem o gene da β-galactosidase íntegro, transformando assim o X-Gal em um precipitado azulado; as colônias brancas, as quais possuem o gene de interesse inserido na região codificante do gene da β-galactosidase (fazendo com que esse perca sua função), não degradam o X-Gal e assim são brancas. A placa foi deixada em estufa a 37 ºC.

Depois de selecionadas as colônias transformadas, estas foram colocadas para crescer durante a noite em meio de cultura LB líquido com AMP 50 mg/mL a 37 ºC, e foi conduzida uma mini-preparação (mini-prep) para recuperação do DNA plasmidial de acordo com o protocolo de lise alcalina da Quiagen (Quiagen, EUA). Para comprovar a inserção do gene de interesse no plasmídio foi realizada uma digestão (figura 5) de volume final 30 μL com as enzimas de restrição *BamHI* e *XhoI*: DNA, *XhoI*, *BamHI*, tampão *BamHI* 10x e água para completar o volume – essa reação de digestão com duas enzimas ao mesmo tempo é recomendada dessa maneira na página da internet do fabricante das enzimas (www.fermentas.com). Os fragmentos visualizados no gel (figura 7) foram recortados com um bisturi estéril em um aparelho de raios ultravioletas, e purificados de acordo com o protocolo do kit GFX (Amersham Biosicences, EUA).

O plasmídio pGEX-4T-1 (Anexo I, figura 3) foi escolhido como o primeiro plasmídio para os testes de expressão em diferentes vetores. Ele foi digerido com as enzimas *BamHI* e *XhoI* para que ele possuísse extremidades coesivas/adesivas para a reação

de ligação com o fragmento purificado de *Rpb4*. Após a digestão do plasmídio, foi conduzida uma reação de ligação do plasmídio com o gene *Rpb4* em um volume de 20 μL: pGEX-4T-1, *Rpb4* purificado, tampão T4 ligase, T4 ligase e água Milli-Q para completar o volume, durante 1 h a 22 ºC; foi utilizada uma relação de 1:3 entre pGEX-4T-1 e *Rpb4* purificado.

Após a reação ter sido finalizada, a ligação foi transformada em células competentes DH10β por choque químico. Essa transformação foi plaqueada em meio LB sólido com AMP 50 mg/mL – antibiótico seletivo para esse plasmídio; as colônias que cresceram foram colocadas em LB líquido com AMP 50 mg/mL durante a noite para a realização da mini-prep no dia seguinte e posterior digestão com *BamHI* e *XhoI* para a comprovação da inserção do inserto (figura 6).

Comprovada a ligação, a construção em questão foi inserida através de transformação química em dois tipos de células hospedeiras de *E. coli* BL21 (DE3), próprias para a expressão de proteínas recombinantes: pLysS e pRil. Essa transformação foi plaqueada em LB sólido com AMP 50 mg/mL e cloranfenicol (CLOR) 34 mg/mL, que são, respectivamente, os marcadores seletivos para o plasmídio pGEX-4T-1 e as células de expressão. A partir das colônias que cresceram foi realizado o ensaio de expressão em pequena escala.

Outro teste de expressão foi feito com o plasmídio pET-28a (Anexo I, figura 4).

Os mesmos procedimentos utilizados para a expressão em pGEX-4T-1 foram utilizados para o plasmídio pET-28a. Utilizou-se como fonte do gene a mesma PCR do ensaio com pGEX-4T-1, e a mesma adenilação, subclonagem em pGEM-T easy, transformação de células competentes, inóculo em meio LB líquido e mini-prep. A digestão

utilizada também foi a mesma (figura 4). Para esta construção digeriu-se o plasmídio pET-28a com as enzimas *BamHI* e *XhoI*. A banda do gel dessa digestão foi purificada com o kit GFX (Amersham Biosciences, EUA); uma reação de ligação de 20 μL foi feita com o purificado do gene *Rpb4* e do plasmídio pET-28a: pET-28a e *Rpb4* na proporção 1:3, tampão T4 ligase 10x, T4 ligase e água Milli-Q para completar o volume. Após a ligação durante a noite a 4 ºC, foi feita a transformação química de células competentes DH10β utilizando com antibiótico a kanamicina (KAN) 50 mg/mL nas placas de meio LB sólido. As colônias que cresceram foram inoculadas em meio LB líquido contendo KAN 50 mg/mL e desses inóculos foi feita a mini-prep e posterior digestão em uma reação de 30 μL, contendo o DNA circular, as enzimas *BamHI* e *XhoI*, tampão BamHI e água para completar o volume (figura 7).

Comprovada a ligação, a construção em questão foi inserida através de transformação química em dois tipos de células hospedeiras de *E. coli* BL21 (DE3): pLysS e pRil. Essa transformação foi plaqueada em LB sólido com KAN 50 mg/mL e cloranfenicol (CLOR) 34 mg/mL, que são, respectivamente, os marcadores seletivos para o plasmídio pET-28a e as células de expressão. A partir das colônias que cresceram foi realizado o ensaio de expressão em pequena escala.

Ensaios de Expressão – Expressão em Pequena Escala

O ensaio de expressão em pequena escala foi realizado para pGEX-4T-1 e pET-28a seguindo etapas semelhantes, pois as construções estavam inseridas nas mesmas células de expressão. Os testes de expressão foram feitos com os 2 plasmídios (pGEX-4T-1 e pET-28a), em diferentes células de expressão (pRil e pLysS), com duas temperaturas (30 e 37ºC)

e com diferentes tempos de indução (4 h, 6 h e durante a noite) para verificar quais as melhores condições de expressão para o gene de interesse. Foram feitos pré-inóculos de 20 mL de LB líquido adicionados com CLOR 34 mg/mL, e mais AMP 50 mg/mL para pGEX-4T-1 e KAN 50 mg/mL para pET-28a.

Após o crescimento durante a noite dos inóculos, utilizou-se um espectrofotômetro para verificar a absorbância, necessária para saber qual será a quantidade de inóculo a ser adicionada em outros 20 mL de LB líquido e CLOR 34 mg/mL, mais os respectivos antibióticos de cada plasmídio para deixar agitando a 37 ºC por 2 h, em média, para se atingir a absorbância entre 0,6 e 0,9 (valores já pré-determinados como ideais para a indução gênica). Esta absorbância é necessária para que seja possível fazer a indução da expressão com um isômero da lactose, o IPTG, já que os plasmídios possuem o operón *lac* que é induzido pela lactose.

Depois de feita a adição de IPTG 100 mM, foram testadas as duas temperaturas distintas para pGEX-4T-1 (figuras 8 e 9), e apenas a temperatura de 37 ºC para pET-28a (figura 10). Também foram testados os tempos de indução e após cada tempo estabelecido, uma alíquota era retirada no fluxo, centrifugada e o precipitado era armazenado no freezer -20 ºC para o posterior analise em um gel SDS-PAGE 15%. Antes da corrida no gel de poliacrilamida, as amostras eram descongeladas, ressuspendidas em 200 µL de água Milli-Q e sonicadas em uma freqüência entre 13-16 W três vezes; no final do processo foram adicionados 100 µL de tampão de amostra (β-mercaptoetanol 5,0%, Stacking Buffer 50 mM, Tris-HCl pH=6.8, SDS 2,0%, Glicerol 45%, Bromofenol Blue 0,02%) e essas amostras foram colocadas 5 min em água fervente. Cada amostra teve 20 µL de seu

conteúdo colocado em uma canaleta específica do gel de poliacrilamida 15%. A eletroforese foi feita em uma voltagem de 150 V.

Ensaios de Expressão – Expressão em Larga Escala

Selecionadas as melhores temperaturas e os melhores tempos de indução para cada construção, fez-se a expressão em larga escala, que difere da expressão em pequena escala pelo uso de um inóculo de 100 mL e uma indução em 2,0 L de LB líquido contendo CLOR 34 mg/mL e AMP 50 mg/mL ou KAN 50 mg/mL, dependendo do plasmídio utilizado. Após os tempos de indução as soluções foram centrifugadas em tubos cilíndricos com tampa de 250 mL em centrífugas Beckman J2-21 durante 7 min a 5000 rpm a 4 ºC. Uma alíquota do pellet foi ressuspendido de maneira semelhante à expressão em pequena escala e um gel SDS-PAGE 15% foi feito (figuras 11 e 12).

Northern Blot

As membranas com amostras de plantas submetidas à deficiência de fosfato, tratadas com fitormônios metil jasmonato e ácido abscísico, de diferentes tecidos, desenvolvimento da gema lateral e expostas a frio *in vivo* e *in vitro* já estavam confeccionadas, pois as mesmas foram utilizadas em outros projetos de nossa equipe. Aproximadamente 5 µg de RNA total foram carregados em cada amostra.

Foi utilizada como sonda a região codificante completa do gene *Rpb4*, contendo 440 pb (o gene *ScRpb4* sozinho possui 432bp). A marcação da sonda foi realizada desnaturando o fragmento de PCR do gene *Rpb4* purificado em água a 95 ºC por 5 min. Após esse tempo a reação foi colocada no gelo por 2 min e foi homogenizada com o kit *Ready-to-Go DNA*

labelling Beads (-dCTP, Amersham Bioscience, EUA); em seguida adicionou-se dCTP α^{32}P. A reação foi mantida em um banho a 37ºC durante 1 h.

A solução de pré-hibridização foi feita com 50 % de formamida deionizada, 5x SSC, 5x Denhardt's, 50 mM de Fosfato de sódio pH 6.8, 1% SDS, DNA de esperma de salmão 100 µg/mL e água DEPC. Após preparada, ela foi pré-aquecida a 42 ºC e colocada em um tubo para pré-hibridar com as membranas durante 2 h a 42 ºC. Concomitante com essas 2 horas, a sonda foi colocada a 65 ºC para desnaturar. Depois de terminada a pré-hibridização, essa solução foi descartada e a sonda foi adicionada, deixando a 42 ºC durante a noite. Finalizado esse período, foram feitas a 65 ºC, e as membranas foram seladas e expostas em cassetes apropriados Phosphorimage FLA3000 (Fuji, Japão) durante 24 h e posteriormente reveladas pelo programa Image Gauge (Fujifilm, Japão).

Localização Subcelular

Ao gene *ScRpb4* foram adicionados por uma PCR sítios das enzimas de restrição *BamHI* e *SphI* nas extremidades 5´ e 3´, respectivamente (Anexo I, figura 5). Esse fragmento, juntamente com o fragmento de GFP digerido com as enzimas *Sph I* e *Xba I*, foi adicionado no plasmídio pRT104 (Töpfer 1987), que contém o promotor CaMV35S e o terminador NOS, já aberto com as enzimas adequadas. Um mapa da construção final se encontra no Anexo I, figura 6.

A construção originalmente disponível em nosso laboratório, baseada em pET101/D-TOPO, foi amplificada por uma PCR de volume final 25 µL, contendo em sua reação DNA 1:10 do gene *Rpb4*, tampão 10x, $MgCl_2$ 50 mM, Taq DNA Polimerase, Primers *BamHI* e *SphI* 5 µM, 4 dNTP 10 mM e água Milli-Q para completar o volume,

com uma temperatura inicial de 94 ºC por 3 min e 30 ciclos de 94 ºC 30 seg, 60 ºC 1 min, 72 ºC 2 min e uma temperatura final de 72 ºC por 5 min com oligonucleotideos que foram desenhados especificamente para essa construção (*Primer* direto com sítio de restrição para *BamHI* mais dois nucleotídeos (AT) e *Primer* reverso com sitio para a enzima *SphI* mais dois nucleotídeos (AT)). Essa adição de nucleotídeos foi necessária para o gene poder entrar no mesmo quadro de leitura *(in frame)* com o promotor do plasmídio pRT-104, vetor utilizado nessa construção. O fragmento amplificado e purificado foi primeiramente poliadenilado a 70 °C por 30 min e em seguida foi realizada a subclonagem no plasmídio pGEM-T easy (Promega, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante durante 16 h a 4 ºC.

Após a subclonagem foi conduzida uma transformação por eletroporação de células competentes DH10β, misturando-se a 1 μL da subclonagem com 40 μL das células competentes; após 1 min. no gelo, colocou-se a mistura na cubeta de transformação e aplicou-se a corrente elétrica; após o choque adicionou-se 1 mL de meio de cultura LB líquido, e as bactérias foram incubadas a 37 ºC durante 1 h em uma estufa, sendo posteriormente plaqueadas em uma placa de petri contendo meio de cultura LB sólido com AMP 50 mg/mL e X-Gal 20 mg/mL. A placa foi deixada em estufa a 37 ºC até o crescimento de colônias.

As colônias transformadas foram colocadas para crescer durante 14-16 h em meio de cultura LB líquido com AMP 50 mg/mL a 37 ºC, e foi conduzida uma mini-prep para recuperação do DNA plasmidial de acordo com o protocolo de lise alcalina da Quiagen (Quiagen, EUA). Para comprovar a inserção do gene de interesse no plasmídio foi realizada uma digestão (figura 14) com as enzimas de restrição *BamHI* e *SphI*: DNA, *SphI*, *BamHI*,

tampão *BamHI* 10x e água para completar o volume – essa reação de digestão com duas enzimas ao mesmo tempo é recomendada pelo fabricante das enzimas (www.fermentas.com). Os fragmentos visualizados no gel (figura 14) foram recortados com um bisturi estéril em um aparelho de raios ultravioleta, e purificados de acordo com o protocolo do kit GFX da Amersham Biosicences (EUA).

O gene *GFP* foi digerido da construção que ele provinha em uma digestão com as enzimas *SphI* e *XbaI* durante 3 h (figura 15). Os fragmentos visualizados no gel foram recortados com um bisturi estéril em um aparelho de raios ultravioleta, e purificados de acordo com o protocolo do kit GFX da Amersham Biosicences (EUA).

