

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

CARLOS WILLIAM FRANCISCHINI

**Identificação e caracterização de RNA mensageiros
candidatos a alvo das proteínas PUMILIO de *Arabidopsis*
através do sistema triplo-híbrido de levedura.**

São Paulo

Data do depósito na SPG:

01/12/2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CARLOS WILLIAM FRANCISCHINI

**Identificação e caracterização de RNA mensageiros
candidatos a alvo das proteínas PUMILIO de *Arabidopsis*
através do sistema triplo-híbrido de levedura.**

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

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Bento Quaggio

São Paulo

2008

CARLOS WILLIAM FRANCISCHINI

Identificação e caracterização de RNA mensageiros candidatos a alvo das proteínas PUMILIO de *Arabidopsis* através do sistema triplo-híbrido de levedura.

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

“Aos meus pais, pelo amor, pela força, pelo apoio e pela confiança depositada em todos os momentos. À Claudia, meu grande amor e à minha princesinha Manuela, pelo amor incondicional que me oferecem todos os dias. Ao meu irmão Felipe e aos verdadeiros amigos Vanessa e Carlos, que sempre estiveram ao lado durante essa difícil e importante etapa da minha vida. Ao eterno mestre Fabio Sartori, meu primeiro orientador e responsável pelo início da minha caminhada científica.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ronaldo Bento Quaggio, Prof. Dr. Shacker Chuck Farah, Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira, Prof. Dr. Frederico José Gueiros Filho e a Profa. Dra. Maria Julia Alves Manso (todos do Instituto de Química-USP) e seus respectivos membros do laboratório À aluna de Doutorado Maria Claudia Pereda Francischini e aos companheiros de laboratório Juliana Cristina Fontanari, Alex William Monteiro e em especial, à Dra. Elaine Cristina Favaro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida e à fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro ao laboratório.

*“Quando tratardes de um assunto, não deveis esgotá-lo.
Basta fazer pensar.”
(Montesquieu)*

Resumo

Francischini, C.W. **Identificação e caracterização de RNA mensageiros candidatos a alvo das proteínas PUMILIO de *Arabidopsis* através do sistema triplo-híbrido de levedura.** 2008. 164p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Proteínas PUF regulam a estabilidade e a tradução através da ligação a seqüências específicas nas regiões 3' não traduzidas (3' UTR) dos mensageiros. A ligação é mediada por um domínio de ligação conservado constituído por 8 repetições de aproximadamente 36 aminoácidos cada. Experimentos realizados no sistema triplo-híbrido de levedura mostraram que os homólogos PUF de *Arabidopsis* APUM-1, APUM-2 e APUM-3 são capazes de ligar especificamente à seqüência chamada de Elemento de Resposta a NANOS (NRE) reconhecida pelo homólogo PUF de *Drosophila*. A utilização de bibliotecas de expressão de RNA em ensaios no sistema triplo-híbrido permitiu a identificação de seqüências de ligação consenso para as três proteínas APUM. Análises computacionais identificaram elementos de ligação a APUM em regiões 3' UTR de importantes transcritos relacionados ao controle do meristema do caule e à manutenção das células totipotentes. Nós mostramos que os homólogos APUM-1, APUM-2 e APUM-3 reconhecem elementos de ligação a APUM nas regiões 3' UTR dos transcritos *WUSCHEL*, *CLAVATA-1*, *ZWILLE* e *FASCIATA-2*. Ensaios de RT-PCR e Western blot semiquantitativos mostraram que a quantidade dos transcritos *WUSCHEL* e *CLAVATA-1* é alterada em plantas antisense induzíveis para APUM-1, APUM-2 e APUM-3. A relevância biológica dessas interações foi observada através de ensaios de co-precipitação, confirmando, portanto, o primeiro caso de regulação traducional descrito para os mensageiros *WUSCHEL* e *CLAVATA-1*. Análises computacionais adicionais para a identificação de outros homólogos PUF em *Arabidopsis* encontraram vinte e cinco proteínas possuindo repetições PUF. Entre elas, os homólogos APUM-4, APUM-5 e APUM-6 apresentam alta similaridade com as proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3, sendo capazes de ligar especificamente à seqüência NRE e aos elementos de ligação a APUM presentes nas regiões 3' UTR dos transcritos *WUSCHEL*, *CLAVATA-1*, *ZWILLE* e *FASCIATA-2*. Os resultados indicam que vários homólogos PUF podem agir como reguladores traducionais em *Arabidopsis* através de um mecanismo molecular conservado entre as espécies, podendo abrir uma nova área de investigação da regulação de mRNA em plantas.

Palavras -chave: proteínas PUF, proteínas de ligação a RNA, sistema triplo-híbrido, *Arabidopsis thaliana*, controle traducional.

Abstract

Francischini, C.W. **Identification and characterization of mRNA targets candidates of the *Arabidopsis* PUMILIO (APUM) proteins using the yeast three-hybrid system.** 2008. 164p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PUF proteins regulate stability and translation through sequence-specific binding to 3' untranslated regions (UTR) of target mRNA transcripts. Binding is mediated by a conserved PUF domain which contains 8 repeats of approximately 36 amino acids each. Through three-hybrid assays, we have found that APUM-1, APUM-2 and APUM-3 *Arabidopsis* PUF homologs can bind specifically to the NANOS Response Element sequence (NRE) recognized by *Drosophila* PUF homolog. Using *Arabidopsis* RNA libraries in three-hybrid screenings, we were able to identify APUM binding consensus sequences. A computational analysis allowed us to identify the APUM binding element within the 3' UTR in many *Arabidopsis* transcripts, even in important mRNAs related to shoot and stem cell maintenance. We show that APUM-1, APUM-2 and APUM-3 are able to bind specifically to APUM binding elements in the 3' UTR of *WUSCHEL*, *CLAVATA-1*, *ZWILLE* and *FASCIATA-2* transcripts. RT-PCR and Western blot semiquantitative assays showed altered *WUSCHEL* and *CLAVATA-1* amounts in APUM-1, APUM-2 and APUM-3 antisense plants. The biologic relevance of these interactions was observed with co-immunoprecipitation assay, which confirmed the first example of translational regulation to *WUSCHEL* and *CLAVATA-1* transcripts. Computational analysis to identify others PUF homologs in *Arabidopsis* found twenty five proteins presenting PUF repeats. Among them, we found that APUM-4, APUM-5 and APUM-6 homologs are very similar to APUM-1, APUM-2 and APUM-3 and also are able to bind specifically to the NRE sequence and to APUM binding elements in the 3' UTR of *WUSCHEL*, *CLAVATA-1*, *ZWILLE* and *FASCIATA-2* transcripts. Our results indicate that the APUM proteins may act as regulators in *Arabidopsis* through an evolutionarily conserved mechanism, which may open up a new approach to investigate mRNA regulation in plants.

Key words: PUF proteins, RNA-binding protein, three-hybrid system, *Arabidopsis thaliana*, translational control.

Lista de Figuras

- Figura 1:** Processo de tradução de um mRNA em eucarioto.
- Figura 2:** Exemplo de regulação traducional do transcrito materno *CICLINA B1* em oócitos de *Xenopus leavis*.
- Figura 3:** Regulação de mensageiros de *Drosophila* mediada pelo reconhecimento da proteína PUMILIO.
- Figura 4:** Característica molecular do domínio PUF de ligação a RNA presente nas proteínas da família PUF.
- Figura 5:** Seqüências consenso de ligação de diferentes homólogos PUF.
- Figura 6:** Mecanismo de atuação das proteínas PUF na regulação do mRNA.
- Figura 7:** Alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 no programa Clustal W.
- Figura 8:** Expressão do gene repórter β - glucuronidase (*GUS*) sob o domínio do promotor do gene APUM-1.
- Figura 9:** Desenvolvimento vegetal.
- Figura 10:** Expressão do gene repórter *GUS* sob o controle dos promotores dos genes *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3* em calos obtidos a partir de plantas carregando a construção repórter.
- Figura 11:** Análise da expressão das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 em extrato protéico de plantas antisense induzíveis por dexametasona comparadas com o extrato protéico da planta selvagem.
- Figura 12:** Comparação entre o fenótipo de plantas selvagens e os fenótipos das linhagens carregando a construção antisense induzível por dexametasona.
- Figura 13:** Regiões do meristema apical do caule onde as expressões dos genes *CLAVATA* e *WUSCHEL* são observadas.
- Figura 14:** Mecanismos moleculares de regulação do destino das células totipotentes no meristema apical de caule de *Arabidopsis*.
- Figura 15:** Representação do sistema triplo-híbrido de levedura.
- Figura 16:** Vetores utilizados no sistema triplo- híbrido de levedura (Invitrogen).
- Figura 17:** Diferença entre as linhagens de levedura L40Ura3 e YBZ-1.

Figura 18: Análise da capacidade de ligação a RNA das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 no sistema triplo-híbrido de levedura.

Figura 19: Indução da proteína recombinante PUF-2 em *E. coli* BL21(DE3)pLysS(RP) e purificação em coluna de níquel em HPLC.

Figura 20: Ensaio de interação “*in vitro*” entre o domínio de ligação recombinante PUF-2 e os transcritos NRE selvagem e NRE mutado no Box B (NREB) marcados radioativamente.

Figura 21: Esquema mostrando as etapas seguidas nos ensaios de triplo-híbrido em larga escala.

Figura 22: Resultado final dos três ensaios de triplo-híbrido usando o domínio de ligação PUF-2 como isca contra a biblioteca de cDNA de fragmentos entre 50-150 pb.

Figura 23: Ensaio de Western blot para validação do anti-soro contra APUM obtido em coelho.

Figura 24: Western blot do extrato protéico total da planta e do extrato protéico total de calo com o anti-soro contra APUM-2 produzido em coelho.

Figura 25: Resultado do seqüenciamento dos clones obtidos no ensaio de triplo-híbrido com a biblioteca de cDNA de calo usando o domínio de ligação PUF-2 como isca.

Figura 26: Análise qualitativa da ativação do repórter *LacZ* nas interações entre os domínios de ligação PUF-1 e PUF-3 com os transcritos 3' UTR identificados nos ensaios de triplo-híbrido utilizando a biblioteca da planta.

Figura 27: Alinhamento das 129 seqüências obtidas nos ensaios de triplo-híbrido com a biblioteca da planta e com a biblioteca de calo no software MEME.

Figura 28: Validação das seqüências consenso de ligação e identificação de candidatos a alvo das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3.

Figura 29: Ensaios de interação entre o domínio PUF-2 e os transcritos *FASCIATA-2* mutantes.

Figura 30: Análise semiquantitativa da expressão dos transcritos candidatos a alvo nas plantas antisense induzíveis para APUM-1, APUM-2 e APUM-3.

Figura 31: Indução em larga escala das proteínas recombinantes sintetizadas a partir dos mRNAs candidatos a alvo de APUM .

Figura 32: Ensaios de Western blot para validação dos anti-soros contra as proteínas WUSCHEL, CLAVATA-1 e FASCIATA-2 produzidos em camundongos.

Figura 33: Análise semiquantitativa da expressão das proteínas CLAVATA-1, FASCIATA-2 e WUSCHEL em plantas selvagens e plantas antisense induzíveis para APUM-1, APUM-2 e APUM-3.

Figura 34: Imunoprecipitação do complexo APUM-mRNA do extrato protéico de plantas selvagens.

Figura 35: Árvore filogenética gerada com as seqüências de aminoácidos dos 25 possíveis homólogos PUF identificados quando a seqüência do domínio PUF da proteína PUMILIO de *Drosophila* foi usada em um BLAST-P contra o banco de dados de *Arabidopsis*.

Figura 36: Alinhamento no programa Clustal W das seqüências de aminoácidos dos domínios PUF das proteínas do grupo I (APUM-4, APUM-5 e APUM-6) e do grupo II (APUM-7 a APUM-12) com o domínio PUF de ligação do homólogo PUMILIO de *Drosophila*.

Figura 37: Análise computacional das seqüências de aminoácidos dos homólogos APUM no programa Pfam e no programa de predição da estrutura secundária “PSIPRED V2.4 Secondary Structure Prediction”.

Figura 38: Análise da especificidade de ligação dos domínios PUF-4, PUF-5 e PUF-6 a RNA.

Figura 39: Análise da capacidade de ligação do domínio PUF-7 a RNA.

Figura 40: Mecanismo de auto-regulação entre os fatores WUSCHEL (WUS) e CLAVATA-3 (CLV-3).

Figura 41: Mecanismo proposto para o papel das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 no sistema de auto-regulação entre WUSCHEL e CLAVATA.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Motivos de ligação reconhecidos por homólogos PUF de diferentes organismos.

Tabela 2: Lista de oligonucleotídeos usados nas reações de amplificação dos domínios PUF dos homólogos APUM.

Tabela 3: Lista de oligonucleotídeos sintetizados para clonagem de seqüências 3' UTR no vetor pRH5'.

Tabela 4: Oligonucleotídeos usados para amplificação dos cDNAs *WUSCHEL*, *CLAVATA-1*, *ZWILLE*, *FASCIATA-2* e *PUF-2*.

Tabela 5: Clones seqüenciados para análise da representatividade da biblioteca primária de cDNA contendo fragmentos entre 50-150 pb.

Tabela 6: Número de colônias obtidas em cada etapa do primeiro ensaio de triplo-híbrido com a biblioteca de cDNA com fragmentos entre 50-150 pb.

Tabela 7: Relação dos transcritos que tiveram suas regiões 3' UTR ligadas especificamente pelo domínio PUF-2 no primeiro ensaio de triplo-híbrido com a biblioteca de cDNA.

Tabela 8: Número de colônias obtidas em cada etapa do segundo ensaio de triplo-híbrido com a biblioteca de cDNA com fragmentos entre 50-150 pb.

Tabela 9: Relação dos transcritos que tiveram suas regiões 3' UTR ligadas especificamente pelo domínio PUF-2 no segundo ensaio de triplo-híbrido com a biblioteca de cDNA.

Tabela 10: Número de colônias obtidas em cada etapa do terceiro ensaio de triplo-híbrido com a biblioteca de cDNA.

Tabela 11: Clones seqüenciados para análise da representatividade da biblioteca primária de cDNA de calo.

Tabela 12: Número de colônias obtidas em cada etapa do ensaio de triplo-híbrido com a biblioteca de cDNA de calo.

Tabela 13: Relação dos transcritos que tiveram suas regiões 3' UTRs ligadas especificamente pelo domínio PUF-2 no ensaio de triplo-híbrido com a biblioteca de cDNA de calo.

Tabela 14. Ocorrência dos elementos de ligação a APUM no transcriptoma de *Arabidopsis thaliana*.

Tabela 15. Relação de alguns transcritos relacionados ao controle do meristema do caule que co-localizam com as proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 e possuem o elemento de ligação a APUM em suas regiões 3' UTR.

Tabela 16: Transcritos identificados nos ensaios de triplo-híbrido possuindo duas citosinas imediatamente localizadas na extremidade 5' do elemento de ligação a APUM.

Tabela 17. Identidade entre as seqüências de aminoácidos de alguns possíveis homólogos PUF em *Arabidopsis*.

Tabela 18. Relação dos doze homólogos PUF com maior similaridade com o domínio PUF de ligação do homólogo PUMILIO de *Drosophila*.

Tabela 19. Alinhamento dos resíduos 12, 13 e 16 de cada repetição dos domínios PUF de humano, *Drosophila* e levedura com os resíduos correspondentes nos domínios PUF das proteínas *Arabidopsis* PUMILIO.

Tabela 20: Número de colônias obtidas em cada etapa do ensaio de triplo-híbrido usando o domínio PUF-7 como isca contra a biblioteca de cDNA da planta com fragmentos entre 50-150 pb.

Tabela 21: Resultados dos ensaios realizados para a identificação e confirmação dos mensageiros sujeitos à regulação pelas proteínas APUM-1, APUM-2, APUM-3.

Sumário

1. Introdução	16
1.1 Regulação ao nível da tradução	16
1.2 A família PUF de proteínas: Reguladores traducionais eucarióticos.....	19
1.3 Manutenção das células tronco: Uma função ancestral atribuída às proteínas PUF	23
1.4 Características estruturais e moleculares das proteínas PUF.....	24
1.5 Uma característica comum entre os diferentes mensageiros regulados por proteínas PUF.....	27
1.6 Mecanismo de ação das proteínas PUF	29
1.7 Proteínas PUF em plantas.....	34
1.8 Localização da expressão de APUM-1, APUM-2 e APUM-3 em <i>Arabidopsis</i>	37
1.9 Ação pleotrópica das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3.....	41
1.10 Regulação da integridade dos meristemas da planta.....	44
2. Objetivos.....	50
3. Materiais e Métodos.....	52
3.1. Sistema Triplo – Híbrido de levedura	52
3.2 Sistema Triplo-Híbrido adaptado.....	53
3.3 Clonagem dos cDNAs referentes ao domínio PUF de ligação dos homólogos APUM-1, APUM-2, APUM-3, APUM-4, APUM-5, APUM-6 e APUM-7 no vetor pYESTrp3	54
3.4 Clonagem de seqüências presentes nas regiões 3' UTR dos mensageiros <i>HUNCHBACK</i> (NRE), <i>FASCIATA-2</i> e <i>CLAVATA-1</i>	55
3.5 Clonagem de seqüências presentes nas regiões 3' UTR dos mensageiros <i>WUSCHEL</i> e <i>ZWILLE</i>	58
3.6 Clonagem dos oligonucleotídeos <i>FASCIATA-2</i> mutantes no vetor pRH5'	59
3.7 Clonagem dos cDNAs <i>WUSCHEL</i> , <i>FASCIATA-2</i> , <i>CLAVATA-1</i> , <i>ZWILLE</i> e <i>PUF-2</i> no vetor de expressão pET-28a	59
3.8 Geração de mutações pontuais nos domínios PUF-2 e PUF-7	61
3.9 Construção de uma biblioteca de cDNA com fragmentos entre 500-1500 pb	62
3.10 Construção da biblioteca de cDNA com fragmentos entre 50-150 pb	62
3.11 Construção da biblioteca de cDNA com fragmentos entre 50-150 pb a partir de tecido de calo	65
3.12 Expansão das bibliotecas de cDNA primárias em meio semi-sólido.....	66
3.13 Mini e Max preparação dos plasmídeos.....	66
3.14 Transformação de levedura em pequena escala.....	67
3.15 Transformação de levedura em larga escala.....	67
3.16 Análise qualitativa da ativação do repórter <i>LacZ</i> em ensaios de triplo-híbrido.....	68

3.17	Análise quantitativa da ativação do repórter <i>LacZ</i> no sistema triplo-híbrido.....	68
3.18	Extração de DNA plasmidial de levedura em tubo eppendorf.....	69
3.19	Extração de DNA plasmidial de levedura em placa.....	70
3.20	Reações de seqüenciamento dos clones.....	71
3.21	Indução das proteínas recombinantes em pequena escala.....	71
3.22	Indução das proteínas recombinantes em larga escala.....	72
3.23	Purificação das proteínas recombinantes induzidas em larga escala.....	72
3.24	Produção da região N-terminal da proteína APUM-2 e imunização de coelhos para obtenção de anti-soro.....	73
3.25	Imunização de camundongos.....	74
3.26	Extração de proteínas totais.....	74
3.27	Ensaio de Western Blot.....	75
3.28	Reações de RT-PCR semiquantitativo.....	76
3.29	Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA).....	77
3.30	Reações de imunoprecipitação do complexo APUM-mRNA	78
4.	Resultados.....	80
4.1	Análise da capacidade de ligação a RNA das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3	80
4.2	Ensaio de interação “ <i>in vitro</i> ” entre o domínio de ligação PUF-2 e o transcrito NRE.....	83
4.3	Utilização de uma biblioteca de cDNA com fragmentos entre 500-1500 pb para identificação de candidatos a alvo de APUM-1, APUM-2 e APUM-3 em ensaios de triplo-híbrido	85
4.4	Construção e análise de uma biblioteca de cDNA com fragmentos entre 50-150 pb.....	86
4.5	Utilização da biblioteca de cDNA com fragmentos entre 50-150 pb para a identificação de candidatos a alvo das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 em ensaios de triplo-híbrido.....	87
4.6	Expressão das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 em tecido de calo.....	93
4.7	Construção e análise de uma biblioteca de cDNA de calo com fragmentos entre 50-150pb	94
4.8	Utilização da biblioteca de cDNA de calo com fragmentos entre 50-150 pb para a identificação de candidatos a alvo das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 em ensaios de triplo-híbrido.....	95
4.9	Análise dos transcritos 3’ UTR obtidos nos ensaios de triplo-híbrido.....	97
4.10	Interação das proteínas APUM-1 e APUM-3 com os transcritos 3’ UTR identificados nos ensaios de triplo-híbrido.....	102
4.11	Identificação de uma seqüência de ligação consenso para os homólogos APUM	103
4.12	Validação dos consensos e sua utilização na identificação de candidatos a alvo das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3.....	104
4.13	Análise dos nucleotídeos adjacentes ao motivo de ligação a APUM	108
4.14	Análise semiquantitativa da expressão dos transcritos candidatos a alvo em plantas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 antisense.....	112

4.15 Expressão e purificação das proteínas recombinantes produzidas pelos mensageiros candidatos a alvo das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3.....	115
4.16 Análises semiquantitativas da expressão das proteínas CLAVATA-1, WUSCHEL e FASCIATA-2 nas plantas antisense induzíveis para APUM-1, APUM-2 e APUM-3	117
4.17 Imunoprecipitação do complexo APUM-mRNA do extrato proteico da planta selvagem	119
4.18 Análise computacional de todos os homólogos PUF em <i>Arabidopsis thaliana</i>	121
4.19 Predição da especificidade de ligação das proteínas APUM de <i>Arabidopsis thaliana</i>	128
4.20 Ligação de APUM-4, APUM-5 e APUM-6 ao transcrito NRE.....	130
4.21 Análise da capacidade de ligação de APUM-7 a RNA	133
4.22 Análise da influência da mutação não conservada no domínio PUF-7 em sua capacidade de ligação a RNA.....	134
5.0 Discussões.....	136
5.1 APUM-1, APUM-2 e APUM-3 são proteínas da família PUF evolutivamente conservadas.....	136
5.2 Utilização do sistema triplo-híbrido de levedura na identificação de mensageiros candidatos a alvo das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3.....	137
5.3 Utilização do elemento de ligação a APUM na identificação de mensageiros regulados pelas proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3.....	139
5.4 Papel das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 no caminho dos fatores WUSCHEL e CLAVATA-1.....	140
5.5 Presença de um grande número de transcritos contendo o elemento de ligação a APUM.....	145
5.6 <i>Arabidopsis</i> é o organismo com o maior número de homólogos PUF	147
5.7 <i>Arabidopsis thaliana</i> possui seis homólogos PUF com a mesma especificidade de ligação a RNA.....	148
5.8 Proteínas APUM do grupo II falham em reconhecer RNA	151
6. Conclusões.....	153
7. Bibliografia.....	155

1.Introdução

Embora grande parte da regulação da expressão gênica de um organismo eucarioto aconteça ao nível da transcrição, a regulação da estabilidade, localização e tradução do RNA mensageiro (mRNA) está diretamente relacionada ao sucesso da embriogênese, dos estágios mais tardios do desenvolvimento, da proliferação de células tronco e também da determinação do sexo do organismo animal (Kuersten & Goodwin, 2003).

A regulação traducional do mRNA geralmente ocorre através da interação de fatores específicos com regiões reguladoras nas extremidades 3' não traduzidas (3' UTR) dos transcritos. A interação entre os fatores controladores e essas regiões não traduzidas resultam na ativação ou repressão do mRNA, controlando assim a tradução espacial e temporal dos mesmos (Mazumder et al., 2003). A regulação traducional através da ligação de proteínas a elementos na extremidade 5' não traduzida (5' UTR) dos transcritos também tem sido descrita na literatura, porém, a ocorrência desse tipo de regulação parece ser muito maior na região 3' UTR (Mazumder et al., 2003; Wilkie et al., 2003).

1.1 Regulação ao nível da tradução

A ativação da tradução de um RNA mensageiro eucariótico pode ser dividida em 3 etapas básicas: 1) Ligação da subunidade ribossomal 40S próximo ao resíduo 7-metilguanosina (CAP), envolvendo também a ligação de vários fatores de iniciação (eIFs); 2) Identificação do códon inicial pela subunidade ribossomal 40S associada aos fatores de iniciação; 3) Liberação dos fatores de iniciação e subsequente interação com a subunidade ribossomal 60S, formando o ribossomo 80S, competente para promover toda a elongação da cadeia (Fig. 1).

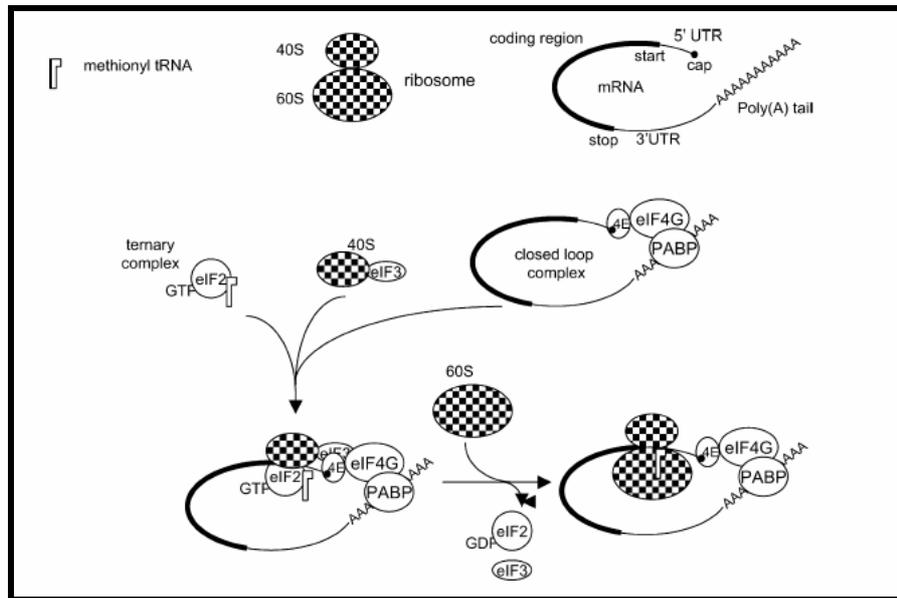


Figura 1: Processo de tradução de um mRNA em eucarioto. O esquema mostra os fatores de iniciação da tradução (eIFs) responsáveis desde a circularização da molécula do mensageiro, através de interações com as proteínas de ligação a 7-metilguanósina (CAP) e as proteínas de ligação à cauda poli A (PABP), até o reconhecimento da maquinaria de tradução e a formação do ribossomo 80S (de Moor et al., 2005).

Embora o 7-metil guanósina (CAP) e a cauda poli-A se localizem nos extremos da molécula do mensageiro, esses dois elementos atuam sinergicamente para estimular a tradução. Isso é possível devido a capacidade de interação do fator de iniciação eIF4G tanto com o fator eIF4E de ligação ao CAP, quanto com a proteína de ligação à cauda poli-A (PABP), circularizando o mensageiro, estabilizando o mesmo e facilitando a reciclagem dos ribossomos conforme a tradução é terminada (Fig. 1) (de Moor et al., 2005). Dessa forma, pode-se entender como seqüências de nucleotídeos em regiões geralmente distantes do códon iniciador e terminador podem ser responsáveis pelo controle da tradução.

Em geral, o tamanho da cauda poli-A é o principal fator controlador da tradução na oogênese e nos estágios iniciais do desenvolvimento animal. Em muitos casos, uma grande cauda poli-A (entre 80 - 500 nucleotídeos) é relacionada à mRNAs traducionalmente ativos, enquanto

caudas curtas (20 - 50 nucleotídeos) são relacionadas a transcritos inativos (de Moor et al., 2005). Muitos desses mRNAs regulados são transcritos maternos, que são estocados em uma forma não traduzida e tornam-se traducionalmente ativos em um estágio específico do oócito ou nos estágios iniciais do desenvolvimento. Um exemplo bem caracterizado ocorre em oócitos em desenvolvimento de *Xenopus leavis*, onde o mensageiro *CICLINA B1* é traducionalmente reprimido através de elementos de poliadenilação citoplasmática (CPE) presentes na região 3' UTR do transcrito. Para evitar a ativação da tradução, a proteína de ligação ao elemento de poliadenilação (CPEB) interage com a proteína MASKIN, que compete com o fator de iniciação eIF4G pela ligação ao fator de iniciação eIF4E (Fig. 2). Durante a maturação do oócito, o mensageiro de *CICLINA B1* é ativado através de um processo que requer poliadenilação citoplasmática. Nesse processo, a proteína MASKIN é fosforilada e, por conseqüência, a interação com o fator de iniciação eIF4E é perdida. O mRNA é então poliadenilado e ligado por proteínas de ligação à cauda poli-A (PABP), que por sua vez interagem com fator de iniciação eIF4G e circularizam o transcrito (Fig. 2) (Macdonald, 2001). Esse processo parece ser comum para todos os transcritos que possuem elementos de poliadenilação citoplasmática (de Moor et al., 2005).

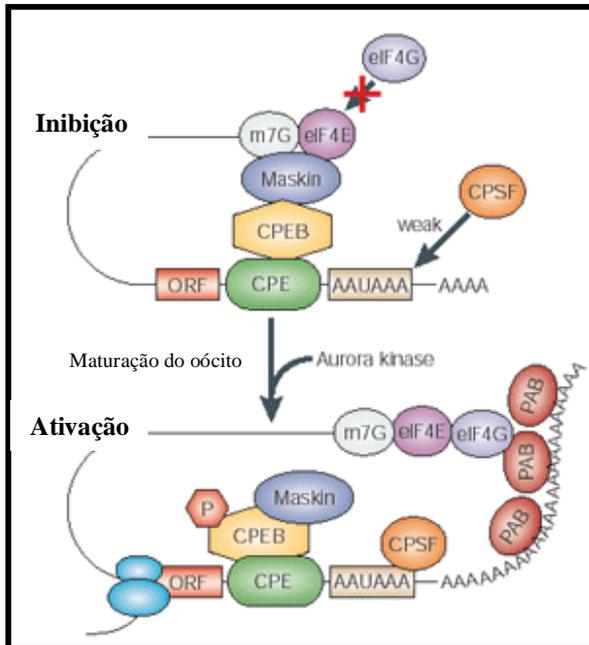


Figura 2: Exemplo de regulação traducional do transcrito materno *CICLINA B1* em oócitos de *Xenopus leavis*. A ligação da proteína MASKIN à proteína de ligação ao elemento de poliadenilação citoplasmática (CPEB) inibe a poliadenilação do transcrito pela proteína que especifica a poliadenilação (CPSF) e também a interação dos fatores de iniciação da tradução com as proteínas de ligação à cauda poli-A. Na maturação do oócito, ocorre a fosforilação da proteína CPEB, resultando na dissociação da proteína MASKIN do fator eIF4E. A ligação da proteína CPSF à sequência AAUAAA leva então ao recrutamento da proteína de extensão da cauda poli-A e, portanto, à ativação do mensageiro (Kuersten & Goodwin, 2003).

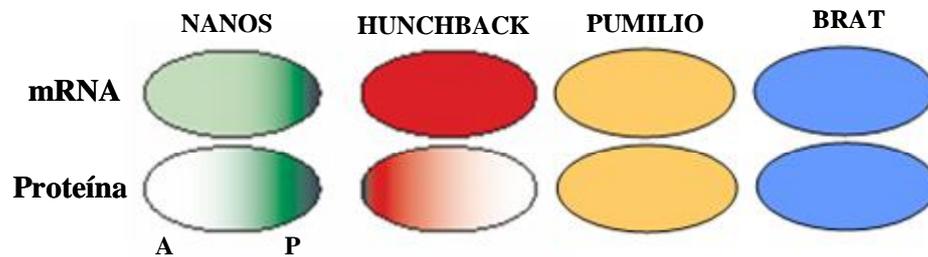
1.2 A família PUF de proteínas: Reguladores traducionais eucarióticos

Um outro exemplo de proteínas que regulam a tradução de mensageiros são as proteínas da família PUF (siglas provenientes das proteínas **P**UMILIO de *Drosophila* e **F**BF de *C. elegans*, primeiros homólogos estudados). Proteínas PUF estão presentes em todos os eucariotos e são uns dos modelos mais interessantes de reguladores traducionais durante o desenvolvimento embrionário, destino de especificação e diferenciação celular (Zamore et al., 1997; Wickens et al., 2002). Seus homólogos reprimem a tradução e/ou causam instabilidade dos mensageiros através da ligação às regiões 3' UTR dos mesmos (Wickens et al., 2002; Spassov & Jurecic, 2003b).

A proteína PUMILIO de *Drosophila melanogaster* foi o primeiro homólogo PUF estudado, sendo sua função relacionada a processos de diferenciação celular no embrião. Morfóticos são mensageiros maternos que conduzem à formação dos eixos que determinam a simetria do organismo. Embora o morfótico *HUNCHBACK* seja uniformemente expresso por

todo o embrião, a proteína, que atua na repressão da formação de estruturas abdominais da mosca (Curtis et al., 1995), é traduzida apenas na parte anterior do mesmo, permitindo assim o desenvolvimento de estruturas como a cabeça e o tórax (Fig. 3A). A inibição do mRNA *HUNCHBACK* na parte posterior acontece através da interação da proteína PUMILIO à região 3' UTR do mesmo, em um processo dependente de outros dois parceiros, chamados NANOS e BRAT, que reprimem progressivamente a tradução do mensageiro materno e criam um gradiente de concentração da proteína HUNCHBACK ao longo do eixo anterior – posterior do embrião (Fig. 3A) (Sonoda & Wharton, 1999, 2001). Devido ao fato da expressão das proteínas PUMILIO e BRAT serem uniforme por todo o embrião, NANOS torna-se o fator responsável pelo gradiente de concentração da proteína HUNCHBACK (Fig. 3A.). NANOS é uma proteína que se liga inespecificamente a RNA (Curtis et al., 1997) e a interação estável com PUMILIO só ocorre com o complexo PUMILIO*HUNCHBACK* (Sonoda & Wharton, 1999). Por outro lado, BRAT interage diretamente com o complexo ternário NANOS/PUMILIO/*HUNCHBACK* (Fig. 3B) (Sonoda & Wharton, 2001). Dessa forma, pode-se concluir que PUMILIO atua como a proteína chave no reconhecimento do mRNA, recrutando toda a maquinaria necessária para a regulação e a formação de dois pólos assimétricos que definem a segmentação corporal da mosca. Na ausência de PUMILIO, a tradução do transcrito *HUNCHBACK* é uniforme e, conseqüentemente, não há segmentação abdominal no embrião (Murata & Wharton, 1995).

A.



B.

Embrião de *Drosophila*

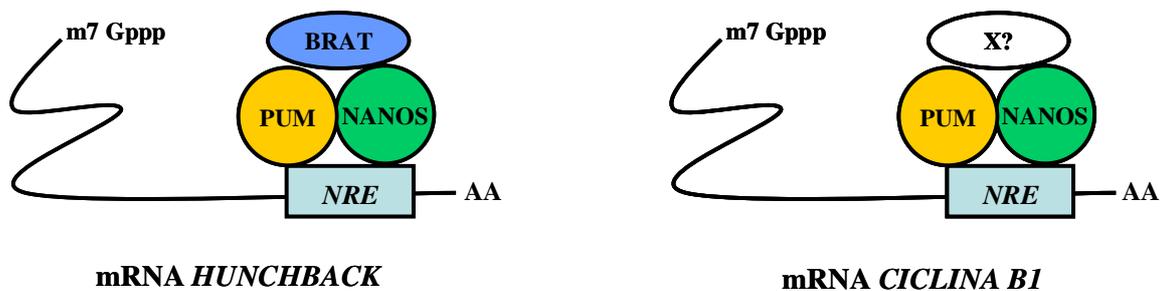


Figura 3: Regulação de mensageiros de *Drosophila* mediada pelo reconhecimento da proteína PUMILIO. A) Padrões de expressão dos fatores envolvidos na segmentação abdominal do embrião da mosca. O mensageiro materno *HUNCHBACK* é expresso por todo o embrião, no entanto, a expressão da proteína é observada somente no eixo anterior (A) do mesmo. As proteínas PUMILIO e BRAT possuem expressão uniforme, enquanto que a proteína NANOS é expressa somente na região posterior (P), local onde a repressão do transcrito *HUNCHBACK* é observada, indicando que NANOS é o fator responsável pelo gradiente de concentração da proteína *HUNCHBACK* na região anterior do embrião. B) Esquema mostrando o complexo de repressão dos mensageiros *HUNCHBACK* e *CICLINA B1*. PUMILIO reconhece uma seqüência de nucleotídeos chamada de elemento de resposta a NANOS (NRE) presente na região 3' UTR dos dois transcritos. O recrutamento do fator NANOS é necessário nos dois casos, no entanto, a ligação do fator BRAT é observada apenas para a regulação do mensageiro *HUNCHBACK*, mas não para a repressão do mRNA *CICLINA B1*.

O segundo exemplo de regulação traducional mediada por proteínas PUF foi descrito em *C. elegans*. Nesse organismo, a escolha entre a produção de oócitos ou espermatócitos é feita através do controle da tradução do mensageiro *FEM-3*, um fator de transcrição a montante da espermatogênese. A ligação do homólogo PUF chamado FBF (nome proveniente de “*FEM-3 binding factor*”) ao mensageiro, desvia a gametogênese para a produção de oócitos, permitindo assim, encontrar na natureza animais machos e hermafroditas (Zhang et al., 1997; Kuwabara, 1998). Essa regulação é dependente de uma proteína homóloga a NANOS (Kraemer et al., 1999). A demonstração de que os homólogos PUF em *Xenopus* e humano também interagem com homólogos de NANOS indica que essa interação é conservada entre as espécies (Jaruzelska et al., 2003; Nakahata et al., 2003).

Recentemente, vários estudos têm relacionado a proteína PUMILIO ao desenvolvimento neuronal de *Drosophila*, uma vez que vários alelos mutantes foram mostrados afetar a formação da memória na mosca adulta (Dubnau et al., 2003). Além disso, PUMILIO regula negativamente o fator de iniciação da tradução eIF4E na junção neuromuscular (Menon et al., 2004) e também é capaz de bloquear o ciclo celular das células germinativas primordiais na fase G2, até que estas migrem para as gônadas. Esse bloqueio ocorre através da ligação da proteína à região 3' UTR do mRNA *CICLINA B1*, através de uma seqüência muito similar àquela presente no transcrito *HUNCHBACK* (Asaoka-Taguchi et al., 1999; Kadyrova et al., 2007). Essa regulação também é dependente da proteína NANOS, no entanto, BRAT não é necessário, indicando que diferentes fatores podem ser recrutados para diferentes alvos (Fig. 3B). Caso similar ocorre com o homólogo PUF de *Xenopus laevis*, que também interfere no ciclo celular ao interagir com a região 3' UTR do mensageiro *CICLINA B1* em um mecanismo dependente de um homólogo de NANOS (Nakahata et al., 2001). Interessantemente, a região 3' UTR de mensageiros *CICLINA B1* de vários animais possui uma seqüência muito similar à necessária para a ligação de

PUMILIO ao 3' UTR de *HUNCHBACK*, indicando que a regulação de alguns mensageiros por proteínas PUF pode ser evolutivamente conservada (Spasov & Jurecic, 2003b).

Saccharomyces cerevisiae é outro organismo onde as proteínas PUF são bastante estudadas. Nesse organismo, o homólogo Puf3p promove o decaimento do mRNA *COX17* (Olivas and Parker, 2000) e os homólogos Puf4p e Puf5p promovem o decaimento do transcrito *HO*, sempre através de ligação à seqüências na região 3' UTR dos mensageiros (Jackson et al., 2004; Hook et al., 2007).

1.3 Manutenção das células tronco: Uma função ancestral atribuída às proteínas PUF

Proteínas PUF têm sido relacionadas a distintos papéis em diferentes organismos, no entanto, a manutenção e a auto-renovação das células tronco é atribuída como uma função ancestral dessa família (Wickens et al., 2002). Em *Drosophila*, PUMILIO garante a proliferação mitótica e a auto-renovação das células tronco germinativas no ovário da mosca adulta (Lin & Spradling, 1997; Forbes & Lehmann, 1998; Parisi & Lin, 1999). Em *C. elegans*, FBF também controla a manutenção de células tronco germinativas através da regulação do mensageiro *GLD-1* (Crittenden et al., 2002). Em planária, o homólogo PUF *DJPum* foi encontrado em neoblastos, células capazes de se auto - renovar e também gerar células diferenciadas durante a regeneração do organismo. A inativação do homólogo PUF através de RNA interferente resultou em uma drástica redução dos neoblastos, causando a incapacidade de regeneração do organismo (Salvetti et al., 2005). Em mamíferos, o homólogo PUMILIO-2 é expresso nas células tronco embrionárias e germinativas de humano (Moore et al., 2003), enquanto os homólogos Pum1 e Pum2 de rato são expressos em células hematopoiéticas do feto e de adultos e também nas células tronco neuronais do feto (Spasov & Jurecic, 2003a).