O plasmídio pRT-104 foi aberto com as enzimas *BamHI* e *XbaI* em uma digestão com tampão Y+/Tango e água para completar o volume durante 3 h (figura 16). Os fragmentos visualizados no gel foram recortados com um bisturi estéril em um aparelho de raios ultravioleta, e purificados de acordo com o protocolo do kit GFX da Amersham Biosicences (EUA).

Após as purificações dos fragmentos, *Rpb4* e *GFP*, e do vetor pRT-104, foi conduzida uma reação de ligação entre os elementos acima citados, pRT-104, *Rpb4* purificado, *GFP* purificado, tampão T4 ligase, T4 ligase e água Milli-Q para completar o volume, durante 1 h a 22 ºC; foi utilizada uma relação de 1:3:2 entre pRT-104, *Rpb4* e *GFP*.

Após a reação ter sido finalizada a ligação foi transformada em células competentes DH10β por eletroporação. Essa transformação foi plaqueada em meio LB sólido com AMP 50 mg/mL. As colônias que cresceram foram colocadas em LB líquido com AMP 50

mg/mL durante a noite e, na manhã seguinte, foi realizada uma mini-prep para recuperação do DNA plasmidial.

Células de cebola foram bombardeadas com partículas de tungstênio contendo a construção pRT104::RPB4::GFP de acordo com Menossi et al. (2000). Após 24 h as células de epiderme foram descascadas e observadas em um microscópio de fluorescência Leica DMI 4000B (Leica, Alemanha), usando um filtro GFP. As imagens foram capturadas usando uma câmera Leica DFC 300 FX (Leica, Alemanha). Duas construções controles foram usadas: pRT104::GFP (controle citoplasmático) e pRT104::TFIIA::GFP, para o núcleo (Gentile et al. 2010).

Hibridização in situ

Foram feitas reações de PCR, para a determinação da orientação do gene no vetor pGEM-T easy::Rpb4. Uma vez determinada a sua orientação a construção foi transferida para células competentes DH10β através de choque químico; essa transformação foi plaqueada em meio LB sólido com AMP 50 mg/mL. As colônias foram colocadas em LB líquido com AMP 50 mg/mL durante a noite e, na manhã seguinte, foi realizada uma mini-prep sem a adição de RNAse para recuperação do DNA plasmidial. A digestão foi realizada em uma reação de volume final 60 μL, contendo o plasmídio proveniente da mini-prep sem RNAse, a enzima *SphI*, React B da Invitrogen, e água para completar o volume. Os fragmentos visualizados no gel foram recortados com um bisturi estéril em um aparelho de raios ultravioleta, e purificados de acordo com o protocolo do kit GFX da Amersham Biosicences (EUA).

Para o ensaio de hibridização *in situ* foram utilizados dois tipos de tecidos: folha madura e inflorescência de cana-de-açúcar. Os tecidos foram coletados e colocados em tampão de fixação; após 20 min. sob vácuo eles foram colocados na geladeira por 16 h. Após a fixação foi feita a desidratação, que consiste em lavagens sucessivas de 3-4 h cada em concentrações crescentes de etanol, iniciando-se em 30% e terminando em 100%. A inclusão em parafina se deu pela imersão dos tecidos em uma mistura contendo etanol e xilol, na qual o xilol tinha a sua concentração aumentada a cada 3-4 h. Quando a concentração de xilol chegou a 100%, a solução foi colocada em estufa a 65 ºC e foram acrescentadas lascas de parafina, substituindo aos poucos a solução de xilol por parafina. Os tecidos foram emblocados e cortados no micrótomo. As laminas com os tecidos foram secadas a 60 °C e após secas foram utilizadas na pré-hibridização.

A etapa seguinte à inserção de parafina foi a pré-hibridização, que consiste em banhos de xilol para a remoção da parafina, e banhos de etanol, para limpeza das lâminas. Após os banhos foram adicionados 300 µL de Proteinase K (1,0 µg/mL em 0,05 M Tris HCL pH 7,5) em cada lâmina e colocou-se em uma estufa a 37 °C durante 20 min. Em seguida, foi realizada a hibridização, adicionando nas lâminas a solução de hibridização contendo a sonda marcada com o *Kit DIG RNA Labeling* (SP6-T7) (Roche, EUA), Tris HCL 1 M pH 7,5-8,0, NaCl 5 M, Formamida deionizada, EDTA, Denhardt e Dextran Sulfato. As lâminas foram colocadas em uma câmara úmida e deixadas durante 14-16 h em uma estufa a 42 ºC. As lâminas então passaram por lavagens sucessivas em tampão SSC nas concentrações de 4 e 2 vezes, e em água milli-Q autoclavada. No final do processo, foi adicionado às lâminas anticorpo Anti-DIG:AP 1:1000. Após lavagens com os tampões de

detecção, as lâminas foram visualizadas em um microscópio Axiovert 40 (Zeiss, Alemanha) acoplado com uma câmera para captura das imagens (figuras de 20 e 21).

RESULTADOS

O gene Rpb4 *de cana-de-açúcar*

Com o intuito de identificar os genes da cana-de-açúcar codificantes para a proteína Rpb4, foi feita uma busca no SUCEST de Cana-de-Açúcar (Vettore et al. 2003), usando como isca a proteína AtRPB15.9 de *Arabidopsis thaliana* (Larkin and Guilfoyle 1998). Apenas um cluster foi encontrado, SCRFHR1007G06.g, codificando para uma proteína similar à AtRPB15.9. O ScRpb4 de cana-de-açúcar apresentou 432 pares de bases, codificando 143 aminoácidos, com um peso molecular estimado de 16 kDa (figura 4 e Anexo I, figura 7).

A análise da cadeia polipeptídica revelou que ScRpb4 tem uma baixa similaridade com o homólogo de humanos (*Homo sapiens*, 34%), *Drosophila melanogaster* (28%) e levedura (*Saccharomyces cerevisiae*, 27%) (figura 2A). Esse alinhamento foi usado para a construção de uma árvore de distância usando o algoritmo de *neighbor-joining* (figura 2B). A proteína ScRpb4 foi agrupada no mesmo clado que o resto das plantas analisadas, compartilhando o mesmo grupo com milho (*Zea mays*) e a *Arabidopsis thaliana* (círculo verde). As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* foram agrupadas em outro clado (círculo violeta), juntamente com os humanos e a drosófila, de acordo com a baixa similaridade encontrada no alinhamento (figura 2A).

A análise da sequência da proteína ScRpb4 com os homólogos de plantas revelou as similaridades de 91.5% com o arroz (*Oryza sativa*), 98.6% com o *Sorghum bicolor*, 96.5% com o milho (*Zea mays*) e 75% com a *Arabidopsis thaliana* entre outros, mostrando que

dentro do reino das plantas há alta similaridade entre os organismos observados (figura 3A). Adicionalmente, usando o mesmo alinhamento completo, uma árvore de *neighbor-joining* foi criada. Como é possível observar na figura 3B, a análise de todos os homólogos da proteína Rpb4 de diferentes plantas possibilita a diferenciação em dois clados principais, um de dicotiledôneas (círculo vermelho) e outro de monocotiledôneas (círculo azul), suportando a ideia da alta similaridade encontrada nos alinhamentos (figura 3A) entre os membros de cada clado.

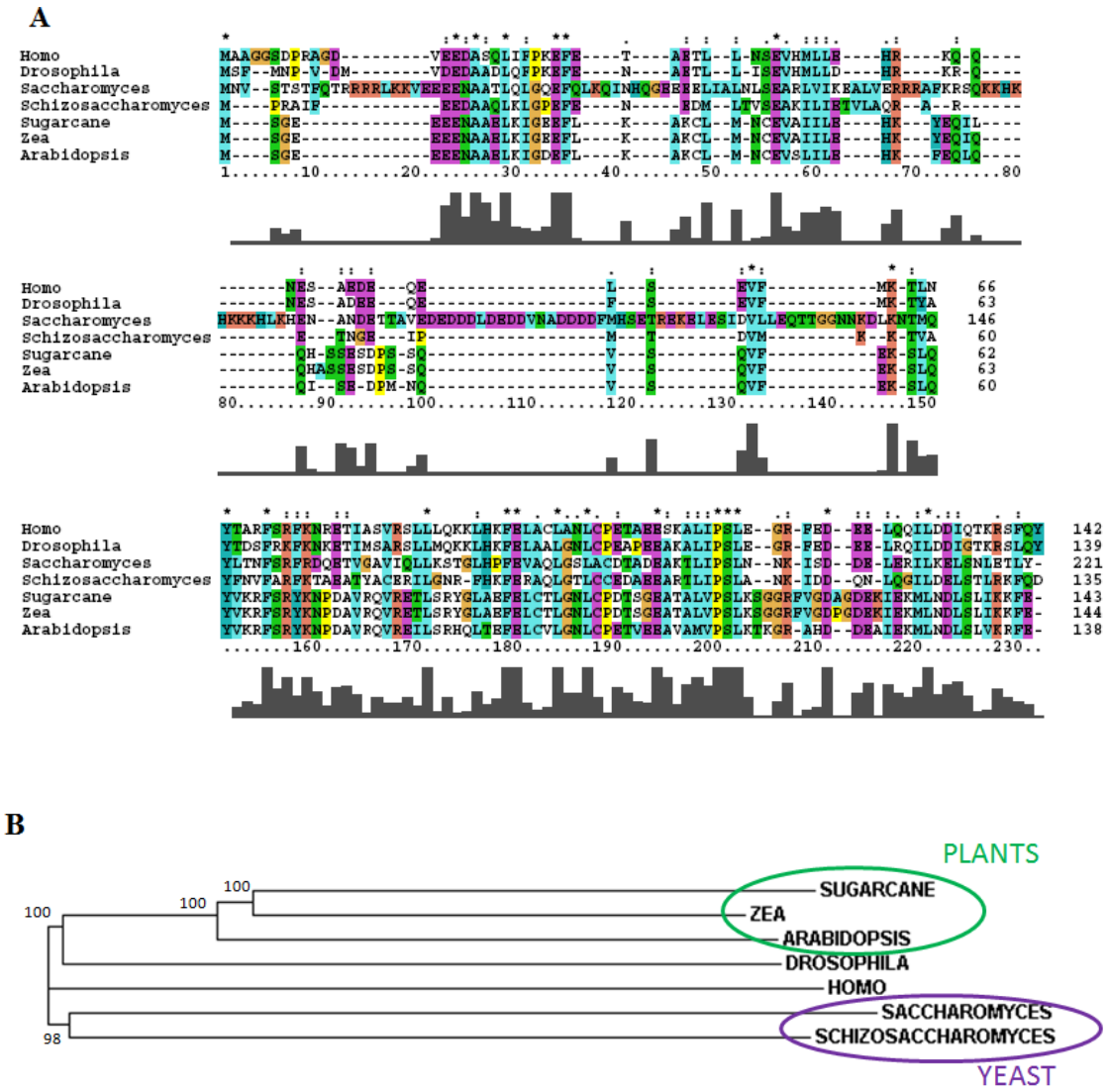

Figura 2. - Alinhamento das sequências de proteínas homólogas de ScRpb4 de cana-de-açúcar. (A) Alinhamento com os homólogos de *Homo sapiens, Drosophila melanogaster, Saccharomyces cerevisiae, Schyzosaccharomyces pombe, Zea mays e Arabidopsis thaliana*; (B) Árvore de *neighbor-joining* das sequências das proteínas de Rpb4 de cana-de-açúcar e das mesmas espécies do alinhamento 2A. As sequências de Rpb4 foram alinhadas para construir a árvore de distância usando o algoritmo de *neighbor-joining*. O círculo verde indica as sequências de plantas; o círculo roxo indica as sequências de leveduras. Valores de suporte estatístico (*bootstrap)* estão em percentual acima de cada nodo. O alinhamento das sequências e a árvore de *neighbor-joining*, foram feitos usando o programa CLUSTALW2. '*' indica que o resíduo da coluna é idêntico; '**:**' substituição conservada; '**.**' substituição semi-conservada. Número de acesso das sequências: Sugarcane (HM562033), *Homo sapiens* (NP 004796.1), *Drosophila melanogaster* (NP 001014633.2),

Saccharomyces cerevisiae (NP 012395.1), *Schyzosaccharomyces pombe* (NP 595415.1), *Zea mays* (NP 001148722.1), *Arabidopsis thaliana* (NP 196554.1).