A capacidade de sustentar a mitose em detrimento à diferenciação também pode ser estendida para organismos unicelulares. Em *Saccharomyces cerevisiae*, linhagens que não possuem o homólogo Puf5p dividem-se menos se comparadas às linhagens selvagens, enquanto que cepas que superexpressam Puf5p dividem-se mais vezes e vivem por mais tempo (Kennedy et al., 1997). Neste caso, a célula mãe pode ser comparada com uma célula tronco, onde a mitose não é sustentada na falta de Puf5p. Analogamente, em *Dictyostelium*, o homólogo PufA promove divisões vegetativas e inibe a diferenciação através da inibição da tradução do mensageiro de uma subunidade da proteína quinase dependente de cAMP (PKA-C), indispensável para a diferenciação em corpo de frutificação e esporos em resposta à falta de nutrientes no meio (Souza et al., 1999). Em mutantes PufA, as células deixam a mitose precocemente e se diferenciam (Souza et al., 1999).

1.4 Características estruturais e moleculares das proteínas PUF

Proteínas da família PUF são facilmente identificadas pela presença de 8 cópias imperfeitas de aproximadamente 36 aminoácidos cada, enoveladas em três α -hélices e alinhadas em seqüência na região C-terminal da proteína (Figura 4A e 4B) (Edwards et al., 2001; Wang et al., 2001). Essa estrutura, responsável pela capacidade de ligação a RNA da proteína, vem sendo chamada na literatura como domínio homólogo ao PUMILIO (PUM – HD) (Zamore et al., 1997) ou domínio PUF de ligação (Zhang et al., 1997). Ensaio de cristalização do domínio PUF da proteína PUMILIO de *Drosophila* mostraram que as oito repetições alinhadas em seqüência formam uma molécula estendida na forma de arco (Edwards et al., 2001) (Figura 4B). Ensaio adicionais de cristalização do domínio PUF da proteína PUMILIO-1 de humano em complexo com a região NRE do transcrito *HUNCHBACK* de *Drosophila* mostraram que cada uma das oito

repetições faz contato com uma base diferente do RNA mensageiro (Fig. 4C e 4D) (Wang et al., 2002).

A especificidade da ligação ao RNA é determinada pela presença de 3 resíduos de aminoácidos conservados nas posições 12, 13 e 16 de cada repetição (Fig. 4C) (Wang et al., 2002). Experimentos de substituições dos resíduos 12, 13 e 16 da repetição 6 (que reconhece uracila) por resíduos presentes nas mesmas posições da repetição 7 (que reconhece guanina), foram suficientes para tornar a repetição 6 capaz de reconhecer uma guanina (Wang et al., 2002). Resultados semelhantes foram obtidos para a proteína FBF de *C. elegans*, onde as substituições nos resíduos 12, 13 e 16 das repetições 2, 3 e 6 foram suficientes para mudar as especificidades das mesmas (Opperman et al., 2005). Esses dados sugerem que proteínas PUF de diferentes organismos reconhecem o RNA através do mesmo mecanismo. Como prova desse comportamento, foi demonstrado que alterações nos resíduos 12, 13 e 16 levam a produção de proteínas PUF com diferentes especificidades ao mensageiro (Cheong & Hall, 2006).

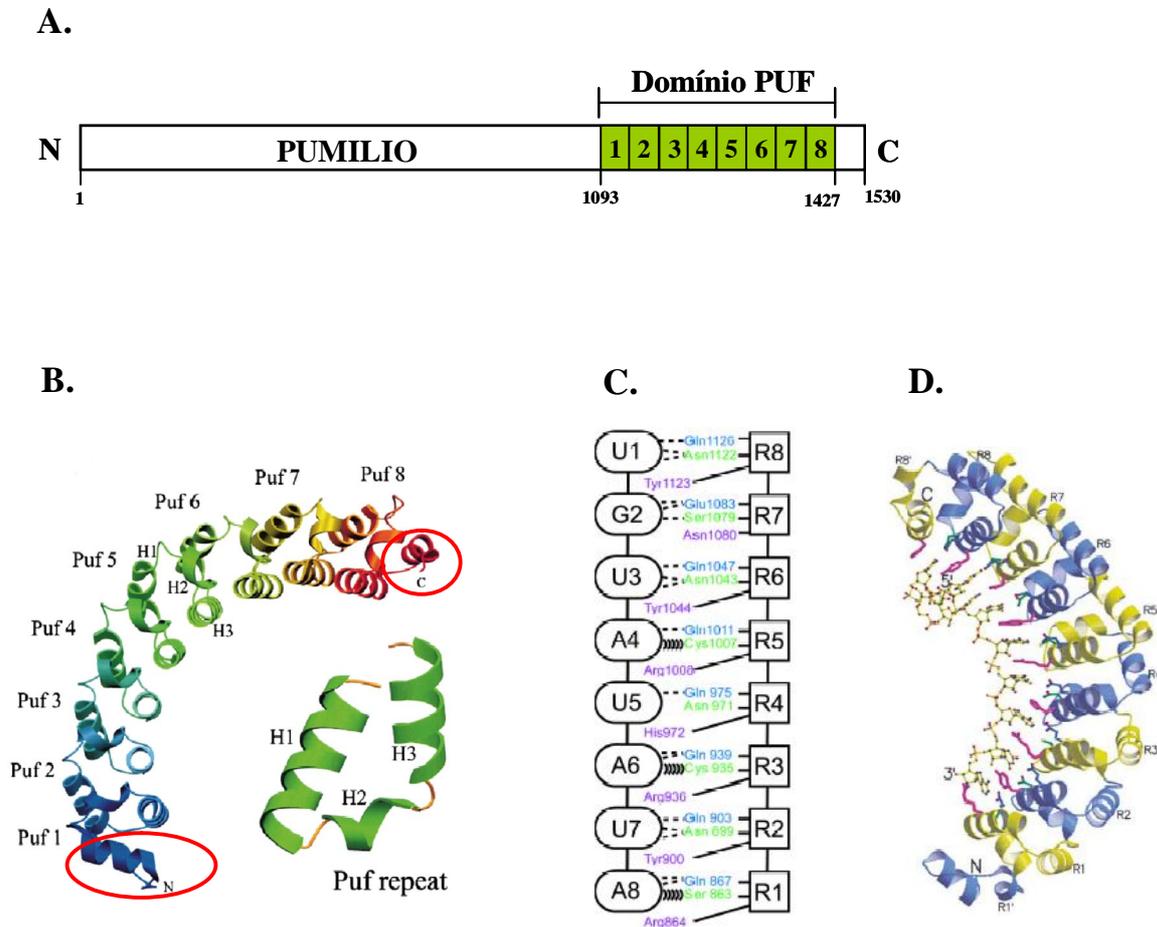


Figura 4: Característica molecular do domínio PUF de ligação a RNA presente nas proteínas da família PUF. A) Esquema representando a proteína PUMILIO de *Drosophila*. O domínio PUF de ligação a RNA é constituído por oito repetições alinhadas em seqüência e localizadas na região C-terminal da proteína. B) Cada repetição é enovelada em três α -hélices, H1, H2 e H3. Os círculos em vermelho indicam seqüências evolutivamente conservadas localizadas nas extremidades N – terminal e C – terminal do domínio PUF de ligação (Edwards et al., 2001). C) Cada uma das oito repetições (R1 a R8) do domínio PUF do homólogo PUMILIO-1 de humano interage com uma base do RNA (representadas nas estruturas ovas). Os três resíduos responsáveis pelo contato direto com o RNA se encontram na hélice H2 de cada repetição e estão representados com as cores verde, azul e roxo. A interação proteína/RNA é obtida através da formação de pontes de hidrogênio (linhas pontilhadas), interações hidrofóbicas (parênteses) e interações empilhamento entre o terceiro resíduo (em roxo) e o anel aromático da base do RNA (Cheong & Hall, 2006). D) Estrutura do complexo entre o domínio PUF de PUMILIO-1 de humano e a seqüência NRE do mRNA *HUNCHBACK*. O mensageiro “em estrutura em barras e bolas” é ligado na parte côncava do domínio (Wang et al., 2002).

1.5 Uma característica comum entre os diferentes mensageiros regulados por proteínas PUF

Em *Drosophila*, o reconhecimento da região 3' UTR do mRNA *HUNCHBACK* pela proteína PUMILIO ocorre através de uma região de 32 nucleotídeos chamada de Elemento de Resposta a NANOS (NRE). Essa denominação é proveniente de observações iniciais de que mutações nessa região causavam um fenótipo idêntico à falta da proteína NANOS no embrião da mosca (Wharton & Struhl, 1989). Ensaios de interação mostraram que o reconhecimento da sequência NRE por PUMILIO é dependente da ligação a duas regiões do transcrito contendo um trinucleotídeo UGU. Essas duas regiões de ligação foram chamadas de Box A e Box B (Tabela 1) (Murata & Wharton, 1995).

À medida que alvos de diferentes homólogos PUF foram sendo conhecidos, foi possível observar que a região característica de reconhecimento dos transcritos é uma sequência de 8 nucleotídeos que engloba um tetranucleotídeo UGUA/U seguido de um trinucleotídeo AUA/U, separados entre si por uma, duas ou três bases (Tabela 1). Essas observações sugerem que o Box B identificado no transcrito NRE de *Drosophila* engloba somente o primeiro tetranucleotídeo UGUA reconhecido pela proteína e que sua extensão deve ser a sequência UGUACAUA (Tabela 1).

Tabela 1: Motivos de ligação reconhecidos por homólogos PUF de diferentes organismos. As seqüências em azul no transcrito *HUNCHBACK* indicam as regiões de reconhecimento da proteína PUMILIO de *Drosophila*. Essas regiões são chamadas de Box A e Box B, respectivamente. As seqüências em vermelho são os nucleotídeos conservados em todos os alvos identificados até o momento. Essas seqüências são muito similares ao Box B quando a seqüência CAUA (marcada em cinza) é considerada.

Organismo (Homólogo PUF)	Seqüência de Ligação	mRNA alvo
<i>Drosophila</i> (PUMILIO)	AUUAUUUU GUUGU CGAAAA UUGUA CAUAAGCC	<i>HUNCHBACK</i> (<i>NRE</i>)
<i>Xenopus</i> (Xpum2)	UC UGUAAAUA	<i>CICLINA B1</i>
<i>Saccharomyces</i> (Puf3p)	CU UGUAUUA	<i>COX17</i>
<i>Saccharomyces</i> (Puf3p)	CC UGUAAAUA	<i>COX17</i>
Humano (PUM-2)	CU UGUACAUA	<i>SDAD1</i>
<i>Dictyostelium</i> (PufA)	UG UGUCAUA	<i>PKA-C</i>
<i>Saccharomyces</i> (Puf4p)	UG UGUAUAUA	<i>HO</i>
<i>C. elegans</i> (FBF)	UGUAAUAUU	<i>FBF</i>
<i>C. elegans</i> (FBF)	CUGUAUCAUU	<i>FOG-1</i>
<i>C. elegans</i> (FBF)	UGUGUCAUU	<i>FEM-3</i>
<i>C. elegans</i> (FBF)	AUGUGCCAUA	<i>GLD-1</i>
<i>Saccharomyces</i> (Puf5p)	GU UGUAUGUAAU	<i>HO</i>

A identificação de seqüências consenso para os homólogos PUF de levedura (Gerber et al., 2004), *Drosophila* (Gerber et al., 2006) e humano (Galgano et al., 2008) mostraram que o tetranucleotídeo UGUA e o trinucleotídeo AUA são de fato os alvos preferenciais das proteínas PUF (Figura 5). Interessantemente, nenhum outro transcrito conhecido possui seqüências com similaridade ao Box A do transcrito NRE de *Drosophila*.

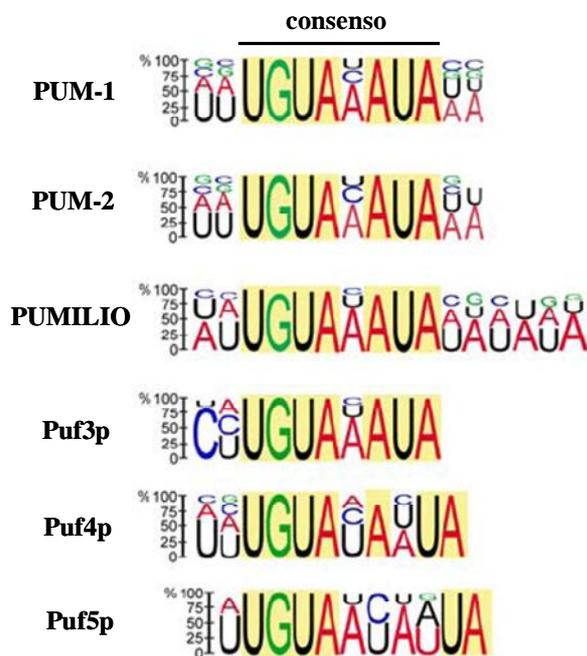


Figura 5: Sequências consenso de ligação dos homólogos PUF de levedura (Puf3p, Puf4p, Puf5p), *Drosophila* (PUMILIO) e humano (PUM-1 e PUM-2). A altura das letras indica a ocorrência do nucleotídeo em cada posição (Galgano et al., 2008).

1.6 Mecanismo de ação das proteínas PUF

Conforme mencionado anteriormente, em oócitos e nos estágios iniciais do embrião animal, muitos mRNAs com cauda poli-A curta são estáveis, mas traducionalmente inativos. Esses mensageiros decaem somente em estágios mais tardios do desenvolvimento. Por outro lado, em levedura, mRNAs com cauda poli-A curta são rapidamente degradados, em um processo

de clivagem do 7-metilguanosa (CAP) chamado “decapping”, seguido de degradação do mensageiro por uma exonuclease com atividade 5' – 3' (Tucker & Parker, 2000). A diferença entre a repressão e o decaimento dos transcritos em embriões animais e leveduras pode ser atribuída ao fato de que o “decapping” dependente da deadenilação é muito mais ativo em leveduras (Wickens et al., 1997). Por exemplo, se o fator de iniciação eIF4E fosse impedido de se ligar ao CAP, sua exposição acarretaria decaimento do mensageiro em leveduras e repressão no embrião animal (Wickens et al., 2002).

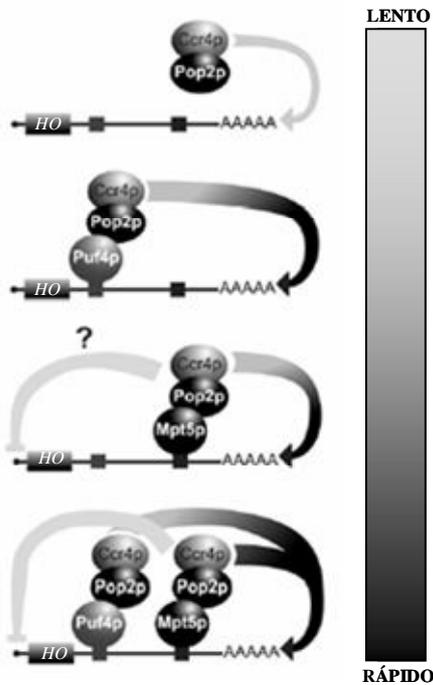
A repressão por homólogos PUF tem sido relacionada à diminuição da cauda poli-A dos mensageiros regulados. Em *Drosophila*, mutações no transcrito *HUNCHBACK* que impedem a ligação da proteína PUMILIO levam a um aumento da cauda poli-A do mensageiro (Wreden et al., 1997). Caso similar ocorre quando o mensageiro *FEM-3* é impedido de ser regulado pelo homólogo FBF de *C. elegans* (Ahringer & Kimble, 1991). Em levedura, os homólogos Puf3p e Puf4p/Puf5p aumentam a taxa de deadenilação dos mRNAs alvos *COX17* e *HO*, respectivamente (Olivas & Parker, 2000; Jackson et al., 2004; Hook et al., 2007).

Além do envolvimento na deadenilação dos mensageiros alvos, o homólogo Puf3p de levedura está relacionado a um segundo passo da degradação. Em cepas Puf3p mutantes, o transcrito *COX17* persiste por tempos bastante prolongados como uma população contendo uma cauda poli-A curta de aproximadamente 0 a 25 nucleotídeos. Análise do transcrito *COX17* em uma cepa mutante no gene *DCPI*, que codifica uma enzima relacionada ao “decapping”, mostrou que o mRNA é estabilizado com uma meia vida 7 vezes maior, sugerindo que além de acelerar a deadenilação, Puf3p acelera o “decapping” dos mensageiros parcialmente ou totalmente deadenilados (Olivas & Parker, 2000). Similarmente, PUMILIO pode reprimir o transcrito *HUNCHBACK* “*in vivo*” através de um mecanismo que independe do tamanho da cauda poli A (Chagnovich & Lehmann, 2001).

Uma hipótese para o mecanismo de ação das proteínas PUF considera que a ligação ao transcrito alvo é acompanhada do recrutamento de complexos protéicos contendo deadenilases. Artigos recentes têm demonstrado que em levedura, as proteínas Puf4p e Puf5p interagem diretamente com a deadenilase POP2 para regulação do transcrito *HO*. A enzima deadenilase POP2 é um componente do complexo NOT-CCR4-POP2, o maior complexo de deadenilases presente em levedura (Tucker et al., 2002; Goldstrohm et al., 2006; Hook et al., 2007). Cepas selvagens em Puf4p e Puf5p inibem totalmente a expressão do mRNA *HO*, enquanto que a redução é parcial em mutantes individuais para as duas proteínas (Hook et al., 2007). Interessantemente, a regulação do transcrito *HO* por esses dois homólogos PUF depende exclusivamente da interação com a deadenilase POP2, mas a atividade de deadenilase dessa proteína não é necessária (Goldstrohm et al., 2006; Goldstrohm et al., 2007; Hook et al., 2007). Quem de fato atua na deadenilação do transcrito *HO* é a deadenilase CCR4 (Goldstrohm et al., 2007; Hook et al., 2007). Dessa forma, conclui-se que POP2 atua como uma ponte entre Puf4p ou Puf5p e CCR4 (Fig. 6A).

Embora as proteínas Puf4p e Puf5p de levedura atuem no recrutamento do mesmo complexo de deadenilase, o mecanismo de ação desses homólogos parece diferir em alguns aspectos: 1) Mutação na deadenilase CCR4 bloqueia a regulação do mRNA *HO* por Puf4p (Hook et al., 2007); 2) A mesma mutação somente diminui a regulação do mesmo transcrito por Puf5p (Goldstrohm et al., 2006). Além disso, mensageiros *HO* totalmente adenilados acumulados em CCR4 mutantes podem ser reprimidos através da superexpressão de Puf5p (Hook et al., 2007). Estes resultados indicam que a repressão por Puf5p ocorre através de um segundo mecanismo independente da deadenilação, sugerindo que outros complexos ou outros fatores, dependentes de POP2, são necessários para a total atividade da proteína (Figura 6A).

A.



B.

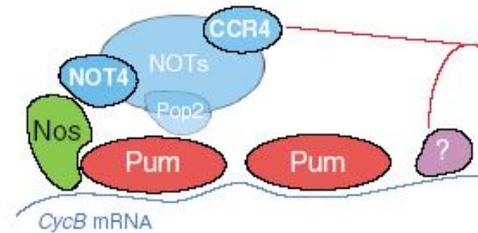


Figura 6: Mecanismo de atuação das proteínas PUF na regulação do mRNA. A) A regulação total do transcrito *HO* de levedura requer a presença dos homólogos Puf4p e Puf5p (este, também chamado de Mpt5p). As duas proteínas atuam como fatores de reconhecimento do mensageiro e recrutam a deadenilase CCR4 através da interação com a deadenilase POP2. A regulação por Puf4p ocorre exclusivamente através da deadenilação do mensageiro por CCR4, enquanto que a regulação mediada por Puf5p ocorre tanto pela deadenilação do mRNA pela deadenilase CCR4 quanto pela interação com possíveis fatores de “deccapping” ainda não confirmados (Hook et al., 2007). B) Em *Drosophila*, a regulação do transcrito *CICLINA B1* por PUMILIO também envolve o recrutamento de POP2 e a atividade deadenilase de CCR4. No entanto, a estabilização do complexo de deadenilases só é obtida através da interação de NANOS com a proteína NOT4 do complexo NOT-CCR4-POP2 (Kadyrova et al., 2007).

Dados recentes indicam que o mecanismo de regulação das proteínas PUF pode ser conservado entre as espécies. O homólogo Puf5p de levedura é capaz de ligar especificamente aos homólogos POP2 de *C. elegans* (CCF-1) e de humano (CNOT-8). Por outro lado, PUMILIO-1 de humano liga-se tanto a CNOT-8 quanto a POP2 de levedura (Goldstrohm et al., 2006). Além disso, a regulação do mensageiro *COX17* por Puf3p também é dependente do complexo NOT-CCR4-POP2 (Tucker et al., 2002).

Como apresentado na secção 1.2, a regulação do transcrito *HUNCHBACK* por PUMILIO é dependente das proteínas NANOS e BRAT, enquanto a regulação do mensageiro *CICLINA B1* é dependente apenas de NANOS (Fig 3B). Ao contrário de levedura, onde várias proteínas foram identificadas serem capazes de ligar diretamente ao homólogo Puf5p (Chen & Kurjan, 1997), a interação da proteína NANOS só ocorre com o complexo PUMILIO/*NRE* e nunca com a proteína PUMILIO isolada (Sonoda & Wharton, 1999). Para investigar se a regulação em *Drosophila* também é dependente das mesmas deadenilases descritas em levedura, Kadyrova e colaboradores, 2007 estudaram o papel do complexo de deadenilase NOT-CCR4-POP2 na repressão do mensageiro *CICLINA B1*. O estudo mostrou que PUMILIO interage diretamente com o ortólogo POP2 de *Drosophila* e também com os ortólogos CNOT7 e CNOT8 de humano. Além disso, os experimentos mostraram que ao contrário do que acontece em levedura, a regulação também é dependente da interação com a proteína NOT4, pertencente ao complexo NOT-CCR4-POP2. O reconhecimento de NOT4 é garantido pela interação com o fator NANOS, revelando que o papel de NANOS é estabilizar o complexo de deadenilase (Fig. 6B). Além disso, os dados confirmam um papel geral para as proteínas PUF: Reconhecer o mRNA a ser regulado e servir como âncora para o recrutamento dos fatores necessários para a regulação.

1.7 Proteínas PUF em plantas

Embora a investigação da função das proteínas PUF esteja bastante avançada em animais e também em levedura, as informações sobre essa família de proteínas em plantas são bastante superficiais, limitando-se a artigos que mostram aumento ou diminuição da expressão de homólogos em experimentos de microarranjos (Zanetti et al., 2005; Cadman et al., 2006).

Nosso laboratório tem como principal interesse a investigação da função de três homólogos PUF de *Arabidopsis thaliana* (At2g29200, At2g29190 e At2g29140) com aproximadamente 90% de identidade entre si (Fig. 7A). Uma vez que a região C-terminal das três proteínas apresenta uma identidade de aproximadamente 50% com o domínio PUF do homólogo PUMILIO de *Drosophila* (Fig. 7B), os genes foram nomeados de *Arabidopsis* PUMILIO (APUM). Assim, os homólogos em estudo at2g29200, At2g29190 e at2g29140 foram anotados no banco de dados de *Arabidopsis* “The *Arabidopsis* Information Resource” (TAIR) como APUM-1, APUM-2 e APUM-3, respectivamente.

B.

			Repetição 1		Repetição 2		Repetição 3
<i>Drosophila_PUM</i>	1		GRSRLLEDFRNQRYPNLQLRDLANETIVEFSQDQHGSRFTIQKLERATAAEKQMVFSSEILAAAYSIMLTDVFGNYVIQKFEFGTPEOKNTLGMQVKGHVLQALALQMYGCRVIQKALESTSPBQQQE				
<i>At2g29200_APUM-1</i>	610		FGSSMLEEFKSNKTRGFELEIAGHVVEFSSDQYGSRFIQKLETATDDEKNMVYBEIEMPOALVLMTDVFGNYVIQKFFEHLGPPORRELAERLEFDHVLPLSLQMYGCRVIQKALEVVDLDQKIK				
<i>At2g29190_APUM-2</i>	614		FGSSMLEEFKSNKTRGFELEIAGHVVEFSSDQYGSRFIQKLETATDDEKNMVYBEIEMPHALALMTDVFNGYVIQKFFEHLGPPORRELAERLEFDHVLPLSLQMYGCRVIQKALEVVDLDQKIK				
<i>At2g29140_APUM-3</i>	606		FGSSMLEEFKSNKTRGFELEIAGHVVEFSSDQYGSRFIQKLETATDDEKNMVYBEIEMPKALALMTDVFNGYVIQKFFEHLGPPORRELAERLEFDHVLPLSLQMYGCRVIQKALEVVDLDQKIQ				
			Repetição 4		Repetição 5		Repetição 6
<i>Drosophila_PUM</i>	124		IVHELDGHVLRKCVKDQNGNHVQKCECVDPVALQFIINAFKGOVYLSLSTHPYGCRVIQRVLEHCT-AEQTPIILDELHEHTEQLIQDQYGNVVIQHVLEHGKQEDKSIILNSVRGKVLVLSQHK				
<i>At2g29200_APUM-1</i>	735		MVKELDGHVMRCVRDQNGNHVQKCECVPEENIEFIIISFFGHVVTLSTHPYGCRVIQRVLEHCHDPDTQSKVMEEILSTVSNLAQDQYGNVVIQHVLEHGKPDERTVIIKELAGKIVQMSQQK				
<i>At2g29190_APUM-2</i>	739		MVKELDGHVMRCVRDQNGNHVQKCECVPEENIEFIIISFFGHVVTLSTHPYGCRVIQRVLEHCHDPDTQSKVMDEIEMSTISMLAQDQYGNVVIQHVLEHGKPDERTVIIKELAGKIVQMSQQK				
<i>At2g29140_APUM-3</i>	731		MVKELDGHVMRCVRDQNGNHVQKCECVPEENIEFIIISFFGHVVTLSTHPYGCRVIQRVLEHCHNPDTQSKVMEEILSTVSNLAQDQYGNVVIQHVLEHGKPDERTVIIKELAGKIVQMSQQK				
			Repetição 7		Repetição 8		
<i>Drosophila_PUM</i>	248		FASNVVEKCVTHATRGERTGLDEVCFTN--DNALHVMMDQYANYVQKMLDVSPTQLKLMTRIRKNMAALRKYTYGKHINAKLEKYYMK-----				
<i>At2g29200_APUM-1</i>	860		FASNVVEKCLTFGGPEEREELVNEMLGTTDENEPLQAMMKDQFANYVQKVLCTCDDQORELILTRIKVHLTALKKYTYGKHIVARIEKLVAGERRMALQSLTQPQADLK				
<i>At2g29190_APUM-2</i>	864		FASNVVEKCLTFGGPEEREELVNEMLGTTDENEPLQAMMKDQFANYVQKVLCTCDDQORELILTRIKVHLNALKKYTYGKHIVARVEKLVAGERRMALQSLTQPQMA---				
<i>At2g29140_APUM-3</i>	856		FASNVVEKCLTFGGPEEREELVNEMLGTTDENEPLQAMMKDQFANYVQKVLCTCDDQORELILTRIKVHLNALKKYTYGKHIVARVEKLVAGERRMALQSLPQPLVA---				

Figura 7: Alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 no programa Clustal W. A) Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos dos três homólogos APUM de interesse em nosso laboratório. Os asteriscos representam os resíduos onde existe identidade entre as três seqüências. B) Comparação das regiões C-terminal de APUM-1, APUM-2 e APUM-3 com a seqüência de aminoácidos do domínio PUF de ligação a RNA do homólogo PUMILIO de *Drosophila*. A identidade é indicada com a cor preta e a similaridade com a cor cinza. As regiões referentes às oito repetições do domínio PUF estão indicadas. Cada repetição é constituída por aproximadamente 36 resíduos de aminoácidos. A região N-terminal do homólogo de *Drosophila* não apresenta similaridade com a região N-Teminal dos homólogos APUM.

1.8 Localização da expressão dos genes *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3* em *Arabidopsis*

Experimentos de localização realizados em nosso laboratório utilizando o gene da β -glucuronidase (*GUS*) sob o controle dos promotores de *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3*, mostraram que os três genes são expressos em mesmo tempo e espaço no meristema do caule, meristema da raiz principal, meristema das raízes secundárias e também em primórdios foliares (Fig. 8), regiões onde ocorre grande proliferação celular.

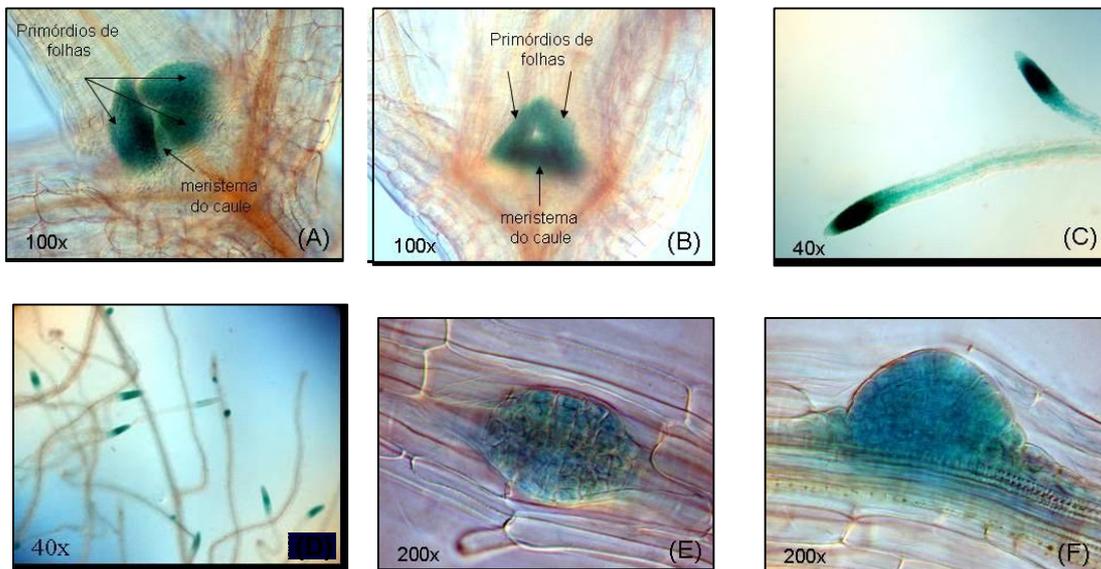


Figura 8: Expressão do gene repórter β - glucuronidase (*GUS*) sob o domínio do promotor do gene *APUM-1*. As plantas mostradas carregam a construção *APUM-1::GUS::NOS*. A) e B) Planta de três semanas apresentando expressão do repórter no meristema apical do caule e nos primórdios foliares. C) e D) Expressão do repórter no meristema apical da raiz principal. E) e F) Expressão do repórter nos meristemas apicais das raízes laterais em desenvolvimento. Plantas carregando as construções *APUM-2::GUS::NOS* e *APUM-3::GUS::NOS* possuem o mesmo padrão de expressão do repórter (Favaro EC, 2007).

Os meristemas são conjuntos de células que conservam as propriedades embrionárias durante todo o ciclo de vida do vegetal, sendo que o controle das divisões e a determinação do

destino final de suas células são controlados por mecanismos de sinalização extracelulares e intracelulares (Weigel & Jurgens, 2002).

O meristema apical do caule (SAM, do inglês “shoot apical meristem”) é a fonte de células para todos os órgãos aéreos produzidos após a germinação. Esse meristema consiste de um pequeno número de células indiferenciadas localizadas entre os dois cotilédones (Fig. 9A). Após a germinação, o meristema inicia uma divisão celular altamente coordenada, que continua durante todo o crescimento vegetativo. Baseado em estudos histológicos, o SAM é subdividido em 3 regiões, chamadas de zona central (CZ), zona periférica (PZ) e zona medular (RZ) (Fig. 9A) (Sharma et al., 2003). A zona central, pequena e situada centralmente em direção ao topo do SAM, contém uma população de células totipotentes que se divide lentamente. Assim, as células filhas são deslocadas gradualmente da zona central para a zona periférica e para a zona medular, onde passam a se dividir mais rapidamente (Baurle & Laux, 2003). Estas células são posteriormente recrutadas para os programas de divisão celular dos órgãos laterais e do caule, respectivamente.

As células do SAM também podem ser agrupadas de acordo com suas camadas clonais, sendo divididas em epiderme (camada L1), subepiderme (camada L2) e camada interna (L3) (Fig. 9A) (Sharma et al., 2003). A divisão na epiderme e subepiderme é anticlinal (plano perpendicular em relação às camadas). Estas células são posteriormente incorporadas para a epiderme e a subepiderme de órgãos laterais (folhas e órgãos florais). A divisão na camada interna é mais complexa e suas células filhas diferenciadas entram para o tecido interno de órgãos laterais e para a casca interna no caule.

O meristema apical da raiz (RAM, do inglês “root apical meristem”) é a fonte produtora da parte subterrânea do vegetal (Weigel & Jurgens, 2002). Quando comparado ao SAM, esse meristema apresenta um menor número de células e uma estrutura mais simples. A raiz madura é

composta de camadas de células organizadas concentricamente que, vistas de dentro para fora, podem ser identificadas como feixe vascular, periciclo, endoderme, córtex e epiderme (Fig. 9B). As células de cada camada têm origem na ponta da raiz, a partir do centro quiescente (QC), composto de células totipotentes com baixa taxa de divisão celular (Fig. 9A). Após a divisão de uma célula iniciadora, a célula filha da periferia sofre diferenciação, ao passo que a outra continua pertencendo ao QC (Fig. 9A) (Benfey & Scheres, 2000).

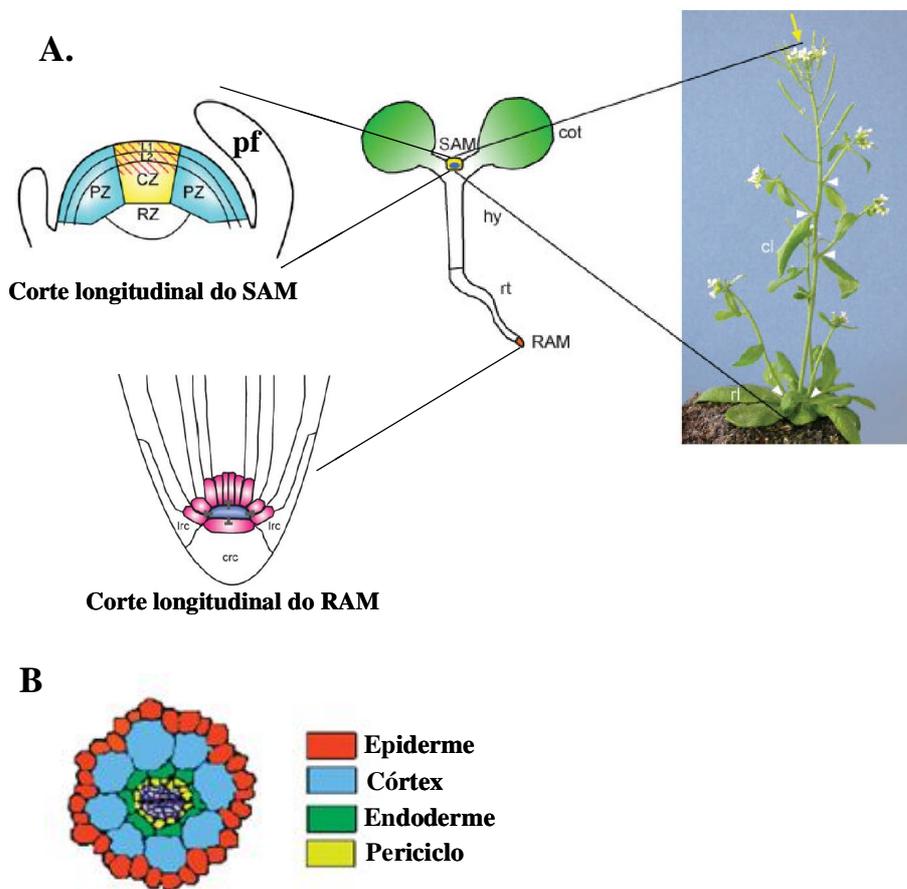


Figura 9: Desenvolvimento vegetal. A) Durante a embriogênese, as plantas estabelecem um corpo rudimentar possuindo cotilédones (cot), hipocótilo (hy) e raiz (rt). Após essa fase, o meristema apical do caule (SAM) é responsável pela formação de toda a parte aérea da planta. A figura mostra a organização do meristema apical de caule em zonas (CZ: zona central; PZ: zona periférica; RZ: zona medular) e camadas (L1 e L2). O meristema apical da raiz (RAM) produz o sistema radicular. O centro quiescente (região em azul) inibe a diferenciação das células totipotentes vizinhas (região em rosa). lrc: ponta da raiz lateral; crc: ponta da raiz central (Baurle & Laux, 2003). B) Esquematização de um corte transversal da raiz mostrando a organização das células em feixe vascular (circulo central em azul escuro), periciclo, endoderme, córtex e epiderme (Malamy & Benfey, 1997).

Portanto, os resultados de localização obtidos com o repórter GUS indicam que os homólogos APUM-1, APUM-2 e APUM-3 são expressos prioritariamente em regiões onde se encontram as células indiferenciadas da planta. Esses resultados são condizentes com as informações sobre proteínas da família PUF em animais, onde as expressões dos homólogos também são observadas em regiões onde se concentram as células tronco do organismo.

Experimentos adicionais utilizando o repórter GUS mostraram que os genes *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3* também são expressos em calos, tecidos formados por células desdiferenciadas obtidas pela indução dos hormônios auxina e citocinina (Raven, 2004). A Figura 10A ilustra o que acontece com a expressão de *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3* durante a formação do tecido de calo. Primeiramente, o periciclo das raízes das plantas repórteres fica completamente azul, sofrendo espessamento após dois dias de crescimento em meio de indução de calo. Nesse momento, as células começam a se dividir sem se diferenciar, resultando no rompimento dos tecidos internos da raiz e, portanto, na produção do calo. As expressões de *APUM-2* e *APUM-3* aumentam durante a formação do calo e se mantêm fortes após o estabelecimento da cultura (Fig. 10C e 10D). Em contraste, *APUM-1* tem um aumento na expressão durante a formação do calo (Fig. 10A), que não se mantêm após o seu estabelecimento, sendo possível observar apenas uma leve coloração azul do repórter (Fig. 10B) (Favaro EC, 2007). Esses resultados em tecido de calo confirmam a alta expressão dos homólogos *APUM* de interesse em regiões indiferenciadas da planta.

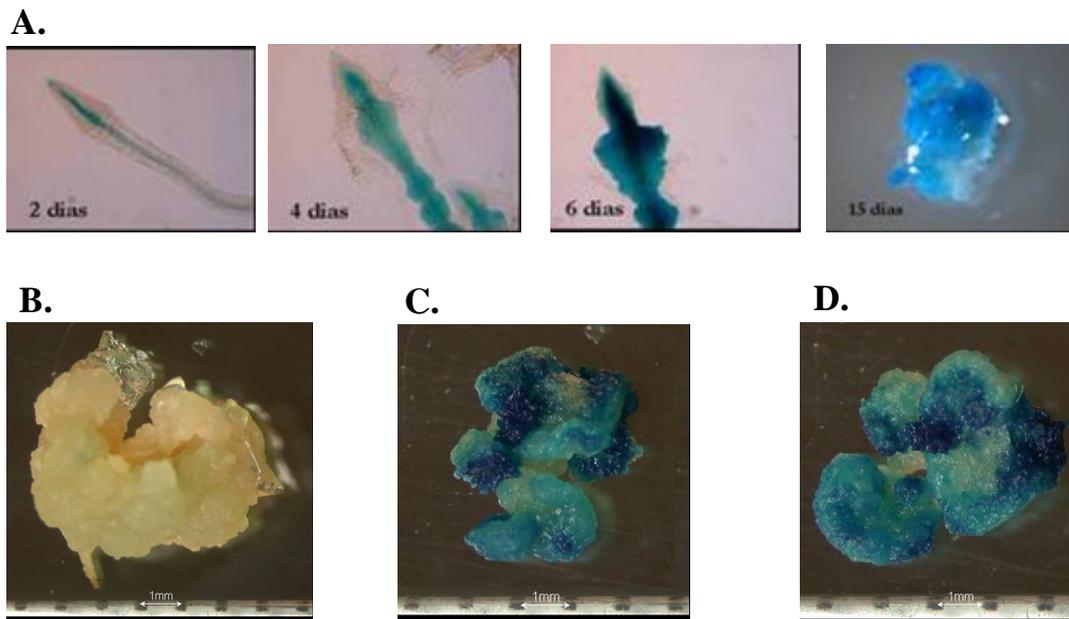


Figura 10: Expressão do gene repórter *GUS* sob o controle dos promotores dos genes *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3* em calos obtidos a partir de plantas carregando a construção repórter. A) Processo de formação de calo a partir de plantas repórteres *APUM-2::GUS::NOS* com uma semana de crescimento transferidas para meio de indução de calo. Este resultado é semelhante ao obtido com as plantas repórteres *APUM-1::GUS::NOS* e *APUM-3::GUS::NOS*. B), C) e D) Expressão do repórter em calos já estabelecidos obtidos a partir de plantas *APUM-1::GUS::NOS*., *APUM-2::GUS::NOS*. E *APUM-3::GUS::NOS*, respectivamente (Favaro EC, 2007).

1.9 Ação pleiotrópica das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3

O banco dados de *Arabidopsis* TAIR disponibiliza plantas com inserções de T-DNA em genes específicos, sendo possível, portanto, obter plantas nocautes individuais para os genes *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3*. Interessantemente, plantas nocautes para qualquer um dos três genes não apresentaram fenótipo diferente daquele observado para as plantas selvagens (Favaro EC, 2007).

Para tentar observar um possível fenótipo relacionado à falta da expressão das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3, a Doutora Elaine Cristina Favaro utilizou uma construção antisense induzível por dexametasona, onde o primeiro exon de *APUM-2*, que possui 100% de identidade com *APUM-1* e *APUM-3*, é expresso de forma a interferir com a tradução dos três mensageiros ao mesmo tempo (Favaro EC, 2007). Análises moleculares mostraram que as plantas transgênicas crescidas em meio contendo 10 μM do indutor dexametasona possuem uma redução significativa na expressão total das proteínas quando comparado com plantas selvagens (Fig. 11) (Favaro EC, 2007).

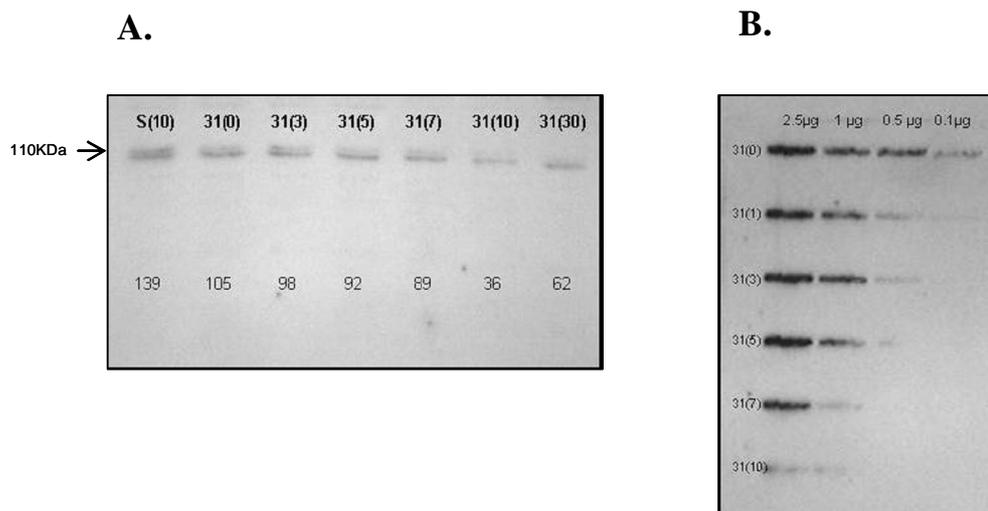


Figura 11: Análise da expressão das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 em extrato protéico de plantas antisense induzíveis por dexametasona (31) comparadas com o extrato protéico da planta selvagem (S). A) Western blot utilizando anti-soro contra APUM-2 produzido em coelho. Os números entre parênteses referem-se às concentrações (em μM) de indutor usadas. Os números localizados abaixo indicam a densidade óptica das bandas, obtidas com o auxílio do software LabWorks 4.0. B) Slot blot com diferentes quantidades de extrato protéico (em μg). Os números entre parênteses indicam a concentração de dexametasona presente no meio de crescimento (Favaro EC, 2007).

O fenótipo observado foi caracterizado principalmente por plantas cloróticas apresentando rosetas com filotaxia normal, mas com um tamanho 35 a 40% menor em relação à planta selvagem, além de folhas reduzidas, raízes menores e menos ramificadas e também produção de flores estéreis (Fig. 12A a 12D). Além desse conjunto de aspectos, também foi possível observar plantas em que não houve crescimento ou desenvolvimento de raiz ou folhas. Esse comportamento foi atribuído ao efeito mais drástico da modificação da expressão dos genes *APUM* (Fig. 12E) (Favaro EC, 2007).

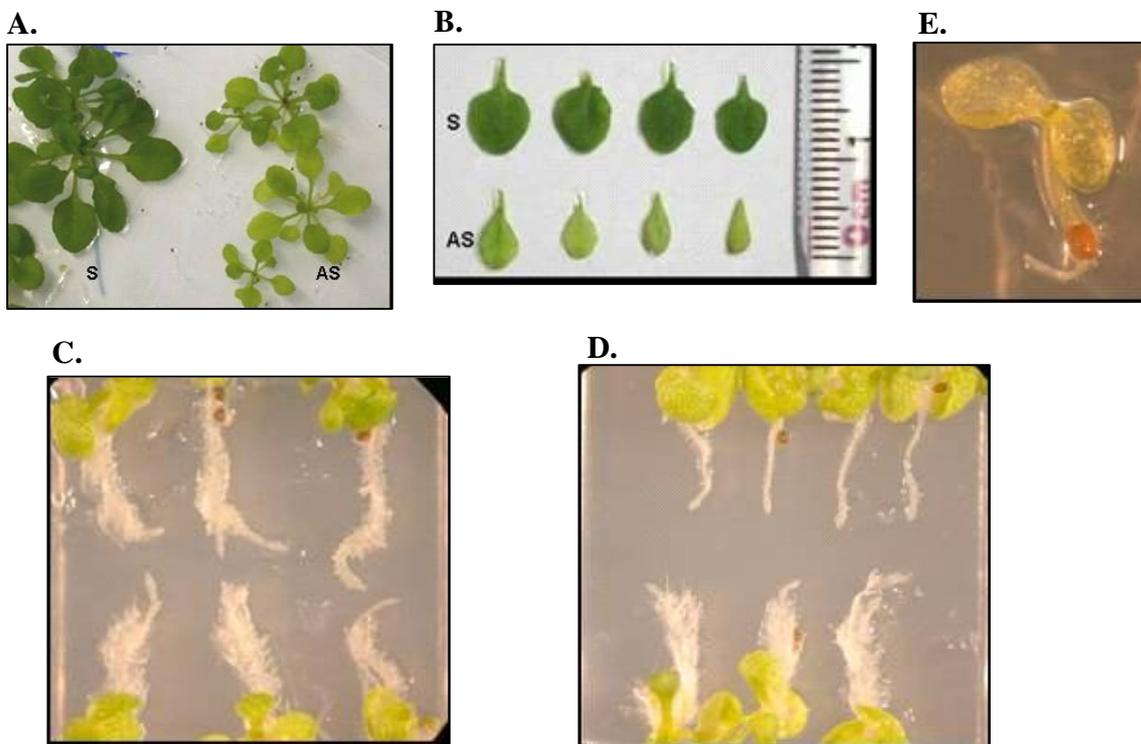


Figura 12: Comparação entre o fenótipo de plantas selvagens (S) e os fenótipos das linhagens carregando a construção antisense induzível por dexametasona (AS). A) Planta antisense clorótica apresentando o diâmetro da roseta menor em relação à planta selvagem. B) Comparação entre várias folhas P1 de plantas selvagens e plantas antisense crescidas em 10 μ M de dexametasona. C) e D) As expressões dos genes *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3* são aumentadas na presença do hormônio auxina. As figuras mostram plantas crescidas por duas semanas em meio contendo auxina sintética na ausência (C) e na presença do indutor dexametasona (D). O experimento mostra que a expressão dos genes *APUM* é importante para a formação das raízes laterais. E) Plantas onde o desenvolvimento é interrompido (possível ação mais drástica do antisense). Todas as plantas mostradas possuem três semanas de crescimento (Favaro EC, 2007).

Os fenótipos observados indicam que a falta das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 leva a uma diminuição da proliferação celular dos tecidos da planta, resultando assim na produção de órgãos menores e menos ramificados. Uma vez que os três genes estudados são expressos em regiões onde se concentram as células indiferenciadas do vegetal, pode-se esperar que as proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 estejam relacionadas ao controle traducional de transcritos relacionados à proliferação celular nessas regiões. Os resultados indicam que, assim como descrito em animais, homólogos PUF em plantas desempenham um papel importante no desenvolvimento vegetal, podendo afetar a formação de vários órgãos em diferentes níveis.

1.10 Regulação da integridade do meristema do caule da planta

Para manter a integridade do meristema do caule durante a repetitiva formação das estruturas do vegetal, a proliferação celular e a iniciação dos órgãos devem ser precisamente coordenadas (Meyerowitz, 1997). Alguns genes que atuam na coordenação do meristema apical do caule são bastante estudados, entre eles estão os genes *CLAVATA-1 (CLV-1)*, *CLAVATA-2 (CLV-2)*, *CLAVATA-3 (CLV-3)*, *WUSCHEL (WUS)* e *SHOOT MERISTEMLESS (STM)*.

Os genes *CLV-1* e *CLV-2* codificam um receptor quinase transmembrana contendo repetições ricas em leucina (LRRs) e fazem parte de um complexo que interage com numerosas proteínas (Clark et al., 1997; Jeong et al., 1999). A proteína CLV-3 é um peptídeo secretado que se liga a este receptor, promovendo a diferenciação celular no meristema (Fletcher et al., 1999). Plantas mutantes para os genes *CLV-1* ou *CLV-3* acumulam até 1000 vezes mais células indiferenciadas em relação às plantas selvagens (Clark et al., 1993; Kayes & Clark, 1998; Fletcher et al., 1999).

Análises genéticas em *Arabidopsis* sugerem um papel central do gene *WUSCHEL* na regulação do destino das células totipotentes durante todo o desenvolvimento da planta. Esse gene codifica um fator de transcrição responsável pelo sinal que especifica a identidade das células totipotentes e também a sua auto-renovação (Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998). Plantas que carregam a perda da função do gene *WUSCHEL* desenvolvem um SAM embrionário normal, mas que não é mantido após a produção de alguns órgãos laterais. Nessas plantas, além de não haver renovação das células totipotentes, o crescimento é interrompido e as células não mantêm o seu destino correto (Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998). Plantas mutantes para o gene *WUS* também apresentam defeitos restritos ao centro do meristema floral, sugerindo que a proteína codificada também é essencial para o desenvolvimento desse meristema (Laux et al., 1996).

O gene *STM* é necessário para a iniciação embrionária do meristema do caule em *Arabidopsis* (Long et al., 1996) e também para a estabilização e a manutenção contínua e funcional do meristema (Clark et al., 1996). Mutações no gene *STM* impedem a formação tanto do SAM primário durante a embriogênese quanto dos SAMs posteriores (Long et al., 1996). Plântulas *STM* mutantes apresentam órgãos fusionados que parecem consumir as células do SAM, não ocorrendo produção pós-embrionária de órgãos laterais (Endrizzi et al., 1996; Lenhard et al., 2002).

Os três genes regulatórios *CLAVATA* e o gene *WUSCHEL* são expressos em pontos precisos do meristema do caule. *CLV-1* é expresso num amplo domínio da zona central sob as três camadas de células do meristema e *WUS* é expresso na mesma região, mas em um domínio menor, chamado de centro de organização (OC). O gene *CLV-3* também é expresso na população de células totipotentes da zona central, mas somente nas duas primeiras camadas (L1 e L2) (Fig.

13). Isto implica que o ligante CLV-3 deve ser capaz de atingir as camadas mais baixas de células para poder interagir com o complexo receptor CLV-1/CLV-2 (Clark, 2001).

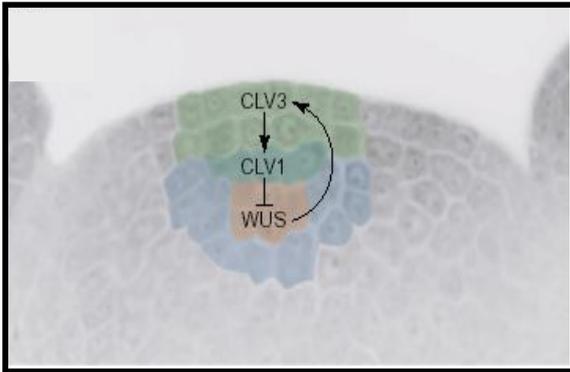


Figura 13: Regiões do meristema apical do caule onde as expressões dos genes *CLAVATA* e *WUSCHEL* são observadas. Todos os genes são expressos na população de células totipotentes da zona central do meristema, mas em domínios diferentes. A região onde a expressão de *WUS* é observada é chamada de centro de organização (OC). *CLV-3* regula negativamente a expressão de *WUS* através de sua ligação a *CLV-1*. *WUS*, por sua vez, é capaz de ativar *CLV-3* em um caminho ainda não conhecido.

Análises genéticas forneceram vários indícios de uma interdependência entre os genes *WUS* e *CLV*. Primeiro, o sinal de *CLV* diminui a expressão de *WUS*, uma vez que a sua intensidade da expressão é ampliada em plantas *CLV* mutantes (Schoof et al., 2000) e a expressão ectópica do gene *CLV-3* elimina a expressão de *WUS*, causando deste modo um fenótipo semelhante ao do mutante *WUS* (Brand et al., 2000). Segundo, devido à expressão do gene *CLV-3* ser específica para as células totipotentes, que requerem *WUS* para a sua manutenção, o caminho dos genes *CLV* pode ser regulado indiretamente por *WUS* (Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998). Dessa forma, plantas com a expressão de *WUS* sob o domínio do promotor do gene *CLV-1* acumulam *CLV-3* em células indiferenciadas (Schoof et al., 2000).

Com base nessas relações, um modelo envolvendo um mecanismo de auto – regulação *WUS/CLV* tem sido proposto para a manutenção das células totipotentes no meristema de caule. Se o número de células totipotentes na zona central é aumentado, mais peptídeo *CLV-3* é produzido na zona central, diminuindo a expressão do gene *WUS*. Pouca expressão de *WUS* reduz

o número de células totipotentes no SAM e, conseqüentemente, atenua a expressão do gene *CLV-3*. Essa diminuição do peptídeo *CLV-3* direciona para uma maior expressão de *WUS* e por conseqüência, um aumento de células totipotentes (Fig. 13 e Fig. 14) (Schoof et al., 2000).

A sinalização *WUS/CLV* também atua na manutenção das células totipotentes no meristema floral. Mutantes de *WUS* formam um número normal de flores, sépalas e pétalas, mas duas voltas centrais são desenvolvidas em um estame (Laux et al., 1996). Este defeito é resultado da inviabilidade de *WUS* em manter uma quantidade suficiente de células totipotentes para formar o número correto de estames e carpelos. Em contraste, o meristema floral de mutantes *CLV* acumula células totipotentes e desenvolvem flores com um elevado número de órgãos florais, especialmente carpelos (Clark et al., 1993; Kayes & Clark, 1998; Fletcher et al., 1999).

Quanto ao gene *STM*, ainda não é claro o modo pelo qual o mesmo age em relação ao caminho regulatório *WUS/CLV*. Diferentemente do gene *WUS*, a expressão do gene *STM* é observada por todo o SAM, mas não nos órgãos em formação (Long et al., 1996). Comparações das funções de *STM* e *WUS* indicam que os dois genes possuem tanto papéis independentes quanto complementares na regulação do SAM, apesar do fato de seus respectivos mutantes mostrarem defeitos similares (Gallois et al., 2002; Lenhard et al., 2002). Enquanto *WUS* funciona especificamente no controle local da identidade das células totipotentes no centro do SAM, *STM* parece ser necessário em todo o meristema para restringir a iniciação de órgãos somente para os lados do mesmo (Gallois et al., 2002; Lenhard et al., 2002). Uma explicação plausível para a função de *STM* é permitir a suficiente amplificação das células filhas das células totipotentes antes que a formação do órgão aconteça (Lenhard et al., 2002). Esta função minimizaria a necessidade de muitas divisões das células totipotentes e assim, um possível acúmulo de mutações devido à replicação do DNA (Baurle & Laux, 2003).

Recentemente, outros genes e também microRNAs têm sido mostrados serem importantes na manutenção meristemática, na sua grande maioria afetando a expressão do gene *WUS* (Fig. 14). No entanto, como esses genes são sempre identificados através de mutantes que acarretam defeito no SAM, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que controlam essa regulação. Por exemplo, os genes *HANABA TARANU (HAN)*, *CORONA (CNA)*, *PHABULOSA (PHB)* e *PHAVOLUTA (PHV)* são fatores de transcrição que diminuem a expressão de *WUS* (Prigge et al., 2005) (Fig. 14), no entanto, ainda não é claro se esse controle da expressão ocorre através da ligação direta ao promotor ou se tais fatores ativam genes que controlam a expressão de *WUS*. Essas e muitas outras perguntas ainda continuam em aberto.

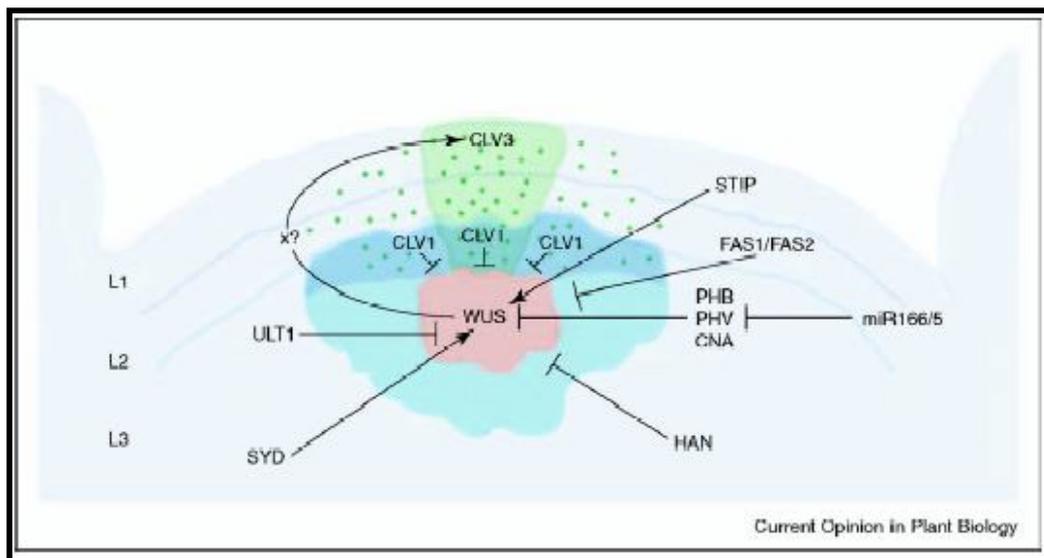


Figura 14: Mecanismos moleculares de regulação do destino das células totipotentes no meristema apical de caule de *Arabidopsis*. A população de células totipotentes é localizada na região central do meristema e é mantida por um sinal (X?) enviado do centro de organização (região rosa, onde se observa a expressão de *WUS*). A figura mostra que *WUSCHEL* pode ser regulado positivamente e negativamente pelo produto de diversos genes. As proteínas *PHB*, *PHV* e *CNA* são fatores de transcrição da classe III HD-ZIP que regulam negativamente o nível de mRNA de *WUS* na região central do meristema (Prigge et al., 2005). Esses genes, por sua vez, são negativamente regulados por microRNAs (Williams et al., 2005). As proteínas *FAS1/FAS2* e *SYD* evitam a expressão ectópica do gene *WUS* através de processos de regulação da cromatina, mantendo uma alta expressão desse gene na região central do meristema (Kaya et al., 2001). Figura retirada do artigo (Williams & Fletcher, 2005).

Entender os mecanismos pelos quais as proteínas são distribuídas nos diferentes compartimentos celulares e tecidos é de extrema importância para a elucidação das funções de vários genes como um todo. Dados indicam que o principal mecanismo para a obtenção de altas concentrações locais de proteínas é realizado por localização de RNA (Micklem, 1995; Johnstone & Lasko, 2001), onde a partir de uma única molécula de mensageiro pode-se gerar várias moléculas de proteínas. A regulação da tradução desses transcritos pode ser realizada por proteínas que se ligam a RNA, interagindo com regiões regulatórias dos mensageiros e bloqueando a maquinaria de tradução ou eliminando as estruturas sinalizadoras importantes do transcrito para a síntese protéica (Decker & Parker, 1995; Evans & Hunter, 2005).

O fato dos possíveis reguladores traducionais APUM-1, APUM-2 e APUM-3 terem sido localizados em tecidos meristemáticos indica que esses homólogos devem estar relacionados à especificação e/ou manutenção das células totipotentes, assim como tem sido descrito para homólogos PUF em outros organismos. Além disso, os resultados dos experimentos da construção antisense mostrando que a diminuição da expressão das três proteínas é suficiente para causar problemas no desenvolvimento da planta, permite especular que o fenótipo observado é resultado da falta ou da diminuição da regulação da tradução de um ou mais transcritos. Estudos das características moleculares das proteínas APUM e a identificação de mensageiros regulados por essas proteínas poderão mostrar se a ação dos homólogos PUF em plantas é conservada evolutivamente e também ajudar na identificação dos possíveis papéis desempenhados pelos mesmos no organismo vegetal.

2. Objetivos

O presente trabalho tem como principais objetivos estudar a conservação molecular dos homólogos da família PUF em *Arabidopsis thaliana*, chamados de *Arabidopsis* PUMILIO (APUM) e também identificar possíveis mensageiros sujeitos a regulação traducional pelas proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3.

3. Materiais e Métodos

3.1. Sistema Triplo – Híbrido de levedura

O sistema triplo-híbrido de levedura é uma importante ferramenta para a detecção e análise de possíveis interações entre proteína e RNA. O sistema utiliza um RNA híbrido como intermediário entre duas proteínas, sendo a interação dos três híbridos necessária para a reconstituição da ativação transcricional dos genes repórteres *HISTIDINA* (*HIS3*) e β -galactosidase (*LacZ*) (SenGupta et al., 1996) (Fig. 15). Como componentes fixos do sistema, estão a proteína LEXA, com o domínio de ligação ao DNA fusionado à proteína de envoltura do bacteriófago MS2, e o RNA híbrido, que contém duas cópias do sítio de ligação da proteína MS2 (SenGupta et al., 1996) (Fig. 15). O domínio de ativação usado é variável entre os sistemas.

Para o presente trabalho, foi adquirido o sistema “RNA-Protein Hybrid Hunter™ Kit” (Invitrogen). Esse sistema usa o domínio de ativação VP16 do vírus “*Herpes simplex*”, um dos mais fortes domínios de ativação já caracterizados até o momento. A cepa utilizada nesse sistema é a L40Ura3 (MATa, ura3-52, leu2-3112, his3 Δ 200, trp1 Δ 1, ade2, LYS2:(LexA op) 4-HIS3, ura3 (LexA-op)8-lacZ). Os vetores usados no sistema estão descritos na figura 16.

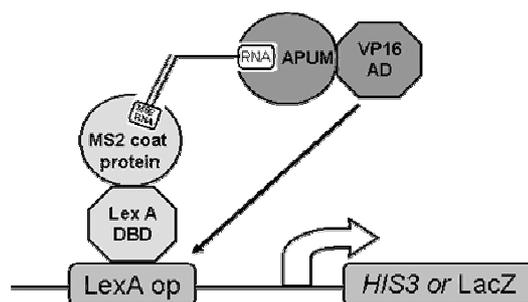


Figura 15: Representação do sistema triplo-híbrido de levedura. O RNA híbrido (RNA de interesse fusionado à sequência de RNA reconhecida pela proteína MS2) interage com a proteína híbrida de ligação ao operador (domínio LEXA de ligação ao DNA fusionado à proteína MS2 de ligação a RNA). A segunda proteína híbrida é o produto da fusão entre o domínio de ativação (VP16) e a proteína de ligação a RNA de interesse (nesse caso, a proteína *Arabidopsis* PUMILIO-APUM). A interação entre os três híbridos reconstitui o fator de ativação da expressão gênica, ativando os genes repórteres *HISTIDINA* (*HIS3*) e β -galactosidase (*LacZ*).

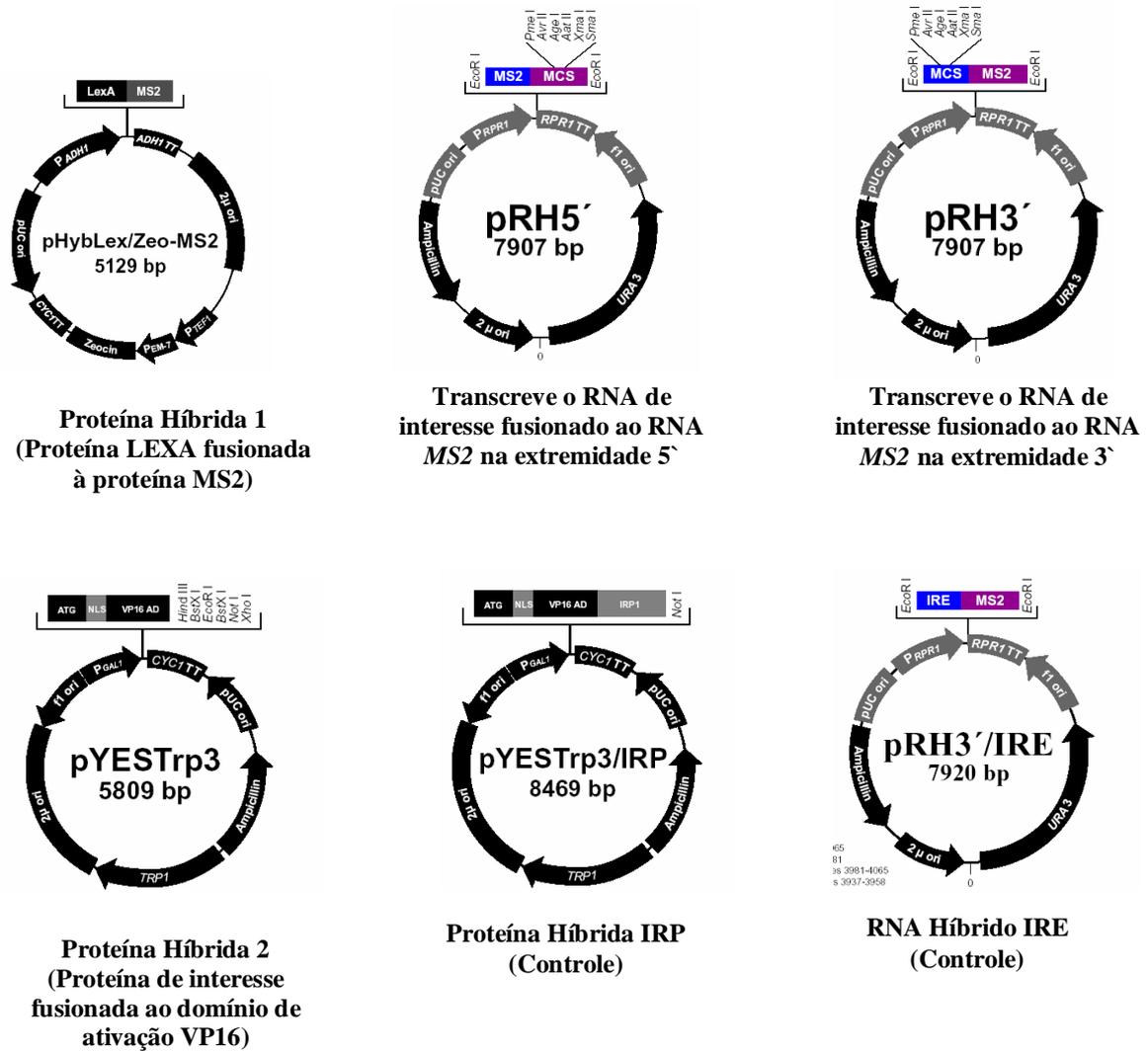


Figura 16: Vetores utilizados no sistema triplo- híbrido de levedura (Invitrogen). O sistema utiliza a interação bem caracterizada entre a proteína de resposta a ferro (IRP) e sua seqüência de ligação IRE (elemento de resposta a ferro) como controle positivo de interação (Pantopoulos, 2004).

3.2 Sistema Triplo-Híbrido adaptado

O sistema triplo-híbrido adquirido comercialmente possui algumas desvantagens em relação a um sistema disponibilizado recentemente. Primeiro, a linhagem L40Ura3 (Invitrogen) não possui a construção para síntese da proteína LEXA/MS2 integrada ao genoma, sendo necessária a transformação de três vetores para a utilização do sistema (Fig. 16). Segundo, o vetor de tradução da proteína LEXA/MS2 é selecionado em levedura através do antibiótico Zeocina (Invitrogen), que além de muito caro, requer uma concentração final muito alta no meio (200µg/mL). Além disso, outro problema bastante comum acontece em ensaios em que um RNA é usado como isca contra uma biblioteca de proteínas. Nessas situações, a quantidade de interações falso-positivas chega a 95% quando a linhagem L40Ura3 é utilizada (SenGupta et al., 1996).

Para solucionar esse problema, Hook e colaboradores, 2005 desenvolveram a linhagem de levedura YBZ-1, que mostrou ser capaz de reduzir drasticamente a proporção de falso-positivos. Essa linhagem possui a construção para síntese da proteína LEXA/MS2 estavelmente integrada ao genoma. A figura 17 mostra a diferença principal entre as linhagens L40Ura3 e YBZ-1.

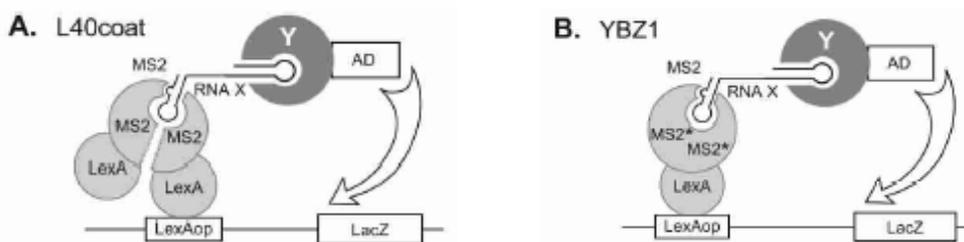


Figura 17: Diferença entre as linhagens de levedura L40Ura3 e YBZ-1. A) Na linhagem L40Ura3, a proteína de fusão de envoltura do bacteriófago (MS2) precisa dimerizar para ligar ao seu RNA. Dessa forma, monômeros LEXA/MS2 ligados ao promotor teriam uma superfície exposta que poderia se ligar à proteínas ou pequenos peptídeos, ativando os genes repórteres sem a ligação ao RNA isca. B) Na cepa YBZ-1, a proteína MS2 é modificada de tal forma que é expressa como um dímero cabeça-cauda fundido em um único monômero LEXA. A linhagem YBZ-1 também possui a construção para síntese da proteína LEXA/MS2 estavelmente integrada no genoma (Hook et al., 2005).

Para o presente trabalho, a linhagem YBZ-1 contornou diversos problemas enfrentados na otimização do sistema da Invitrogen, como o aumento da eficiência de transformação, uma vez que necessita apenas da co-transformação de dois vetores, a independência do uso do antibiótico Zeocina e também o número significativamente baixo de interações falso-positivas nos ensaios de triplo-híbrido usando bibliotecas como presa.

3.3 Clonagem dos cDNAs referentes ao domínio PUF de ligação dos homólogos APUM-1, APUM-2, APUM-3, APUM-4, APUM-5, APUM-6 e APUM-7 no vetor pYESTrp3

RNA total foi extraído de plantas com duas semanas de crescimento ou de tecido de inflorescência utilizando o reagente Trizol (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado utilizando o kit “SuperScript III RNase H Reverse Transcriptase” (Invitrogen), com 2 µg de RNA total e 250 ng de “random primers”, conforme protocolo do fabricante. As reações de PCR foram feitas utilizando a enzima “High Fidelity PCR Taq Polimerase” (Invitrogen), conforme especificação do fabricante e 1 µL da reação de transcrição reversa. Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR possuem a seqüência para o pareamento com a seqüência do cDNA referente ao domínio PUF de ligação de cada homólogo APUM e também as seqüências necessárias para as reações de recombinação no sistema GatewayTM (Invitrogen) (Tabela 2). Os produtos amplificados nas reações foram posteriormente transferidos para o vetor pDONR201 do sistema GatewayTM (Invitrogen) através de reações de recombinação, conforme protocolo do fabricante.

Para transformar o vetor pYESTrp3 do sistema triplo-híbrido em um vetor destino do sistema Gateway, capaz de receber o inserto clonado no vetor pDONR201, um cassete de recombinação foi inserido ao mesmo mantendo a correta janela de leitura. Em seguida, os cDNAs de interesse foram transferido para o vetor pYESTrp3 através de reações de recombinação, conforme protocolo do fabricante.

Todos os clones foram seqüenciados e posteriormente analisados quanto a ausência de mutações e a correta janela de leitura.

Tabela 2: Lista de oligonucleotídeos usados nas reações de amplificação dos domínios PUF dos homólogos APUM.

Oligonucleotídeo	Seqüência
PUF-1/2/3 F	5' AAAAAGCAGGCTACATGGATGCTAGTTTGGATGAAGGC 3'
PUF-1 R	5' AGAAAGCTGGGTTAAGGTCTTAAGCCATCTGGG 3'
PUF-2 R	5' AGAAAGCTGGGTTTACGCCATCTGAGGCTGGGTTAGGGA CTGCAAAGCCAT 3'
PUF-3 R	5' AGAAAGCTGGGTGTCCCTTACGCCACCAGAGG 3'
PUF-4 F	5' AAAAAGCAGGCTACATGAGCTTAGAAGGTGCCAATG 3'
PUF-4 R	5' AGAAAGCTGGGTTTCATCTCCTCAATTCTTGGT 3'
PUF-5 F	5' AAAAAGCAGGCTCCATGAGCATCGTTGATGATCTA 3'
PUF-5 R	5' AGAAAGCTGGGTCCTAACCTTCTGTTCCCTCTTCTG 3'
PUF-6 F	5' AAAAAGCAGGCTCAATGCATGTAGATATTGGCAGTAC 3'
PUF-6 R	5' AGAAAGCTGGGTATTATGGAGTGGTGTTCGCGGCAA 3'
PUF7- F	5' AAAAAGCAGGCTCTCGAGCATTGATGTCTAATAATG 3'
PUF-7 R	5' AGAAAGCTGGGTATCACTTCTTCAATAGTATCCTCG 3'

3.4 Clonagem de seqüências presentes nas regiões 3' UTR dos mensageiros *HUNCHBACK* (NRE), *FASCIATA-2* (*FAS-2*) e *CLAVATA-1* (*CLV-1*)

Os pares de oligonucleotídeos complementares NRE selvagem, NRE mutante no Box A (NREA), NRE mutante no Box B (NREB) e NRE mutante nos boxes A e B (NREAB) foram desenhados conforme descrito no artigo de Murata & Wharton, 1995 e Cui et al., 2002. Para desenho dos pares de oligos *FAS-2* e *CLV-1*, foram usadas seqüências complementares

correspondentes a 32 pb de uma região na região 3' UTR contendo o elemento de ligação a APUM (Tabela 3). Os oligos possuem uma extremidade coesiva com a enzima de restrição AvrII na extremidade 5' e sítios de restrição para as enzimas AvrII e SmaI na extremidade 3', respectivamente. A extremidade coesiva AvrII na extremidade 5' foi desenhada de forma que o sítio de reconhecimento para essa enzima seja perdido após a ligação ao vetor.

O anelamento das seqüências complementares sintetizadas foi realizado seguindo o protocolo "DNA primer Supporting Information/Protocol for Adapter Production" obtido pelo site da Invitrogen (www.invitrogen.com). Foram utilizados 100 nmoles de cada oligo, 100 µL de tampão de anelamento (10X)(100 nM Tris-HCl, pH 7,5, 1 M de NaCl e 0,01 M de EDTA) e água para um volume final de 1 mL. As reações foram incubadas a 65°C por 10 minutos e posteriormente à temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida, 3 µL dos oligos pareados foram digeridos com 0.3 U da enzima SmaI (New England Biolabs) em um volume final de 10 µL. As reações de ligação foram realizadas utilizando aproximadamente 50 ng do vetor pRH5' previamente digerido com as enzimas AvrII e SmaI (New England Biolabs), 1 µL dos oligos pareados digeridos com SmaI (New England Biolabs) e 1 U de enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs) em um volume final de 10 µL, seguido de incubação por 16 h a 16°C, precipitação com glicogênio/acetato de sódio/etanol (Sambrook et al., 1989) e eletroporação em *E. coli* DH10B.

A confirmação da presença do inserto foi feita por reações de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para o vetor pRH5' (Tabela 3), seguido de eletroforese em gel de agarose 2%. O inserto amplificado do vetor pRH5' vazio foi utilizado como controle negativo.

Tabela 3: Lista de oligonucleotídeos sintetizados para clonagem das seqüências 3' UTR no vetor pRH5'. Os números entre parênteses nos oligos FAS-2 referem-se às substituições feitas em relação ao transcrito selvagem.

Oligonucleotídeo	Seqüência
NRE F	5' CTAGATTATTATGTTGTCGAAAATTGTACATAAGCCTAGG CCCCCGGGGA 3'
NRE R	5' TCCCCGGGGGACTAGGCTTATGTACAATTTTCGACAACA TAATAAT 3'
NRE-BOXA F	5' CTAGATTATTATCTGCTCGAAAATTGTACATAAGCCTAGG CCCCCGGGGA 3'
NRE-BOXA R	5' TCCCCGGGGGACTAGGCTTATGTACAATTTTCGAGCAG ATAATAAT 3'
NRE-BOXB F	5' CTAGATTATTATGTTGTCGAAAATATGACATAAGCCTAGG CCCCCGGGGA 3'
NRE-BOXB R	5' TCCCCGGGGGCCTAGGCTTATGTCATATTTTCGACAACA TAATAAT 3'
NRE-BOXAB F	5' CTAGATTATTATCTGCTCGAAAATATGACATAAGCCTAGGC CCCCGGGGGA 3'
NRE-BOXAB R	5' TCCCCGGGGGCCTAGGCTTATGTCATATTTTCGAGCAG ATAATAAT 3'
FAS-2 F	5' CTAGCGTCTCGTCTCTAAAGGCAATGTACATATAGACCTA GGCCCCGGGGGA 3'
FAS-2 R	5' TCCCCGGGGGCCTAGGTCTATATGTACATTGCCTTTAG AGACGAGACG 3'
CLV-1 F	5' CTAGATTTCTAATACTTTTCGGGTTTGTATATTTGTTCTAG GCCCCGGGGGA 3'
CLV-1 R	5' TCCCCGGGGGCCTAGGAACAAATATACAAACCCGAAAGT ATTAGAAAT 3'
WUS – F	5' CTAGTCTAGATCTCTCGTTATGTGTAATTTGTAATTA CCCCCGGGGA 3'
FAS-2 F (+4)	5' CTAGTCTAGACGTCTCGTCTCTAAAGGCAATGTGCATATA GACCCCCGGGGGA 3'
FAS-2 (-02/-01)-F	5' CTAGTCTAGACGTCTCGTCTCTAAAGGCCCTGTACATATA GACCCCCGGGGGA 3'
FAS-2 (-04/-03)-F	5' CTAGTCTAGACGTCTCGTCTCTAAAGTAAATGTACATATAG ACCCCCGGGGGA 3'
FAS-2 (-06/-05)-F	5' CTAGTCTAGACGTCTCGTCTCTAACTGCAATGTACATATAG ACCCCCGGGGGA 3'
FAS-2 (-08/-07)-F	5' CTAGTCTAGACGTCTCGTCTCTCCAGGCAATGTACATATA GACCCCCGGGGGA 3'
FAS-2 (-10/-09)-F	5' GGACTAGTCGTCTCGTCTAGAAAGGCAATGTACATATA GACCCCCGGGGGA 3'
FAS-2 (-12/-11)-F	5' CTAGTCTAGACGTCTCGTAGCTAAAGGCAATGTACATATA GACCCCCGGGGGA 3'
FAS-2 (-14/-13)-F	5' CTAGTCTAGACGTCTCTGCTCTAAAGGCAATGTACATATAG ACCCCCGGGGGA 3'
FAS-2 (+9/+10)-F	5' CTAGTCTAGACGTCTCGTCTCTAAAGGCAATGTACATAGC GACCCCCGGGGGA 3'

FAS-2 (+11/+12)-F	5' CTAGTCTAGACGTCTCGTCTCTAAAGGCAATGTACATATA TCCCCCGGGGA 3'
UTR – REVERSO	5' TCCCCCGGGG 3'
pRH5'-F	5' CTGTCTCTATACTCCCCTATAG 3'
pRH5'-R	5' CAAAATTCAATAGTTACTATCGC 3'

3.5 Clonagem de seqüências presentes nas regiões 3' UTR dos mensageiros *WUSCHEL* (*WUS*) e *ZWILLE* (*ZLL*)

Oligonucleotídeos senso correspondentes a uma seqüência de 32 pb da região 3' UTR de *WUSCHEL* (*WUS*) e *ZWILLE* (*ZLL*) contendo o elemento de ligação a APUM foram sintetizados. Cada óligo senso possui um sítio de restrição para a enzima XbaI na extremidade 5' e um sítio de restrição para a enzima SmaI na extremidade 3' (Tabela 3). Devido ao fato de todos os oligos senso possuírem os últimos 11 nucleotídeos em comum, apenas um oligo antisenso foi sintetizado (UTR-Reverso, Tabela 3). As reações de pareamento entre os oligos senso e antisenso foram feitas seguindo o protocolo “DNA primer Supporting Information/Protocol for Adapter Production” obtido pelo site da Invitrogen, conforme descrito na secção 3.4.