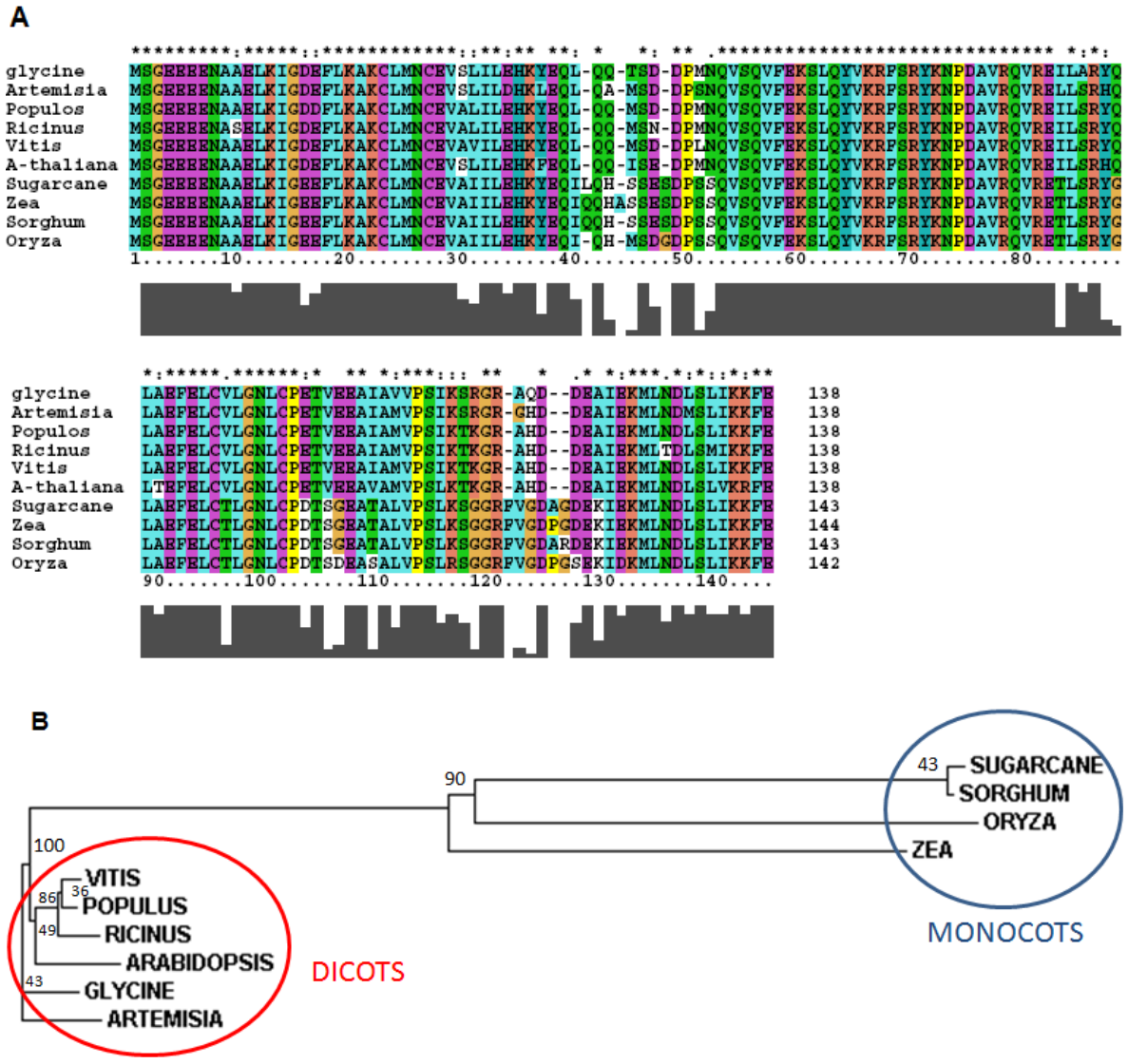

Figura 3. - Alinhamento das sequências de proteínas homólogas de plantas de ScRpb4 de cana-de-açúcar. (A) Alinhamento com diferentes homólogos de plantas; (B) Árvore de *neighbor-joining* das sequências das proteínas de Rpb4 de cana-de-açúcar e das mesmas espécies do alinhamento 3A. As sequências de Rpb4 foram alinhadas para construir a árvore de distância usando o algoritmo de *neighbor-joining*. O círculo vermelho indica as sequências de dicotiledôneas; o círculo azul indica as sequências de monocotiledôneas. Valores de *bootstrap* estão em percentual acima de cada nodo. O alinhamento das sequências e a árvore de *neighbor-joining*, foram feitos usando o programa CLUSTALW2. '*' indica que o resíduo da coluna é idêntico; '**:**' substituição conservada; '**.**' substituição semi-conservada. Número de acesso das sequências: Sugarcane (HM562033), *Homo*

sapiens (NP 004796.1), *Drosophila melanogaster* (NP 001014633.2), *Saccharomyces cerevisiae* (NP 012395.1), *Schyzosaccharomyces pombe* (NP 595415.1), *Zea mays* (NP 001148722.1), *Oryza sativa* (NP 001045683.1), *Glicine max* (ACU16388.1), *Arabidopsis thaliana* (NP 196554.1), *Populus trichocarpa* (XP 002307132.1), *Sorghum bicolor* (XP 002453184.1), *Vitis vinifera* (XP 002282413.1), *Ricinus communis* (XP 002522014.1), *Artemisia annua* (ABQ32301.1).

Clonagem e Expressão de Rpb4 *em Diferentes Vetores de Expressão*

Foram feitas duas amplificações, uma sem diluição e outra diluída 100 vezes (figura 4). Foi recortada a banda da diluição de 10x por apresentar um melhor padrão de amplificação.

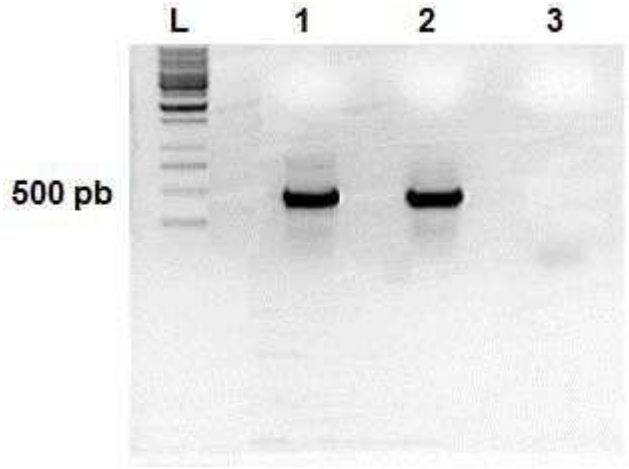

Figura 4. Gel de eletroforese da PCR do gene *ScRpb4*. L: ladder 1kb plus (Promega, EUA); 1: amplificação a partir da diluição de 10x; 2: amplificação a partir da diluição de 100x; 3: controle negativo (todos os reagentes exceto o DNA). O fragmento apresenta ao redor de 440 pb.

Após a purificação da banda, adenilação, subclonagem em pGEM-T easy, transformação de células competentes, crescimento em meio LB líquido e mini-preparação do DNA plasmidial; foi realizada uma digestão com as enzimas *BamHI e XhoI* para comprovação da inserção do fragmento no plasmídio pGEM-T easy (figura 5).

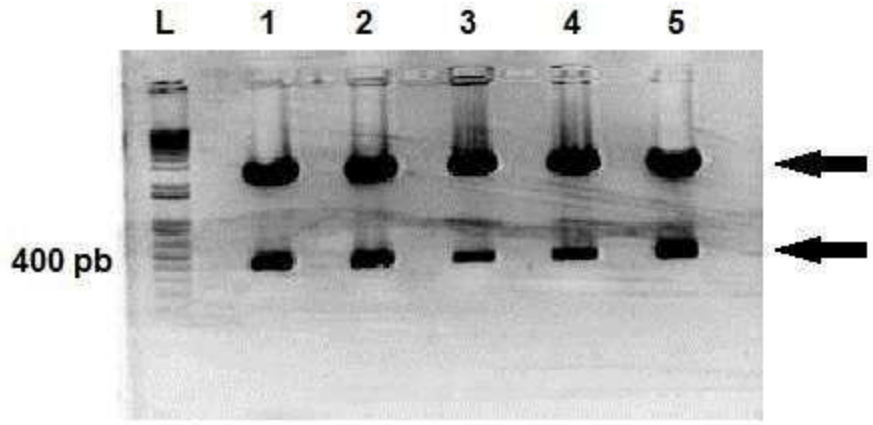

Figura 5. Digestão para comprovação da inserção do gene *ScRpb4* no plasmídio pGEM-T easy. Todos os clones digeridos apresentaram o inserto (seta inferior); seta superior: plasmídio pGEM-T easy digerido (*3018* pb). L: ladder 1 kb plus (Promega, EUA); 1 a 6: clones independente digeridos com *BamHI* e *XhoI*.

Após a purificação das bandas relacionadas ao *Rpb4* oriundo da digestão do plasmídio pGEM-T easy, foi feita a digestão do plasmídio de expressão pGEX-4T-1 com as enzimas *BamHI e XhoI* para a abertura do vetor, para que fosse, posteriormente, realizada uma ligação entre esse vetor e o fragmento advindo da purificação. Em seguida à ligação, fez-se uma transformação de células competentes, crescimento em meio LB líquido e mini-preparação do DNA plasmidial; foi realizada uma digestão para comprovação da inserção do fragmento no plasmídio pGEM-T easy (figura 6).

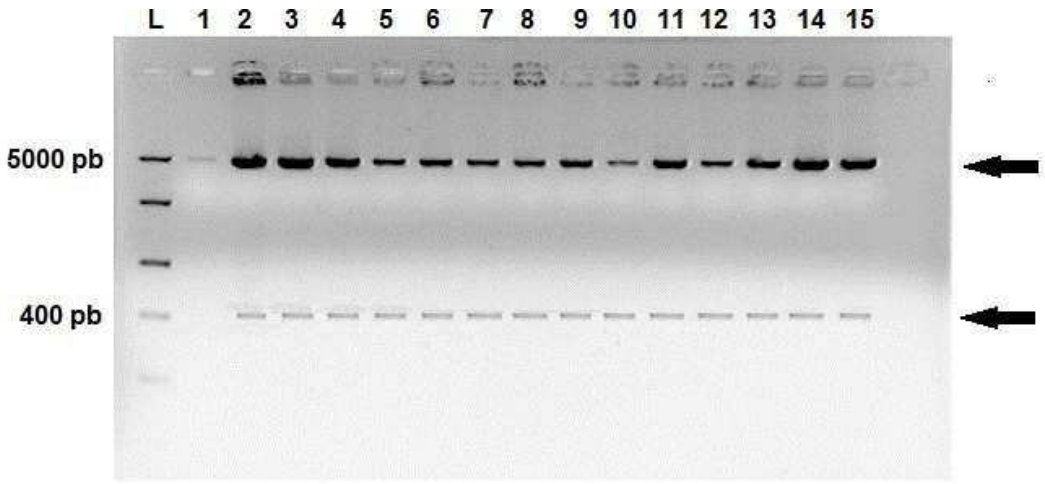

Figura 6. Digestão da construção pGEX-4T-1::Rpb4 com *BamHI* e *XhoI*. Na seta superior indica o plasmídio pGEX-4T-1 aberto (5000 pb) e a seta inferior o gene *ScRpb4* após a digestão (440 pb). L: ladder Fast Ruller (Promega, EUA); 1 a 15: clones independentes digeridos com *BamHI* e *XhoI*.

Para a inserção de *Rpb4* em outro vetor de expressão, pET-28a, foram utilizados os mesmos procedimentos da inserção no plasmídio pGEX-4T-1. A figura 7 comprova a inserção do gene no vetor.

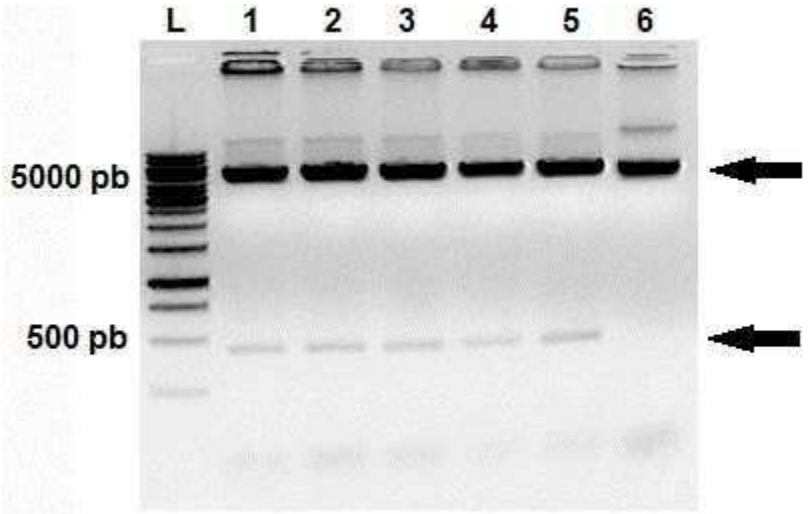

Figura 7. Digestão da construção pET-28a::Rpb4 para comprovar a inserção do gene no plasmídio. L: ladder 1 kb (Promega, EUA); 1 a 6: clones independentes digeridos com *BamHI* e *XhoI*. Seta superior: plasmídio pET-28a digerido (5369 bp); seta inferior: inserto digerido (440 bp).

Após a inserção do gene *Rpb4* nos vetores de expressão pGEX-4T-1 e pET-28a iniciou-se a etapa da expressão em pequena escala.

Ensaios de Expressão em Pequena Escala

Os testes de expressão foram feitos para verificar quais as melhores condições de expressão para o gene de interesse. Esses testes foram realizados em plasmídios diferentes (pGEX-4T-1 e pET-28a), com diferentes células de expressão (pRil e pLysS), diferentes tempos de indução (4 h, 6 h e durante a noite) e diferentes temperaturas (30 e 37 ºC) para pGEX-4T-1 e apenas a temperatura de 37 ºC para pET-28a, pois este apresentou um ótimo resultado nesta temperatura, não necessitando testar a segunda.

A expressão da construção pGEX-4T-1::*Rpb4* é visualizada nos géis de poliacrilamida das figuras 8 e 9. Na figura 8 está o perfil das células pRil e pLysS em uma temperatura de 30 ºC, enquanto que a figura 9 apresenta o perfil das mesmas células em uma temperatura de 37 ºC.

No gel da figura 8 é possível visualizar uma banda ao redor de 42 kDa de tamanho nos três tempos de indução, que estava ausente no controle *não induzido*. Essa banda é mais bem visualizada em células pLysS do que em pRil. Na figura 9 não é possível visualizar nenhuma banda correspondente a esse peso molecular. Pode-se concluir, baseado nas duas figuras apresentadas, que o melhor padrão de expressão para pGEX-4T-1 foi na célula de expressão pLysS a uma temperatura de 30 ºC com um tempo de indução de 6 h.