A fita antisenso dos oligos anelados foi estedida utilizando a enzima Klenow (100 µL da reação de anelamento, 15 µL tampão NEB 2 (10X), 1 µL de Klenow (New England Biolabs) (5U/µL) e 29 µL de H₂O). Em seguida, cada par de oligo pareado foi digerido com 0.3 U da enzima XbaI (Fermentas) e 0.3 U da enzima SmaI (Fermentas) e ligado ao vetor pRH5' previamente digerido com as enzimas AvrII (New England Biolabs) e SmaI (Fermentas). As reações de ligação e também a confirmação da presença do inserto foram realizadas conforme descrito na secção 3.4.

3.6 Clonagem dos oligonucleotídeos *FASCIATA-2* mutantes no vetor pRH5'

Os oligonucleotídeos *FAS-2* mutantes foram desenhados baseando-se na seqüência selvagem mostrada na tabela 3, substituindo-se uma purina por uma pirimidina e vice-versa em cada posição de interesse. Considerando-se a primeira uracila do sítio de ligação a APUM (UGUACAUA) como o nucleotídeo +1, foram feitas substituições duplas do nucleotídeo -14 ao -1, +4 e também dos nucleotídeos +9 ao +12 (Tabela 3).

O pareamento e a posterior clonagem dos oligos foram realizados seguindo a mesma estratégia descrita para os oligos *WUSCHEL* e *ZWILLE* (secção 3.5). Os oligos senso foram anelados com o oligo UTR reverso (Tabela 3), estendidos com Klenow (New England Biolabs), digeridos com XbaI (Fermentas) e SmaI (Fermentas) e ligados no vetor pRH5' previamente digerido com AvrII (NEB) e SmaI (Fermentas) utilizando a enzima T4 DNA ligase (Fermentas).

3.7 Clonagem dos cDNAs *WUSCHEL*, *FASCIATA-2*, *CLAVATA-1*, *ZWILLE* e *PUF-2* no vetor de expressão pET-28a

O sistema de expressão pET (plasmid for Expression by T7 RNA polimerase) foi usado para a expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*. Nesse sistema, os genes de interesse são clonados sob o forte controle de um promotor do bacteriófago T7, sendo a indução da proteína recombinante dependente da expressão do gene da T7 RNA polimerase na célula hospedeira. O gene que codifica a T7 RNA polimerase no genoma da célula bacteriana BL21(DE3) e suas derivadas estão sob o controle de lacUV5, sendo a sua expressão induzida por isopropyl-1-thio- β -D-galactoside (IPTG) (Rosenberg et al., 1987).

RNA total foi extraído de plantas com 2 semanas de crescimento utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), conforme o protocolo do fabricante. As reações de síntese do cDNA foram realizadas utilizando o kit "SuperScript II Reverse Transcriptase" (Invitrogen) conforme

protocolo do fabricante. Um volume de 1 μ L do cDNA foi usado como molde em reações de RT-PCR utilizando a enzima “Taq polimerase High Fidelity” (Invitrogen) e os pares de oligos específicos para a amplificação das seqüências de *WUS*, *FAS-2*, *CLV-1*, *ZLL*. Os oligos para *PUF-2* foram desenhados para amplificar todo o domínio PUF de APUM-2 (Fig. 7), enquanto os demais oligos foram desenhados para amplificação dos primeiros 700-900 pb do cDNA, incluindo o códon de iniciação e um códon de terminação inserido na seqüência (Tabela 4). No caso do cDNA *WUCHEL*, que possui 800 pb, os oligos foram desenhados para amplificar toda a seqüência. O programa usado foi: 94°C por trinta segundos e 28 ciclos de 94°C por trinta segundos, 55 °C por trinta segundos e 68 °C por 1 minuto. Após a amplificação, os produtos de PCR foram digeridos com 0.5 U das enzimas de restrição BamHI e SalI (Tabela 4) e purificados em kit de purificação de PCR (Qiagen), conforme protocolo do fabricante. Os fragmentos purificados foram usados em reações de ligação com aproximadamente 50 ng do vetor pET28a previamente digerido com as mesmas enzimas usadas na digestão dos insertos e 1 U da enzima T4 DNA ligase (Fermentas) em um volume final de 10 μ L. Posteriormente, as reações foram incubadas a 16°C por 16 h e transformadas por eletroporação em *E.coli* DH10B.

Após a extração do DNA plasmidial, os clones foram checados por digestão e confirmados por seqüenciamento.

Tabela 4: Oligonucleotídeos usados para amplificação dos cDNAs *WUSCHEL*, *CLAVATA-1*, *ZWILLE*, *FASCIATA-2* e *PUF-2*. As seqüências em negrito são os sítios de restrição usados nas clonagens no vetor pET28a. Com exceção de *PUF-2*, todos os oligos foram desenhados para amplificação dos primeiros 700-900 pb de cada cDNA, possuindo a códon de iniação e um códon de terminação adicionado.

Oligonucleotídeo	Seqüência
WUSCHEL 5'	5' CGGGATCCCACATGGAGCCGCCACAGCATCAGCAT 3'
WUSCHEL 3'	5' ACGCGTCGACCTAGTTCAGACGTAGCTCAAGAGA 3'
ZWILLE 5'	5' CGGGATCCATGCCGATTAGGCAAATGAAAG 3'
ZWILLE 3'	5' ACGCGTCGACTTAGCCTAAGTCATGCATATTTGCC 3'
CLAVATA-1 5'	5' CGGGATCCATGGCGATGAGACTTTTGAAGAC 3'
CLAVATA-1 3'	5' ACGCGTCGACTTATGTTAAACCACCGAACTCCGGT 3'
FASCIATA-2 5'	5' GCCATATGAAGGGAGGTACGATACAG 3'
FASCIATA-2 3'	5' ACGCGTCGACGGCAATGTCTCATCATGA 3'
PUF-2 5'	5' CGGGATCCATGGATGCTAGTTTGGATGAAGGC 3'
PUF-2 3'	5' ACGCGTCGACTTACGCCATCTGAGGCTGGGTTA 3'

3.8 Geração de mutações pontuais nos domínios PUF-2 e PUF-7

As reações para geração de mutações pontuais nos domínios PUF-2 (vetor pYESTrp3PUF-2/N→H) e PUF-7 (vetor pYESTrp3PUF-7-7/H→N) foram realizadas de acordo com o protocolo do kit "QuikChange Site-Directed Mutagenesis" (Stratagene). Os oligos usados foram: F- 5'GAGCCAACAGAAGTTTGCTTCACACGTTGTTGAGAAATGTTT 3' e R- 5'GTCAAACATTTCTCAACAACGTGTGAAGCAAACCTTCTGTTGG 3' para PUF-2 and F- 5'CGATGCAGAAATTCAGTAGCAACATGGTGGAAACGATGTCTCA 3' e R-5'GCATGAGACATCGTTCCACCATGTTGCTACTGAATTTCTGCA 3' para PUF-7.

3.9 Construção de uma biblioteca de cDNA com fragmentos entre 500-1500 pb

A biblioteca de cDNA com fragmentos entre 500-1500 pb foi construída pelo Dr. Ronaldo Bento Quaggio para os trabalhos com os sistemas um e dois híbridos de levedura.

A extração de RNA foi feita com o reagente Trizol (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Foram extraídos RNA total de plantas com 7 a 14 dias de germinação, de plantas adultas e também de vários tecidos separadamente (raiz, caule, folha, flores e frutos). O isolamento dos mRNAs foi feito seguindo o protocolo do kit “MessageMaker[®] Reagent Assembly” (Invitrogen) e sua concentração foi determinada por espectrofotômetro a 260 nm. A síntese e a clonagem de cDNA foi feita utilizando o kit “SuperScript[™] Plasmid System with Gateway[™] Technology” (Invitrogen), conforme especificação do fabricante.

Para utilização da biblioteca no sistema triplo-híbrido de levedura, os cDNAs inseridos no vetor da biblioteca pEXP-AD502, que contém sítios de recombinação para o sistema Gateway[™], foram transferidos para o vetor pDONR201 através de reação de recombinação. O vetor pRH5’ do sistema triplo-híbrido foi transformado em um vetor destino do sistema Gateway[™] através da clonagem de um cassete de recombinação, conforme protocolo do sistema. Os fragmentos de cDNA inseridos no vetor pDONR201 foram então transferidos para o vetor pRH5’ por recombinação (reação LR), seguindo protocolo do sistema. A amplificação da biblioteca foi feita em meio semi-sólido conforme descrito na secção 3.12.

3.10 Construção da biblioteca de cDNA com fragmentos entre 50-150 pb

RNA total foi extraído de plantas com aproximadamente 2 semanas de crescimento junto a alguns buquês de flores utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), conforme o protocolo. O isolamento do mRNA foi feito seguindo o protocolo do kit “PolyATtract mRNA Isolation Systems” (Promega) e a concentração foi determinada em espectrofotômetro a 260 nm.

Aproximadamente 2 µg de mRNA foram usados para cada uma das 6 reações de síntese de cDNA, realizadas conforme o protocolo do kit “CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit” (Invitrogen). A primeira fita foi sintetizada com “random primers” e Superscript III, enquanto que a síntese da segunda fita foi sintetizada com dNTPs, *E. coli* DNA ligase, *E. coli* DNA Polimerase e *E. coli* RNase H, fornecidos com o kit. A reação foi então tratada com T4 DNA Polimerase, purificada com fenol-clorofórmio, precipitada com glicerol/acetato de amônio/etanol e ressuspensa em 18 µL de água milli-Q. Posteriormente, os cDNAs foram digeridos com 1U das enzimas AluI, HaeIII, DraI e SspI (New England Biolabs), nas combinações AluI/HaeIII, AluI/SspI, AluI/DraI, HaeIII/DraI, HaeIII/SspI e DraI/SspI e fracionados em gel “low-melting” 2% (Ostrowski et al., 2002). Todos os fragmentos gerados por essas enzimas possuem extremidades cegas. As bandas referentes aos fragmentos entre 50-150 pb foram cortadas e purificadas com fenol-clorofórmio (Sambrook et al., 1989). O material foi precipitado com glicogênio/acetato de sódio/etanol (Sambrook et al., 1989), ressuspensa em 50µL de água milli-Q e quantificado em espectrofotômetro a 260 nm.

A clonagem dos fragmentos foi feita seguindo um protocolo fornecido pelo Dr. Jerry Ostrowski através de e-mail (não publicado), onde se descarta a necessidade de desfosforilação do vetor pRH5’ digerido com a enzima PmeI, etapa mais crítica para uma boa eficiência das ligações. Após algumas otimizações no protocolo original, a melhor eficiência foi obtida com a reação a seguir:

Componente da reação	Concentração	Volume utilizado
Vetor pRH5'	100 ng/ μ L	1,0 μ L
insertos 50-150 pb	10 ng/ μ L	15,0 μ L
Tampão 4 (NEB)	10X	5,0 μ L
BSA	10X	5,0 μ L
ATP	10 mM	5,0 μ L
PmeI (NEB)	10 U/ μ L	0,5 μ L
T4 ligase (NEB)	400 U/ μ L	2,0 μ L
água milli-Q	-----	16,5 μ L

Após incubação a 25°C por 16 horas, 0,5 μ L da enzima PmeI foi adicionada à reação e incubada por 1 hora a 37°C. A reação foi então purificada com fenol-clorofórmio, precipitada com glicogênio/acetato de sódio/etanol (Sambrook et al., 1989), ressuspensa em 10 μ L de água e eletroporada em *E. coli* DH10B, utilizando 1 μ L do material ressuspensa para cada transformação. As células eletroporadas foram recuperadas em 1 mL de meio SOC por 1 hora à 37 °C sob agitação de 200 r.p.m e armazenadas em freezer a -80°C em alíquotas de 20 mL (volume referente a 10 transformações + 10 mL de glicerol 40%). Para cada grupo de 10 transformações, 200 μ L foram separados, congelados por 24 h a -80°C, descongelados e usados para quantificação da eficiência da transformação.

Ao final de 130 eletroporações, um total aproximado de $7 \cdot 10^6$ clones primários foram obtidos e amplificados em meio semi-sólido conforme descrito na secção 3.12.

3.11 Construção da biblioteca de cDNA com fragmentos entre 50-150 pb a partir de tecido de calo

Para obtenção do tecido de calo, um volume de sementes de *Arabidopsis* ecotipo Columbia foi esterilizado com três volumes de uma solução contendo 50% de cândida e 0,1% de Tween 20 durante dez minutos. Imediatamente, as sementes foram lavadas várias vezes com água milli-Q estéril em câmara de fluxo laminar, ressuspendidas em seis volumes de uma solução estéril contendo 0,1% de ágar e aplicadas sobre placas de Petri contendo meio sólido 0,5xMS (GIBCO) com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Após a semeadura, as placas foram seladas com esparadrapo microporoso, incubadas no escuro por quatro dias a 4 °C e transferidas para uma estufa a 22 °C com regime de 16 horas de luz. Após uma semana de crescimento, as plantas foram transferidas para meio 0,5xMS de indução de calo (0,8% de ágar, 1,5% sacarose, 2,2µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 0,2µM de cinetina (Ki)).

Para a construção da biblioteca, RNA total de calo foi extraído seguindo o protocolo do reagente Trizol (Invitrogen). O isolamento do mRNA foi feito seguindo o protocolo do kit “PolyATtract mRNA Isolation Systems” (Promega) e sua concentração foi determinada em espectrofotômetro a 260 nm.

Aproximadamente 2 µg de mRNA foram usados para cada uma das 6 reações de síntese de cDNA conforme o protocolo do kit “CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit” (Invitrogen). A primeira fita foi sintetizada com oligo dT e Superscript III e a segunda fita com dNTPs, *E. coli* DNA ligase, *E. coli* DNA Polimerase e *E. coli* RNase H, fornecidos com o kit. Em seguida, a reação foi tratada com T4 DNA Polimerase, purificada com fenol-clorofórmio, precipitada com glicerol/acetato de amônio/etanol e ressuspendida em 18µL de água milli-Q.

Posteriormente, as 6 reações foram digeridas com 1 U de cada enzima nas combinações AluI/HaeIII, AluI/SspI, AluI/DraI, HaeIII/DraI, HaeIII/SspI e DraI/SspI (New England Biolabs) e os fragmentos entre 50-150pb foram purificados, clonados no vetor pRH5' e transformados conforme descrito na seção 3.9.

Ao final de 83 eletroporações, um total aproximado de $7 \cdot 10^6$ clones primários foram obtidos e amplificados em meio semi-sólido conforme descrito na seção 3.12.

3.12 Expansão das bibliotecas de cDNA primárias em meio semi-sólido

As expansões das bibliotecas primárias foram feitas seguindo o protocolo do sistema “SuperScript™ Plasmid System with Gateway™ Technology for cDNA Synthesis and Cloning” (Invitrogen). Para cada biblioteca, aproximadamente 8×10^5 transformantes primários foram inoculados para cada 500 mL de meio LB contendo 1.35 g de “agarose type IX: Ultra – low Gelling Temperature” (Sigma) e carbenicilina para concentração final de 50 µg/mL. Posteriormente, as culturas foram incubadas em banho de gelo por 1 hora e depois em estufa a 30°C por 40–45 horas. Após essa incubação, as células foram centrifugadas por 20 minutos a 7000 r.p.m. e ressuspensas em um volume final de 200 mL de meio LB contendo 12,5% de glicerol. A biblioteca foi então quantificada e estocada em tubos de 1,5 mL a -80°C.

3.13 Mini e Max preparação dos plasmídeos

As extrações de DNA plasmidial em pequena escala foram feitas de acordo com a referência Sambrook e colaboradores, 1989.

As extrações de DNA plasmidial em larga escala foram feitas utilizando o QUIAGEN-tip 500, seguindo o protocolo “QUIAGEN® Plasmid Purification Handbook”.

Para a maxi preparação da biblioteca de cDNA, aproximadamente 2.5×10^9 transformantes foram usados como pré-inóculo para 500 mL de meio LB contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de carbenicilina. As células foram crescidas a 30°C até O.D_{600} de aproximadamente 1.0 e o DNA foi extraído conforme descrito no parágrafo acima. Todo DNA obtido por maxi preparação foi diluído ou precipitado para uma concentração final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.14 Transformação de levedura em pequena escala

As transformações de levedura em pequena escala foram feitas seguindo o protocolo “ProQuest Two-Hybrid System Technology” (Invitrogen), que se baseia no método de transformação química com acetato de lítio 0.1 M e PEG 3350 40%. As co-transformações foram feitas com 1 μg dos vetores pYESTrp3/PUF (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e pRH5'/RNA de interesse (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em 50 μL de célula competente YBZ-1, seguido de incubação a 30°C por 30 minutos e choque-térmico a 42°C por 15 minutos. Em seguida, as reações foram centrifugadas a 8000 r.p.m. por 30 segundos, ressuspendidas em 500 μL de água milli-Q estéril e plaqueadas em meio mínimo YC com um volume de 100 μL . O meio mínimo YC foi preparado conforme descrito no protocolo do kit “RNA-Protein Hybrid Hunter™ Kit” (Invitrogen).

3.15 Transformação de levedura em larga escala

Os ensaios de levedura em larga escala foram realizados seguindo o protocolo “ProQuest Two-Hybrid System Technology” (Invitrogen), que se baseia na transformação química com acetato de lítio 0.1 M e PEG 3350 40%. Para cada ensaio, 150 μL do vetor pYESTrp3/PUF (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e 150 μL da biblioteca de cDNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foram adicionados a 4 mL de célula competente YBZ-1 e 12 mL de solução PEG 40%/Acetato de lítio 0,1 M. As células foram então divididas em aliquotas de 950 μL em tubos eppendorf de 1,5 mL, incubadas a 30°C por 30

minutos e a 42°C por 15 minutos. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 8000 r.p.m. por 30 segundos, ressuspendidas em 400 µL de água milli-Q e plaqueadas em 30 placas de Petri de 150 mm contendo meio mínimo YC sem os aminoácidos uracila, triptofano e histidina YC(Ura,Trp,His⁻) e a concentração apropriada de 3-aminotriazol.

3.16 Análise qualitativa da ativação do repórter *LacZ* em ensaios de triplo-híbrido

A indução do repórter *LacZ* foi observada seguindo o método descrito no protocolo do sistema “ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway™ Technology” (Invitrogen). As colônias testadas foram crescidas sobre uma membrana de nitrocelulose em meio sólido YPDA (10g de extrato de levedura, 20g de peptona, 20g de glicose, 0,2g de adenina e 20 g de ágar para volume final de 1L) a 30°C entre 18-24h. Em seguida, a membrana foi mergulhada em nitrogênio líquido por aproximadamente 30 segundos e colocada sobre uma placa de petri contendo um papel de filtro embebido de uma mistura de 10 mL de tampão Z (16,1g Na₂HPO₄.7H₂O, 5,5g NaH₂PO₄.H₂O, 0,75g KCl e 0,246g MgSO₄.7H₂O para 1 L de água, pH 7), 500 µL de X-Gal 20 mg/mL em dimetilformamida e 60 µL de β-mercaptoetanol. As placas foram incubadas a 37°C e monitoradas quanto ao surgimento de coloração azul das colônias.

3.17 Análise quantitativa da ativação do repórter *LacZ* no sistema triplo-híbrido

As análises quantitativas de ativação do repórter *LacZ* foram feitas seguindo o protocolo “ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway™ Technology” (Invitrogen), que utiliza um ensaio de cultura líquida e orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato. Cada colônia a ser testada foi crescida durante a noite em 2,5 mL de meio mínimo YC faltando uracila e triptofano (Ura⁻,Trp⁻) a 30°C e 250 r.p.m. Em seguida, 1 mL da cultura foi usado como pré-inóculo para 5 mL de meio rico YPDA e incubado a 30°C e 250 r.p.m. até O.D₆₀₀ entre 1.0-1.5.

Após o crescimento, 1,5 mL de célula foi centrifugado e ressuspendido em 1,5 mL de tampão Z (descrito na secção 3.15). As células foram novamente centrifugadas e ressuspendidas em 300 µL de tampão Z, resultando num fator de concentração de 5 vezes. Desse volume ressuspendido, 100 µL de células foram lisadas com choque térmico em nitrogênio líquido e banho-maria a 37°C por três vezes. Após a adição de 0,7 mL de tampão Z contendo 0,27% de β-mercaptoetanol. a cada tubo de células lisadas, 160 µL de ONPG (4 mg/mL) em tampão Z foram imediatamente adicionados e as reações foram incubadas a 30°C por 1 hora. As reações foram interrompidas com 0,4 mL de Na₂CO₃ 1M e centrifugadas a máxima rotação por 10 minutos. O sobrenadante foi usado para determinação da densidade óptica em espectrofotômetro em 420 nm. Uma mistura do tampão Z com ONPG foi usada como tubo branco.

Para a determinação das unidades de β-galactosidase em cada reação, a fórmula abaixo foi usada:

$$\text{Unidades de } \beta\text{-galactosidase} = 1,000 \times O.D_{420} / (t \times V \times O.D_{600})$$

Onde: t= tempo de incubação transcorrido

$$V = 0,1 \text{ mL} \times \text{fator de concentração e } O.D_{600} = A_{600} \text{ de } 1 \text{ mL de cultura}$$

3.18 Extração de DNA plasmidial de levedura em tubo eppendorf

Extrações de DNA plasmidial de levedura em tubo foram realizadas seguindo o protocolo descrito por Bernstein e colaboradores, 2002. Aproximadamente 3 mL de uma cultura crescida durante a noite em meio mínimo a 30°C foi precipitado a máxima rotação por 5 minutos. A parede celular foi rompida através da adição de 100 µL de uma solução de lise (5% Triton X-100, 8% sacarose, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA), seguido de agitação em vortex por 5 minutos com 0,2 g de pérolas de vidro (Sigma), adição de mais 100 µL da solução

de lise e fervura por 3 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi separado, o DNA foi precipitado com etanol e o precipitado ressuscitado em 10 µL de H₂O. O DNA plasmidial obtido foi transferido para *E. coli* H10B utilizando um volume de 1 µL para cada eletroporação.

3.19 Extração de DNA plasmidial de levedura em placa

As extrações de DNA plasmidial de levedura em placa de 96 poços “COSTAR, assay block, cat No. 3960”, foram realizadas conforme protocolo Sambrook, 1989.

Em cada placa, 96 colônias positivas foram inoculadas em 2 mL de meio mínimo YC (Ura) e incubadas a 30°C e 250 r.p.m. por 36-48 h. Em seguida, as células foram precipitadas por centrifugação a 4°C e 2700 r.p.m. por 8 minutos e o sobrenadante foi descartado por inversão. O material precipitado foi ressuscitado por agitação no volume residual de meio e 1 mL de “rescue buffer” (50 mM Tris-Cl pH 7,5; 10mM EDTA; 0,3% β-mercaptoetanol) foi adicionado a cada poço. Após este procedimento, a placa foi agitada por vortex e as células foram precipitadas por centrifugação a 4°C e 2700 r.p.m. por 8 minutos. O material precipitado foi então ressuscitado em 25 µL de solução de lise (2 mg/mL de zymoliase, 0,2 mg/mL de RNase em “rescue buffer”) e incubado a 37°C por 1 hora, sendo 25 µL de uma solução SDS 10% adicionada posteriormente a cada poço. A placa foi mantida em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente e um volume 100 µL de acetato de potássio 3M foi adicionado e incubado em freezer a -80°C por 15 min. Após o descongelamento, a placa foi centrifugada a 4°C e 4000 rpm por 15 minutos e 120 µL do sobrenadante foi recolhido em placa MicroAmp (Applied Biosystem, cat No. N801-0560). Para cada 120 µL, 84 µL de isopropanol foi adicionado, centrifugado a 4000 r.p.m. por 30 min, descartado o sobrenadante e o precipitado lavado com etanol 70%. Após a secagem do precipitado, o DNA foi ressuscitado em 10 µL de água.

3.20 Reações de seqüenciamento dos clones

As reações de PCR para seqüenciamento foram realizadas utilizando o kit “Big Dye Terminator Ready Reaction Mix” (Applied Biosystems) com algumas modificações referentes ao protocolo do fabricante. Para cada reação, utilizou-se 6 µL de tampão “save money” (200 mM de Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM de MgCl₂), 3,2 pmols de oligonucleotídeo, 200-500 ng de DNA, 1,5 µL de “Terminator Ready Reaction Mix” e água para um volume final de 20 µL. As condições da reação foram 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos para 40 ciclos. A precipitação e a aplicação no seqüenciador automático ABI 377 da Perkin Elmer seguiram o protocolo do equipamento.

3.21 Indução das proteínas recombinantes em pequena escala

Um procedimento padrão de indução em pequena escala foi usado para testes iniciais de indução das proteínas recombinantes em *E.coli*. As linhagens de *E. coli* testadas para a expressão das proteínas recombinantes foram BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysS(RP) e BL21(DE3)pLysS(Ril). Primeiramente, uma colônia isolada contendo o vetor de expressão pET28a/cDNA de interesse foi inoculada em 6 mL de meio 2xYT contendo os antibióticos necessários. As culturas foram incubadas a 37°C e 200 r.p.m. até O.D₆₀₀ igual a 0,8. Alíquotas de 1 mL foram então retiradas e usadas como controle das amostras não induzidas. Em seguida, 0,4 mM de isopropil-tiogalactosídeo (IPTG) foi adicionado para indução da expressão das proteínas. Após 4 horas de indução, alíquotas de 1 mL foram retiradas e usadas como controle de amostras induzidas. As amostras de indução e não-indução foram centrifugadas a 14000 r.p.m. por 5 minutos a temperatura ambiente, ressuspendidas em tampão de amostra (50% glicerol, 260 mM de Tris-HCl pH 6,8, SDS 10% , 0,5% azul de bromofenol e β- mercaptoetanol), fervidas durante 10 minutos e corridas em gel SDS-PAGE 12% ou 15% (Sambrook et al., 1989).

3.22 Indução das proteínas recombinantes em larga escala

Para indução de proteínas em larga escala, uma alçada de colônias transformadas com o plasmídeo de expressão foi transferida para 150 mL de 2xYT contendo os antibióticos necessários e crescida a 37°C e 200 r.p.m. até OD₆₀₀ igual a 0,8. Posteriormente, uma alíquota de 25 mL foi utilizada como inóculo para 500 mL de 2xYT contendo os antibióticos necessários e incubada a 37 °C sob agitação de 200 r.p.m. até OD₆₀₀ igual a 0,8. Após a retirada de uma alíquota de 1 mL para controle de células não induzidas, a cultura foi induzida com 0.4mM de isopropil-tiogalactosídeo (IPTG) por 4 horas a 37 °C. Um volume de 1 mL foi então retirado e as células foram coletadas por centrifugação a 4°C e 5000 r.p.m. por 15 minutos. As amostras controles (não induzida e induzida) foram centrifugadas, ressuspensas em tampão de amostra, fervidas e corridas em gel SDS-PAGE 12% ou 15% (Sambrook et al., 1989).

3.23 Purificação das proteínas recombinantes induzidas em larga escala

Células coletadas após indução em larga escala foram ressuspensas em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 25% sacarose, 1 mM EDTA pH8,0 e inibidor de proteases Roche) e lisadas em “French Press”. Posteriormente, o material foi centrifugado por 45 minutos a 15000 r.p.m.. Para proteínas solúveis, o sobrenadante obtido após a lise foi separado e usado na purificação em HPLC. Para proteínas insolúveis, o precipitado do material lisado foi ressuspendido com 20 mL de Tampão A (50 mM de Tris-HCl pH 8, 20 mM de Imidazol, 100 mM NaCl) contendo 14 mM de β-mercaptoetanol e 8 M de uréia. Como o vetor pET28a possui uma cauda de hexahistidina, uma coluna de afinidade (Ni²⁺) foi usada na purificação de todas as proteínas em equipamento de HPLC. Para proteínas solúveis, a coluna foi equilibrada com 10 volumes do Tampão A, enquanto que para proteínas insolúveis, a coluna foi equilibrada com 10 volumes de tampão A contendo 14 mM de β-Mercaptoetanol e 8 M de uréia. Aproximadamente

20 mL de cada material foi aplicado na coluna, seguido de lavagem com 10 volumes do Tampão A e eluição em tampão B (50 mM de Tris-HCl pH 8, 500 mM de Imidazol, 100 mM NaCl) para proteínas solúveis ou tampão B contendo 14 mM de β -mercaptoetanol e 8 M de Uréia para proteínas insolúveis, com um gradiente de concentração de imidazol. As frações de 2 mL referentes ao pico de eluição da proteína foram recolhidas. Por fim, a coluna foi lavada com 20 volumes de etanol 20%.

3.24 Produção da região N-terminal da proteína APUM-2 e imunização de coelhos para obtenção de anti-soro

RNA total foi extraído de plantas com 2 semanas de crescimento utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), conforme o protocolo do fabricante. As reações de síntese do cDNA foram realizadas utilizando o kit “SuperScript II Reverse Transcriptase” (Invitrogen) conforme protocolo do fabricante. Um volume de 1 μ L do cDNA foi usado como molde em reações de RT-PCR utilizando a enzima “Taq polimerase High Fidelity” (Invitrogen) e os pares de oligos específicos para a amplificação do cDNA de APUM-2. Os oligos possuem as seqüências necessárias para as reações de recombinação no sistema GatewayTM (Invitrogen). As seqüências dos oligos usados foram F-5’AAAAGCAGGCTTCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCATGATACCGGAACTGGGG 3’ e R-5’AGAAAGCTGGGTTTACGCCATCTGAGGCTGGGTTAGGGACTGCAAAGCCATCC 3’. Os produtos amplificados nas reações foram posteriormente transferidos para o vetor pDONR201 do sistema GatewayTM (Invitrogen) através de reações de recombinação BP, seguido de transferência para o vetor de expressão pDEST17 do mesmo sistema através de reações de recombinação LR. A construção foi então digerida com a enzima de restrição StyI e o vetor foi religado com T4 DNA ligase (New England Biolabs). A região N-terminal, mais uma pequena

região de 11 aminoácidos da região C-terminal da proteína APUM-2 (65 KDa) foi produzida em *E. coli* BL21(SI) contendo o plasmídeo mágico. A proteína recombinante foi purificada conforme descrito na secção 3.23.

Para imunização, foram usados dois coelhos machos de 3 meses de idade. Antes da primeira imunização, uma alíquota do soro de cada coelho foi retirada e usada como controle de soro pré-imune. O primeiro inóculo foi feito com 200µg (400µL) de proteína recombinante purificada (0,5 µg/µL) junto ao mesmo volume de adjuvante completo (Sigma). Outros três inóculos foram feitos a cada sete dias com 200µg de proteína (400µL) junto ao mesmo volume de adjuvante incompleto (Sigma). O sangue de cada coelho foi então colhido, centrifugado e o soro foi separado e armazenado em alíquotas de 1mL em freezer a -20°C.

3.25 Imunização de camundongos

Aproximadamente 10 camundongos foram imunizados para cada proteína recombinante, sendo 10 µg de proteína usados por inóculo em cada animal. Todas as proteínas foram diluídas para uma concentração final de 0,1 µg/µL. O primeiro inóculo foi feito com uma mistura de 100 µL da proteína com o mesmo volume de adjuvante completo (Sigma). Os três inóculos restantes foram feitos a cada sete dias com 100 µL de proteína junto ao mesmo volume de adjuvante incompleto (Sigma). Após o quarto inóculo, o sangue de cada camundongo foi retirado, centrifugado e o soro foi armazenado em alíquotas de 200 µL a -20°C.

3.26 Extração de proteínas totais

A extração de proteína total foi feita a partir de 50 mg de tecido pulverizado em N₂ líquido e ressuspenso em 50 µL de tampão de extração (50mM de Tris-acetato pH 7,9, 100 mM de acetato de potássio, 1 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 20% de glicerol e 200 µM de PMSF). A

suspensão foi centrifugada a 4°C e 14000 r.p.m por 10 minutos e o sobrenadante foi recolhido em um novo tubo para as análises (Welgel and Glazebrook, 2002). Os extratos foram quantificados pelo método de Hartree (Hartree, 1972).

3.27 Ensaios de Western blot

Após eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (Sambrook et al, 1989), as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra-Amersham Biosciences) em tampão Tris/Glicina 20 mM pH 9,0 e 20% de etanol utilizando o equipamento “Trans-Blot Semi-Dry Eletroforetic Transfer Cell” (Bio-Rad), de acordo com as especificações do fabricante, por 1 hora a 15 V. Posteriormente, a membrana de nitrocelulose foi corada com solução de Ponceau (Corante Ponceau 0,2%/Ácido Acético 1,0%) e descorada em água. A membrana foi então bloqueada em tampão TBS-TT (20 mM de Tris-HCl pH 7,6 , 137 mM de NaCl, 0,03% de Tween-20 e 0,05% de Triton X-100) + 5% leite desnatado por 2 horas à temperatura ambiente e incubada com anticorpo diluído em TBS-TT + 5% leite desnatado durante a noite a 4°C. No dia seguinte, a membrana foi lavada por 5 vezes de 15 minutos em tampão TBS-TT e incubada por 1 a 2 horas com o anticorpo secundário proteína-A (no caso de anti-soro produzido em coelho) ou anti-IGG (para anti-soros produzidos em camundongos) diluído 1:30000 (proteína-A) e 1:10000 (anti-IGG) em tampão TBS-TT + 5% leite, seguido de lavagem por 5 vezes de 15 minutos com tampão TBS-TT. Os anticorpos secundários proteína-A e anti-IGG são conjugados a peroxidase. Em seguida, a membrana foi reagida em solução ECL (Amersham) conforme protocolo do fabricante e o resultado da reação do ECL com a peroxidase foi observado em filme de raio X.

Para os ensaios semiquantitativos, foram usados 20 µg de extrato protéico de plantas selvagens crescidas em meio 0,5xMS contendo 10 µM do indutor dexametasona e também de

plantas transgênicas antisense induzíveis por dexametasona crescidas em meio 0,5xMS sem a adição do indutor ou com a adição de 10 μ M do indutor. Para cada proteína investigada, foram feitas reações em triplicata para três lotes de plantas crescidas independentemente. As bandas obtidas foram quantificadas com o auxílio do software LabWorks 4.0 e posteriormente comparadas com a quantificação da proteína majoritária RUBISCO na membrana de nitrocelulose corada com reagente de Ponceau.

Para o cálculo da porcentagem de proteína nas plantas analisadas, a quantificação das bandas obtidas no Western blot foi dividida pela quantificação da banda da proteína RUBISCO. Após ensaios em triplicata para três lotes de plantas crescidas independentemente, 9 relações (proteína Western/RUBISCO) foram obtidas para cada proteína em cada uma das três situações de crescimento. A média entre as 9 relações e também o desvio padrão foram calculados e usados para gerar um gráfico (ver resultados).

3.28 Reações de RT-PCR semiquantitativo

RNA total foi extraído de plantas selvagens crescidas em meio 0,5xMS contendo 10 μ M do indutor dexametasona e também de plantas transgênicas antisense induzíveis por dexametasona crescidas em meio 0,5xMS sem a adição do indutor ou com a adição de 10 μ M do indutor. Para cada reação de síntese de cDNA, foram utilizados 2 μ g de RNA total, a enzima “Superscript III Reverse Transcriptase” (Invitrogen) e “random primers”, conforme protocolo do fabricante. O RNA total usado foi extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante.

As reações de RT-PCR semiquantitativo foram feitas utilizando 1 μ L de cDNA, 5 μ L de tampão (10X), 1,5 μ L de MgCl₂ (50 mM), 1,0 μ L de dNTP (10 mM), 1 μ L de cada oligo (10 μ M), 0,2 μ L de Taq Platinum (Invitrogen) e 39,3 μ L de H₂O. As condições foram 95°C por 2 minutos,

95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto. Os oligos usados para amplificação de *FAS-2*, *ZLL*, *WUS* e *CLV-1* foram os mesmos descritos para a clonagem dos cDNAs no vetor de expressão pET28a (Tabela 4). O cDNA de *ACTINA* foi usado como normalizador nas reações e os oligos usados foram F-5' ATGGCTGATGGTGAAGACATTC3' e R-5' TCGGTTAGGATCTTCATCAGCG3'. Os oligos usados na amplificação do cDNA At3g63500 foram F-5' CATGCCATGGGAAACAGCTGAGACAAGCT3' e R-5' ACGCGTCGACTTACAAGGCCAGACTCTGCTT 3'. Todos os produtos amplificados variaram entre 700-900 pb.

Para selecionar um ponto fora da saturação, os tubos foram retirados individualmente em diferentes ciclos e um volume de 10 µL foi corrido em gel de agarose 1%. Após a análise quantitativa das bandas no software LabWorks 4.0, o ciclo 28 foi escolhido para as reações de amplificação dos cDNAs *CLV-1*, *FAS-2*, *ZWILLE*, *At3g63500* e *ACTINA* e o ciclo 38 para amplificação de *WUS*.

Para o cálculo da porcentagem de transcrito nas plantas analisadas, a quantificação das bandas dos cDNAs candidatos a alvo foi dividida pela quantificação da banda de *ACTINA*. Após ensaios em triplicata para quatro lotes de plantas crescidas independentemente, 12 relações (cDNA candidato/ACTINA) foram obtidas para cada cDNA em cada uma das três situações de crescimento. A média entre cada as 12 relações e também o desvio padrão foram calculados e usados para gerar um gráfico (ver resultados).

3.29 Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA)

Oligonucleotídeos referentes à seqüência do transcrito NRE selvagem e NRE mutado no Box B (NREB) foram sintetizados pela empresa BIONEER. As seqüências são: NRE selvagem - 5' AUUAUUUUGUUGUCGAAAAUUGUACAUAAAGCC3' e NREB-

5'AUUUUUUUGUUGUCGAAAAUAUGCAUAAGCC3'. Nas reações de incorporação, foram usados 20 pmoles de cada óligo, 3 μL de tampão NEB 3 (10X), 5 μL de radioativo γ - ^{32}P UTP e 3U de enzima PNK (New England Biolabs) em um volume final de 30 μL . Após incubação por 30 minutos a 37°C, as reações foram purificadas com fenol-clorofórmio, precipitadas com etanol e ressuspensas em 50 μL H_2O livre de RNase.

Para cada reação de ligação “in vitro”, diferentes quantidades da proteína recombinante PUF-2 (0-60 μM) foram usadas em tampão de ligação contendo 2,0 μL de HEPES pH 7,4 (0,1M), 1 μL de KCl (0,1 M), 0,4 μL de MgCl_2 (0,1 M), 0,2 μL de DTT (0,1 M), 0,2 μL de BSA (1mg/mL), 0,2 μL de Tween20 (1%), 0,1 μL de RNase OUT (40U/ μL) (Invitrogen) e 2 μL do RNA marcado radioativamente, num volume final de 20 μL .

Após incubação por 1 a 2 horas a temperatura ambiente e adição de 4 μL de tampão de amostra (6X), as reações foram corridas em gel não desnaturante 5% em tampão TBE 1X, seguido de secagem e exposição em “storage phosphor screen” (Molecular Dynamics).

3.30 Reação de imunoprecipitação do complexo APUM-mRNA

A co-imunoprecipitação das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 diretamente do extrato protéico da planta foi feita conforme descrito em Weigel and Glazebrook, 2002, com algumas modificações. Plantas de 2 a 3 semanas de crescimento foram submetidas a uma reação de “cross-linker reversível” utilizando formaldeído e posteriormente congeladas a -80°C, conforme descrito no artigo Lee e colaboradores, 2006. Para obtenção do extrato protéico, 100 mg do material congelado foram macerados em N_2 líquido, transferido para um eppendorff de 2 mL e ressuspensado em 100 μL de “grinding buffer” (50mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 0,1% Nonidet P-40, inibidor de proteases (1X) (Roche), 100U de RNase OUT/mL (Invitrogen) e 2 mM de “Ribonucleoside Vanadil complex” (Sigma)). Após ressuspensado em

vortex, o extrato foi centrifugado por 5 minutos a 14000 r.p.m. e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Este procedimento foi repetido várias vezes até não existir material sendo precipitado.

Para a imunoprecipitação, 10 μ L de anti-soro contra APUM-1, APUM-2 e APUM-3 ou 10 μ L de um anti-soro inespecífico para as três proteínas foram incubados com 100 μ L de proteína-A ligada covalentemente a sefarose (Sigma) sob leve agitação a 4°C durante a noite. O complexo anti-soro/proteína-A foi então centrifugado por 10 minutos a 14000 r.p.m., lavado com 1 mL de “grinding buffer” por 3 vezes e incubado com 100 μ L do extrato de proteínas sob leve agitação a 4°C durante a noite. Após centrifugação, o material foi lavado por 3 vezes com 1 mL de “grinding buffer” e o precipitado foi incubado a 65°C para desfazer o “cross-linker” (Lee et al., 2006). O RNA foi extraído da amostra utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) e usado em reações de síntese de cDNA.

4. Resultados

4.1 Análise da capacidade de ligação a RNA das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3

Um alinhamento feito no programa CLUSTALW mostrou que as regiões C-terminal dos homólogos *ARABIDOPSIS PUMILIO* – 1, 2 e 3 (APUM-1, APUM-2 e APUM-3) possuem uma identidade de aproximadamente 50% com a seqüência de aminoácidos do domínio PUF do homólogo PUMILIO de *Drosophila* e também as oito repetições necessárias para o reconhecimento do RNA (Fig. 7B). Resultados obtidos através de ensaios com o repórter GUS realizados pela Doutora Elaine Cristina Favaro mostraram que as expressões de APUM-1, APUM-2 e APUM-3 co-localizam em tempo e espaço nas regiões meristemáticas do caule e da raiz, em primórdios foliares e tecidos de calo (Fig. 8 e Fig. 10), indicando uma provável redundância funcional entre essas proteínas. Baseado nessas informações e na alta identidade entre os três homólogos (Fig. 7A), nós primeiramente concentramos os esforços na confirmação da capacidade de ligação a RNA de APUM-1, APUM-2 e APUM-3 e também na capacidade dessas proteínas em reconhecer o mesmo transcrito.

Em *Drosophila*, a regulação do mensageiro *HUNCHBACK* é dependente da ligação de PUMILIO à região chamada de elemento de resposta a NANOS (NRE) presente na região 3' UTR do transcrito (Fig. 3 e Fig. 18A). Tendo em vista a alta identidade das regiões C-terminal de APUM-1, APUM-2 e APUM-3 com o domínio PUF do homólogo de *Drosophila* (Fig. 7B), nós utilizamos o sistema triplo-híbrido de levedura para verificar a interação dessas regiões (chamadas de domínios PUF-1, PUF-2 e PUF-3, respectivamente) com o transcrito NRE. Os resultados das análises de indução do repórter *LacZ* mostraram que as três proteínas reconhecem o transcrito de *Drosophila* especificamente (Fig. 18B).

O reconhecimento da seqüência NRE pelo homólogo PUMILIO ocorre através do Box A, que contém um trinucleotídeo UGU e do Box B, que contém um tetranucleotídeo UGUA (Tabela

1). Para verificar se os domínios PUF-1, PUF-2 e PUF-3 também utilizam os boxes A e B como as principais regiões de ligação ao RNA, nós analisamos a interação dessas proteínas com transcritos NRE possuindo mutações no Box A (NREA), Box B (NREB) e nos Boxes A e B conjuntamente (NREAB) (Fig 18 A). As mutações foram geradas levando-se em consideração a troca dos trinucleotídeos UGU nos dois boxes (Murata & Wharton, 1995; Cui et al., 2002). Os resultados das análises de indução do repórter *LacZ* no sistema triplo-híbrido mostraram que as três proteínas reconhecem o transcrito NRE através do Box B (Fig. 18 B). Medidas quantitativas da β -galactosidase produzida indicaram que os domínios PUF-1, PUF-2 e PUF-3 reconhecem os transcritos NRE e NREA com afinidades semelhantes. Além disso, os resultados mostraram que a ativação do repórter *LacZ* é totalmente abolida quando o Box B do transcrito NRE é mutado (Fig. 18 C).

Para checar se o reconhecimento do transcrito NRE pode ser afetado pela divergência existente entre as regiões N-terminal das três proteínas APUM com a mesma região do homólogo PUMILIO de *Drosophila*, a proteína APUM-2 inteira foi testada no sistema triplo-híbrido contra o transcrito NRE selvagem e NRE mutantes. O resultado mostrou que APUM-2 reconhece os transcritos de forma similar àquela observada para o domínio PUF-2, uma vez que o reconhecimento também ocorreu através do Box B (Fig. 18 D).

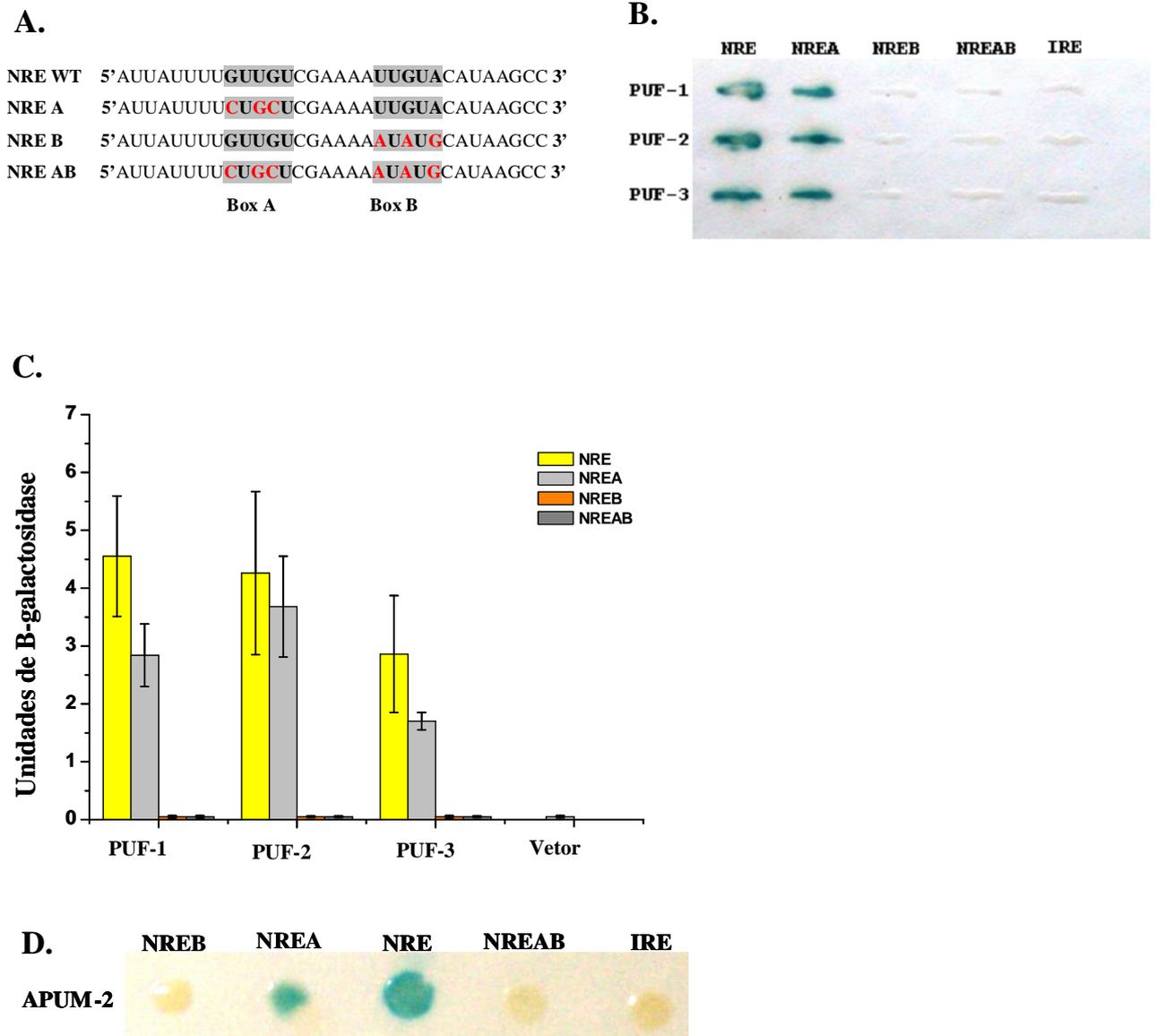


Figura 18: Análise da capacidade de ligação a RNA das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 no sistema triplo-híbrido de levedura. A) Seqüência dos transcritos usados nos ensaios. As regiões marcadas em cinza são os boxes A e B, respectivamente, e as regiões em vermelho são as substituições geradas em cada transcrito. NRE WT: transcrito NRE selvagem; NREA: transcrito NRE mutante no Box A; NREB: transcrito NRE mutante no Box B; NREAB: transcrito NRE mutante nos Boxes A e B. B) Ensaio qualitativo de ativação do repórter *LacZ* nas interações entre os domínios PUF de ligação dos homólogos APUM-1, APUM-2 e APUM-3 (chamados de domínios PUF-1, PUF-2 e PUF-3, respectivamente) e os transcritos NRE. O transcrito *IRE* foi usado como controle negativo de interação. C) Análise quantitativa da β -galactosidase produzida nas interações mostradas em B. O vetor pYESTrp3 vazio foi usado como controle negativo de interação. D) Ensaio qualitativo de ativação do repórter *LacZ* nas interações entre a proteína APUM-2 inteira e os transcritos NRE. O transcrito *IRE* foi usado como controle negativo de interação.

Portanto, os resultados indicam que APUM-1, APUM-2 e APUM-3 são proteínas PUF com a capacidade de ligação a RNA evolutivamente conservada e que o reconhecimento é dependente da sequência UGUA presente no Box B do transcrito NRE. A interação com o RNA independe das regiões N-terminal das proteínas, tornando-se possível especular que embora o transcrito NRE não seja o mensageiro alvo dos três homólogos, a sequência UGUA deve estar presente no(s) verdadeiro(s) mensageiro(s) regulado(s). Além disso, essas proteínas devem reconhecer os nucleotídeos AUA presentes após o motivo UGUA do transcrito NRE, assim como ocorre em homólogos de outros organismos (Tabela 1).

4.2 Ensaio de interação “*in vitro*” entre o domínio de ligação PUF-2 e o transcrito NRE

O ensaio de ligação “*in vitro*” de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA) foi usado para confirmar os resultados das interações obtidos com o sistema triplo-híbrido. Para isso, o domínio PUF-2 foi induzido na cepa BL21(DE3)pLysS(RP) e purificado em coluna de níquel (Fig. 19).

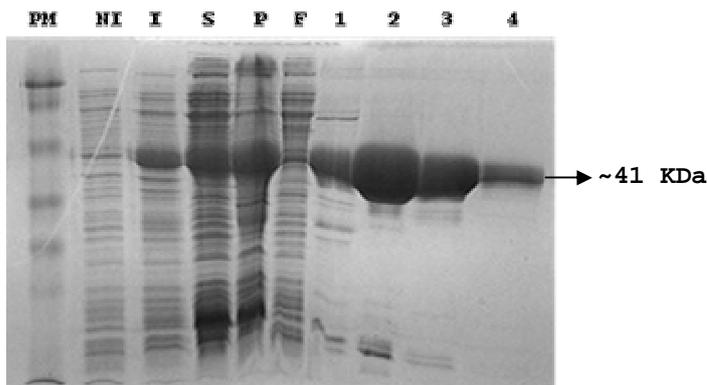


Figura 19: Indução da proteína recombinante PUF-2 em *E. coli* BL21(DE3)pLysS(RP) e purificação em coluna de níquel em HPLC. Após a lise das células, a proteína foi encontrada tanto no sobrenadante quanto no precipitado. O sobrenadante foi utilizado para purificação. PM: Marcador de peso molecular; NI: Amostra não induzida; I: Amostra induzida; S: Sobrenadante após lise das células; P: Precipitado após lise das células; F: recuperado pós-coluna. As colunas numeradas representam a quantidade de tubos obtidos durante a eluição da proteína da coluna níquel.

Para o ensaio de ligação “*in vitro*”, várias concentrações da proteína recombinante PUF-2 (0 – 60 μM) foram incubadas com o transcrito NRE selvagem e com o transcrito NRE mutado no Box B (NREB) marcados com [γ - ^{32}P UTP]. Após incubação por 1 hora a temperatura ambiente, as reações foram corridas em gel não desnaturante 6% e expostas em “Phosphor screen”. Os resultados obtidos confirmam os ensaios de triplo-híbrido, uma vez que o domínio de ligação PUF-2 foi capaz de ligar ao transcrito NRE selvagem (Fig. 20A). Por outro lado, o ensaio mostrou uma pequena interação entre PUF-2 e o transcrito NREB, talvez devido a um possível reconhecimento do Box A não detectado pelo sistema triplo-híbrido (Fig. 20B).

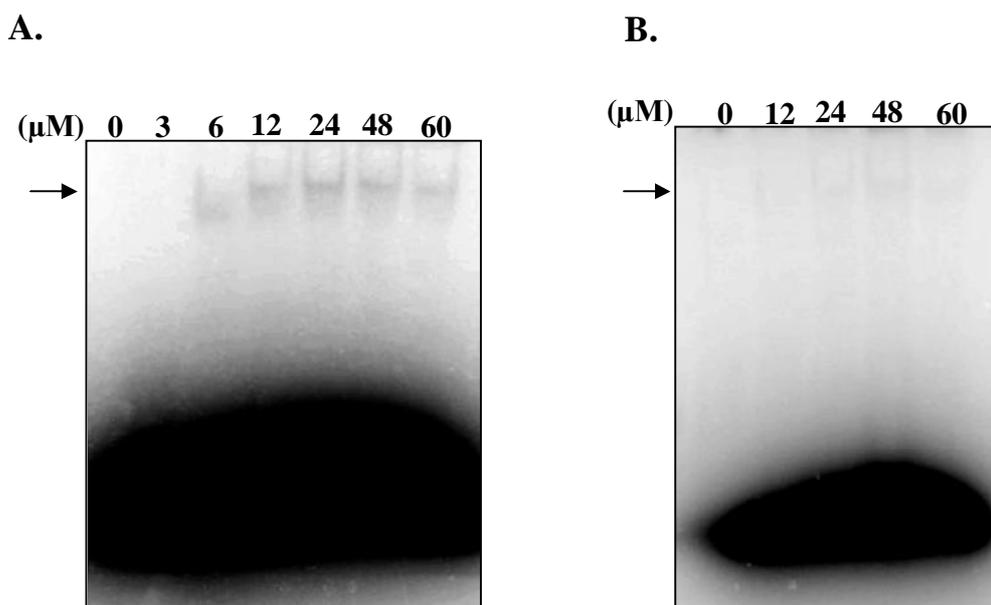


Figura 20: Ensaio de interação “*in vitro*” entre o domínio de ligação recombinante PUF-2 e os transcritos NRE selvagem e NRE mutado no Box B (NREB), ambos marcados radioativamente com [γ - ^{32}P UTP]. A) Experimento de mudança de mobilidade eletroforética entre o domínio de ligação PUF-2 e o transcrito NRE selvagem. As quantidades de proteína recombinante usadas foram 0, 3, 6, 12, 24, 48 e 60 μM . B) Experimento de mudança de mobilidade eletroforética entre o domínio de ligação PUF-2 e o transcrito NREB. As quantidades de proteína recombinante usadas foram 0, 12, 24, 48 e 60 μM . As amostras foram corridas em gel não desnaturante 6%.

4.3 Utilização de uma biblioteca de cDNA com fragmentos entre 500-1500 pb para identificação de candidatos a alvo de APUM-1, APUM-2 e APUM-3 em ensaios de triplo-híbrido

Uma vez que a capacidade de ligação a RNA dos três homólogos PUF de interesse foi confirmada, os esforços foram concentrados na identificação de possíveis candidatos a alvo dessas proteínas. Primeiramente, uma biblioteca híbrida de cDNA com fragmentos entre 500-1500 pb foi gerada a partir de RNA mensageiro extraído de diferentes tecidos da planta. Essa biblioteca, inicialmente construída para ser utilizada nos sistemas um e dois híbridos de levedura, foi transferida para o vetor pRH5' do sistema triplo-híbrido através de reações de recombinação, utilizando as facilidades do sistema Gateway (Invitrogen). Após a obtenção de aproximadamente $1 \cdot 10^6$ transformantes primários, a biblioteca foi expandida em meio semi-sólido, aliquotada e congelada a -80°C .

Para os ensaios de triplo-híbrido, o domínio de ligação PUF-2 (utilizado como isca) foi co-transformado com a biblioteca de cDNA na cepa YBZ-1. Interessantemente, mesmo após vários ensaios, nenhuma interação positiva foi obtida. Uma explicação para esse resultado pode ser atribuída ao tamanho dos fragmentos de RNA gerados a partir da biblioteca, uma vez que Sengupta e colaboradores, 1999, descreveram o sucesso na identificação de RNAs ligados à proteína de levedura SNP1 quando uma biblioteca construída a partir de DNA genômico com fragmentos entre 50-150 pb foi usada. O artigo mostra que o tamanho do fragmento de RNA é um fator limitante do sistema, uma vez que os repórteres não foram ativados eficientemente quando transcritos com tamanhos maiores que 400 pb foram ligados a uma proteína controle.

4.4 Construção e análise de uma biblioteca de cDNA com fragmentos entre 50-150 pb

Como descrito acima, Sengupta e colaboradores, 1999, construíram uma biblioteca com fragmentos pequenos a partir de DNA genômico. Uma vez que o genoma de *Arabidopsis thaliana* possui aproximadamente $130 \cdot 10^6$ pb, a construção de uma biblioteca genômica com insertos entre 50-150 pb exigiria a obtenção de aproximadamente $1,3 \cdot 10^6$ clones primários para que todo o genoma estivesse representado uma única vez. Como os fragmentos gerados para a construção da biblioteca possuem extremidades cegas, seriam necessários aproximadamente $1,3 \cdot 10^7$ clones primários para que a biblioteca representasse cinco vezes o genoma, considerando-se a probabilidade de 50% dos insertos entrarem na posição senso durante a clonagem no vetor pRH5'.

Devido à grande quantidade de clones primários necessária para a construção de uma biblioteca genômica e à dificuldade na obtenção de um vetor linearizado com alta eficiência de inserção, nós optamos pela construção de uma biblioteca de cDNA sintetizado a partir de RNA mensageiro extraído de plântulas de 2 a 3 semanas de crescimento e também de buquês de flores. O cDNA sintetizado foi digerido com enzimas de restrição específicas e os fragmentos entre 50-150 pb foram purificados e ligados ao vetor pRH5'. Após as eletroporações, aproximadamente $7 \cdot 10^6$ clones primários foram obtidos.

Para checar a representatividade da biblioteca primária, 100 clones foram escolhidos aleatoriamente e seqüenciados. Como o esperado, apenas 2 seqüências representaram o vetor pRH5' vazio, enquanto que as 98 restantes foram derivadas de clones distintos com tamanhos variando entre 30-190 pb, sendo 56 na orientação senso e 42 na orientação antisenso (Tabela 5).

Tabela 5: Clones seqüenciados para análise da representatividade da biblioteca primária de cDNA contendo fragmentos entre 50-150 pb. Os 100 clones foram escolhidos aleatoriamente e foram derivados de 98 seqüências distintas.

Número de clones	Insertos Senso	Insertos Antisenso	Vetor Vazio
100	56	42	02

Portanto, o seqüenciamento indicou que dos $7 \cdot 10^6$ clones primários obtidos, 2% é vetor vazio e aproximadamente 50% estão na orientação senso, resultando em aproximadamente $3,5 \cdot 10^6$ clones primários na posição de interesse. Em seguida, a biblioteca primária foi expandida em meio semi-sólido, alíquotada e congelada a -80°C .

Para verificar se a biblioteca gerada pode auto-ativar o repórter histidina (*HIS3*) no sistema triplo-híbrido, co-transformações em pequena escala com $1\mu\text{g}$ da biblioteca e $1\mu\text{g}$ do vetor pYESTrp3 vazio foram plaqueadas em meio mínimo YC (Ura,Trp,His)⁻ sem 3-aminotriazol (3-AT) ou com concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM, 2,5 mM e 5,0 mM de 3-AT. 3-aminotriazol é um inibidor competitivo do produto do gene repórter *HIS3*, assim, células contendo maior quantidade do produto *HIS3* podem sobreviver em maiores quantidades do inibidor (Bernstein et al., 2002). Os resultados mostraram que a auto-ativação da biblioteca pode ser praticamente inibida quando as células são crescidas em meio YC contendo 0,5 mM de 3-AT.

4.5 Utilização da biblioteca de cDNA com fragmentos entre 50-150 pb para a identificação de candidatos a alvo das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 em ensaios de triplo-híbrido

Todos os ensaios de triplo-híbrido com a biblioteca de cDNA foram realizados utilizando o domínio de ligação PUF-2 como isca. Os ensaios foram divididos em 3 etapas (Figura 21): 1ª) Seleção de colônias que ativam os repórteres *HIS3* e *LacZ*. 2ª) Identificação das colônias onde a

ativação dos repórteres é dependente da interação com a isca PUF-2. Essa etapa é de extrema importância para a eliminação de falso positivos, que são capazes de ativar os repórteres de maneira independente da ligação à isca. 3ª) Extração de DNA plasmidial das colônias onde a ativação é dependente de PUF-2 e nova transformação dos clones isolados com o domínio PUF-2 no sistema triplo-híbrido. Os clones capazes de ativar os genes repórteres especificamente nesse ensaio (chamados de clones de seqüências específicas) foram então seqüenciados e identificados com o auxílio do BLAST no banco de dados de *Arabidopsis* TAIR.

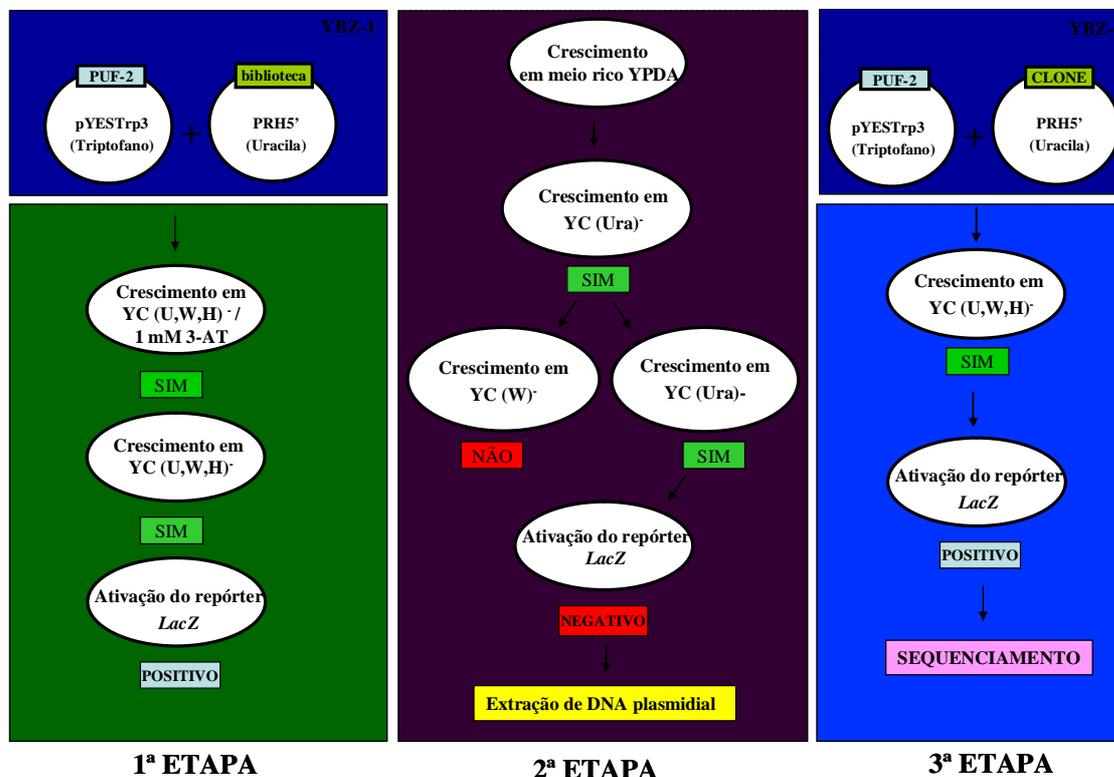


Figura 21: Esquema mostrando as etapas seguidas nos ensaios de tripla híbrido em larga escala. **1ª etapa:** Células YBZ-1 co-transformadas com os vetores pYESTrp3/PUF-2 (seleção com triptofano) e pRH5'/biblioteca (seleção com uracila) que ativaram o repórter *HIS3* foram capazes de crescer em meio mínimo YC faltando uracila, triptofano e histidina contendo 1 mM de 3-AT (YC (U,W,H)⁻/1mM de 3-AT). Essas células foram repicadas em meio mínimo YC (Ura,Trp,His)⁻ e testadas quanto a ativação do repórter *LacZ*. **2ª etapa:** Colônias positivas para os dois repórteres foram crescidas em meio rico YPAD para posterior seleção de colônias que perderam o vetor pYESTrp3/PUF-2 mas não o vetor pRH5'/biblioteca. As colônias verdadeiramente positivas que perderam a ativação do repórter *LacZ* após terem o vetor pYESTrp3/PUF-2 expelido foram submetidas à extração de DNA plasmidial. **3ª etapa:** Os clones isolados foram co-transformados com o vetor pYESTrp3/PUF-2 na cepa YBZ-1 e testados quanto a ativação dos repórteres *HIS3* e *LacZ* no sistema triplo-híbrido. Como controle negativo, os clones também foram co-transformados com a proteína controle do sistema triplo-híbrido IRP. Clones que ativaram o repórter na presença de PUF-2 (seqüência específica), mas não na presença de IRP foram então seqüenciados. Em todas as etapas, o crescimento das células ocorreu à temperatura de 30°C.

No primeiro ensaio, aproximadamente $3,5 \cdot 10^6$ transformantes da biblioteca foram testados contra o domínio PUF-2 em meio YC (Ura,Tpr,His)⁻/1mM 3-AT. A tabela 6 mostra a quantidade de colônias obtidas em cada seleção.

Tabela 6: Número de colônias obtidas em cada etapa do primeiro ensaio de triplo-híbrido com a biblioteca de cDNA com fragmentos entre 50-150 pb. Aproximadamente $3,5 \cdot 10^6$ clones foram transformados.

Etapa	Número de colônias
Crescimento em (His)⁻ + 1mM 3-AT	743
β-galactosidase positiva	133
Proteína dependente	115
Seqüência específica	94
Seqüenciamento	94

Dos clones seqüenciados, 44 foram derivados de seqüências na orientação senso. Entre eles, 8 foram derivados de regiões 3' UTR de 5 transcritos diferentes (Tabela 7).

Tabela 7: Relação dos transcritos que tiveram suas regiões 3' UTR ligadas especificamente pelo domínio PUF-2 no primeiro ensaio de triplo-híbrido com a biblioteca de cDNA. O número de identificação, a descrição e as informações sobre a possível função biológica foram obtidos no banco de dados de *Arabidopsis* TAIR.

Número de Identificação	Nº. de vezes isolado	Descrição	Função Biológica
At3g63500	4	Proteína expressa	Desconhecida
At2g40140	1	Proteína “Zinc finger” com domínio de Ankirina	Regulação da transcrição e defesa contra infecção por fungo.
At4g36040	1	Proteína contendo domínio DNAJ	Enovelamento protéico
At4g39090	1	“Embryo defective” (RD19)	Resposta a estresse Fisiológico
At5g24490	1	Proteína ribossomal	Envolvida no processo de tradução.

Além desses transcritos de regiões 3' UTR, quatro transcritos distintos foram identificados como sendo regiões 5' UTR dos genes At4g23420 (família de proteína SDR/função desconhecida), At3g16460 (família de proteína jacalina lectina/função desconhecida), At3g12370 (proteína ribossomal/processo de tradução) e At4g19160 (proteína expressa/função desconhecida).

Posteriormente, um segundo ensaio foi feito para a identificação de novos candidatos e confirmação dos candidatos obtidos no primeiro ensaio. Nesse experimento, aproximadamente $2,2 \cdot 10^6$ transformantes da biblioteca foram testados contra o domínio PUF-2 em meio YC (Ura,Tpr,His)/ 1mM 3-AT. A tabela 8 mostra a quantidade de colônias obtidas em cada seleção.

Tabela 8: Número de colônias obtidas em cada etapa do segundo ensaio de triplo-híbrido com a biblioteca de cDNA com fragmentos entre 50-150 pb. Aproximadamente $2,2 \cdot 10^6$ clones foram transformados.

Etapas	Número de colônias
Crescimento em (His)⁻ + 1mM 3-AT	1030
β-galactosidase positiva	160
Proteína dependente	102
Seqüência específica	75
Seqüenciamento	75

Dos 75 clones seqüenciados, 35 foram derivados de seqüências na orientação senso, sendo 5 deles regiões 3' UTR de 2 transcritos diferentes que já haviam sido obtidos no primeiro ensaio (Tabela 9).

Tabela 9: Relação dos transcritos que tiveram suas regiões 3' UTR ligadas especificamente pelo domínio PUF-2 no segundo ensaio de triplo-híbrido com a biblioteca de cDNA. O número de identificação, a descrição e a possível função biológica foram obtidos no banco de dados de *Arabidopsis* TAIR.

Número de Identificação	Nº. de vezes isolado	Descrição	Função Biológica
At3g63500	3	Proteína expressa	Desconhecida
At2g40140	2	Proteína "Zinc finger" com domínio Ankirina	Regulação da transcrição e defesa contra infecção por fungo.

Nesse ensaio, o transcrito 5' UTR do gene At4g19160 (proteína expressa/função desconhecida), que já havia sido identificado no experimento anterior, foi identificado 3 vezes.

Um terceiro ensaio no sistema triplo-híbrido foi realizado plaqueando o material transformado em meio mínimo YC (Ura,Trp,His)⁻ contendo 2,5mM 3-AT. Com uma maior estringência, apenas colônias com as interações mais fortes entre PUF-2/RNA poderiam sobreviver. Nesse experimento, aproximadamente 1,0. 10⁶ transformantes da biblioteca foram testados contra o domínio PUF-2, conforme mostrado na tabela 10.

Tabela 10: Número de colônias obtidas em cada etapa do terceiro ensaio de triplo-híbrido com a biblioteca de cDNA. Devido ao baixo número de colônias *LacZ* positivas, a etapa de identificação de clones proteína dependentes não foi realizada. Aproximadamente 1,0. 10⁶ clones foram transformados.

Etapas	Número de colônias
Crescimento em (His)⁻ + 2,5mM 3-AT	120
B-galactosidase positiva	31
Proteína dependente	Não realizado
Seqüência específica	20
Seqüenciamento	20

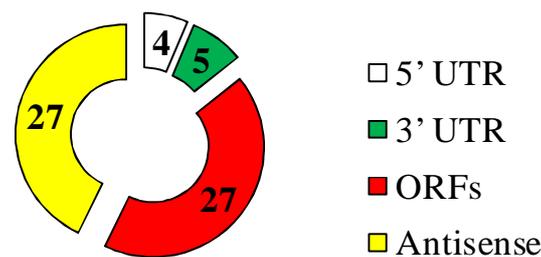
Infelizmente, dos 20 clones seqüenciados, nenhum foi derivado de transcritos de regiões 3' UTR ou 5' UTR.

Em resumo, após os três ensaios de triplo-híbrido realizados, aproximadamente 7.10^6 transformantes independentes foram testados contra o domínio PUF-2, obtendo-se um total de 189 interações positivas derivadas de 63 clones distintos (Fig. 22A). Desses 63 clones, 36 (57%) foram derivados de insertos na orientação senso, sendo 5 (15%) regiões 3' UTR (Fig. 22B).

A.

Número de transformantes	$7,0 \times 10^6$
Crescimento em (His)^r + 3-AT	1893
Colônias com β-galactosidase positiva	324
Colônias proteína dependentes	237
RNAs ligados especificamente por PUF-2	189
Seqüências distintas	63

B.



63 seqüências distintas

Figura 22: Resultado final dos três ensaios de triplo-híbrido usando o domínio de ligação PUF-2 como isca contra a biblioteca de cDNA de fragmentos entre 50-150 pb. A) Número total de colônias identificadas considerando todos os passos realizados nos três ensaios. B) Distribuição das 63 seqüências distintas identificadas em relação às suas posições no transcriptoma de *Arabidopsis*.

4.6 Expressão das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 em tecido de calo

Experimentos de localização utilizando o repórter GUS mostraram que os genes *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3* são bastante expressos em tecido de calo (Fig. 10). Para confirmar a alta expressão das três proteínas APUM nesse tecido, a região N-terminal da proteína APUM-2 foi produzida e posteriormente usada para a produção de anti-soro em coelhos. A eficácia do anti-soro produzido foi verificada em ensaio de Western blot (Fig. 23).

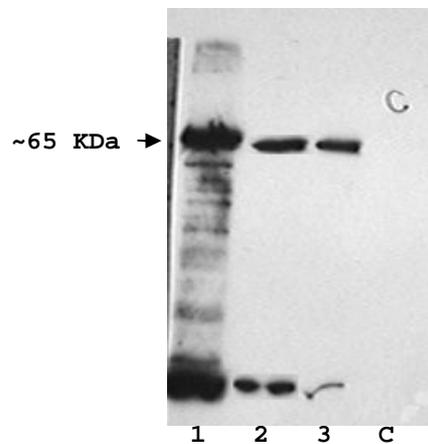


Figura 23: Ensaio de Western blot para validação do anti-soro contra APUM obtido no coelho 1. A proteína recombinante APUM-2/N-terminal (região N-terminal de APUM-2, com aproximadamente 65 KDa) inoculada no animal foi usada no ensaio contra diferentes diluições do anti-soro. 1: Anti-soro diluído 1:400; 2: Anti-soro diluído 1:1000; 3: Anti-soro diluído 1:10000; C: Controle negativo (proteína recombinante contra o soro pré-imune do coelho). O mesmo experimento foi realizado para o anti-soro do coelho 2 e o resultado obtido foi similar ao mostrado na figura.

Em seguida, o anti-soro foi utilizado em um Western blot contra diferentes quantidades de extrato protéico total da planta e também de extrato protéico total de calo. Os resultados confirmaram a alta expressão de APUM em tecido de calo em relação aos tecidos da planta (Fig. 24).

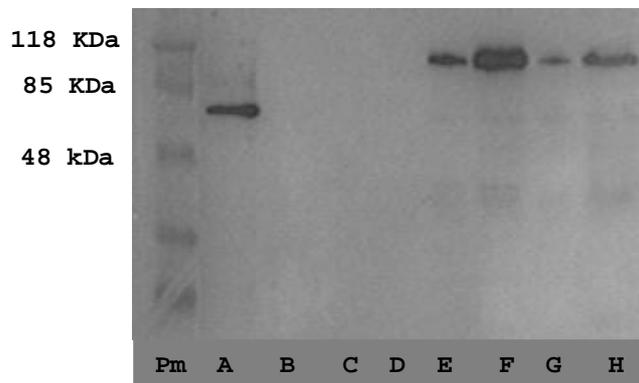


Figura 24: Western blot do extrato protéico total da planta e do extrato protéico total de calo com o anti-soro contra APUM-2. PM: Marcador de peso molecular. A) Proteína recombinante APUM-2/N-terminal (aproximadamente 65 kDa). B), C) e D) 1 μ g, 2,5 μ g e 5 μ g, respectivamente, de extrato total da planta. E) e F) 2,5 μ g e 5 μ g, respectivamente, de extrato total de calo. G) e H) 2,5 μ g e 5 μ g, respectivamente, de extrato total de calo de uma planta APUM-2 nocaute, indicando que o anti-soro é capaz de reconhecer as proteínas APUM-1 e APUM-3. As proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 possuem aproximadamente 110 kDa e a diluição do anti-soro utilizada no ensaio foi 1:10000.

Os resultados obtidos permitem especular que a alta expressão das proteínas APUM está diretamente relacionada à uma grande quantidade do(s) mensageiro (s) regulado(s). Dessa forma, uma biblioteca construída a partir mensageiros de tecido de calo poderia aumentar as chances de identificação de possíveis alvos para os três APUMs em relação à biblioteca da planta, onde a expressão das proteínas é restrita a pequenas regiões em um nível bem menor do que aquele encontrado em calo.

4.7 Construção e análise de uma biblioteca de cDNA de calo com fragmentos entre 50-150pb

Para checar a hipótese descrita acima, uma biblioteca de cDNA de tecido de calo com fragmentos entre 50-150 pb foi construída. Aproximadamente $7 \cdot 10^6$ clones primários foram obtidos após as eletroporações. Para checar a representatividade da biblioteca primária, 100 clones foram escolhidos aleatoriamente e seqüenciados.

Os tamanhos dos clones seqüenciados variaram entre 35-160 pb, sendo todos eles fragmentos distintos entre si. Os resultados indicam que dos $7 \cdot 10^6$ clones primários, um número muito pequeno de clones corresponde ao vetor pRH5' vazio (5%) e 55% (aproximadamente $3,9 \cdot 10^6$) são transcritos na orientação senso (Tabela 11). Posteriormente, os clones foram amplificados em meio semi-sólido, aliquotados e congelados a -80°C .

Tabela 11: Clones seqüenciados para análise da representatividade da biblioteca primária de cDNA de calo. Os 100 clones foram escolhidos aleatoriamente e foram derivados de 95 seqüências distintas.

Número de clones	Insertos Senso	Insertos Antisenso	Vetor Vazio
100	55	40	5

Após a extração de DNA plasmidial da biblioteca, foram realizados testes para checar a auto-ativação do repórter *HIS3* da mesma forma descrita para a biblioteca de cDNA da planta (secção 4.4). Os testes mostraram um pequeno crescimento quando 0,5 mM de 3-AT foi adicionado ao meio de crescimento.

4.8 Utilização da biblioteca de cDNA de calo com fragmentos entre 50-150 pb para a identificação de candidatos a alvo das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 em ensaio de triplo-híbrido

A metodologia usada no ensaio seguiu as etapas descritas na figura 21. Nesse experimento, aproximadamente $4 \cdot 10^6$ transformantes da biblioteca foram testados contra o domínio PUF-2 (Tabela 12).

Tabela 12: Número de colônias obtidas em cada etapa do ensaio de triplo-híbrido com a biblioteca de cDNA de calo.

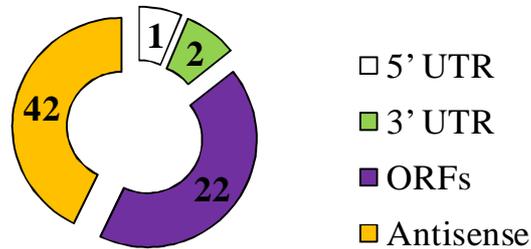
Etapa	Número de colônias
Crescimento em (His)^r + 1 mM 3-AT	193
β-galactosidase positiva	137
Seqüência específica	112
Seqüenciamento	112

O seqüenciamento mostrou que as 112 interações positivas foram derivadas de 66 clones distintos. Desses 66 clones, 22 (37%) foram insertos na orientação senso, sendo 2 (9%) regiões 3' UTR (Tabela 13 e Fig.25).

Tabela 13: Relação dos transcritos que tiveram suas regiões 3' UTR ligadas especificamente pelo domínio PUF-2 no ensaio de triplo-híbrido com a biblioteca de cDNA de calo. O número de identificação, a descrição e a possível função biológica foram obtidos no banco de dados de *Arabidopsis* TAIR.

Número de Identificação	Nº. de vezes isolado	Descrição	Função Biológica
At4g27450	3	Proteína desconhecida	Desconhecida
At1g72710	2	Proteína Caseína Kinase	Desconhecida

Além dos 3 transcritos 3' UTR mostrados na tabela 13, um transcrito 5' UTR com número de identificação At5g39570 (proteína de função desconhecida) também foi identificado.



66 seqüências distintas

Figura 25: Resultado do seqüenciamento dos clones obtidos no ensaio de triplo-híbrido com a biblioteca de cDNA de calo usando o domínio de ligação PUF-2 como isca. A figura mostra a distribuição das 66 seqüências distintas identificadas em relação às suas posições no transcriptoma da planta.

4.9 Análise dos transcritos 3' UTR obtidos nos ensaios de triplo-híbrido

Como até o momento nenhum transcrito alvo da família PUF mostrou ser regulado através da ligação à sua região 5' UTR, uma pesquisa bibliográfica sobre os transcritos 3' UTR obtidos nos ensaios de triplo-híbrido foi feita tomando-se como base as informações descritas no banco de dados TAIR. Como o esperado, todos os transcritos possuem regiões semelhantes ao Box B do transcrito NRE (abaixo, marcados em cinza). Os resultados das pesquisas bibliográficas para cada transcrito estão detalhados abaixo:

At3g63500: O tamanho do cDNA é 3699 pb.

Correlações biológicas	(região do cDNA) Seqüência identificada
<ul style="list-style-type: none"> A proteína foi descrita ser capaz de interagir com proteínas ligadas ao genoma de vírus, facilitando o seu movimento e aumentando a suscetibilidade da planta pelo mesmo (Dunoyer et al., 2004). 	<p>(183)5'ugcgucugacaUGUACAGCcc cugccaaauuuuaauaggcaatAGUAAAU</p>
<ul style="list-style-type: none"> Possui um domínio PHD “Finger”, sendo portanto, um possível fator de transcrição. O domínio PHD “Finger” é frequentemente encontrado em proteínas relacionadas à remodelação da cromatina (Sung & Amasino, 2004). 	<p>Aaauaacgacaagaagcaaaugg 3' (3257)</p>

At2g40140: O tamanho do cDNA é 2223 pb.