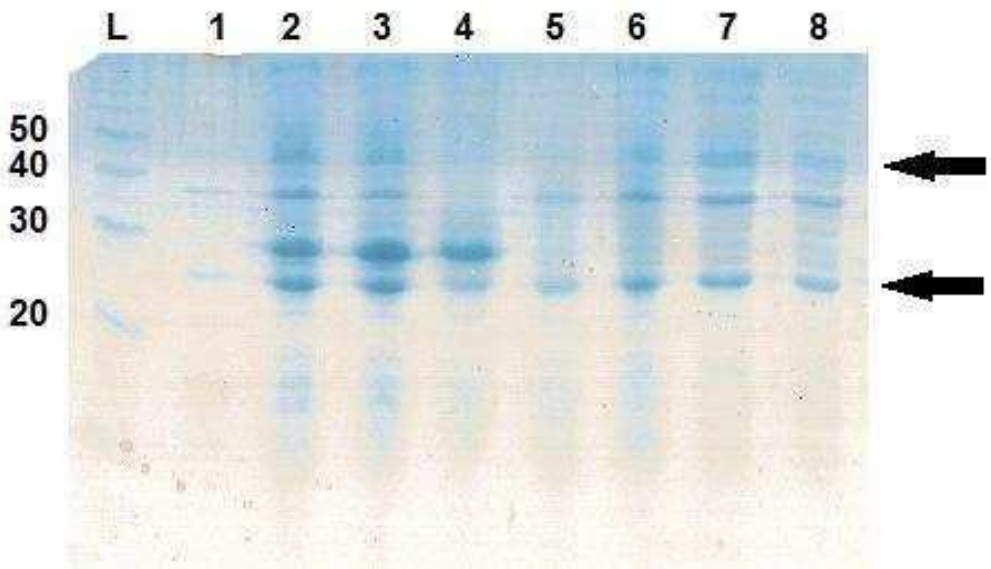

Figura 8. Expressão da construção pGEX-4T-1::*Rpb4*. Células de *E. coli* pRil e pLysS foram induzidas em temperatura de 30°C em diferentes tempos com 100 mM de IPTG e separadas em gel SDS-PAGE 15%: *L*: Padrão de peso molecular (PPM); *1*: não induzido em células pRIL (controle); *2*: induzido durante 4 h em células pRIL; *3*: induzido durante 6 h em células pRIL; *4*: induzido durante a noite em células pRIL; *5*: não induzido em células pLysS (controle); 6: induzido durante 4 h em células pLysS; 7: induzido durante 6 h em células pLysS; 8: induzido durante a noite em células pLysS. A seta superior indica a provável localização da proteína recombinante fusionada, possuindo um peso aproximado de 42 kDa, 26 kDa do pGEX-4T-1 (seta inferior) e 16 kDa de Rpb4.

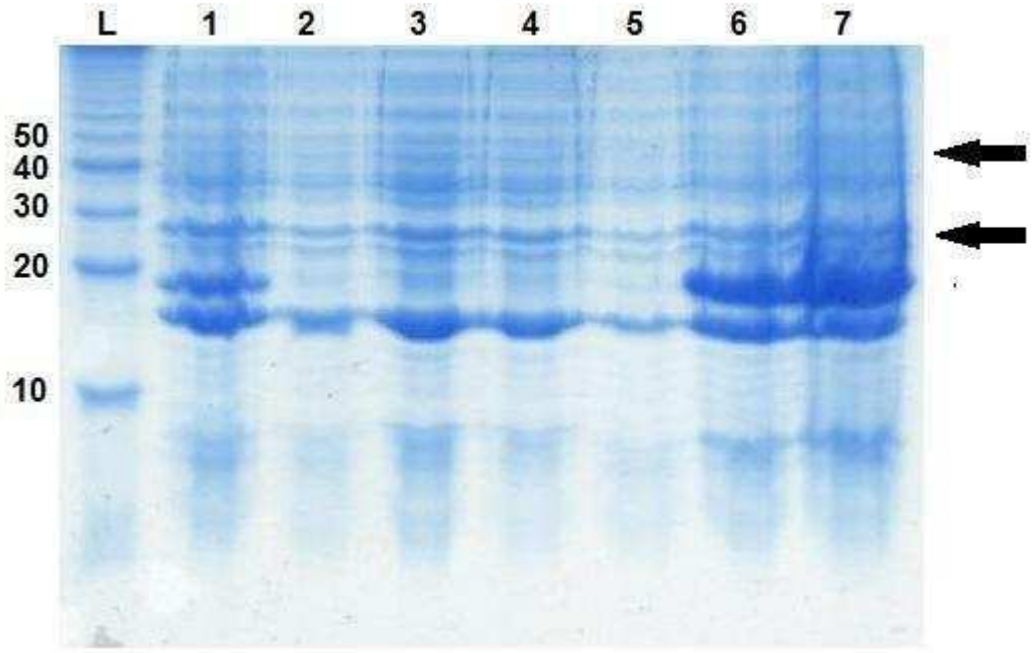

Figura 9. Expressão da pGEX-4T-1::*Rpb4* em um gel SDS-PAGE 15%. Células de *E. coli* pRil e pLysS foram induzidas em temperatura de 37 °C em diferentes tempos com 100 mM de IPTG – *L*: Padrão de peso molecular; 1: plasmídio pGEX-4T-1 fechado sem nenhum gene exógeno; *2*: células pRil com o plasmídio pGEX-4T-1 não induzido; *3*: células pRil com o plasmídio pGEX-4T-1 induzido 4h; 4: células pRil com o plasmídio pGEX-4T-1 induzido durante a noite; 5: células pLysS com o plasmídio pGEX-4T-1 não induzido; *6*: células pLysS com o plasmídio pGEX-4T-1 induzido 4h; 7: células pLysS com o plasmídio pGEX-4T-1 induzido durante a noite. A seta superior indica a provável localização da proteína recombinante fusionada com o plasmídio, possuindo um peso aproximado de 42 kDa: 26 kDa do pGEX-4T-1 (seta inferior) e 16 kDa de Rpb4.

Para a construção pET-28a::*Rpb4* houve uma visualização mais clara da banda relacionada com o peso molecular previsto para a expressão em todas as temperaturas testadas para as células de expressão pRil (figura 10). Sendo assim, escolheu-se o menor tempo de indução para realizar os testes de expressão em larga escala.

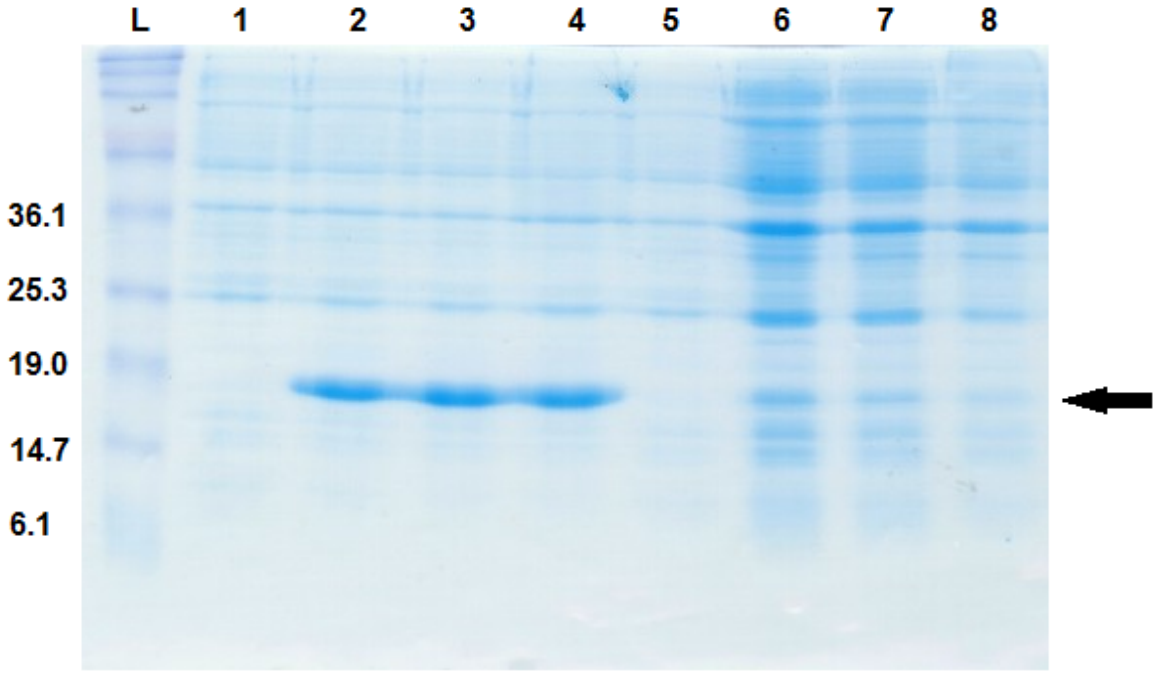

Figura 10. Expressão da pET-28a::*Rpb4*. Células de *E. coli* pRil e pLysS foram induzidas em temperatura de 37°C em diferentes tempos com 100 mM de IPTG e separadas em um gel SDS-PAGE 15%: *L*: Padrão de peso molecular (PPM); 1: células pRil com o plasmídio pET-28a não induzido; *2*: células pRil com o plasmídio pET-28 induzido 4 h; *3*: células pRil com o plasmídio pET-28 induzido 6 h; 4: células pRil com o plasmídio pET-28 induzido durante a noite; 5: células pLysS com o plasmídio pET-28a não induzido; 6: células pLysS com o plasmídio pET-28 induzido 4 h; 7: células pLysS com o plasmídio pET-28 induzido 6 h; 8: células pLysS com o plasmídio pET-28 induzido durante a noite. A seta indica a provável expressão da proteína-alvo.

Expressão em Larga Escala

Para o caso do pGEX-4T-1, foi selecionada a expressão em células pLysS em uma temperatura de 30 ºC durante 6 h. Para pET-28a foi selecionada a expressão em pRil a 37 ºC durante 4 h. Após esse tempo de expressão as soluções foram centrifugadas em tubos cilíndricos com tampa de 250 mL cada em centrífugas Beckman J2-21 durante 7 min a 5000 rpm a 4 ºC. Uma alíquota do pellet foi ressuspendido da mesma maneira que a expressão em pequena escala e um gel SDS-PAGE 15% foi feito (figura 11).

É possível visualizar que a expressão da proteína de interesse aparece ao redor de 42 kDa, tal como verificado anteriormente (figura 8).

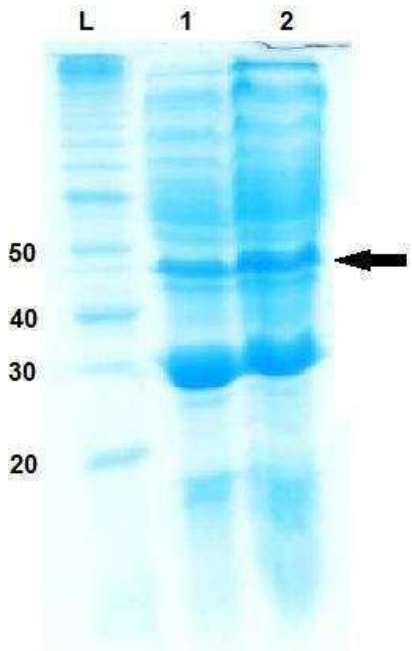

Figura 11. Expressão em larga escala de pGEX-4T-1::*Rpb4* em pLysS durante 6 h a 30 ºC. Foram corridas duas alíquotas da mesma indução. A provável localização da proteína está marcada com a seta. L: Padrão de peso molecular (PPM); 1 e 2: induzido 6 h.

Na expressão mostrada na figura 12 é possível verificar a expressão da proteína de interesse ao redor de 16 kDa, que é o seu peso predito. A indução da expressão da proteína aparece de uma maneira mais clara que a da figura 11.

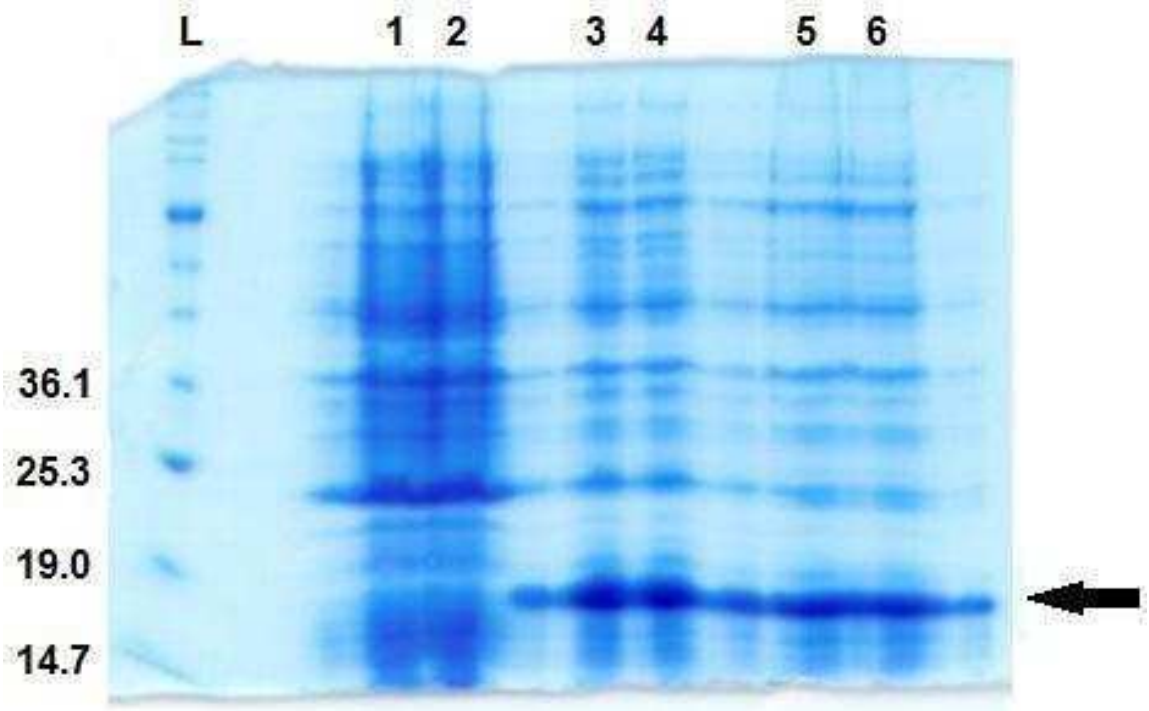

Figura 12. Expressão em larga escala da proteína Rpb4. Células de *E. coli* pRil contendo a construção pET-28a::*Rpb4* foram induzidas durante 4 h a 37 ºC. Foram corridas duas alíquotas da mesma indução. A provável localização da proteína está marcada com o quadrado vermelho. L: Padrão de peso molecular; 1 e 2: não induzido; 3 e 4: induzido 6 h; 5 e 6: induzido 6 h (mesma amostra dos nº 3 e 4).