Correlações biológicas	(região do cDNA) Seqüência identificada
<ul style="list-style-type: none"> Proteína conhecida como ZFAR1. Apresenta domínio “zinc finger” do tipo CCH com atividade de fator de transcrição (TAIR). Plantas possuindo um T-DNA no gene apresentam aumento na suscetibilidade de infecção pelo fungo Botrytis (AbuQamar et al., 2006). 	<p>(1840)5'cugccgucgugggcagagcaaaUG UAUAUAgaccaugagcagcagauuguggc auaa 3' (1896)</p>

-
- Possui um domínio de repetições de Ankirina (TAIR). Esses tipos de repetições estão presentes em proteínas envolvidas em diferentes funções, como regulação do ciclo celular, interações do citoesqueleto e transdução de sinal (Becerra et al., 2004).
-

At4g36040: O tamanho do cDNA é 1104 pb.

Correlações biológicas	(região do cDNA) Seqüência identificada
<ul style="list-style-type: none"> • Proteína com um domínio DNAJ, sendo portanto, envolvida no enovelamento proteico (TAIR). 	<p>(528)5'cuacgucggacggaacugggaaaccga ucaguguugguagugaguuaacucggugaccg aguuaguagaacgaguuaauuagUGUAAA UAcgaagcca 3' (625)</p>
<ul style="list-style-type: none"> • O gene é positivamente regulado pelos fatores de transcrição APETALA3 e PISTILLATA em pétalas e estames (Zik & Irish, 2003b). Os fatores APETALA3 e PISTILLATA estão diretamente envolvidos na formação e na especificação de pétalas e estames (Krizek & Meyerowitz, 1996). 	

At4g39090: O tamanho do cDNA é 1533 pb.

Correlações biológicas	(região do cDNA) Seqüência identificada
<ul style="list-style-type: none"> • Proteína conhecida como “embryo defective 3005” ou RD19 “Responsive to Desiccation 19” (Yamaguchi et al., 1992). 	<p>(1339)5’uuuauucucugcuucucugcuUGUA</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Descrita como sendo uma cisteína proteinase com resposta a alguns tipos de estresses fisiológicos (Xiong et al., 2002). A proteína também foi descrita estar envolvida no sistema de resistência à infecção pela bactéria <i>Ralstonia solanacearum</i> (Bernoux et al., 2008). 	<p>AAUAaa 3’ (1367)</p>

• **At5g24490:** O tamanho do cDNA é 1298 pb.

Correlações biológicas	(região do cDNA) Seqüência identificada
<ul style="list-style-type: none"> • Um possível componente estrutural da subunidade ribossomal 30S no cloroplasto (TAIR). 	<p>(1046)5’cucaucucuccuuacaguuuaccug uguaggaguuaggguuucugaauaacaauagc aacaagauuguagaagucagUGUACAU A 3’(1132)</p>

At1g72710: O tamanho do cDNA é 2086 pb.

Correlações biológicas	(região do cDNA) Seqüência identificada
<ul style="list-style-type: none"> • Proteína caseína kinase do tipo I. Caseína kinases do tipo I têm sido relacionadas a importantes processos, como tráfico vesicular, segregação cromossomal, progressão do ciclo celular, processos de desenvolvimento e ritmo circadiano (Gross & Anderson, 1998; Knippschild et al., 2005). 	<p>(1690)5'ccagugaaugaucuugaaacccccggg acaagUGUAAAUUAaaagacaaagaugac cucuc 3' (1749)</p>

At4g27450: O tamanho do cDNA é 1134 pb.

Correlações biológicas	(região do cDNA) Seqüência identificada
<ul style="list-style-type: none"> • Recentemente, foi mostrado que a expressão do transcrito At4g27450 é diminuída em relação ao aumento do hormônio auxina (Wirta et al., 2005). Pouco é conhecido a respeito desses genes que diminuem a expressão em resposta a auxina exógena (Park & Han, 2003). Em um estudo de um ortólogo ARP (auxin-repressed protein) de <i>Robinea pseudoacacia</i>, relacionado ao tamanho do hipocótilo, Park e Han, 2003, mostraram que a diminuição do nível do transcrito após a adição de auxina é regulada pós-transcricionalmente através das regiões UTRs. 	<p>(1044)5'cuugccaugaauaaaacUGUGA AUAauaaag 3' (1074)</p>

4.10 Interação das proteínas APUM-1 e APUM-3 com os transcritos 3' UTR identificados nos ensaios de triplo-híbrido

Os resultados de interação entre os domínios de ligação PUF-1, PUF-2 e PUF-3 e os transcritos NRE indicaram que as três proteínas podem reconhecer a mesma seqüência de RNA (Fig. 18). Para confirmar esses dados, os transcritos identificados nos ensaios de triplo-híbrido com a biblioteca da planta foram testados contra os domínios PUF-1 e PUF-3 no sistema triplo-híbrido. Os resultados mostraram que de fato, os três homólogos podem reconhecer os mesmos transcritos especificamente (Fig.26).

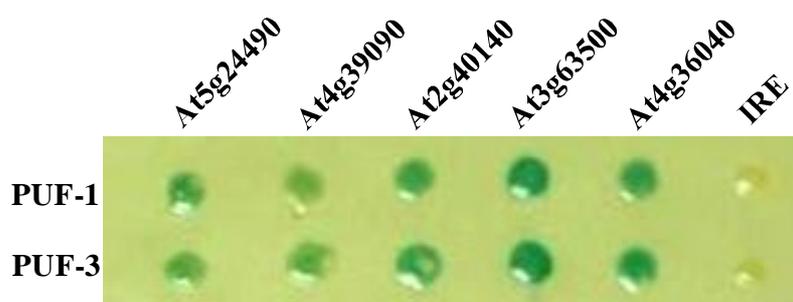


Figura 26: Análise qualitativa da ativação do repórter *LacZ* nas interações entre os domínios de ligação PUF-1 e PUF-3 com os transcritos 3' UTR identificados nos ensaios de triplo-híbrido utilizando a biblioteca da planta. O transcrito *IRE* foi usado como controle negativo de interação.

4.11 Identificação de uma sequência de ligação consenso para os homólogos APUM

Em todos os ensaios de triplo híbrido descritos, os clones identificados foram seqüenciados somente após a confirmação da interação específica com o domínio PUF-2, mediante a ausência de interação com a proteína controle IRP. Supreendentemente, um grande número de transcritos derivados de clones na orientação antisense foram ligados pelo domínio PUF-2 (Fig.22 e Fig. 25), sugerindo que independentemente da existência biológica do transcrito identificado, deve haver uma característica comum entre todos os RNAs ligados por PUF-2.

Para checar essa possibilidade, o programa MEME “multiple expectation maximization for motif elucidation” (<http://meme.nbcr.net/meme/intro.html>) (Bailey & Elkan, 1994) foi utilizado para a identificação de uma região consenso entre todos os 129 clones distintos identificados nos ensaios de triplo-híbrido com a biblioteca da planta e com a biblioteca de tecido de calo (Fig.22 e Fig. 25). Após a análise do alinhamento, o programa mostrou que a semelhança entre as seqüências se restringe a uma região de 8 nucleotídeos muito similar à seqüência do Box B do transcrito NRE (Fig. 27A e 27B). A partir das regiões identificadas, foi possível derivar duas seqüências consenso possuindo os nucleotídeos mais conservados em cada posição (Fig. 27C e 27D). Os consensos foram nomeados como “elementos de ligação a APUM”. A similaridade entre os elementos de ligação a APUM e o Box B confirma as análises de interação entre os domínios PUF-1, PUF-2 e PUF- 3 e os transcritos NRE no sistema triplo-híbrido, onde foi observado que a ligação com o RNA ocorre independentemente do Box A (Fig. 18B e 18C).

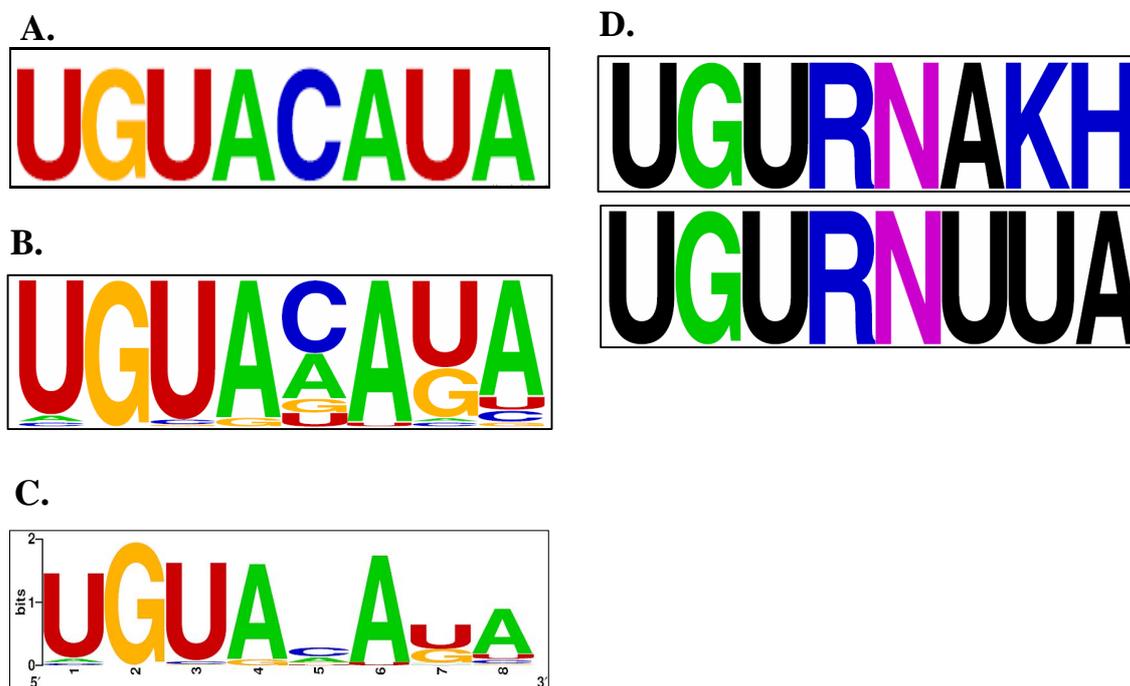


Figura 27: Alinhamento das 129 seqüências obtidas nos ensaios de triplo-híbrido com a biblioteca da planta e com a biblioteca de calo no programa MEME. A) Seqüência do Box B presente no transcrito NRE considerando os nucleotídeos CAUA. B) Região de oito nucleotídeos presente em 100% das seqüências analisadas. C) Análise da frequência de nucleotídeos em cada posição do motivo identificado em B. A altura das letras indica a frequência do nucleotídeo observada em cada posição do motivo (programa Weblogo <http://weblogo.berkeley.edu/>) (Crooks et al., 2004). D) Seqüências consenso para as proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 derivadas da região mostrada em B e C. R: nucleotídeos A ou G; K: nucleotídeos G ou U; H: nucleotídeos A, C ou U; N: nucleotídeos A, C, G e U. As seqüências foram chamadas de elementos de ligação a APUM. Somente nucleotídeos que apresentaram uma frequência mínima de 10% em cada posição foram usados para compilar o consenso.

4.12 Validação dos consensos e sua utilização na identificação de candidatos a alvo das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3

Uma vez que os dois elementos de ligação a APUM identificados são muito pequenos, suas frequências no transcriptoma da planta devem ser bastante altas. De fato, uma busca dos dois consensos no banco de dados de *Arabidopsis* TAIR mostrou que aproximadamente 56% de todas as regiões codificadoras (ORFs) e 43% de todas seqüências 3' UTR possuem pelo menos uma

região de ligação a APUM. Interessantemente, a frequência do consenso em regiões 5' UTR é significativamente menor (Tabela 14).

Tabela 14. Ocorrência dos elementos de ligação a APUM no transcriptoma de *Arabidopsis thaliana*.

Consenso	5' UTR^a	3' UTR^a	ORF^a
UGURNAKH	1831	7630	16803
UGURNUUA	377	1881	3844

^aSeqüências conhecidas e putativas descritas no banco de dados de *Arabidopsis thaliana* (TAIR). Os valores obtidos são resultados das análises de um total de 21835 seqüências 3' UTR, 20564 seqüências 5'UTR e 36690 regiões codificadoras (ORFs).

Uma vez que aproximadamente 12. 10⁶ clones foram testados contra o domínio PUF-2 nos ensaios de triplo híbrido com a biblioteca da planta e com a biblioteca de calo, os dados da tabela 14 indicam que o número de transcritos identificados deveria ser bem maior do que os 129 obtidos. Esse contraste imediatamente remete à seguinte pergunta: Os elementos de ligação a APUM deduzidos através das seqüências obtidas nos ensaios de triplo-híbrido são suficientes para o reconhecimento da proteína?

Para tentar responder a pergunta acima, nós utilizamos novamente o banco de dados de *Arabidopsis* TAIR para identificar transcritos que possuem elementos de ligação a APUM em suas regiões 3' UTR e que co-expressam com as proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 em tempo e espaço no meristema de caule. O resultado da pesquisa mostrou a ocorrência do consenso em regiões 3' UTR de um grande número de transcritos com funções bem descritas na literatura, sendo vários deles relacionados ao controle do meristema e à função de manutenção das células totipotentes (Tabela 15).

Tabela 15. Relação de alguns transcritos relacionados ao controle do meristema do caule que co-localizam com as proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 e possuem o elemento de ligação a APUM em suas regiões 3' UTR. O número de identificação, a localização do elemento de ligação a APUM no transcrito e a função biológica descrita foram obtidos no banco de dados TAIR.

Nome (Identificação)	(Localização do consenso na região 3' UTR)	Função
<i>FASCIATA-1</i> (At1g65470)	(79)UGUGGAUA	Organização estrutural dos meristemas do caule e da raíz.
<i>FASCIATA-2</i> (At5g64630)	(486)UGUACAUA (538)UGUGGAUC	Organização estrutural dos meristemas do caule e da raíz.
<i>CLAVATA-1</i> (At1g75820)	(90)UGUAUAUU (113)UGUAUAUU	Diferenciação celular e regulação do meristema do caule.
<i>CLAVATA-2</i> (At1g65380)	(18)UGUAUAUU (63)UGUGAAGU (116)UGUGUAUA	Diferenciação celular e regulação do meristema do caule.
<i>CLAVATA-3</i> (At2g27250)	(34)UGUAAAUU	Diferenciação celular e regulação do meristema do caule.
<i>ZWILLE</i> (At5g43810)	(84)UGUAAAUU	Controle da organização das células da zona central e periférica no meristema de caule.
<i>STM</i> (At1g62360)	(136)UGUGUATC	Manutenção de células totipotentes e regulação do meristema do caule.
<i>WUSCHEL</i> (At2g17950)	(147)UGUAAUUA	Manutenção de células totipotentes e regulação do meristema do caule.

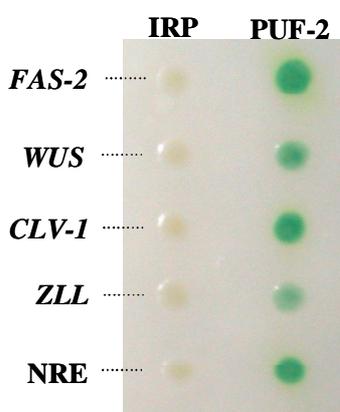
Para o teste de interação, foram escolhidos os transcritos *CLAVATA-1* (*CLV-1*), *WUSCHEL* (*WUS*), *FASCIATA-2* (*FAS-2*) e *ZWILLE* (*ZLL*), uma vez que possuem algumas das diferentes variações no elemento de ligação a APUM preditas nos consensos (Fig. 27D e 28A). Os experimentos foram realizados seguindo a mesma estratégia utilizada para os transcritos NRE, ou seja, uma região de 32 pb da região 3' UTR de cada transcrito contendo o elemento de ligação a APUM foi sintetizada (Fig. 28A), clonada no vetor pRH5' e testada contra o domínio de

ligação PUF-2 no sistema triplo-híbrido de levedura. Surpreendentemente, as análises qualitativas e quantitativas da ativação do repórter *LacZ* mostraram que o domínio PUF-2 é capaz de interagir especificamente com os quatro transcritos testados (Fig. 28B e 28C). Análises adicionais mostraram que os domínios PUF-1 e PUF-3 também reconhecem esses transcritos especificamente (não mostrado).

A.

NRE 5' AUUAUUUUGUUGUCGAAAAU**UGUACAU**AAGCC 3'
WUSCHEL 5' AUCUCUCGUUAUGUGUAAUU**UGUAAUU**ACUAG 3'
CLAVATA-1 5' GUUUCUAAUACUUUCGGGUU**UGUAUAUU**UGUU 3'
ZWILLE 5' CUAUACCAAUGUUUUUCUUA**UGUAAAUU**UUGU 3'
FASCIATA-2 5' CGUCUCGUCUCUAAAGGCAA**UGUACAU**AUAGA 3'

B.



C.

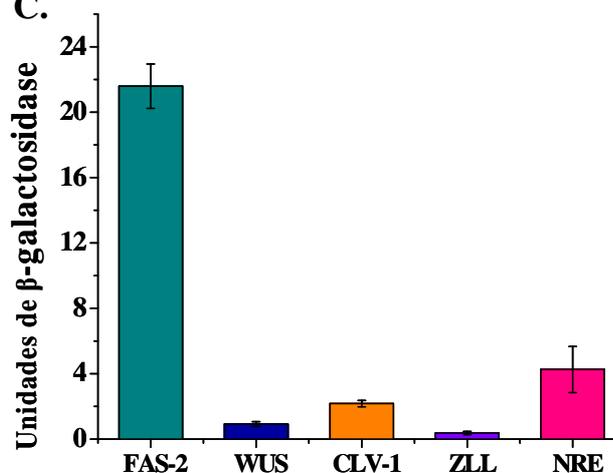


Figura 28: Validação das seqüências consenso de ligação e identificação de candidatos a alvo das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3. Os transcritos *CLAVATA-1* (*CLV-1*), *WUSCHEL* (*WUS*), *FASCIATA-2* (*FAS-2*) e *ZWILLE* (*ZLL*) foram escolhidos para o teste de interação por apresentarem em suas regiões 3' UTR diferentes variações do elemento de ligação a APUM e também por co-localizarem com as proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 no meristema do caule. A) Seqüências de 32 nucleotídeos usadas nos ensaios de interação no sistema triplo-híbrido. O elemento de ligação a APUM presente em cada seqüência é marcado em cinza. A seqüência do transcrito NRE é mostrada para comparação. B) Ensaio qualitativo de ativação do repórter *LacZ* nas interações entre o domínio de ligação PUF-2 e os transcritos candidatos a alvo. O transcrito NRE foi usado como controle positivo e a proteína IRP foi usada como controle negativo de especificidade. C) Análise quantitativa da produção de β -galactosidase obtida em cada interação. Os valores foram obtidos após ensaios em triplicata.

Portanto, os resultados indicam que a presença do elemento de ligação a APUM é suficiente para o reconhecimento do domínio PUF-2. Além disso, os consensos podem ser utilizados para a identificação de possíveis mensageiros alvo das proteínas APUM, uma vez que os transcritos usados nos ensaios possuem motivos de ligações com diferentes variações preditas na figura 27D. Em adição, os dados fornecem indícios de que os homólogos APUM podem ter um papel central no controle do meristema do caule em *Arabidopsis*, podendo regular vários pontos do desenvolvimento da planta através do controle traducional de importantes transcritos.

4.13 Análise dos nucleotídeos adjacentes ao motivo de ligação a APUM

Até o momento, os resultados apresentados mostram que o elemento de ligação a APUM é suficiente para que o transcrito seja reconhecido pelas proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3. No entanto, embora o motivo de ligação possa garantir a interação, as análises quantitativas de β -galactosidase indicaram que o domínio PUF-2 se liga aos transcritos testados com diferentes afinidades (Fig. 28C). As diferenças observadas nos motivos de ligação dos transcritos *FAS-2*, *WUS*, *CLV-1* e *ZLL* (Fig. 28A) permitem sugerir que pequenas variações nessas regiões são suficientes para afetar a afinidade da interação com a proteína em diferentes níveis. Por outro lado, apesar dos transcritos *FAS-2* e NRE serem reconhecidos através do mesmo elemento UGUACAUA (Fig. 28A), *FAS-2* é ligado por PUF-2 com uma afinidade aproximadamente cinco vezes maior do que a observada para o transcrito NRE (Fig. 28C). Esses dados indicam que o transcrito *FAS-2* possui nucleotídeos específicos responsáveis pela alta afinidade de ligação que se localizam fora do motivo de reconhecimento da proteína.

Para examinar a contribuição dos nucleotídeos adjacentes ao motivo de ligação em *FAS-2*, transcritos mutantes com substituições duplas nas bases de -1 a -14 e de +9 a +12 (Fig. 29A) foram gerados e testados contra o domínio PUF-2 no sistema triplo-híbrido. A força da interação

foi verificada através de medidas quantitativas da β -galactosidase produzida pela ativação do repórter *LacZ* (Hook et al., 2005). Os resultados mostram que todas as substituições a montante e a jusante reduziram a afinidade de PUF-2 pelo transcrito em diferentes níveis, não havendo incremento em nenhum caso (Fig. 29B e 29C). A redução mais severa foi observada no transcrito apresentando substituições nas posições -1/-2, uma vez que a interação foi totalmente abolida (Fig. 29B). Como o elemento de ligação a APUM também permite a presença de uma guanina na posição +4 (Fig. 27D), uma substituição da adenina presente nessa posição do transcrito *FAS-2* por uma guanina foi gerada e a interação foi testada contra o domínio PUF-2. O resultado mostrou que de fato, a interação é mantida quando uma guanina é presente nessa posição (Fig. 29C).

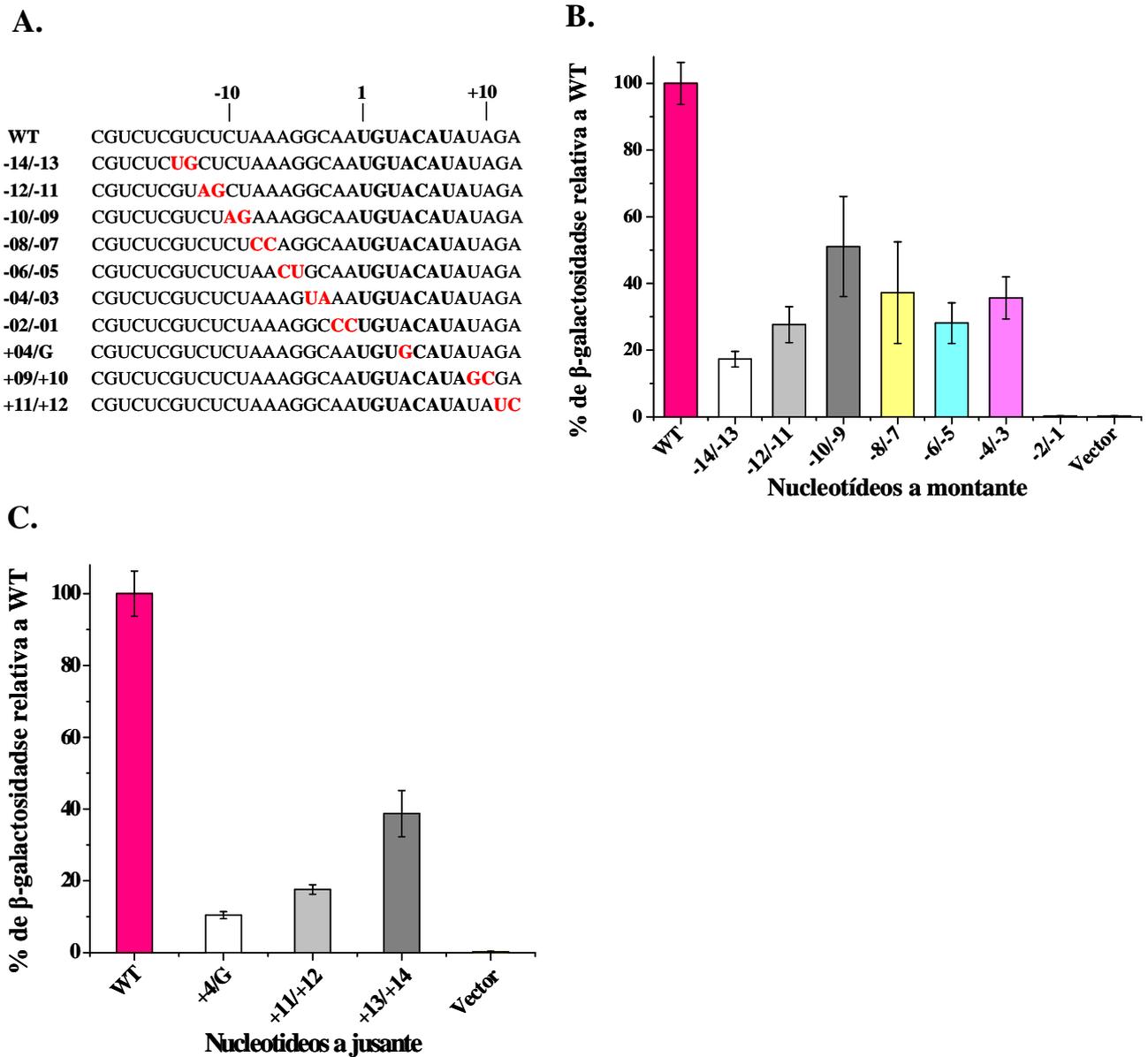


Figura 29: Ensaios de interação entre o domínio PUF-2 e os transcritos *FASCIATA-2* mutantes. A) As substituições duplas geradas em cada transcrito estão marcadas em vermelho. A primeira uracila do motivo de ligação (em negrito) foi chamada de nucleotídeo 1. Os números na primeira coluna indicam a posição dos nucleotídeos substituídos em relação ao transcrito selvagem (WT). Em todos os casos, uma pirimidina foi trocada por uma purina e vice-versa. B) e C) Ensaios quantitativos de β-galactosidase para as interações testadas com os transcritos possuindo mutações a montante do motivo de ligação e a jusante, respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os valores mostrados foram calculados em relação à interação entre o domínio de ligação PUF-2 e o transcrito *FAS-2* selvagem (WT). O vetor pRH5' vazio foi usado como controle negativo de interação.

Uma vez que apenas as substituições de AA para CC nas posições -2 e -1 do transcrito *FAS-2* foram capazes de abolir a interação com a proteína, é possível esperar que um determinado mensageiro não será ligado por PUF-2 caso o motivo de ligação a APUM apresente duas citosinas imediatamente localizadas em sua extremidade 5'. Interessantemente, uma nova análise das seqüências obtidas nos ensaios de triplo-híbrido mostrou a incidência de duas citosinas nas posições -2/-1 do elemento de ligação em 6 dos 129 clones obtidos (Tabela 16).

Tabela 16: Transcritos identificados nos ensaios de triplo-híbrido possuindo duas citosinas imediatamente localizadas na extremidade 5' do elemento de ligação a APUM (marcado em cinza).

Número de Identificação	Biblioteca usada no ensaio	Orientação	Seqüência identificada
At1g64180	planta	Senso	5'ccauagaagugucuuucgccgaccuuccact CC UGUGCAUA uuag 3'
At4g24440	planta	Antisenso	5'cucagggcucagcguaccgcucugaaccaucuc gucc aaagucuccgucagacacaucccgaucgucgaucu CCUGUACAGA aacc 3'
At1g78630	planta	Antisenso	5'gucucuacugucauaccaccaggucguccugaa ugccu CCUGUACAGA aacc 3'
At2g43160	calo	Senso	5'cugucagugauucacgcagc CCUGUAUA UA gugaaagggauggggagaccccacaaguu accguccaggag 3'
At3g32940	calo	Senso	5'ccgucgaccuauuuacuuccau CCUGUA CAUA gaccaacacuguuaccagacauagaccaa ucaguacgg 3'

Em resumo, os resultados indicam que todos os nucleotídeos adjacentes ao elemento de ligação contribuem para a afinidade de interação entre o RNA e a proteína. Dessa forma, a alta afinidade entre o domínio PUF-2 e o transcrito *FAS-2* deve ser devido ao conjunto de bases

adjacentes à região reconhecida e não a nucleotídeos em posições específicas. Essa hipótese pode explicar porque a presença de duas citosinas nas posições -2/-1 de *FAS-2* foi capaz de abolir a interação do transcrito com PUF-2, mas não foi capaz de impedir que alguns transcritos fossem ligados pela proteína nos ensaios de triplo-híbrido. Nós concluímos que o elemento de ligação a APUM é o ponto de reconhecimento da proteína ao RNA, enquanto o conjunto de nucleotídeos adjacentes ao mesmo contribui na obtenção das interações fracas ou fortes necessárias para a regulação do mensageiro em questão.

4.14 Análise semiquantitativa da expressão dos transcritos candidatos a alvo em plantas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 antisense

Após a identificação dos candidatos a alvo dos homólogos APUM através dos ensaios no sistema triplo-híbrido, uma das estratégias cogitadas foi a de tentar identificar as regiões da planta onde esses mensageiros são expressos, de tal forma que a relevância biológica das interações seria investigada somente para aqueles transcritos que co-localizassem com as proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 em tempo e espaço. Em adição, na tentativa de investigar possíveis papéis desses candidatos, plantas possuindo inserções de T-DNA em regiões que afetam a função dos genes foram obtidas junto ao banco de dados TAIR de *Arabidopsis*. Infelizmente, todas as plantas adquiridas possuíam muitas inserções no genoma, comprometendo assim uma investigação mais detalhada. Por outro lado, nós conseguimos mostrar a interação de APUM-1, APUM-2 e APUM-3 com quatro importantes transcritos relacionados ao meristema de caule que co-expressam com as proteínas em tempo e espaço. Baseado nisso, foi decidido que seria mais conveniente tentar relacionar inicialmente APUM-1, APUM-2 e APUM-3 aos transcritos que já possuem função e localização conhecidas, do que utilizar o tempo com a caracterização de candidatos que podem não co-localizar com essas proteínas em tempo e espaço.

Recentes estudos têm mostrado que as proteínas PUF atuam na desestabilização do mRNA e/ou no impedimento da tradução (secção 1.7). Portanto, pode-se esperar que se os transcritos *FAS-2*, *WUS*, *CLV-1* e *ZLL* são realmente regulados pelos homólogos estudados, plantas onde a expressão das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 estão afetadas deverão apresentar um aumento na quantidade desses mensageiros e/ou na quantidade de proteína sintetizada pelos mesmos.

Em nosso laboratório, a Doutora Elaine Favaro utilizou um sistema antisense induzível por dexametasona capaz de afetar a tradução dos três transcritos APUM simultaneamente (Fig. 11 e Fig. 12). A verificação das quantidades dos mensageiros candidatos a alvo de APUM-1, APUM-2 e APUM-3 nessas plantas foi investigada através de ensaios de RT-PCR semiquantitativo. A quantificação do mensageiro At3g63500 também foi realizada, devido ao fato do transcrito ter sido isolado um maior número de vezes nos ensaios de triplo-híbrido utilizando a biblioteca da planta (Tabelas 7 e 9). Para os ensaios, foram utilizados cDNAs sintetizados a partir de RNA total extraído de plantas induzíveis crescidas em meio MS contendo 0 μ M e 10 μ M de dexametasona e também de plantas selvagens crescidas em meio MS contendo 10 μ M do indutor. Em todos os casos, o mensageiro de *ACTINA*, que não possui o elemento de ligação a APUM em sua região 3' UTR, foi usado como normalizador.

Após a realização de reações em triplicata para quatro lotes de plantas crescidas independentemente, os resultados obtidos indicaram um aumento na expressão de aproximadamente 20% para os transcritos *CLV-1* e *ZLL* e de aproximadamente 30% para o transcrito *WUS* (Fig. 30A a 30C). Por outro lado, os transcritos At3g63500 e *FAS-2* não apresentaram diferença em nenhuma das plantas analisadas (Fig. 30D e 30E).

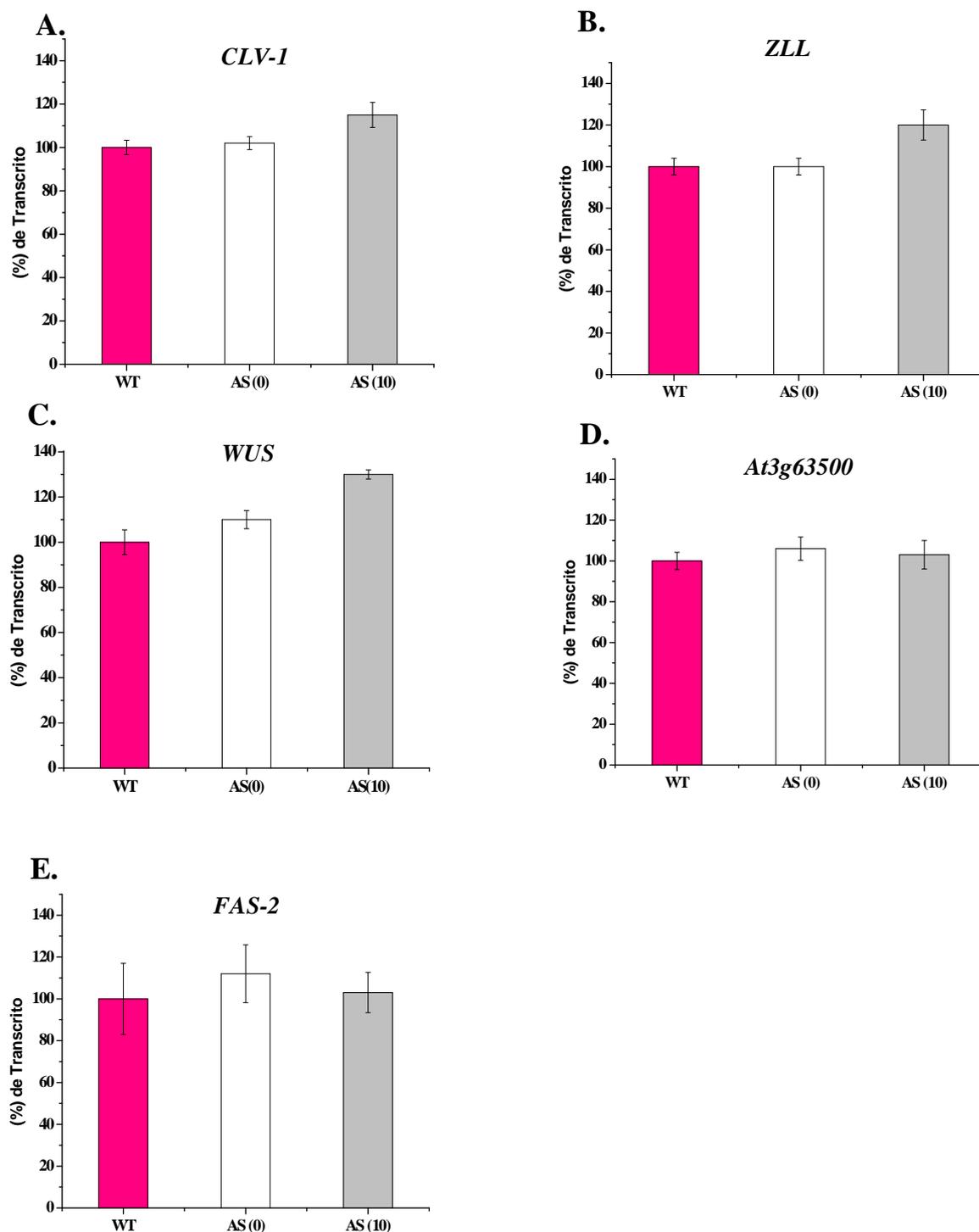


Figura 30: Análise semiquantitativa dos transcritos candidatos a alvo nas plantas antisense induzíveis para APUM-1, APUM-2 e APUM-3. WT: plantas selvagens crescidas em meio contendo 10 μ M de dexametasona; AS (0): plantas antisense crescidas em meio sem a adição de dexametasona; AS (10): plantas antisense crescidas em meio contendo 10 μ M de dexametasona. A) a E) Resultados dos ensaios de RT-PCR para os transcritos *CLAVATA-1*, *ZWILLE*, *WUSCHEL*, *At3g63500* e *FASCIATA-2*, respectivamente. Os resultados foram obtidos de reações feitas em triplicata para cada um dos quatro lotes de plantas crescidas independentemente.

4.15 Expressão e purificação das proteínas recombinantes produzidas pelos mensageiros candidatos a alvo das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3

As proteínas recombinantes FASCIATA-2, WUSCHEL, CLAVATA-1 e ZWILLE foram produzidas em *E. coli* e purificadas em HPLC. Com exceção de WUSCHEL, onde o tamanho total do cDNA é de 800 pb, todos os oligos foram sintetizados para amplificar os 700-900 pb iniciais do cDNA (Tabela 4), incluindo a primeira metionina. Portanto, o tamanho de todas as proteínas recombinantes ficaram entre 25 KDa a 35 KDa (Fig. 31).

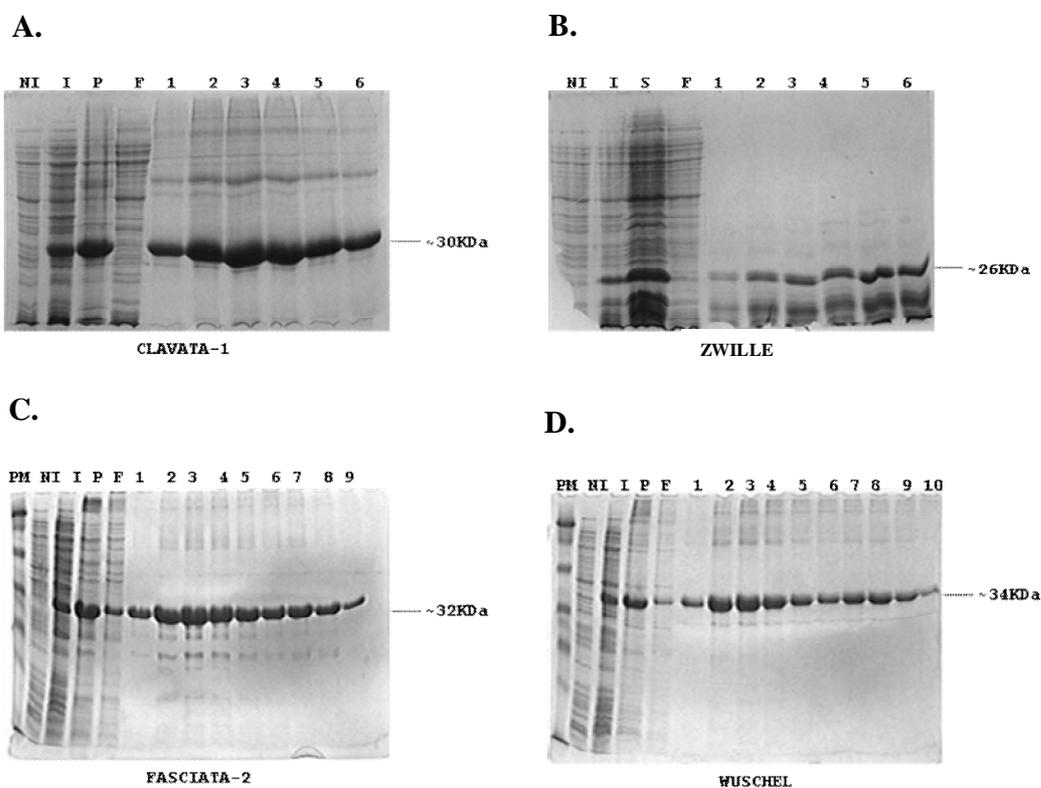
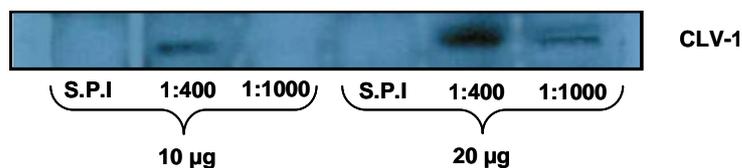


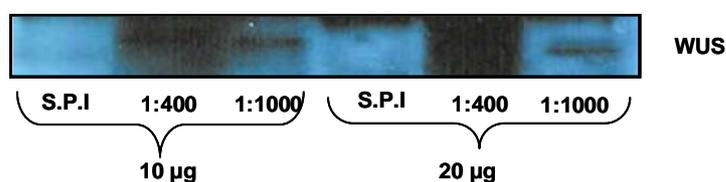
Figura 31: Indução em larga escala das proteínas recombinantes sintetizadas a partir dos mRNAs candidatos a alvo de APUM. Todas as proteínas foram purificadas em coluna de níquel em HPLC. A) Proteína CLAVATA-1 induzida em *E. coli* BL21(DE3)pLysS(Ril). B) Proteína ZWILLE induzida em *E. coli* BL21(DE3)pLysS(Ril). C) Proteína FASCIATA-2 induzida em *E. coli* BL21(DE3)pLysS. D) Proteína WUSCHEL induzida em *E. coli* BL21(DE3)pLysS. PM: marcador de peso molecular; NI: amostra não induzida; I: amostra induzida com 0,4mM de IPTG; S: sobrenadante após lise das células; P: precipitado após lise das células; F: fração pós-coluna. As colunas numeradas representam a quantidade de tubos obtidos na eluição das proteínas da coluna de níquel.

Após a purificação, as proteínas recombinantes foram inoculadas em camundongos para a obtenção de anti-soro. A especificidade das amostras obtidas foi testada em experimentos de Western blot contra 10 µg e 20 µg de extrato total de proteínas da planta selvagem. Os resultados mostraram que os anti-soros contra CLAVATA-1, WUSCHEL e FASCIATA-2 foram específicos (Fig.32). Por outro lado, o anti-soro contra ZWILLE não foi específico (não mostrado), provavelmente pelo fato da proteína recombinante não estar idealmente pura (Fig. 31B).

A.



B.



C.

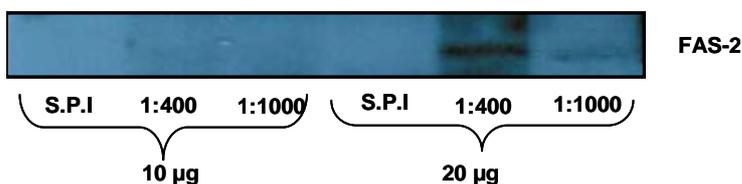


Figura 32: Ensaio de Western blot para validação dos anti-soros contra as proteínas WUSCHEL, CLAVATA-1 e FASCIATA-2 produzidos em camundongos. Todos os ensaios foram realizados utilizando diluições de 1:400 e 1:1000 do anti-soro contra 10 e 20 µg de extrato protéico total da planta selvagem. O soro pré-imune (S.P.I) foi usado como controle negativo com uma diluição de 1:400. A) Anti-soro contra CLAVATA-1. B) Anti-soro contra WUSCHEL. C) Anti-soro contra FASCIATA-2. O anti-soro contra ZWILLE não foi específico e , por isso, não é mostrado.

4.16 Análises semiquantitativas da expressão das proteínas CLAVATA-1, WUSCHEL e FASCIATA-2 nas plantas antisense induzíveis para APUM-1, APUM-2 e APUM-3

Todos os ensaios de Western blot semiquantitativos foram realizados utilizando uma diluição 1:1000 de cada anti-soro e 20 µg de extrato protéico total de plantas selvagens, de plantas antisense crescidas em 0 µM de dexametasona e de plantas antisense crescidas em 10 µM do mesmo indutor (Fig. 33A). Para o cálculo da porcentagem das proteínas em cada planta, as bandas obtidas após a revelação dos ensaios foram quantificadas no software LabWorks 4.0 e comparadas com a quantificação da banda referente à proteína majoritária RUBISCO, encontrada na altura de aproximadamente 60 KDa na membrana de nitrocelulose corada com o reagente de Ponceau (Fig. 33B). Os resultados indicaram um aumento na expressão de aproximadamente 15% para a proteína CLAVATA-1 e de aproximadamente 40% para a proteína WUSCHEL (Fig. 33C e 33D). Nenhum aumento da expressão foi observado para a proteína FASCIATA-2 (Fig. 33E).

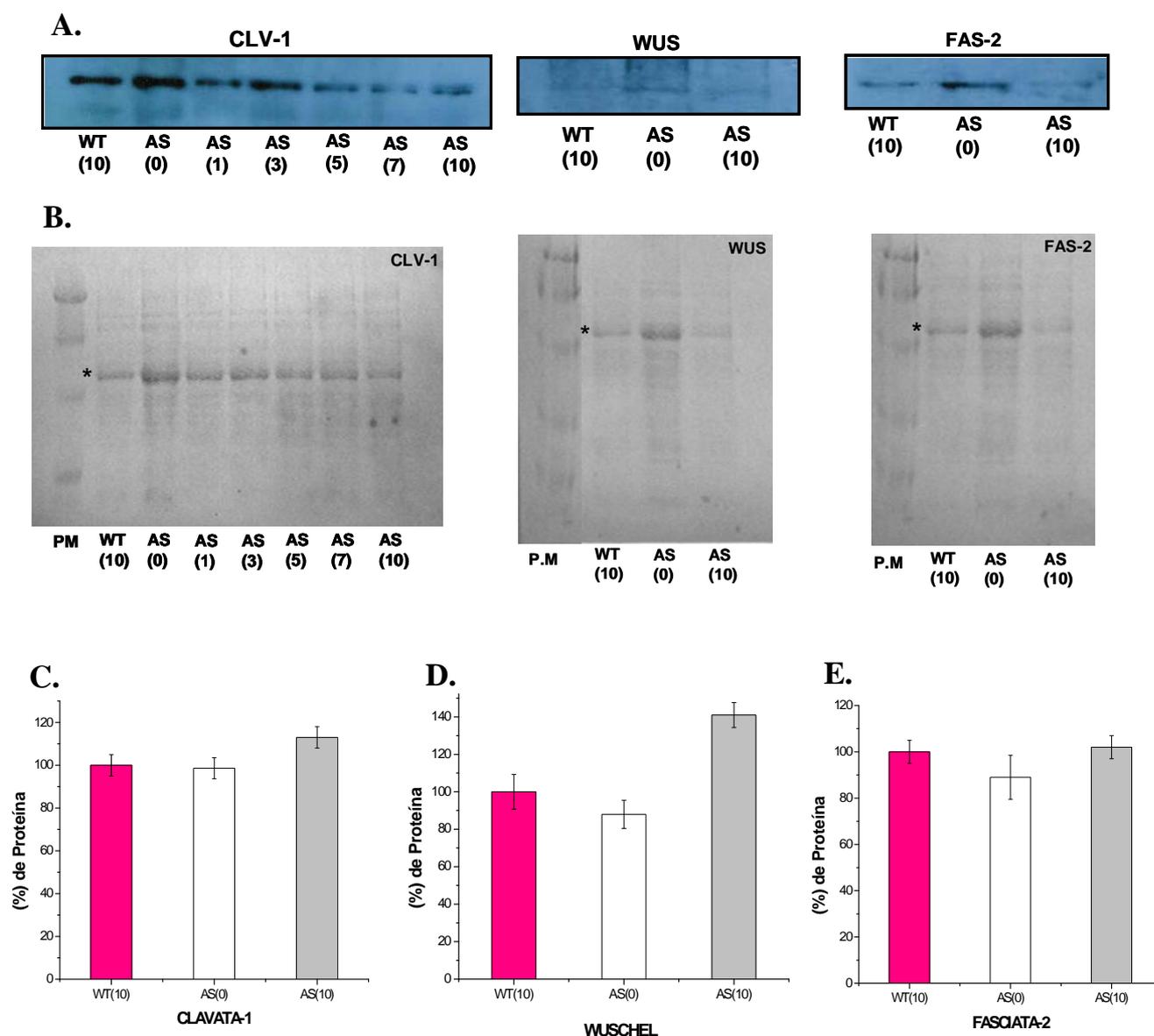


Figura 33: Análise semiquantitativa da expressão das proteínas CLAVATA-1, FASCIATA-2 e WUSCHEL em plantas selvagens (WT) e plantas antisense induzíveis para APUM-1, APUM-2 e APUM-3 (AS). Os valores entre parenteses referem-se às quantidades de indutor dexametasona utilizadas no meio de crescimento. A) Bandas observadas nos ensaios de Western blot para CLV-1, FAS-2 e WUS. B) Membrana de nitrocelulose corada com reagente de Ponceau. A proteína majoritária RUBISCO (indicada por um asterisco) foi utilizada como normalizador nos cálculos. C), D) e E) Expressão das proteínas CLAVATA-1, WUSCHEL e FASCIATA-2, respectivamente, nas plantas antisense em relação à planta selvagem. Os resultados foram obtidos de experimentos feitos em triplicata para cada um dos três lotes de plantas crescidas independentemente.

4.17 Imunoprecipitação do complexo APUM-mRNA do extrato proteico da planta selvagem

Para confirmar a relevância biológica das interações entre os candidatos a alvo e as proteínas APUM, nós realizamos ensaios de imunoprecipitação do complexo APUM-mRNA direto do extrato protéico da planta selvagem e investigamos a precipitação dos mensageiros via reações de RT-PCR. Nos ensaios, a integridade do RNA no extrato da planta foi garantida através de um “cross-linker” reverso entre a proteína e o RNA e também pela adição dos inibidores de RNase em concentrações elevadas (Fig. 34A). As proteínas APUM foram precipitadas do extrato protéico utilizando anti-soro contra APUM e proteína-A ligada a sefarose (Fig. 34B).

Os resultados das reações de RT-PCR usando o cDNA sintetizado a partir do mRNAs isolados nas imunoprecipitações mostraram que os transcritos *CLAVATA-1* e *WUSCHEL* foram especificamente imunoprecipitados (Fig. 34C e 34D), confirmando assim, os resultados semiquantitativos de RT-PCR e Western blot. Os mensageiros *FASCIATA-2*, *ZWILLE* e *At3g63500* não foram detectados nas reações, indicando que o aumento da quantidade do mensageiro *ZWILLE* observada nos ensaios semiquantitativos de RT-PCR (Fig. 30B) pode ser um reflexo indireto da falta das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3.

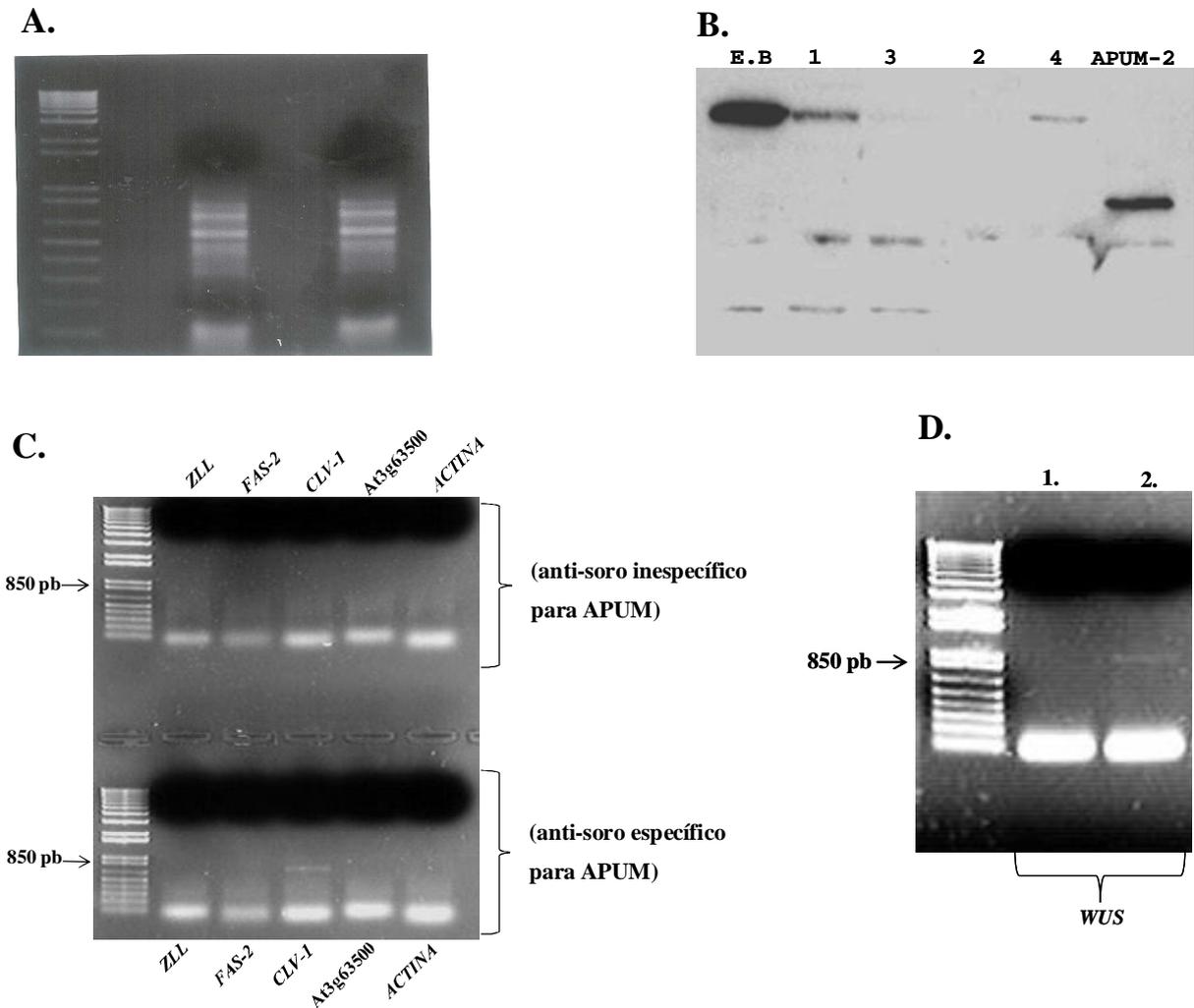


Figura 34: Imunoprecipitação do complexo APUM-mRNA do extrato protéico de plantas selvagens. A) Extração de RNA total do extrato protéico. A integridade do RNA foi garantida com a utilização de “cross-linker” reverso e altas concentrações de inibidores de RNase. Da esquerda para direita: marcador de peso molecular e duas amostras de RNA extraídas de dois extratos distintos. B) Western blot mostrando a imunoprecipitação das proteínas APUM do extrato protéico. EB: extrato bruto utilizado no ensaio de imunoprecipitação; 1 e 2: sobrenadante e precipitado, respectivamente, da reação controle usando anti-soro inespecífico para APUM e proteína-A; 3 e 4: sobrenadante e precipitado, respectivamente, da reação usando anti-soro específico contra APUM e proteína-A; APUM-2: região N-terminal recombinante da proteína APUM-2. C) e D) RT-PCR do material imunoprecipitado com anti-soro inespecífico para APUM (representado pelo número 1 na letra D) e com o anti-soro específico contra APUM (representado pelo número 2 na letra D). Os oligos utilizados nas amplificações são os mesmos usados para os experimentos de RT-PCR semiquantitativo, portanto, os produtos amplificados estão na faixa entre 700 a 900 pb (Tabela 4). Os resultados mostram que os transcritos *CLAVATA -1* (*CLV-1*) e *WUSCHEL* (*WUS*) foram especificamente imunoprecipitados.

4.18 Análise computacional de todos os homólogos PUF em *Arabidopsis thaliana*

Embora nosso laboratório esteja interessado em investigar o papel das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3, esses são apenas três entre vários possíveis homólogos PUF descritos no banco de dados de *Arabidopsis* TAIR. Os resultados descritos até o momento fornecem fortes indícios de que os transcritos *CLAVATA-1* e *WUSCHEL* são regulados por APUM-1, APUM-2 e APUM-3, no entanto, outros transcritos que interagiram especificamente com as três proteínas não apresentaram relações biológicas com as mesmas. Partindo-se dessas observações, outras questões foram levantadas: 1) Existem outros homólogos PUF em *Arabidopsis* que apresentam a mesma especificidade de ligação a RNA observada para APUM-1, APUM-2 e APUM-3? 2) Os candidatos a alvo identificados até o momento também podem ser candidatos a alvo de outros homólogos PUF da planta?

Para tentar identificar todos os possíveis membros da família PUF em *Arabidopsis*, foi realizado um BLAST-P com domínios PUF de homólogos de vários organismos contra o banco de dados da planta. O maior número de homólogos foi identificado quando a sequência do domínio PUF da proteína PUMILIO de *Drosophila* foi usada no alinhamento, mostrando a presença de 25 possíveis membros com diferentes níveis de similaridade com o homólogo da mosca, entre eles, *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3*.

As seqüências de aminoácidos das proteínas identificadas foram usadas para gerar uma árvore filogenética no programa MEGA (Kumar et al., 2004), sendo possível dividi-las em quatro grupos distintos de alta similaridade entre si, com apenas três membros fora desses grupos (Fig. 35). As proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 ficaram relacionadas no grupo I, juntamente com outros três homólogos. Baseado na nomenclatura dada para as proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3, as demais proteínas foram registradas no banco de dados TAIR como APUM-4 a APUM-25 (Fig. 35).

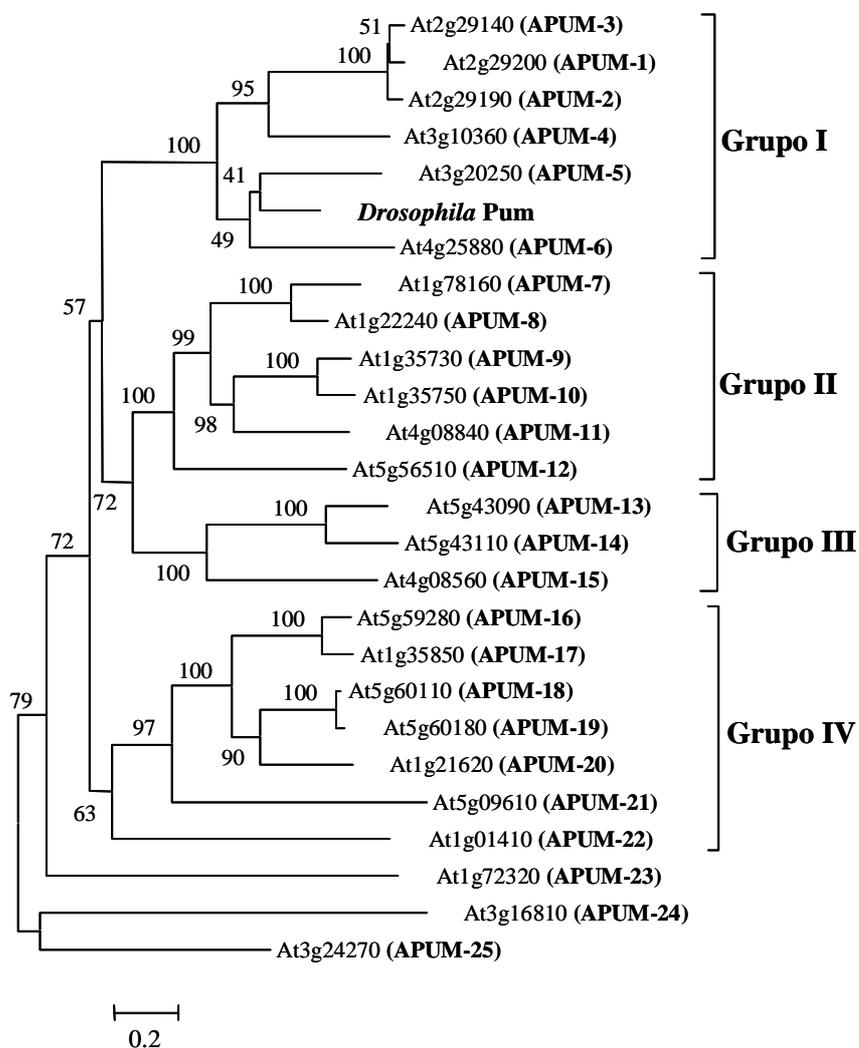


Figura 35: Árvore filogenética gerada com as seqüências de aminoácidos dos 25 possíveis homólogos PUF identificados quando a seqüência do domínio PUF da proteína PUMILIO de *Drosophila* foi usada em um BLAST-P contra o banco de dados de *Arabidopsis*. As proteínas foram divididas em 4 grupos de alta similaridade entre si, sendo os homólogos previamente estudados APUM-1, APUM-2 e APUM-3 relacionados ao grupo I. Os homólogos APUM-23, APUM-24 e APUM-25 são bastante divergentes entre si e em relação às demais proteínas e, por isso, não foram classificados como um grupo.

Um alinhamento no programa Clustal W com os homólogos mais próximos entre si indicados na árvore filogenética mostrou que além de APUM-1, APUM-2 e APUM- 3, outros pares de genes também codificam proteínas com um alto grau de identidade (Tabela 17).

Tabela 17. Identidade entre as seqüências de aminoácidos de alguns possíveis homólogos PUF em *Arabidopsis*. Os homólogos APUM-2, APUM-1 e APUM-3 (primeira linha, respectivamente) estão descritos para comparação.

Número de Identificação	Similar ao	Identidade entre a seqüência da proteína inteira	Identidade dentro do domínio PUF
At2g29190	At2g29140/At2g29200	90%	95%
At3g20250	At4g25880	38%	63%
At1g78160	At1g22240	65%	84%
At1g35730	At1g35750	78%	80%
At5g43090	At5g43110	64%	68%
At1g35850	At2g59280	83%	84%
At5g60180	At5g60110	95%	96%

Dos 25 homólogos analisados, as proteínas dos grupos I e II são as que possuem um domínio PUF mais similar ao domínio PUF do homólogo de *Drosophila* (Tabela 18 e Fig. 36). Interessantemente, os homólogos APUM-4, APUM-5 e APUM-6 são tão próximos à proteína PUMILIO de *Drosophila* quanto as proteínas de interesse em nosso laboratório (Fig. 36). Por outro lado, os demais homólogos (APUM-13 a APUM-25) são mais próximos entre si do que a membros PUF de outros organismos (não mostrado).

Tabela 18. Relação dos doze homólogos APUM com maior similaridade com o domínio PUF de ligação do homólogo PUMILIO de *Drosophila*.

	Número de identificação	Similaridade com o domínio PUF de <i>Drosophila</i>	Identidade com o domínio PUF de <i>Drosophila</i>
grupo I	At2g29200 (APUM-1)	74%	54%
	At2g29190 (APUM-2)	75%	54%
	At2g29140 (APUM-3)	74%	54%
	At3g10360 (APUM-4)	73%	54%
	At3g20250 (APUM-5)	73%	55%
	At4g25880 (APUM-6)	69%	52%
grupo II	At1g78160 (APUM-7)	56%	29%
	At1g2240 (APUM-8)	55%	30%
	At1g35730 (APUM-9)	51%	29%
	At1g35750 (APUM-10)	53%	29%
	At4g08840 (APUM-11)	57%	29%
	At5g56510 (APUM-12)	53%	31%

A.

		Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3
<i>Drosophila_PUM</i>	1	GRSRLEEDFRNQRYPNLQRLDLANHIVEFSODQHGSRFIQOKLERATAAEKQMVFSSEILAAAYSLMTDVFNGYVIQKFFFG-TPEOKNTLGMQVKGHVLQALALOMYGCRCVIQKALESTSPBOQQE		
At3g10360_APUM-4	644	AEASLLECFKNNKTRSELESETVGHVVEFSMDQYGSRFIQOKLETATDEKNAIFPEILPYCRTLMTDVFGNYVIQKFFEHGTTKORRELAEQVTHGVHLALSLOMYGCRCVIQKALEVVELEQQAR		
At3g20250_APUM-5	608	KRHSFLDELKSPNARKLELSDTAGRVVEFSVDQHGSRFIQOKLEHCSDEKASVFSSEVLPQASKLMTDVFNGYVIQKFFTEHGTTAORBELVKQLAGQMVSLSLQMYGCRCVIQKALEVIDVDQKTE		
At4g25880_APUM-6	512	RLCNFLEBELKSGKGRRFDLSDITGHVVEFSADQHGSRFIQOKLENCCKPEKAAVFERELPHACKLMTDVFNGYVIQKFFBYGNSTORRELADQLMGQIVPLSLQMYGCRCVIQKALEVIEPDRVR		
		Repetição 4	Repetição 5	Repetição 6
<i>Drosophila_PUM</i>	124	IVHELDGHLKCVKQDQNGNHVQKCECVDFVALQFTINAFKQVYSLSTHPYGCRCVIQRILEHCT-ABQTPILDELHEHTEQLIQDQYGNVYIQHVLEHGKQEDKSTILNSVRGKVLVLSQHK		
At3g10360_APUM-4	769	MVKELDGSVMKCVHDQNGNHVQKCELERLPDQWQFIISSFYKVLALSHPYGCRCVIQRVLEHIDTETQRITIMEEIMDSVCTLAQDQYGNVYIQHLIQHGKPHERSEITNKLAGQIVKMSQOK		
At3g20250_APUM-5	733	LIRELDGNVLCVDRDQNGNHVQKCEISMPAGRIQFVIAAFRGQVATLSTHPYGCRCVIQRILEHCSDEBETHCIIDEILLESAFALAHQDQYGNVYIQHVLERGKPDERRQIIEKLTGNVQMSQHK		
At4g25880_APUM-6	637	LARELDGQVMRCVDRDQNGNHVQKCEIENIPADKVGFMLYAFRGQVSSLSMHPYGCRCVIQRILEHCSHDHQCRTIIEILSVCVLSKQDQYGNVYIQHVLEKGTSEERERIRGKLSGHIVQLSLHK		
		Repetição 7	Repetição 8	
<i>Drosophila_PUM</i>	248	FASNVVEKCVTHATRGERGTGLIDEVCTFN--DNAHVMMKDQYANYVQKMDVSEPTQLKLMTKIRKNMAALRKYTYGKHIINAKLEKYYMK-----		
At3g10360_APUM-4	894	FASNVVEKCLTFGGPEERQVLVNEMLGYTDENEPLQAMMKDPFQNYVQKVLLETCDQSLALILLSRKIVHLNALKRYTYGKHIIVARVEKLIITGERRIGLSSSLAANTTP--		
At3g20250_APUM-5	858	YASNVVEKCLEHADSTEREFLDEEIMGKSEEDNEHLAMMKDQYANYVQKVLLETISKDQORELLVQRMKIHLQSLRKYTYGKHIIVARVEQOLFBESEVSEEGLEG-----		
At4g25880_APUM-6	762	FASNVIEKCLEVGGRRVERDLIKEITAGPDESYSNGLMMMKDQYANYVQKIFETCTADQRLTFSRVRMHASALKRYTYGKHIIVSRLEQPSIEENQETRR-----		

B.

		Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3
<i>Drosophila_PUM</i>	12	-----QRYPNLQRLDLANHIVEFSODQHGSRFIQOKLERATAAEKQMVFSSEILAAAYSLMTDVFNGYVIQKFFFGTPEQKNTLGMQVKG---HVLQALALOMYGCRCVIQKALE		
At1g78160_APUM-7	320	-----PTEICHPSLPMNCDIQGYVYLMKADQHGCRFLQRFDEGTSVDAMITFNEVIAHVVELMMDPFNGYLMQKLLDVCTEEQRTQIVLVAETEEPGQLIRISLNAYGTRVQVRLV		
At1g22240_APUM-8	185	-----ISSNPNESLPKVSEFGQYVVEFMKADQHGCRFLQVFEFGSALDALVFESEVIEPHVVELMMDPFNGYLMQKLLDVCNEEQRTQILMVTSEPGQLIRISLNAYGTRVQVRLV		
At1g35730_APUM-9	227	LIGQGSYGKMSPKSNNDLVSMVEIYGSVNLMAKQIGCRVLOKLVVEGTFEAKVILLAIIDHVVELSMDPFNGYVIQKLEFVSDDEEQRTLIVSVLTSNPRELIRICLNLYGTRVQVKMI		
At1g35750_APUM-10	199	-----KINGGLPLDLVSMVEIYGSVNLMAKQIGCRALQKLVVEGTVLDSKVIIFLEIIDHVVELSMDPLGNYVIQKLLVSVSDDEEQRTMIVSVLTSKPRELIRICLNLYGTRVQVKMI		
At4g08840_APUM-11	230	-----KEDSLDLASMVDSYGSVYLMKADQHGCRLLQKFEVDEGNFVDVMIIFRKEVINNVIELGTDPFGNYLIQKLLIEVCNEEQRTQILIRLTSKPGELVIRISLNAYGTRVQVKLI		
At5g56510_APUM-12	255	NEDLTMSSLNLSLQPKYNSIAEARGKIYLAQDQHGCRFLQRFSEKDGNDIEMINENIDYISELMMDPFNGYLVQKLLIEVCNEEQRTQIMQIVHSTTRKPSLILIKISCDMHGTRAVQKLV		
		Repetição 4	Repetição 5	Repetição 6
<i>Drosophila_PUM</i>	115	ESIS-PEQQEIVHELDGHLKCVKQDQNGNHVQKCECVDFVALQFTINAFKQVYSLSTHPYGCRCVIQRILEHCTABQTPILDELHEHTEQLIQDQYGNVYIQHVLEHGKQEDKSTIL		
At1g78160_APUM-7	431	ETIRSGKQISLVKALRPGFIDLKDLNGNHVIQRCLOCLSTEDNKFFEDATKFCIEIATHRHGCCVLQKCIAYSMRQOREKLIAEISRNSLILLAODPFNGYAVQVLELRIPSAVAMM		
At1g22240_APUM-8	296	ESIKTRKQISLVKLSALRPGFNLNLDLNGNHVIQRCLOCLSTEDNEFFEDATKFCIDLATHRHGCCVLQKCIAYSSGLOREKLVTEISRNSLFLAODPFNGYAVQVLELRIPSAVAMM		
At1g35730_APUM-9	347	ETVKTQOIALVKSALRPGFLLVLDLNGNHVIQRCLOCLSTEDNEFFVEAATKYCAEIALATHRHGCCVLQKCIAYSSGLOREKLVTEISRNSLFLAODPFNGYAVQVLELRIPSAVAMM		
At1g35750_APUM-10	311	KTVKTQOIALVKSALRPGFLLVLDLNGNHVIQRCLEFFLVNDNKFFVEAATEYCAQIATHRHGCCVLQKCIAYSSGLOREKLVTEISRNSLFLAODPFNGYAVQVLELRIPSAVAMM		
At4g08840_APUM-11	339	ETVTTKQOISLVKSALRPGFLLSFLRELNGNHVILNCLKFFSNDNKFLEAATKFCIEIATHRHGCCVLQKCIAYSSGLOREKLVTEISRNSLFLAODPFNGYAVQVLELRIPSAVAMM		
At5g56510_APUM-12	375	ETAKREBEISIIISALKHGIIVHLIKNVNGNHVIQRCLOYLLPYCGKFFEAATTHCVELATHRHGCCVLQKCIAYSEGEQKQHLVSEIASNALLSODPFNGYAVQVLELRIPSAVAMM		
		Repetição 7	Repetição 8	
<i>Drosophila_PUM</i>	234	INSVRGKVLVLSQHKFASNVVEKCVTHATRGERGTGLIDEVCTFNDNALHVMKQYANYVQKMDVSEPTQLKLMTKIRKNMAALRKYTYGKHIINAKLEKYYMK-----		
At1g78160_APUM-7	551	LAQLKGHYVQLSMQKFSSSHVVERCLMHCPE-SRQIVRELVSVPH--FDQLLODPYANFVICAALAAATKGPLHSLVVEVLRP-HSILRNPNYCKRIFSRNLLKK--		
At1g22240_APUM-8	416	LAQLKGHYVELSMQKFSSSHVVERCLMHCPE-SRQIVRELVSVPH--FDQLLODPYANFVICAALAVTKGSLHATLVEVLRP-HSILRNPNYCKRIFSRNLLKN--		
At1g35730_APUM-9	465	LVQFRMHYAELATQKFSSSHVEKCLRKYPE-SRAEIVRELLSVPH--FEYLLQDPYANYVIQTALSVTKGCPVRAKLVAKVYR-YGKLSHSSPYCKKIFSKTILKK--		
At1g35750_APUM-10	429	LFPFRTHCTELATQKFSSSHVEKCLRKYPE-SRAEIVRELLSVPH--FEQLLQDPYANYVIQTALSVTKGAVRARLVEKVKR-FGKLQSNPYCKKIFSKTILKK--		
At4g08840_APUM-11	457	LEFELRCNYVKLATQKFSHVVEKCLRKYPE-SRQIVRELVSVLN--EGYLLQDPYANYVIQTALSKTKVSV-----		
At5g56510_APUM-12	495	LEOLEGNYTELQKFSNVVEKCLKLADKRRARITRELINYGR--LDQVMDPYGNYVICAALQKSKGNVHALLVDATKLNISLRTNPNYCKKIVLSALSKK--		

Figura 36: Alinhamento no programa Clustal W das seqüências de aminoácidos dos domínios PUF das proteínas do grupo I (APUM-4, APUM-5 e APUM-6) e do grupo II (APUM-7 a APUM-12) com o domínio PUF de ligação do homólogo PUMILIO de *Drosophila*. A identidade entre os resíduos é indicada com a cor preta e a similaridade com a cor cinza. As regiões referentes às oito repetições do domínio PUF estão indicadas. Cada repetição é constituída de aproximadamente 36 resíduos de aminoácidos. A região N-terminal do homólogo de *Drosophila* não apresenta similaridade com a mesma região nos homólogos APUM e por isso foram omitidas da figura.

Para verificar a quantidade de repetições nos domínios PUF de ligação de cada homólogo da planta, a seqüência de aminoácidos de cada proteína foi analisada no programa Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) usando um valor de “cutoff” de 1.0. A análise mostrou que as proteínas dos grupos I e II possuem as oito repetições características dos membros da família, enquanto que os demais homólogos possuem um domínio PUF faltando uma ou várias repetições (Fig. 37).

Como uma forma de confirmar os dados acima, o programa “PSIPRED V2.4 Secondary Structure Prediction” (McGuffin et al., 2000) (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) foi utilizado para verificar a predição das 3 α -hélices características das repetições dos domínios PUF (Fig. 4) em cada repetição identificada no programa Pfam. Para checar a confiabilidade dos resultados, nós primeiramente analisamos a predição da estrutura secundária das oito repetições presentes nos domínios PUF dos homólogos PUMILIO de *Drosophila*, FBF-2 de *C. elegans* e Puf3p de levedura. Como o esperado, o programa indentificou 3 α -hélices em todas as repetições analisadas. As repetições PUF identificadas no programa Pfam foram então analisadas e a presença das estruturas secundárias características foram preditas em várias repetições (Figura 37).

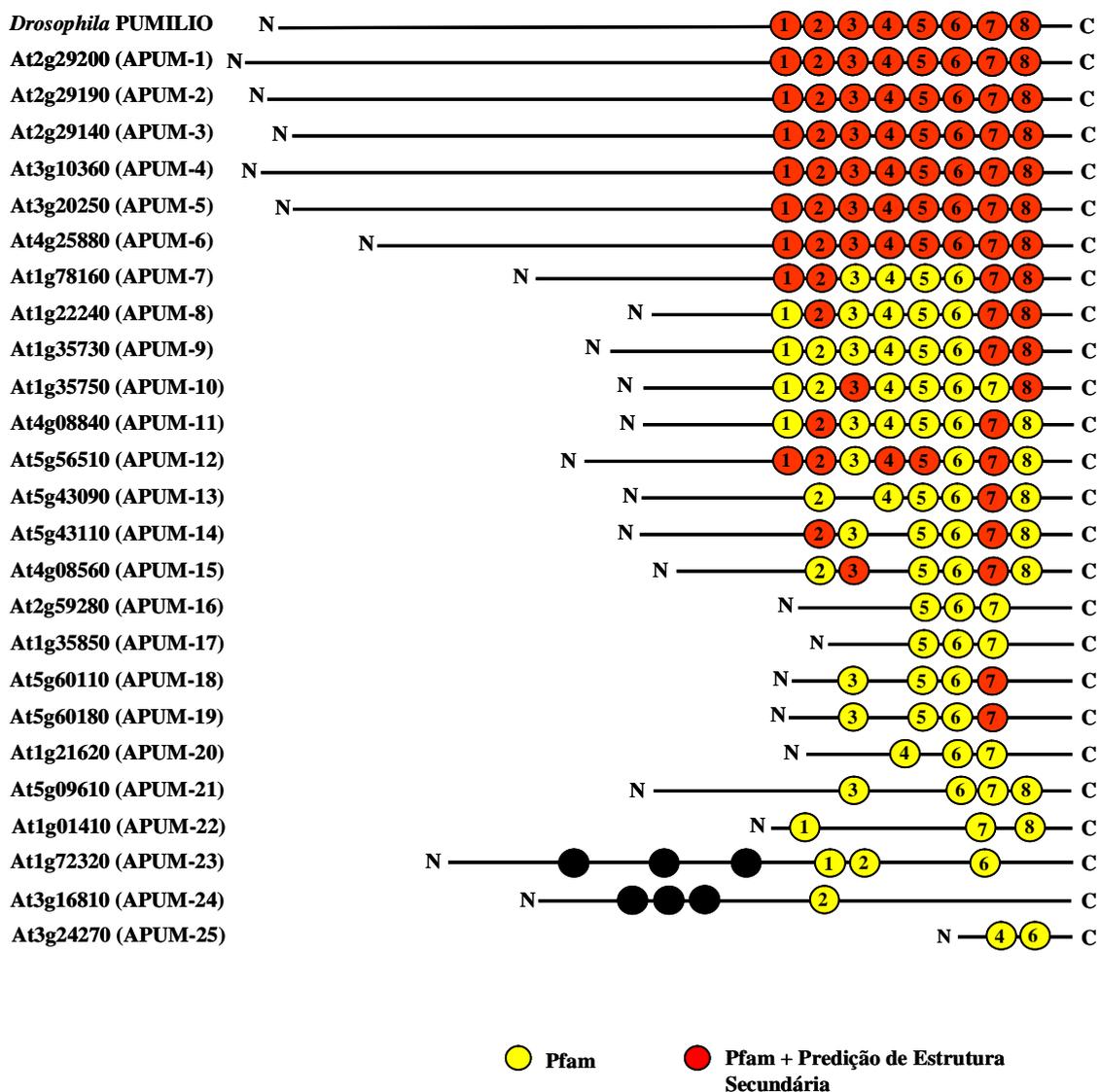


Figura 37: Análise computacional das seqüências de aminoácidos dos homólogos APUM no programa Pfam (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) e no programa de predição da estrutura secundária “PSIPRED V2.4 Secondary Structure Prediction” (McGuffin et al., 2000) (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Os círculos vermelhos representam repetições identificadas no programa Pfam que tiveram a estrutura secundária de 3 α -hélices preditas no programa PSIPRED V2.4, enquanto os círculos amarelos representam as repetições identificadas no Pfam que não apresentaram a estrutura secundária no programa PSIPRED V2.4. A proteína PUMILIO de *Drosophila* foi usada como controle das análises. Os números representam a posição da repetição identificada em relação ao domínio PUF do homólogo de *Drosophila*. Os círculos pretos representam repetições identificadas nas análises localizadas fora da região C-terminal da proteína.

4.19 Predição da especificidade de ligação das proteínas APUM de *Arabidopsis thaliana*

Proteínas PUF reconhecem o RNA através dos resíduos de aminoácidos 12, 13 e 16 localizados na segunda hélice de cada repetição do domínio PUF de ligação (Fig. 4) Em uma tentativa de prever a especificidade de ligação dos homólogos PUF de *Arabidopsis*, nós verificamos o grau de conservação dos resíduos 12, 13 e 16 nas repetições de cada APUM em relação a outros homólogos PUF bem caracterizados. O resultado obtido mostrou que as proteínas do grupo I (APUM-1, APUM-2, APUM-3, APUM-4, APUM-5 e APUM-6) possuem os resíduos conservados com PUM-1 de humano e PUMILIO de *Drosophila* nas posições analisadas, enquanto que as proteínas do grupo II (APUM-7, APUM-8, APUM-9, APUM-10, APUM-11 e APUM-12) possuem os resíduos 12, 13 e 16 conservados com o homólogo Puf4p de levedura (Tabela 19). No entanto, APUM-7, APUM-8, APUM-9, APUM-10 e APUM-11 possuem uma mutação não conservada no resíduo 13 da repetição 7, o que poderia interferir no reconhecimento do trinucleotídeo UGU, essencial para a ligação de todas as proteínas PUF (Tabela 1 e 19). As proteínas APUM-13 a APUM-25 não possuem conservação nos resíduos 12, 13 e 16 com nenhum homólogo PUF conhecido (não mostrado).

Tabela 19. Alinhamento dos resíduos 12, 13 e 16 de cada repetição dos domínios PUF de humano, *Drosophila* e levedura com os resíduos correspondentes nos domínios PUF das proteínas *Arabidopsis* PUMILIO. As posições 12, 13 e 16 conservadas entre as seqüências estão destacadas em cinza, respectivamente. As posições não conservadas são destacadas em amarelo. Os nucleotídeos preferenciais ligados por cada repetição dos homólogos PUMILIO de *Drosophila* e Puf4p de levedura são descritos em vermelho (Gerber et al., 2004; Gerber et al., 2006).