Northern Blot

A expressão dos mRNA de ScRpb4 foi analisada em diferentes tecidos de cana-de-açúcar; durante o desenvolvimento da gema lateral; sob deficiência de fosfato do solo; após tratamento com ABA e MeJA; e exposição ao frio. Essas expressões foram avaliadas por *nothern blot* (figura 13). Essas condições são as mesmas usadas anteriormente para avaliar as mudanças de expressão gênica em cana-de-açúcar (Schlögl et al. 2008). Os transcritos de *ScRpb4* foram detectados em todos os tecidos, com uma expressão ligeiramente maior em folha imatura, gema lateral, raiz e flores (figura 13A). A expressão de *ScRpb4* não foi afetada durante o estresse por frio (figura 13B), exposição a metil-jasmonato (MeJA) ou

ácido abscísico (ABA) (figura 13C) e desenvolvimento da gema lateral (figura 13D). Outro estresse abiótico, deficiência de fosfato em raízes (figura 13E), também não causou nenhuma alteração na expressão. *ScRpb4* aparenta ser ubiquamente expresso e mudanças no nível de expressão foram observadas em apenas alguns tecidos. Nenhuma variação na expressão foi observada sob a influência de hormônios ou estresse.

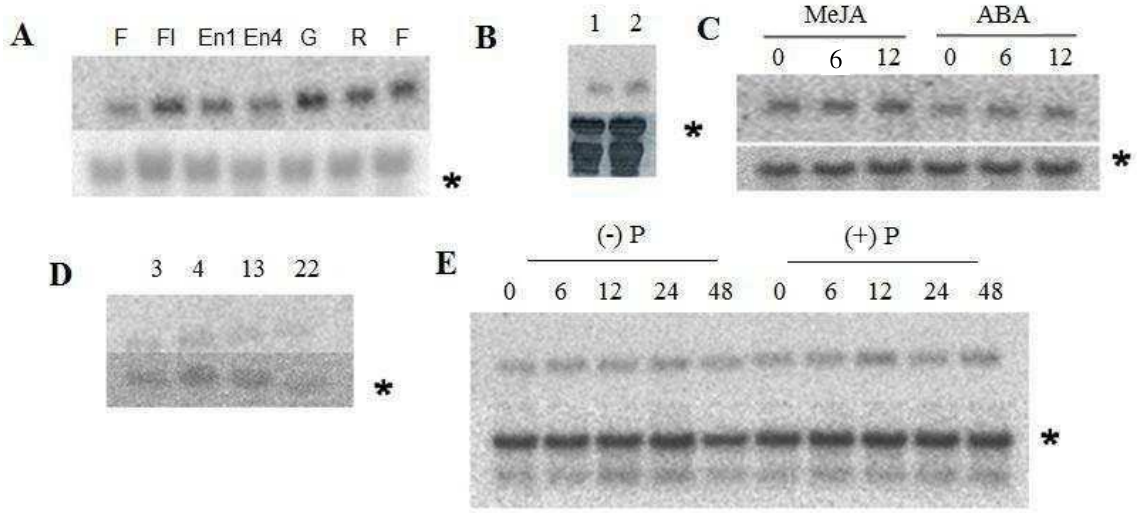

Figura 13. Expressão do gene *Rpb4* de cana-de-açúcar em diferentes tecidos e condições. A) Expressão em diferentes tecidos. F: folha; FI: folha imatura (palmito); En1: entrenó 1; En4: entrenó 4; G: gema; R: raiz; F: flor; B) Expressão em resposta ao frio de plantas de cana-de-açúcar da linhagem SP80-3280 cultivadas *in vitro*. 1: 26 ºC por 24 h; 2: 4 ºC por 24 h; C) Expressão em resposta aos fitormônios metil jasmonato (MeJa) e ácido abscísico (ABA) após 0, 6, 12h; D) Expressão durante o desenvolvimento da gema lateral ao longo de tempos específicos: 3, 4, 13 e 22 dias; E) Expressão gênica em raízes em resposta à privação de fósforo (-P) ao longo dos períodos (horas) específico: sem fósforo (-P) 0, 6, 12, 24 e 48 h; com fósforo (+P) 0, 6, 12, 24 e 48 h. Aproximadamente 5 µg de RNA total foram carregados em cada amostra. A membrana foi hibridada com sonda correspondente à região completa codificante do gene *Rpb4*. '*' sinal da hibridação com sonda de um rRNA como controle da quantidade de RNA.

Localização Subcelular

A construção originalmente disponível em nosso laboratório, baseada em pET101/D-TOPO, foi amplificada com o novo par de oligonucleotídeos construídos, por uma PCR de volume final 25 µL, contendo em sua reação DNA 1:10 do gene *Rpb4*, tampão 10x, $MgCl_2$ 50 mM, Taq DNA Polimerase, Primers *BamHI* e *SphI* 5 µM, 4 dNTP 10 mM e água Milli-Q para completar o volume, com uma temperatura inicial de 94 ºC por 3 min e 30 ciclos de 94 ºC 30 seg, 60 ºC 1 min (temperatura de *anneling*), 72 ºC 2 min, e uma temperatura final de 72 ºC por 5 min.

A banda visualizada foi recortada e purificada, sendo realizada uma adenilação, subclonagem em pGEM-T easy, transformação de células competentes, crescimento em meio LB líquido e mini-preparação do DNA plasmidial; foi realizada uma digestão com as enzimas *BamHI e XhoI* para comprovação da inserção do fragmento no plasmídio pGEM-T easy (figura 14).

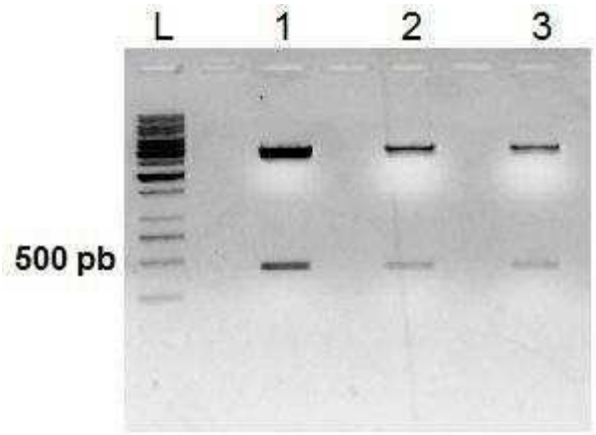

Figura 14. Confirmação da construção pGEM-T easy::Rpb4 digerida com as enzimas *BamHI e SphI*. L: ladder 1 kb Promega; 1, 2 e 3: a banda mais inferior se refere ao gene *Rpb4* (440 bp).

O gene *GFP* foi digerido com as enzimas *SphI* e *XbaI* (figura 15). Os fragmentos visualizados no gel foram recortados e purificados.

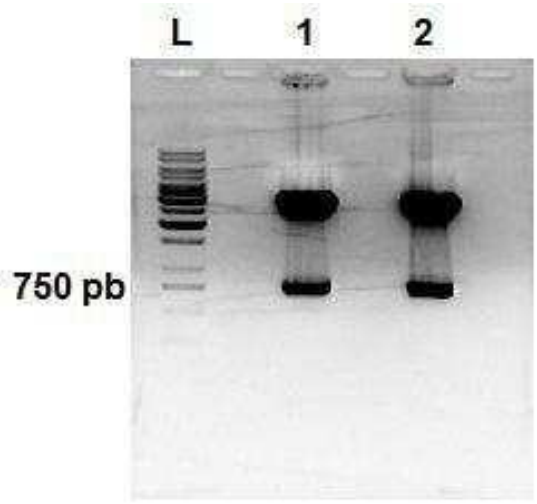

Figura 15. Digestão para obtenção do fragmento GFP. L: ladder 1 kb Promega; 1 e 2; construção pGEM-T easy::GFP digerida com as enzimas *SphI e XbaI*; a banda mais inferior refere-se ao gene *GFP* (750bp).

O plasmídio pRT-104 foi aberto com as enzimas *BamHI* e *XbaI* (figura 16). Os fragmentos visualizados no gel foram e purificados.

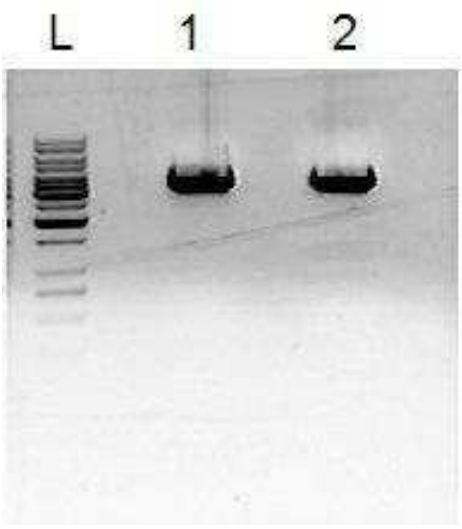

Figura 16. Digestão para a abertura do vetor da expressão pRT-104 com as enzimas *BamHI e XbaI*. L: ladder 1 kb Promega; 1 e 2; plasmídio pRT-104 digerido com as enzimas *BamHI e XbaI*.

Com os dois genes (*Rpb4* e *GFP*) e o vetor pRT-104 purificados, foi conduzida uma reação de ligação.

A construção quimérica 35S::ScRpb4::GFP (figura 17A) foi introduzida em células de epiderme de cebola através de bombardeamento de partículas, e posteriormente visualizado em microscópio de fluorescência. O sinal GFP foi detectado no núcleo (figura 17B) e no citoplasma (figura 17C) de células de epiderme de cebola. O controle do núcleo (35S::TFIIA::GFP) e o controle citoplasmático (pRT104::GFP) foram localizados no núcleo (figura 17D) e no citoplasma (figura 17E), respectivamente.

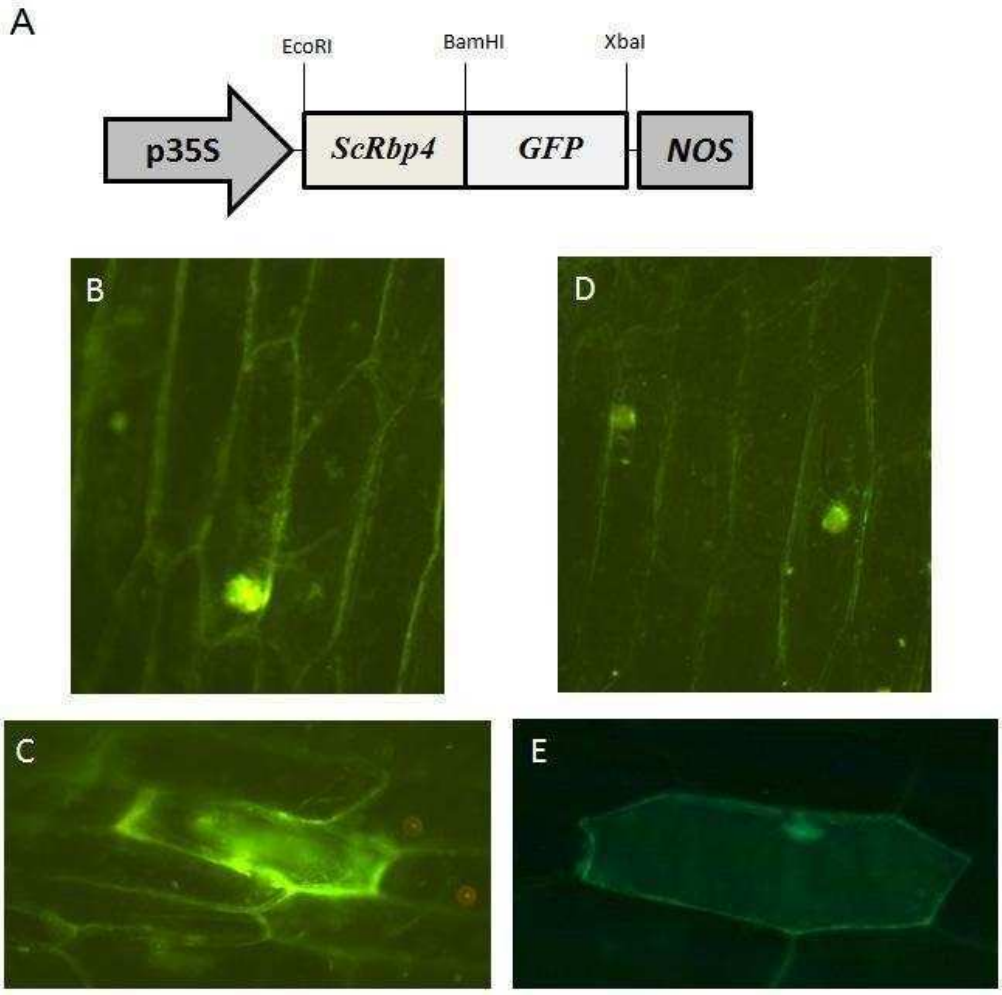

Figura 17. Localização subcelular de ScRpb4 em epiderme de células de cebola. A) Esquema da construção contendo a fusão ScRpb4::GFP; B e C) Sinal GFP detectado no núcleo (B) e no citoplasma (C) de células de cebola após serem bombardeadas com a construção ScRpb4::GFP; (D) controle nuclear (pRT104::TFIIA::GFP); e E) controle citoplasmático (pRT104::GFP).

Hibridização in situ

Primeiramente foi realizada a verificação da orientação do gene *ScRpb4* no plasmídio pGEM-T easy através de uma PCR, para posterior síntese da sonda. Nesse plasmídio são conhecidas as orientações dos primers T7 e SP6, que juntamente com os primers desenhados (com sítios de restrição para *BamHI* e *SphI*) foi possível determinar a orientação desejada (Figura 18).

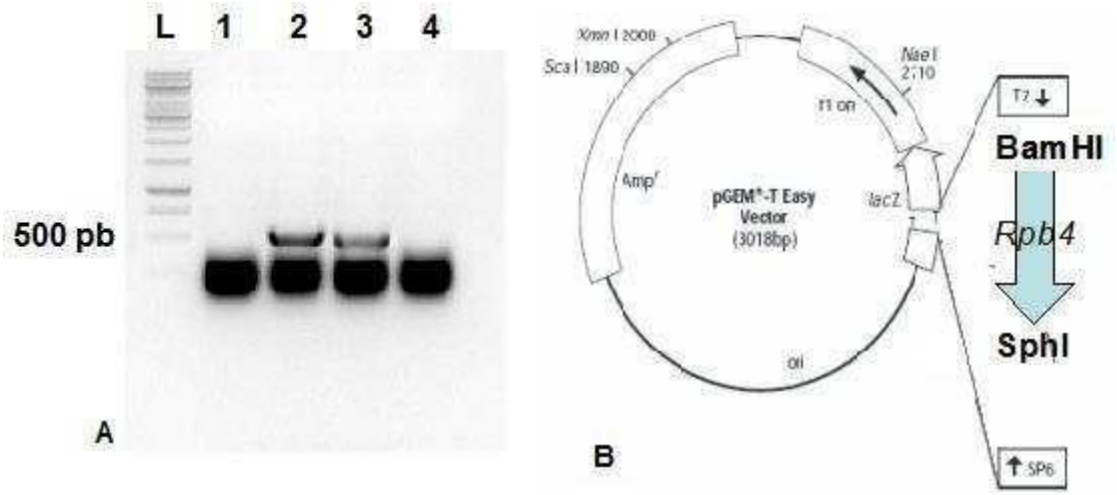

Figura 18. Determinação da orientação da região codificante de *ScRpb4* clonada em pGEMT-Easy. A) Gel da PCR da orientação do gene *Rpb4* no plasmídio pGEM-T easy. L: ladder 1 kb Promega (EUA); 1 a 4: Combinações dos primers: 1:*BamHI* e T7; 2: *BamHI* e SP6; 3: *SphI* e T7; 4: *SphI* e SP6. B) Orientação do gene no plasmídio.

Como ocorreram as amplificações *BamHI*/SP6 e T7/*SphI*, pode-se concluir que a orientação do gene é a mostrada na figura 18.B. A orientação é importante para se determinar com qual enzima será feita a digestão para a geração das sondas sense e anti-sense. No caso do gene *Rpb4* a digestão será realizada com a enzima *BamHI* (sense) e *SphI* (antisense).

Utilizando o DNA da construção com sua orientação determinada, foi realizada uma transformação de células competentes DH10B através de choque elétrico e posterior mini-preparação sem RNAse; esse tipo de mini-prep é necessária nesse caso porque a técnica da hibridização se baseia na impregnação de transcritos primários, e caso fossem utilizadas substâncias contendo RNAse ocorreria a degradação desses transcritos. O resultado da digestão dessa mini-prep é mostrado na figura 19.

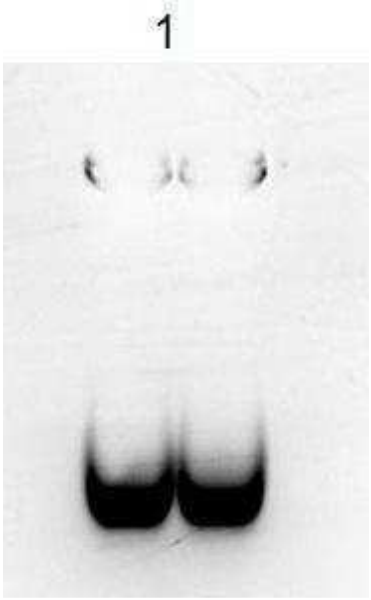

Figura 19. Digestão da mini-prep sem RNAse da construção pGEM-T easy::Rpb4. 1: pGEM-T easy::Rpb4 linearizado; a mesma amostra foi distribuída em 2 poços do gel de agarose devido ao seu volume final ser maior que a capacidade de cada poço individualmente.

Após as bandas referentes à digestão terem sido purificadas, elas foram utilizadas para o ensaio de hibridização *in situ*.

No final das etapas da hibridização, as lâminas foram visualizadas em um microscópio Axiovert 40 (Zeiss, Germany) acoplado com uma câmera para captura das imagens. A sonda anti-sense de *ScRpb4* foi hibridizada em secções transversais de folha

madura de cana-de-açúcar (figura 20) e secções longitudinais de meristema reprodutivo (figura 21). Nas folhas maduras foi observado que a acumulação de mRNA de ScRpb4 está restrita a células da bainha do feixe vascular (figura 20A e C), com uma baixa expressão no xilema, floema e células do mesófilo. No meristema reprodutivo, a expressão foi localizada nas glúmas, páleas, lodículas, meristema floral e par de meristemas vegetativos (figura 21A e C). Nenhum sinal foi observado na hibridização com a sonda sense de ScRpb4 (figuras 20B e D e 21B e D).

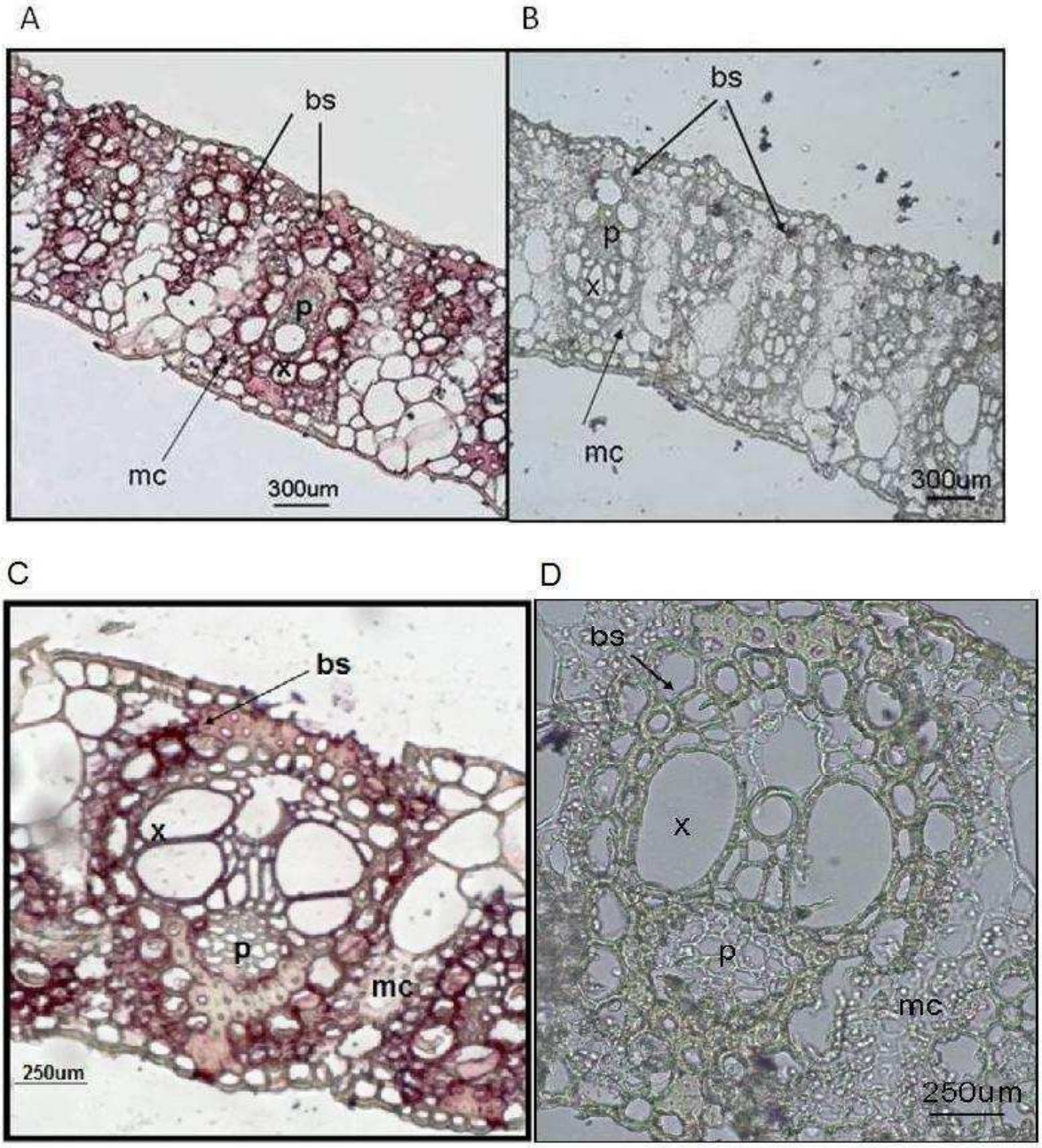

Figura 20. Hibridização *in situ* de cortes transversais da folha matura. A marcação dos transcritos é mostrada em diferentes tonalidades de vermelho. A) Corte transversal do tecido foliar mostrando o precipitado roxo em alguns tipos celulares quando foi utilizada a sonda antisense ; B), Mesmo tecido com a sonda sense; C) Detalhe do feche vascular; D) Mesmo detalhe com a sonda sense, sem coloração. Bs = células da bainha do feixe vascular; p = floema; x = xilema; mc = células do mesófilo.

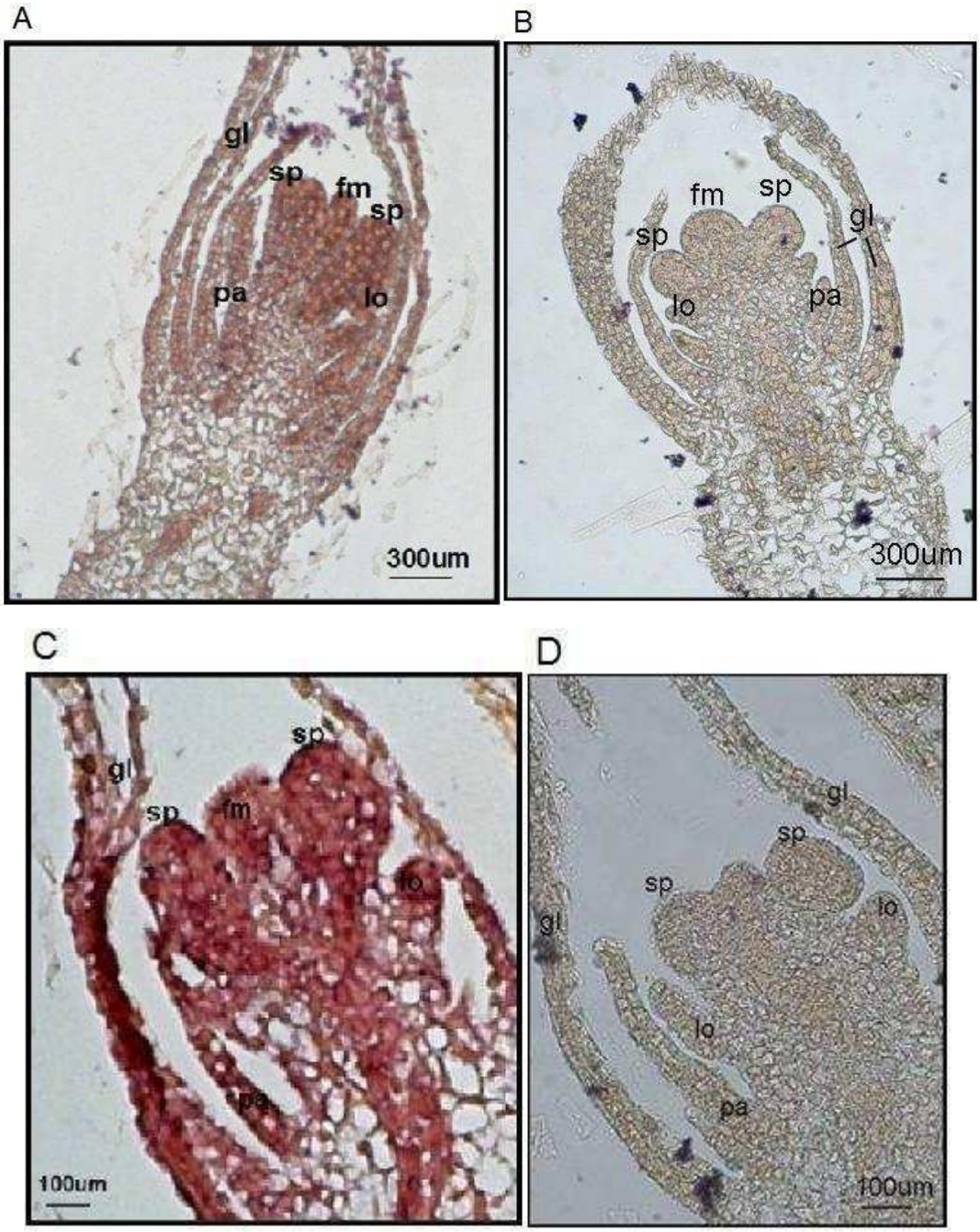

Figura 21. Hibridização *in situ* de cortes longitudinais da inflorescência de cana-de-açúcar. A) Corte longitudinal da inflorescência mostrando o precipitado roxo em alguns tipos celulares quando foi utilizada a sonda anti-sense; B) Mesmo tecido com a sonda sense; C) Detalhe do meristema apical com a sonda anti-sense; D) Mesmo detalhe com a sonda sense, sem coloração; . Bs = células da bainha do feixe vascular; p = floema; x = xilema; mc = células do mesófilo; gl = glúmas; sp = par de meristemas vegetativos; fm = meristema floral; pa = palea; lo = lodícula.