Repetição	1	2	3	4	5	6	7	8
PUM-1 (humano)	SRFIQ	NYVIQ	CRVIQ	NHVVQ	CRVIQ	NYVIQ	SNVVE	NYVVQ
PUMILIO (<i>Droso</i>)	SRFIQ	NYVIQ	CRVIQ	NHVVQ	CRVIQ	NYVIQ	SNVVE	NYVVQ
APUM-1	SRFIQ	NYVIQ	CRVIQ	NHVVQ	CRVIQ	NYVVQ	SNVVE	NYVVQ
APUM-2	SRFIQ	NYVIQ	CRVIQ	NHVVQ	CRVIQ	NYVVQ	SNVVE	NYVVQ
APUM-3	SRFIQ	NYVIQ	CRVIQ	NHVVQ	CRVIQ	NYVIQ	SNVVE	NYVVQ
APUM-4	SRFIQ	NYVIQ	CRVIQ	NHVIQ	CRVIQ	NYVIQ	SNVVE	NYVVQ
APUM-5	SRFIQ	NYVIQ	CRVIQ	NHVIQ	CRVIQ	NYVTQ	SNVVE	NYVVQ
APUM-6	SRFIQ	NYVIQ	CRVIQ	NHVIQ	CRVIQ	NYVTQ	SNVIE	NYVVQ
<i>Dros. Cons.</i>	A	U	A	A/U/C	A	U	G	U
Puf4p	CRFLQ	NYLVQ	TRSLQ	NHVIQ	CCVLQ	NYIIQ	SNVVE	NYVLQ
APUM-7	CRFLQ	NYLMQ	TRVVQ	NHVIQ	CCVLQ	NYAVQ	SHMVE	NFVIQ
APUM-8	CRFLQ	NYLMQ	TRVVQ	NHVIQ	CCVLQ	NYAVQ	SHMVE	NFVIQ
APUM-9	CRVLQ	NYIVQ	TRVVQ	NHVIQ	CCVLQ	NYVVQ	SHVIE	NYVIQ
APUM-10	CRALQ	NYIVQ	TRVIQ	YHVLQ	CCVLQ	NYVVQ	SHVIE	NYVIQ
APUM-11	CRLIQ	NYLIQ	TRVVQ	NHVIL	CCVLQ	NYLVQ	SHVVE	NYVIQ
APUM-12	CRFLQ	NYLVQ	TRAVQ	NHVVQ	CCVLQ	NYVLQ	SNVVE	NYVIQ
<i>Puf4p Cons.</i>	A	U	C/U/A	A	A	U	G	U

Uma vez que as análises computacionais indicaram que as proteínas do grupo I possuem um domínio PUF com oito repetições enoveladas em 3 α -hélices (Fig. 38) e também todos os resíduos necessários para o reconhecimento do RNA conservados com os homólogos de humano e de *Drosophila*, é possível sugerir que essas seis proteínas compartilham a mesma especificidade de ligação observada para as proteínas PUMILIO e PUM-1, ou seja, devem reconhecer o transcrito NRE especificamente através do Box B. De fato, nossos resultados já confirmaram essa hipótese para as proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 (Fig. 18).

Com relação aos homólogos do grupo II, as análises indicaram que a maioria das oito repetições identificadas em cada proteína não possui a estrutura secundária necessária para a ligação ao RNA (Fig. 37). Além disso, a mutação não conservada no resíduo 13 da repetição 7 de APUM-7 a APUM-11 pode resultar em uma perda da capacidade de reconhecimento do transcrito, uma vez que essa repetição é descrita como sendo a mais crítica para o reconhecimento do mensageiro (Cheong & Hall, 2006). Baseado nessas informações, nós esperamos que as proteínas do grupo II não sejam capazes de reconhecer o transcrito NRE.

Como os demais homólogos não tiveram todas as repetições necessárias identificadas nas análises (Fig. 37), nem os aminoácidos responsáveis pelo reconhecimento do RNA conservados com homólogos bem caracterizados, nós acreditamos que essas proteínas devem reconhecer regiões do RNA de maneira distinta à observada para os homólogos PUF clássicos.

4.20 Ligação de APUM-4, APUM-5 e APUM-6 ao transcrito NRE

Para confirmar as análises de predição descritas acima, a capacidade de interação de APUM-4, APUM-5 e APUM-6 com os transcritos NRE foram testadas no sistema triplo-híbrido de levedura. Para isso, os cDNAs referentes aos domínios PUF das três proteínas (chamados de PUF-4, PUF-5 e PUF-6, respectivamente) foram amplificados e clonados no vetor pYESTrp3. Após as transformações em levedura, as colônias foram testadas para verificação da ativação do repórter *LacZ*. Os resultados mostraram a interação das proteínas com o transcrito NRE selvagem e o transcrito NRE mutado no Box A (NREA), mas não com os transcritos NRE mutados no Box B (NREB e NREAB), confirmando as hipóteses sugeridas através das análises computacionais. Medidas quantitativas da β -galactosidase produzida mostraram que embora APUM-1, APUM-2, APUM-3, APUM-4, APUM-5 e APUM-6 reconheçam o transcrito NRE através do Box B, a afinidade de ligação ao transcrito é variável entre as proteínas (Fig. 38A).

Para investigar se as seqüências consenso e ligação obtidas para APUM-1, APUM-2 e APUM-3 podem ser estendidas para as demais proteínas do grupo I, a interação dos domínios PUF-4, PUF-5 e PUF-6 com os transcritos *CLV-1*, *FAS-2*, *ZLL* e *WUS* foi testada. Análises de interação mostraram que o repórter *LacZ* foi ativado em todos os casos, sugerindo que a especificidade de ligação é exatamente a mesma para todas as proteínas do grupo I. A interação de PUF-4, PUF-5 e PUF-6 também foi testada com o transcrito *FAS-2* possuindo substituições nos nucleotídeos -2/-1 e novamente os resultados mostraram o mesmo comportamento apresentado para os domínios PUF-1, PUF-2 e PUF-3, uma vez que a interação foi abolida em todos os casos (Fig. 38B).

Dessa forma, é possível afirmar que os dois elementos de ligação obtidos para as proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 também são válidos para APUM-4, APUM-5 e APUM-6.

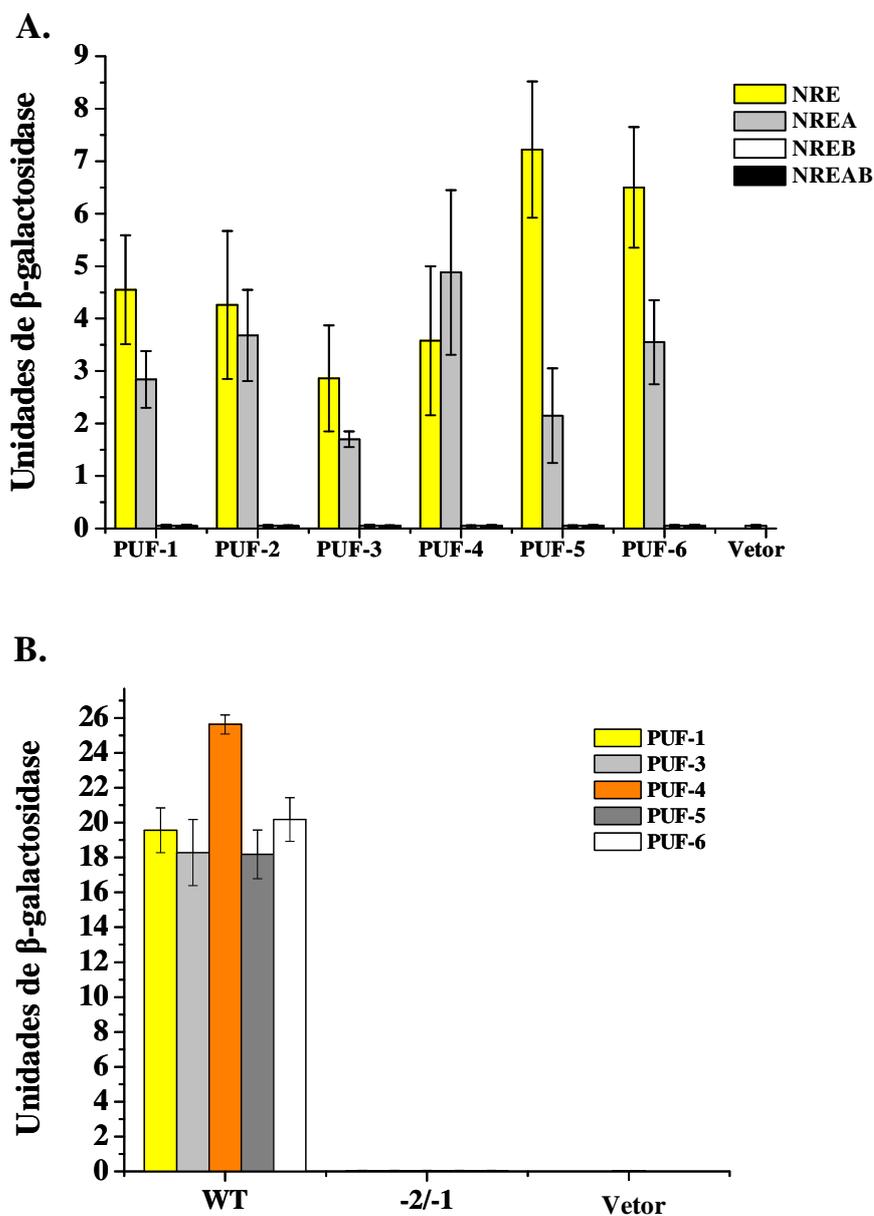


Figura 38: Análise da especificidade de ligação dos domínios PUF-4, PUF-5 e PUF-6 a RNA. A) Teste quantitativo de ativação do repórter *LacZ* nos ensaios de interação entre as proteínas e os transcritos NRE selvagem e NRE mutantes. O resultado mostra que PUF-4, PUF-5 e PUF-6 reconhecem o transcrito NRE através do Box B, da mesma forma observada para os demais homólogos do grupo I (Fig. 18). O vetor pYESTrp3 vazio foi usado como controle negativo de interação. B) Análise quantitativa da β -galactosidase produzida na interação entre as proteínas e os transcritos *FAS-2* selvagem (WT) e *FAS-2* mutante nos nucleotídeos -2/-1. Os resultados da ativação do repórter nas interações entre os domínios PUF-1 e PUF-3 e os mesmos transcritos foram adicionados para comparação. O vetor pRH5' vazio foi usado como controle negativo de interação.

4.21 Análise da capacidade de ligação de APUM-7 a RNA

Os resultados computacionais obtidos para os homólogos APUM-7 a APUM-11 nos levaram a sugerir que essas proteínas não possuem a capacidade de ligação ao transcrito NRE. Para checar essa hipótese, a proteína APUM-7 foi escolhida como membro representativo dos homólogos APUM do grupo II para o teste de capacidade de interação com os transcritos NRE selvagem e NRE mutantes. Primeiramente, o domínio PUF da proteína APUM-7 (chamado de PUF-7) foi amplificado e clonado no vetor pYESTrp3 do sistema triplo-híbrido. Após as transformações, as análises qualitativas para ativação do repórter *LacZ* mostraram que, de fato, APUM-7 não é capaz de se ligar a nenhum dos transcritos testados (Fig. 39A).

Como já mencionado anteriormente, o resultado negativo para as interações entre o domínio de ligação PUF-7 com o transcrito NRE pode ser atribuído a dois fatores: 1) À mutação não conservada observada no resíduo 13 da repetição 7 (Tabela 19). 2) À ausência do enovelamento correto de algumas repetições do domínio PUF-7 (Fig. 37). No entanto, também deve ser considerada a possibilidade do transcrito NRE simplesmente não ser reconhecido pela proteína. Como aconteceu nas interações entre as proteínas do grupo I e o transcrito *FAS-2(-2/-1)*, o transcrito NRE pode possuir nucleotídeos adjacentes ao motivo de ligação que não permitem o reconhecimento do domínio PUF-7.

Para checar se o domínio PUF-7 pode se ligar a alguma seqüência de mensageiro, o mesmo foi usado como isca em um ensaio de triplo-híbrido contra a biblioteca de cDNA da planta (Tabela 20). Surpreendentemente, todos os 50 clones selecionados após a 1ª etapa foram falso-positivos.

Tabela 20: Número de colônias obtidas em cada etapa do ensaio de triplo-híbrido usando o domínio PUF-7 como isca contra a biblioteca de cDNA da planta com fragmentos entre 50-150 pb. Devido ao baixo número de colônias que ativaram os repórteres, a 2ª etapa (figura 21) não foi realizada. Aproximadamente $1 \cdot 10^6$ clones foram transformados.

Etapas	Número de colônias
Crescimento em (His)^r + 1mM 3-AT	283
B-galactosidase positiva	50
Proteína dependente	Não realizado
Seqüência específica	0
Seqüenciamento	0

4.22 Análise da influência da mutação não conservada no domínio PUF-7 em sua capacidade de ligação a RNA

Para investigar se a substituição de uma asparagina por uma histidina na posição 13 da repetição 7 do domínio PUF -7 (Tabela 19) pode ser a responsável pela incapacidade de ligação a RNA observada nos ensaios, uma mutação sítio dirigida foi realizada para substituir essa histidina por uma asparagina (PUF-7/H→N). Além disso, a asparagina presente nessa mesma posição no domínio PUF-2 foi substituída por uma histidina (PUF-2/N→H). A interação das duas proteínas mutantes foi testada contra o transcrito NRE no sistema triplo-híbrido. O resultado de ativação do repórter *LacZ* mostrou que o domínio PUF-2 mutante manteve a capacidade de reconhecimento do transcrito NRE, enquanto que o domínio PUF-7 mutante continuou incapaz de reconhecer o mesmo transcrito (Fig. 39B).

A.



B.

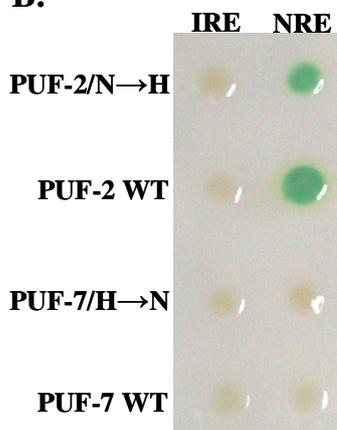


Figura 39: Análise da capacidade de ligação do domínio PUF-7 a RNA. A) Teste qualitativo de ativação do repórter *LacZ* nos ensaios de interação entre o domínio de ligação PUF-7 e os transcritos NRE (Fig. 18A). As interações entre os transcritos NRE e o domínio de ligação PUF-2 foram usadas como controle. A proteína IRP e o transcrito IRE foram usados tanto como controle de especificidade de ligação quanto como controle positivo do sistema triplo-híbrido. B) Teste qualitativo da ativação do repórter *LacZ* nas interações entre o domínio de ligação PUF-2/N→H (PUF-2 com substituição da Asparagina por Histidina na posição 13 da repetição 7) e o domínio PUF-7/H→N (PUF-7 com substituição da Histidina por Asparagina na posição 13 da repetição 7) com o transcrito NRE. Os domínios PUF-2 e PUF-7 selvagens (WT) foram usados como controle.

5.0 Discussões

5.1 APUM-1, APUM-2 e APUM-3 são proteínas da família PUF evolutivamente conservadas

Em nosso laboratório, vários experimentos genéticos realizados forneceram indícios de que as proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 (90% de identidade, Fig. 7A) podem exercer papéis redundantes na planta, no entanto, as características moleculares dos homólogos ainda não haviam sido investigadas. No presente trabalho, foi demonstrado que essas três proteínas são homólogos PUF evolutivamente conservados, sendo capazes de reconhecer o transcrito NRE ligado pela proteína PUMILIO de *Drosophila* especificamente. O reconhecimento ocorre através do Box B do transcrito NRE (Fig. 18B e 18C), sendo independente da região N-terminal das proteínas (Fig. 18D).

Através de ensaios de triplo-híbrido, foi possível obter duas seqüências consenso de ligação a APUM-1, APUM-2 e APUM-3, extremamente similares à seqüência do Box B do transcrito NRE e às regiões ligadas por homólogos PUF de diferentes organismos (Tabela 1, Fig. 5 e Fig. 27). As duas seqüências foram nomeadas como elementos de ligação a APUM. Interessantemente, os elementos de ligação identificados parecem ser suficientes para o reconhecimento dos mensageiros pelas três proteínas (Fig. 28), no entanto, nucleotídeos adjacentes aos motivos podem modular a afinidade da interação ou até mesmo impedi-la (Fig. 29).

Portanto, os resultados obtidos mostram que APUM-1, APUM-2 e APUM-3 são homólogos PUF molecularmente conservados e que essas proteínas podem ser capazes de atuar redundantemente na regulação de um mesmo mensageiro.

5.2 Utilização do sistema triplo-híbrido de levedura na identificação de mensageiros candidatos a alvo das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3

A identificação de mensageiros regulados por proteínas que se ligam a RNA é uma tarefa desafiadora, principalmente quando a função da proteína de interesse não é bem caracterizada.

O sistema triplo-híbrido de levedura tem sido usado com sucesso na identificação de interações entre proteína e RNA, no entanto, a maior parte dos ensaios descritos na literatura utilizaram um mRNA como isca contra uma biblioteca de proteínas. O tamanho do RNA é o principal fator limitante do sistema (Sengupta et al., 1999), fato que explica a falta de obtenção de interações positivas quando uma biblioteca com fragmentos entre 500-1500 pb foi usada em ensaios de triplo-híbrido contra o domínio de ligação PUF-2 (secção 4.3). Até a presente data, poucos artigos têm descrito o uso de proteínas que se ligam a RNA como isca em ensaios no sistema triplo-híbrido, e em todos os casos, o sucesso foi alcançado somente quando uma biblioteca expressando fragmentos de RNA entre 50-150 pb foi usada (Sengupta et al., 1999; Ostrowski et al., 2002; Seay et al., 2006). Da mesma maneira, nós obtivemos sucesso na identificação de interações positivas somente quando bibliotecas de cDNA de pequenos fragmentos foram usadas. No entanto, embora um grande número de interações tenha sido obtido, muitos insertos ligados pelo domínio de ligação PUF-2 foram derivados de seqüências na orientação antisense (Fig. 22 e Fig. 25), fato explicado pelo método usado na construção da biblioteca, uma vez que os insertos gerados podem ser inseridos tanto na orientação senso como antisense (secção 3.9). Entre os transcritos na orientação senso ligados pelo domínio PUF-2, apenas 7 foram derivados de regiões 3' UTR (ver secção 4.9).

Se por um lado os ensaios de triplo-híbrido não foram eficientes na identificação de um grande número de candidatos a alvo das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3, as seqüências ligadas especificamente ao domínio PUF-2 foram de extrema utilidade para a identificação de

seqüências consenso de ligação das proteínas (Fig. 27). Através dos consensos, foi possível verificar que um grande número de mensageiros expressos nas mesmas regiões que APUM-1, APUM -2 e APUM-3 não foram ligados nos ensaios de triplo-híbrido (Tabela 15). Algumas hipóteses que podem explicar a falta de identificação desses transcritos são: 1) Na construção da biblioteca, um grande número de transcritos pode ter ficado fora da região entre 50-150 pb purificada após a digestão do cDNA. 2) Uma vez que o motivo reconhecido pelo domínio PUF-2 pode ocorrer em um grande número de transcritos (Tabela 14), clones naturalmente mais expressos possuindo o elemento de ligação, mas não regulados pelas proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3, podem ter atuado competitivamente em relação a clones verdadeiramente regulados, que apresentam um nível de expressão mais baixo.

Nesse trabalho, nós mostramos que a identificação e utilização de seqüências consenso eliminam a necessidade de ensaios de triplo-híbrido adicionais, uma vez que possibilita a investigação direta de interações com uma maior probabilidade de relevância biológica. Recentemente, a mesma estratégia descrita nesse trabalho de Doutorado foi usada para identificar possíveis transcritos regulados pelos homólogos PUF-5 e PUF-6 de *C. elegans* (Stumpf et al., 2008).

5.3 Utilização do elemento de ligação a APUM na identificação de mensageiros regulados pelas proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3

Através de análises computacionais, foi possível identificar transcritos expressos no meristema de caule que possuem o elemento de ligação a APUM em suas regiões 3' UTR (Tabela 15). Ensaios de interação mostraram o domínio de ligação PUF-2 é capaz de reconhecer os transcritos *WUSCHEL*, *CLAVATA-1*, *FASCIATA-2* e *ZWILLE* especificamente (Fig. 28).

Ensaios de RT-PCR e Western blot semiquantitativos indicaram que as interações entre o domínio PUF-2 e os transcritos *WUSCHEL* e *CLAVATA-1* observadas no sistema triplo-híbrido são biologicamente relevantes, uma vez que a quantidade dos transcritos foi aumentada em plantas apresentando baixa expressão das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 (Fig. 30, Fig. 33 e Tabela 21). Ensaios adicionais de imunoprecipitação mostraram que os mensageiros *WUS* e *CLV-1* foram especificamente imunoprecipitados quando um anti-soro específico para as três proteínas APUM foi usado (Fig. 34). Nós concluímos que APUM-1, APUM-2 e APUM-3 atuam na regulação traducional dos dois transcritos na planta. Além disso, o aumento da quantidade dos alvos regulados indica que os homólogos estudados atuam na desestabilização do mRNA.. Seria interessante analisar o tamanho da cauda poli-A dos transcritos *WUS* e *CLV-1* nas plantas antisense analisadas e também investigar a capacidade de APUM-1, APUM-2 e APUM-3 em interagir com proteínas do complexo NOT-CCR4-POP2 de deadenilases (Fig. 6).

Por outro lado, embora os resultados de RT-PCR semiquantitativo tenham indicado um aumento para o transcrito *ZLL* nas plantas analisadas (Fig. 30 e Tabela 21), o resultado de imunoprecipitação não confirmou a existência física dessa interação na planta (Fig.34 e Tabela 21). Uma hipótese para essas observações é que a alteração na expressão do transcrito *ZLL* é um resultado indireto da falta das proteínas APUM, ou seja, APUM-1, APUM-2 e APUM-3 devem regular outros transcritos que influenciam a expressão de *ZLL*. Curiosamente, embora o transcrito

FAS-2 tenha apresentado a maior afinidade de interação com as proteínas APUM entre todos os candidatos testados (Fig. 28C), nenhum dos experimentos realizados mostrou evidências de interação biológica entre as proteínas e o transcrito (Figura 30, Fig. 33 e Tabela 21). No entanto, o mensageiro *FAS-2* continua sendo um forte candidato à regulação traducional pelos demais homólogos APUM que se mostraram capazes de reconhecer o transcrito com grande afinidade (Fig.38).

Tabela 21: Resultados dos ensaios realizados para a identificação e confirmação dos mensageiros sujeitos à regulação traducional pelas proteínas APUM-1, APUM-2, APUM-3.

Transcrito candidato a alvo	Interação PUF/3'UTR	Quantidade em plantas com baixa expressão de APUM-1, APUM-2 e APUM-3.		Imunoprecipitação com APUM
		Transcrito	Proteína	
<i>CLAVATA-1</i>	sim	aumento de 20%	aumento de 15%	sim
<i>FASCIATA-2</i>	sim	inalterada	inalterada	não
<i>ZWILLE</i>	sim	aumento de 20%	não verificada	não
<i>WUSCHEL</i>	sim	aumento de 30%	aumento de 40%	sim

5.4 Papel das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 no caminho dos fatores WUSCHEL e CLAVATA-1

Como descrito na secção 1.10, o fator de transcrição WUSCHEL é indispensável para a produção e a manutenção das células totipotentes no meristema do caule. Essa proteína é regulada negativamente pelo complexo protéico de sinalização CLV-1/CLV-2/CLV-3, que atua em um modelo de auto-regulação que garante o correto balanço das células totipotentes no meristema de caule da planta. Nesse mecanismo, por exemplo, se o número de células

totipotentes torna-se muito grande, observa-se um aumento do peptídeo CLV-3 e uma diminuição da expressão da proteína WUS. Essa diminuição de WUS resulta em uma diminuição do número de células totipotentes e, concomitantemente, em uma redução do peptídeo CLV-3 (Fig. 40).

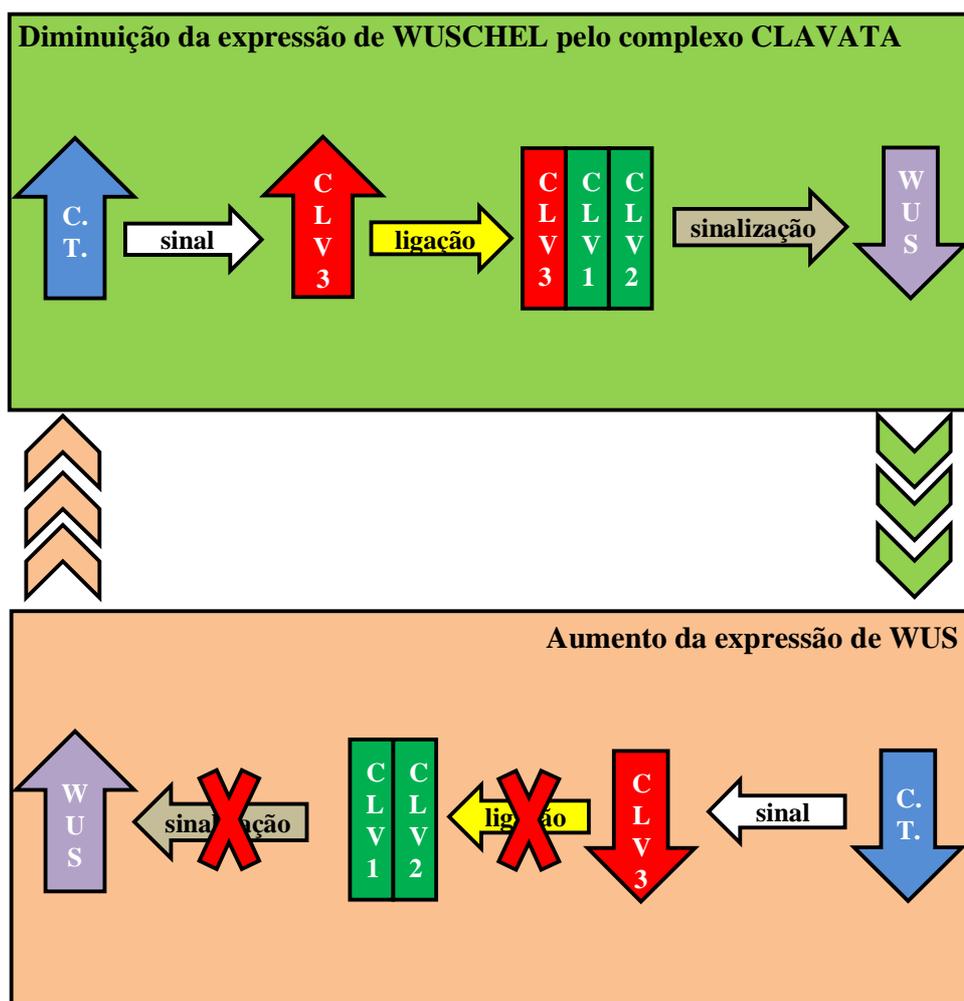


Figura 40: Mecanismo de auto-regulação entre os fatores WUSCHEL (WUS) e CLAVATA-3 (CLV-3). O aumento do número de células totipotentes (C. T.) leva a um aumento da expressão do peptídeo CLV-3, que por sua vez reconhece os componentes CLV-1 e CLV-2 e ativa o complexo de sinalização que resulta na diminuição da expressão do fator WUS. A diminuição da expressão de WUS, por sua vez, leva a uma diminuição do número de células totipotentes, resultando na diminuição da expressão do peptídeo CLV-3 e também em um aumento do fator WUSCHEL. Como a expressão de CLV-1, CLV-3 e WUS são observadas em domínios específicos do meristema apical do caule (Fig. 13 e Fig. 14), o aumento ou a diminuição de CLV-3 e WUS descritos na figura é resultado de sinais emitidos das regiões que expressam esses fatores. Esse mecanismo é extremamente importante para o correto balanço do número de células totipotentes no meristema de caule da planta.

Como discutido na secção anterior, os experimentos realizados confirmam a interação biológica entre as proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 e os transcritos *CLV-1* e *WUS* (Tabela 21). No entanto, a relação das proteínas APUM no caminho desses mensageiros não é clara. Em animais, proteínas PUF possuem um papel central na produção e na manutenção de células tronco, uma vez que na falta dos homólogos, as células tronco falham em se proliferar e entram em diferenciação (secção 1.3). A presença dos homólogos APUM-1, APUM-2 e APUM-3 nas regiões meristemáticas da planta (Fig. 8) e a relação dessas proteínas com transcritos relacionados à manutenção das células totipotentes são fortes indícios de que a função observada em animais também é conservada em plantas. Além disso, a elevada expressão de APUM-1, APUM-2 e APUM-3 em tecido de calo sugere que esses homólogos são necessários para a manutenção da situação indiferenciada do tecido (Fig. 10). Em adição, a diminuição da expressão das três proteínas resultou em plantas apresentando tamanho reduzido das folhas e da raiz principal, além de reduzida formação de raízes secundárias (Fig.11), indicando que os homólogos PUF devem atuar no controle de mensageiros relacionados à proliferação celular em várias regiões da planta.

Em *Drosophila*, a regulação do transcrito *HUNCHBACK*, é essencialmente dependente do reconhecimento do complexo PUMILIO/NRE pelas proteínas parceiras NANOS e BRAT, enquanto que a regulação do complexo PUMILIO/*CYCLINA B1* nas células-tronco germinativas é dependente apenas de NANOS, mas não de BRAT (Fig. 3). Uma explicação plausível para essas observações é que a ligação de NANOS aos dois transcritos resulta em diferentes mudanças em sua conformação, de tal forma que a proteína BRAT torna-se incapaz de reconhecer o complexo PUMILIO/NANOS/*CICLINA B1*. Interessantemente, em nosso laboratório, nenhuma interação positiva foi obtida quando o domínio PUF-2 foi usado como isca contra uma biblioteca

de proteínas em ensaios no sistema duplo-híbrido, indicando que, assim como ocorre em *Drosophila*, a ligação de uma proteína parceira deve ser dependente do reconhecimento do complexo APUM/mRNA.

Embora as evidências de um mecanismo de auto-regulação entre WUSCHEL e CLAVATA-3 sejam bem descritas na literatura, as bases moleculares que atuam nesse sistema permanecem desconhecidas (Fig. 13 e Fig. 14). Uma especulação para o papel dos homólogos APUM na zona central do meristema do caule seria a participação dos mesmos no balanço de células totipotentes através da atuação no mecanismo de auto-regulação entre WUSCHEL e CLAVATA-3. Nesse modelo, a sinalização envolvida quando o número de células totipotentes é aumentado ou diminuído envolveria a ativação ou a inibição da regulação mediada pelos homólogos APUM-1, APUM-2 e APUM-3. Por exemplo, se o número de células totipotentes no meristema do caule é aumentado, a sinalização do complexo CLAVATA levaria a ativação da expressão de uma proteína parceira de APUM (chamada de X) envolvida na inibição do mensageiro *WUSCHEL* (Fig. 41A). Por outro lado, a diminuição do número de células totipotentes ocasionada pela diminuição da expressão de WUSCHEL geraria um sinal capaz de atenuar a expressão do peptídeo CLV-3 e também induzir a ativação da expressão de um segundo parceiro de APUM (chamado de Y), envolvido na inibição do mensageiro *CLAVATA-1*. Essa situação resultaria na desestabilização do complexo CLAVATA e, conseqüentemente, na desativação do parceiro X de APUM relacionado à inibição da expressão do transcrito *WUSCHEL* (Fig. 41B). Esse modelo poderia ajudar a entender como as proteínas PUF são capazes de atuar no controle da proliferação celular na planta e também como o mecanismo de auto-regulação entre WUSCHEL e CLAVATA pode ser controlado molecularmente.

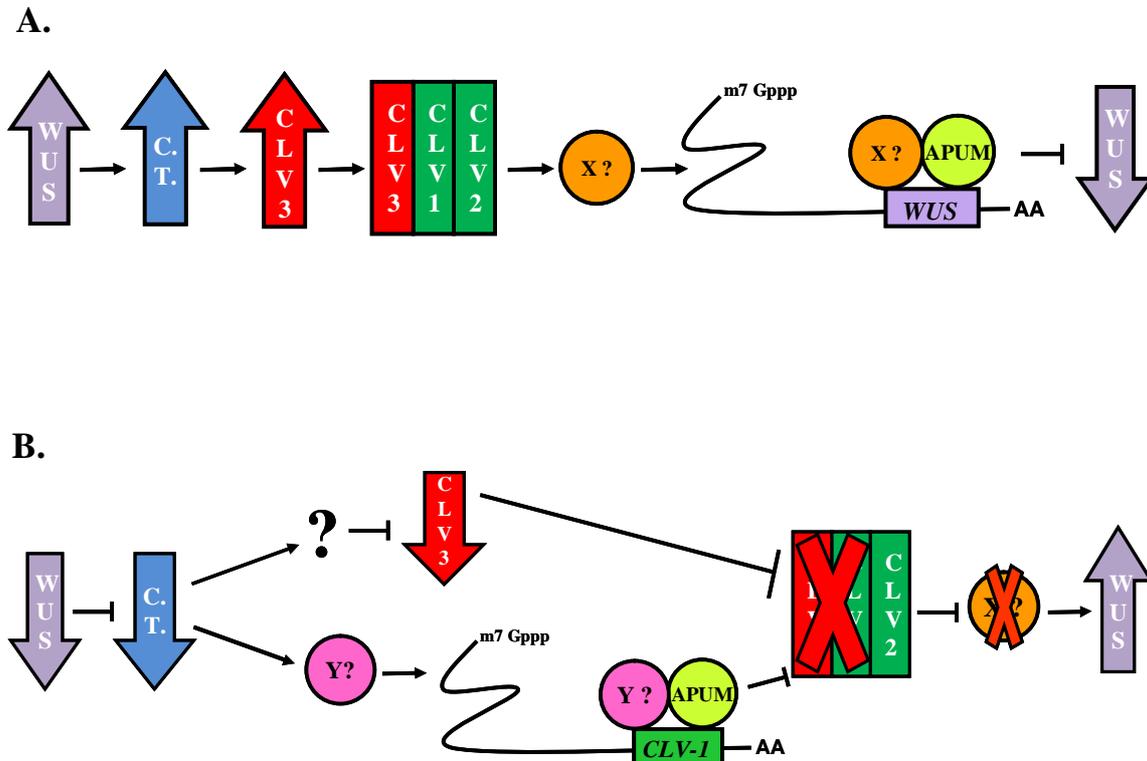


Figura 41: Mecanismo proposto para o papel das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 no sistema de auto-regulação entre WUSCHEL e CLAVATA. A) A sinalização do complexo CLAVATA ativaria a expressão de uma proteína (X) necessária para a inibição do mensageiro WUS por APUM. B) A diminuição do número de células totipotentes (C.T) ocasionada pela diminuição de WUS geraria um sinal responsável pela diminuição da expressão de CLV-3 (através de um mecanismo desconhecido) e também pela ativação de outra proteína (Y) necessária para a inibição do mensageiro CLV-1 por APUM. Essa inibição simultânea de CLV-3 e CLV-1 impediria a ativação do complexo CLAVATA e, conseqüentemente, a ativação da proteína X, impedindo APUM de inibir a tradução do mRNA WUS.

Interessantemente, assim como *CLAVATA-1*, os transcritos *CLAVATA-3* e *CLAVATA-2* também possuem um motivo de ligação a APUM em suas regiões 3' UTR (Tabela 15). Essa observação coloca as proteínas APUM como fortes candidatas à regulação de CLV-3 no mecanismo proposto na figura 41B. Dessa forma, pode-se esperar que os homólogos APUM-1, APUM-2 e APUM-3 atuam na regulação dos três transcritos *CLAVATA*.

Por fim, a figura 14 mostra que o conhecimento sobre a regulação da expressão do gene *WUSCHEL* se restringe a atuação de fatores de transcrição e também de fatores relacionados à regulação da cromatina. Os resultados descritos na presente tese são os primeiros indícios de regulação traducional para *WUSCHEL* e *CLAVATA-1*. Além disso, esses também parecem ser os primeiros indícios de regulação traducional via ligação de proteínas à regiões 3' UTR de mensageiros em *Arabidopsis thaliana*. Esses resultados podem abrir uma nova abordagem na investigação de mensageiros em plantas, uma vez que sugere que muitos aspectos do desenvolvimento podem ser coordenadamente regulados por proteínas de ligação a RNA.

5.5 Presença de um grande número de transcritos contendo o elemento de ligação a APUM

Proteínas que se ligam a RNA têm sido relacionadas a diversos aspectos da regulação pós-transcricional, incluindo o processamento, exportação, localização, degradação e regulação traducional do RNAs (Dreyfuss et al., 2002; Mazumder et al., 2003). Recentemente, tem sido mostrado que certas proteínas que se ligam a RNA associam-se com grandes e distintas populações de transcritos, suportando uma hipótese de que essas proteínas podem estar atuando como operons pós-transcricionais, onde mRNAs codificando proteínas funcionalmente relacionadas seriam coordenadamente regulados por componentes mRNP específicos (Keene & Tenenbaum, 2002; Keene, 2003, 2007). Recentemente, o homólogo de levedura Puf3p foi relacionado ao controle traducional de mensageiros mitocondriais codificados no núcleo, regulando mais de 200 transcritos envolvidos na síntese de proteínas relacionadas à cadeia respiratória e à maquinaria de tradução mitocondrial (Saint-Georges et al., 2008).

Experimentos de identificações sistemáticas usando microarranjos após a imunoprecipitação dos complexos PUF-mRNA nativos de cinco proteínas PUF de levedura, mostraram que cada homólogo interage com sub-populações específicas de mensageiros. Além

disso, Puf3p, Puf4p e Puf5p foram mostrados ligar a, respectivamente, 56%, 26% e 49% de todas as regiões 3' UTR de levedura possuindo os consensos de ligação identificados através do alinhamento das seqüências enriquecidas no experimento (Gerber et al., 2004). A mesma estratégia foi usada para identificar mensageiros ligados aos homólogos PUMILIO de *Drosophila* no embrião e ovários adultos e aos homólogos PUM1 e PUM2 de humano. Os resultados descritos mostram que a proteína da mosca interage com aproximadamente 24% de todas as seqüências 3' UTR possuindo o motivo UGUAHAUA identificado no experimento (Gerber et al., 2006), enquanto os consensos obtidos para os dois homólogos em humano são encontrados em 20% das regiões 3' UTR de todos os genes anotados (Galgano et al., 2008).

Utilizando o banco de dados TAIR, nós identificamos a ocorrência dos elementos de ligação a APUM em aproximadamente 43% de todas as seqüências 3' UTR de *Arabidopsis thaliana* descritas até o momento (Tabela 14). Essa alta incidência sugere que os homólogos APUM devem regular um grande número de mensageiros na planta. Dessa forma, *WUSCHEL* e *CLAVATA-1* devem ser apenas dois entre vários mensageiros regulados. Baseado nos resultados obtidos no presente trabalho, nós concluímos que transcritos possuindo o motivo de ligação a APUM em suas regiões 3' UTR expressos temporalmente e espacialmente com os homólogos APUM-1, APUM-2, APUM-3, APUM-4, APUM-5 e APUM-6, são alvos em potencial para sofrer regulação traducional mediada por essas proteínas. Assim, da mesma forma que mostrado para *Drosophila*, levedura e humano, as proteínas APUM devem estar envolvidas em muitos aspectos do desenvolvimento da planta através da regulação coordenada de muitos transcritos.

5.6 *Arabidopsis* é o organismo com o maior número de homólogos PUF

O maior número de proteínas PUF encontrado em um mesmo organismo é descrito em *C. elegans*, com onze homólogos, seguido por levedura e *Trypanosoma* com seis (Gerber et al., 2004; Gu et al., 2004; Caro et al., 2006), humano, camundongo e *Plasmodium* com dois (Cui et al., 2002; Spassov & Jurecic, 2002, , 2003a) e *Drosophila*, *Dyctiostelium* e *Planaria* com apenas um homólogo (Macdonald, 1992; Souza et al., 1999; Salvetti et al., 2005). Através de análises computacionais, nós identificamos vinte e cinco possíveis homólogos PUF em *Arabidopsis thaliana*, tornando-se, portanto, o maior número de homólogos da família encontrado em um mesmo organismo até o momento. A análise filogenética mostrou que as proteínas podem ser agrupadas em quatro grupos de alta identidade entre si (Fig. 35). Os homólogos APUM-1 a APUM-12 (grupos I e II) apresentam a maior similaridade com a proteína PUMILIO de *Drosophila* (Tabela 18), enquanto os demais membros não possuem similaridade relevante com qualquer outro homólogo PUF já estudado. Assim como descrito para APUM-1, APUM-2 e APUM-3, os demais homólogos identificados foram nomeados como *Arabidopsis* PUMILIO (APUM) e registrados no banco de dados TAIR como APUM-4 a APUM-25.

Ensaio de caracterização funcional de diferentes proteínas PUF têm mostrado que homólogos com alta identidade em um mesmo organismo parecem atuar de maneira redundante, enquanto homólogos mais divergentes apresentam funções distintas. Em *C. elegans*, as proteínas FBF-1 e FBF-2 (90% de identidade) atuam redundantemente na decisão entre a produção de oócitos ou espermatócitos e também