DISCUSSÃO

Neste trabalho foi caracterizado o gene *ScRpb4*, codificante da quarta maior subunidade da RNA polimerase II de cana-de-açúcar. Foi encontrada uma alta identidade na sequência proteica entre os homólogos de plantas analisados, em contraste com uma baixa similaridade com leveduras, humanos e drosófila. Isso é consistente com trabalhos anteriores com *Saccharomyces*, nos quais foi relatada uma alta identidade entre os homólogos de diferentes espécies de leveduras, e uma baixa identidade entre o resto dos eucariotos, incluindo *Arabidopsis thaliana* (Sampath and Sadhale 2005). A baixa identidade encontrada entre a Rpb4 de cana-de-açúcar e a de levedura (27%) é consistente com a estrutura da proteína da levedura, a qual apresenta uma região única não-conservada que separa as regiões N- e C-terminal, que são conservadas entre os organismos (Sampath et al. 2003). De acordo com ambos os alinhamentos realizados, duas árvores de *neighbor-joining* foram feitas. Ambas refletem as diferenças encontradas entre as proteínas Rpb4 dos diferentes organismos, e adicionalmente, na árvore de NJ das diferentes plantas (figura 8B), foi observado que as monocotiledôneas e as dicotiledôneas foram agrupadas em diferentes clados. Esse padrão de agrupamento também foi observado para ScTFIIA, que codifica para um fator basal de transcrição da maquinaria de transcrição de cana-de-açúcar (Gentile et al. 2010).

Tanto para pET-28a quanto para pGEX-4T-1 foi possível verificar a presença de uma banda de tamanho semelhante à visualizada nos géis de pequena escala, as quais são relacionadas à expressão da proteína recombinante.

Os padrões de expressão de ScRpb4 encontrados foram diferentes entre os plasmídios pGEX-4T1 e pET-28a. O plasmídio pGEX-4T-1 expressa a proteína glutationa S-transferase (GST) juntamente com a proteína-alvo, enquanto que o plasmídio pET-28a expressa apenas a proteína-alvo com uma cauda de histidina. Os testes de expressão em pequena escala foram conduzidos usando duas células de expressão (pRIL e pLysS), duas temperaturas (30 e 37 ºC) e três tempos de indução (4 h, 6 h e overnight), visando verificar o melhor padrão de expressão para ScRpb4. Dentre todas as possibilidades testadas, a melhor foi utilizando o plasmídio pET-28a, com a célula de expressão pRIL, por 4 h a 37ºC. A banda do gel de poliacrilamida ao redor de 16 kDa foi claramente observada, a qual corresponde ao peso molecular predito para a ScRpb4. Pode-se concluir que ScRpb4 está pronto para ser purificado e seguir adiante em mais estudos, tais como determinação de estrutura, que poderão ser realizado em análises posteriores de nosso laboratório. Alguns anos atrás, a estrutura completa de raio-X da RNA Polimerase II de levedura foi determinada, incluindo o heterodímero Rpb4/Rpb7 (Armache et al. 2003; Bushnell e Kornberg 2003). Uma completa caracterização da estrutura tridimensional da RNA Polimerase II é interessante para a compreensão dos mecanismos que regulam a transcrição em plantas. Recentemente, uma refinação da estrutura da RNA Pol II de leveduras foi feita, especificando a conformação de duas regiões que estão próximas da superfície da Pol II, proporcionando a mais completa referência estrutural para análises posteriores (Meyer et al. 2009).

O gene ScRpb4 aparenta ser ubiquamente expresso, não havendo tampouco diferenças significativas no nível dos transcritos entre diversos tecidos de cana, o que é o esperado para uma subunidade da RNA polimerase. Esse fato além de corroborar que o

gene seja essencial na célula em diversas etapas do desenvolvimento celular, corrobora a hipótese de que a quantidade de moléculas dessa subunidade não se altera, ela é a mesma quando a célula cresce sob condições ideais ou quando sob estresse; o que é alterado é o estado de agregação dela com a pol II (Farago 2003).

A expressão de *ScRpb4* não apresentou mudanças em folhas tratadas com os hormônios MeJA ou ABA, e em raízes expostas a baixos níveis de fosfato. Todo o perfil de expressão de ScRpb4 está de acordo com os dados disponíveis do homólogo de *Arabidopsis thaliana* na base de dados pública de *microarray* (*The Bio-Array Resource for Plant Functional Genomics*, http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi, (Winter et al. 2007). O homólogo de Rpb4 em *Arabidopsis* (At5g09920.1, correspondente a proteína NP 196554.1 usada na figura 2) está expresso na maioria dos tecidos, tais como inflorescência, raiz, folhas, talo, sementes, entre outros, mostrando a mesma expressão ligeiramente maior no meristema apical, raiz, semente, folhas imaturas e flores. Nenhuma mudança foi observada em resposta à aplicação de homônios, tais como ABA, MeJA, IAA (Ácido indolil-3-acético) e GA-3 (Ácido Giberélico). Além do mais, nenhum efeito foi observado de plantas de *Arabidopsis* submetidas à estresse de frio (ainda usando a mesma base de dados), reforçando os dados obtidos em nosso trabalho, no qual nenhum diferencial de expressão foi observados sob estresses abióticos.

A expressão ubíqua de ScRpb4 nos tecidos e condições de estresse está de acordo com o padrão esperado para uma subunidade da RNA Pol II, devido ao papel fundamental desta proteína. Esse padrão sugere um importante papel desta subunidade em diferentes etapas do desenvolvimento celular. Mais ainda, indica que o nível de ScRpb4 dentro da célula é constante mesmo quando as condições alteram-se de ótimas para não-ótimas (fato

visto em um estresse). De fato, a Rpb4 de leveduras supostamente tem um papel na resposta celular ao estresse, por um mecanismo pós-transcricional.

A localização celular demonstra que ScRpb4 foi direcionada para o núcleo e o citoplasma. A localização no núcleo está de acordo com a função da proteína, como uma subunidade da RNA Pol II. O mesmo foi observado para uma subunidade putativa do fator basal de transcrição TFIIH de cana-de-açúcar, o qual foi direcionado para o núcleo como esperado para uma proteína envolvida na transcrição (Gentile et al. 2009). De maneira interessante, em leveduras, ambas as subunidades Rpb4 e Rpb7 tem sido encontradas agindo na transcrição (no núcleo) e também na exportação de mRNA para o citoplasma e na via de decaimento do mRNA no citoplasma. Assim, há a possibilidade de que este heterodímero faça a ligação entre o núcleo e o citoplasma, e que ambas as subunidades possam ser encontradas no citoplasma (Selitrennik et al. 2006). Sob condições normais o transporte de ambas as subunidades depende do progresso da transcrição. Porém sob condições de estresse, como falta de nutrientes e temperatura, ambas as subunidades são transportadas de uma maneira independente do progresso da transcrição (Selitrennik et al. 2006).

A folha, no início de seu desenvolvimento, é composta de meristema apical (é o broto, a folha jovem como um todo), e esse meristema possui a protoderme (mais externa, vai dar origem a epiderme), meristema fundamental (são as células que preenchem, parênquimas), e o procâmbio (mais interno, que vai originar os feixes vasculares ou colaterais) (Appezzato-da-Glória, B. e Carmello-Guerreiro S. M., 2003). Nos cortes de folhas pode-se notar uma maior coloração nas células da bainha do feixe vascular, e uma menor intensidade no floema, xilema e células do mesófilo. É na bainha do mesófilo onde

ocorre a maioria das reações de metabolismo foliar (Taiz, e Zeiger, 2004), portanto é de se esperar que mais RNA polimerase sejam recrutadas para esse local, pois possuindo uma intensa atividade metabólica há também uma intensa transcrição gênica.

Na inflorescência, no início de seu desenvolvimento, tem-se o meristema apical (é o botão jovem, pois é uma flor em desenvolvimento), e esse meristema é composto de protoderme (mais externa, vai dar origem a epiderme), procâmbio (que vai dar origem aos vasos) e meristema fundamental (são as células que preenchem, parênquimas). (Appezzato-da-Glória, B. e Carmello-Guerreiro S. M., 2003).

Na figura 20 é possível visualizar o meristema corado como um todo, enquanto que na figura 21 visualizam-se as estruturas individualizadas, ou seja, as glumas, os meristemas vegetativos, o meristema floral, as paleas e as lodículas bem coradas. A coloração está presente em todas as partes do meristema, pois é nesse local onde as células estão em intenso crescimento. É a partir do meristema que as células vão se diferenciar, dando origem aos tecidos da planta, sendo nesse local, portanto, onde há uma intensa necessidade de transcrição gênica. Isso está de acordo com a expressão observada na base de dados de Arabidopsis, onde o meristema apical apresenta uma expressão maior que o restante dos tecidos.

CONCLUSÕES

A proteína ScRpb4 de cana-de-açúcar apresenta alta similaridade com as homólogas de plantas, principalmente as de monocotiledôneas (91.5% com o arroz – *Oryza sativa*, 98.6% com o *Sorghum bicolor* e 96.5% com o milho – *Zea mays*).

Uma boa qualidade de expressão em células bacteriana, tanto em pequena quanto em larga escala, foi verificada no vetor de expressão pET-28a, em uma temperatura ótima de 37 ºC durante 4 h de indução com IPTG.

Em plantas submetidas a diferentes estresses e tratamentos (frio, privação de fosfato, hormônios MeJa e ABA) não ocorre nenhum tipo de expressão diferencial do gene *ScRpb4*. O gene apresentou expressão inalterada também durante o desenvolvimento da gema lateral e foi expresso em todos os tecidos de cana-de-açúcar avaliados: folha madura, folha imatura, entrenós, gema lateral, raiz e flor.

A acumulação de transcritos primários apresentou correlação com a intensa atividade metabólica: na inflorescência nas glúmas, meristemas vegetativos e meristema floral, locais onde ocorrerá a diferenciação celular da planta adulta.

A análise da localização de fusão com GFP em epiderme de células de cebola indicou o direcionamento de ScRpb4 para o núcleo e o para o citoplasma. No núcleo temos um indício de sua participação como subunidade da Pol II, e no citoplasma um indício de sua relação com a exportação de mRNA, tal qual verificado em leveduras.

Todos os resultados presentes neste trabalho indicam a importância da *ScRpb4* nas células, particularmente nos tecidos imaturos, com intensa divisão celular.

BIBLIOGRAFIA

Appezzato-da-Glória, B e Carmello-Guerreiro, S. M., editoras (2003) Anatomia Vegetal. 1ª ed. Editora UFV.

Armache, K.J.; Kettenberger, H. & Cramer, P. (2003) Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. Proc Natl Acad Sci USA 100, 6964-6968.

Bushnell, D.A., Kornberg, R.D. (2003): Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-A resolution: implications for the initiation of transcription. Proc Natl Acad Sci USA 100: 6969-6973.

Choder, M. & Young, R. A. (1993) A Portion of RNA Polymerase II Has a Component Essential for Stress Response and Stress Survival. Mol. Cell. Biol. 13, 6984-6991.

Choder, M. (2004) Rpb4 and Rpb7: subunits of RNA polymerase II and beyond. TRENDS Bioch. Sci. 29, 674-681.

Cramer, P.; Bushnell, D. A. & Kornberg R. D. (2001). Structural Basis of Transcription: RNA Polymerase II at 2.8 Ångstrom Resolution. Science 292, 1863-1876.

Farago, M.; Nahari, T.; Hammel, C.; Cole, C. N. & Choder, M. (2003) Rpb4p, a Subunit of RNA Polymerase II, Mediates mRNA Export during Stress. Mol. Biol. Cell 14, 2744-2755.

Gentile, A., Ditt, R.F., Dias, F.O., Da Silva, M.J., Dornelas, M.C., Menossi, M. (2009): Characterization of ScMat1, a putative TFIIH subunit from sugarcane. Plant Cell Rep 28: 663-672.

Gentile, A., Da Cruz, P., Tavares, R.G., Krug-Baldacin, M.G., Menossi, M. (2010): Molecular characterization of ScTFIIAγ, encoding the putative TFIIA small subunit from sugarcane Plant Cell Rep 29: 857-864.

Khazak, V.; Estojak, J.; Cho, H.; Majors, J.; Sonoda, G; Testa, J. R. & Golemis, E. A. (1998) Analysis of the Interaction of the Novel RNA Polymerase II (pol II) Subunit hsRPB4 with Its Partner hsRPB7 and with pol II. Mol. Cell. Biol. 18, 1935-1945.

Larkin, R. M. & Guilfoyle, T. J. (1998) Two Small Subunits in Arabidopsis RNA Polymerase II Are Related to Yeast RPB4 and RPB7 and Interact with One Another. J. Biol. Chem. 273, 5631-5637.

McKune K., Richards K.L., Edwards A.M., Young R.A., Woychik N.A. (1993) RPB7, One of Two Dissociable Subunits of Yeast RNA Polymerase II, is Essential for Cell Viability. Yeast 9, 295-299.

Menossi M., Puigdomènech P., Martínez Izquierdo, J.A. (2000) Improved analysis of promoter activity in biolistically transformed plant cells. Biotechniques 28, 54-58.

Meyer, P.A., Ye, P., Suh, M.H., Zhang, M., Fu, J. (2009): Structure of the 12-subunit RNA polymerase II refined with the aid of anomalous diffraction data. J Biol Chem **284**: 12933-12939.

Muratoglu, S., Georgleva, S., Papai, G., Scheer, E., Enunlu, I., Komonyi, O., Cserpan, I., Lebedeva, L., Nabirochkina, E., Udvardy, A., Tora, L., Boros, I. (2003): Two different Drosophila ADA2 homologues are present in distinct GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. Mol Cell Biol **23**: 306-321.

Pillai, B.; Sampath, V.; Sharma, N. & Sadhale, P. (2001). Rpb4, a Non-essential Subunit of Core RNA Polymerase II of Saccharomyces cerevisiae Is Important for Activated Transcription of a Subset of Genes. J. Biol. Chem. 276, 30641-30647.

Sampath, V., Rekha, N., Srinivasan, N., Sadhale, P. (2003): The conserved and non-conserved regions of Rpb4 are involved in multiple phenotypes in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 278: 51566-51576, 2003.

Sampath, V., Sadhale, P. (2005): Rpb4 and Rpb7: A sub-complex integral to multi-subunit RNA polymerases performs a multitude of functions. Iubmb Life 57: 93-102.

Schlögl PS, Nogueira FT, Drummond R, Felix JM, De Rosa VE Jr, Vicentini R, Leite A, Ulian EC, Menossi M. (2008) : Identification of new ABA- and MEJA-activated sugarcane bZIP genes by data mining in the SUCEST database. Plant Cell Rep. 2008 Feb;27(2):335-45.

Selitrennik, M., Duek, L., Lotan, R., Choder, M. (2006): Nucleocytoplasmic shuttling of the Rpb4p and Rpb7p subunits of Saccharomyces cerevisiae RNA polymerase II by two pathways. Eukaryot Cell **5**: 2092-2103.

Sheffer, A.; Varon, M. & Choder, M. (1999) Rpb7 Can Interact with RNA Polymerase II and Support Transcription During Some Stress Independently of Rpb4. Mol. Cell. Biol. 19, 2672-2680.

Taiz, L. e Zeiger, E. (2004). Fisiologia Vegetal. Editora Artmed. 3ª edição.

Töpfer, R.; Matzeit, V.; Gronenborn, B.; Schell, J. & Steinbiss, H. H. (1987) A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. Nucl. Acids Res. 15, 5890.

Vettore, A.L., *et al* (2003): Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. Genome Res **13**: 2725-2735.

Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., Provart, N.J. (2007): An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. PLoS One **2**: e718.

Woychik, N. A. & Young, R. A. (1989) RNA Polymerase II Subunit RPB4 is Essential for High- and Low-Temperature Yeast Cell Growth. Mol. Cell. Biol 9, 2854-3859.

ANEXO I

ILUSTRAÇÕES

Primer Direto

5' GGATCCATGTCCGGCGAGGAGGA 3'

Sítio de *BamHI* Tm=80,1 %GC 65,2 23bp

Primer Reverso

5' CTCGAGCTACTCGAACTTCTTGATGAGGG 3'

Sítio de *XhoI* Tm=78,2 %GC 51.7 29bp

Figura 1. Primers utilizados para a amplificação de *ScRpb4* no ensaio de expressão gênica.

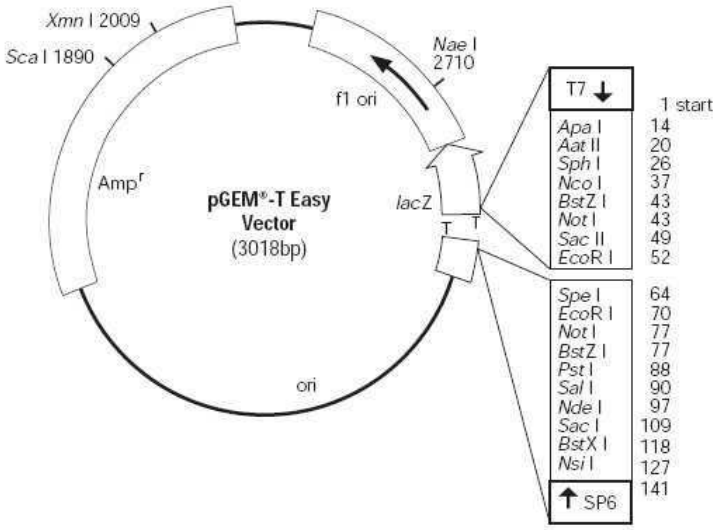

Figura 2. Plasmídio pGEM-T Easy utilizado para a subclonagem do gene *ScRpb4*.

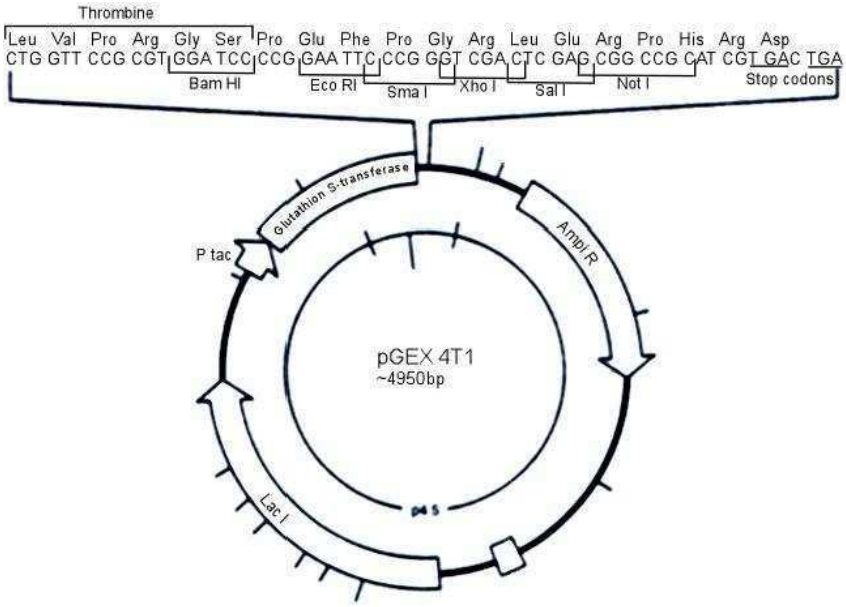

Figura 3. Plasmídio pGEX-4T-1 utilizado para expressão de proteínas Rpb4. Como o gene da glutationa S-transferase (GST) está upstream ao gene da proteína de interesse, no momento da expressão da proteína, a proteína resultante terá aproximadamente 42 kDa: 26 kDa GST e 16 kDa da Rpb4.

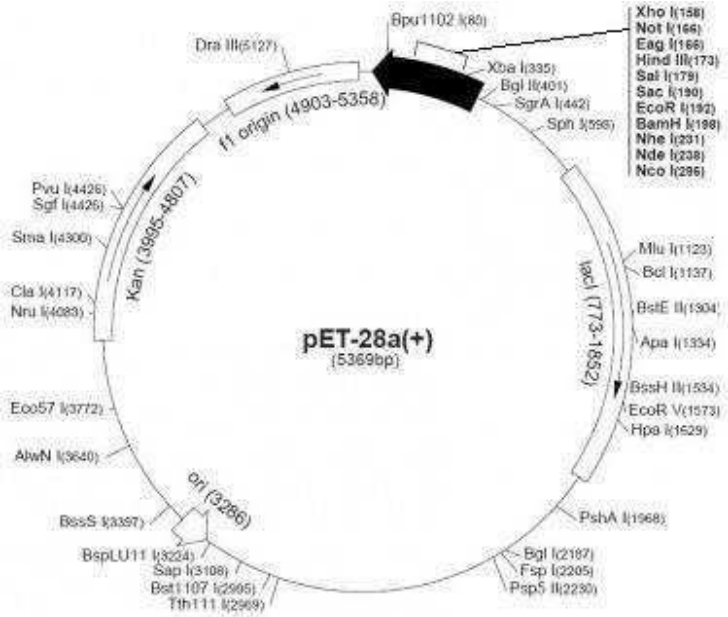

Figura 4. Plasmídio pET-28a utilizado para expressão de proteína ScRpb4. Em detalhe as enzimas usadas para a abertura do plasmídio. O peso molecular final da proteína recombinante vai ser praticamente o mesmo que ela possuía, diferentemente do caso do pGEX-4T-1, pois no caso do pET-28a os 6 aminoácidos de histidina (conhecidos como cauda de histidina) sintetizados no final da proteína de interesse não vão influenciar significativamente o peso molecular final.

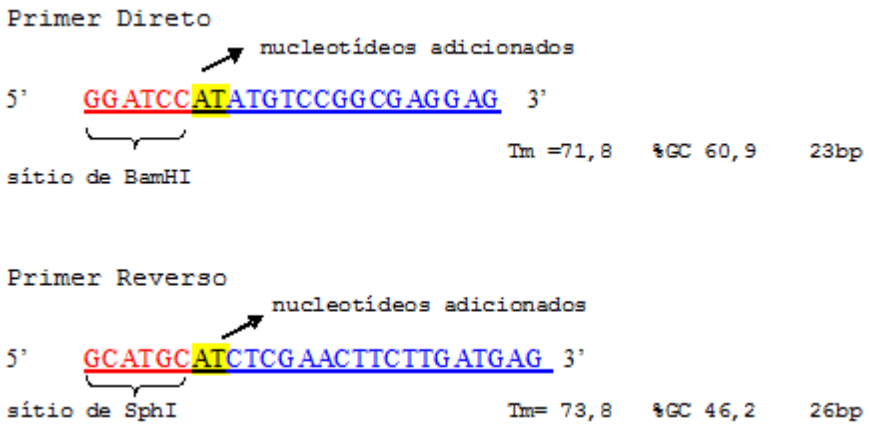

Figura 5. Primers desenhados com os novos sítios de restrição para entrar en frame com o vetor.

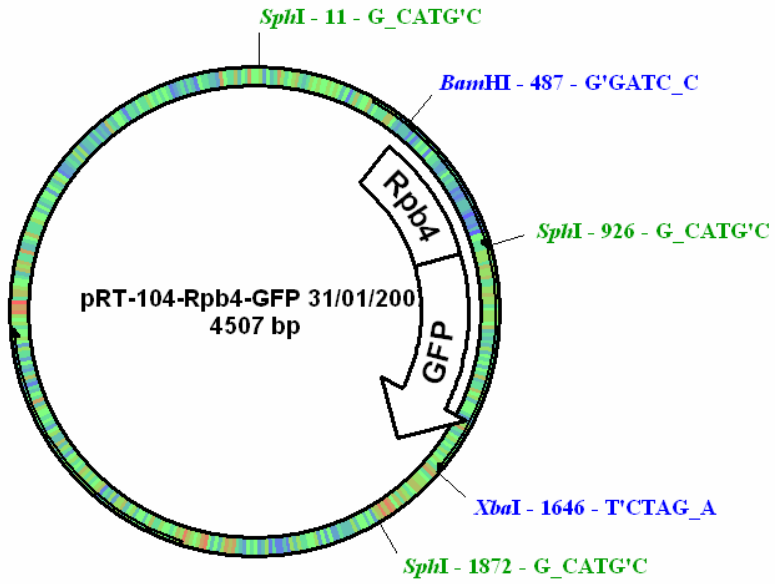

Figura 6. Mapa da construção que será bombardeada em epiderme de cebola.

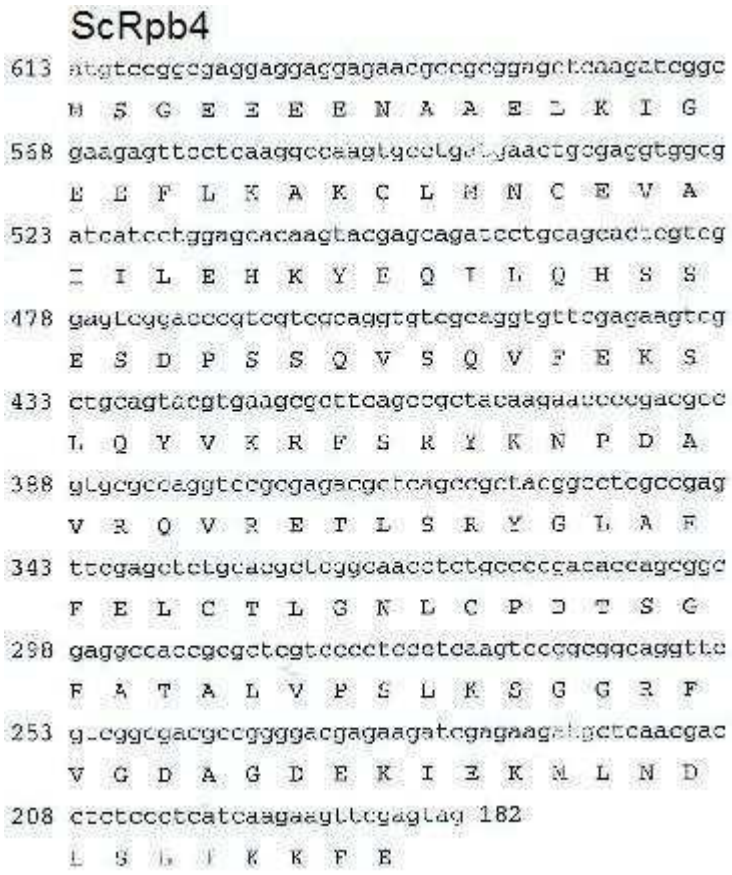

Figura 7. Gene *ScRpb4* de cana-de-açúcar e sequência de aminoácidos deduzida. O gene possui 432 pares de bases, codificando uma proteína de 143 aminoácidos, com um peso molecular estimado de 16 kDa.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado intitulada "Rpb4: uma subunidade não muito convencional da RNA polimerase II – estudos em cana-de-açúcar":

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(X) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*:
CIBio, sob projeto nº 20007/03 – Genômica Funcional de Plantas.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Aluno: Fábio Ometto Dias

Orientador: Marcelo Menossi Teixeira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:
( ) Deferido ( ) Indeferido

Nome:
Função:

Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP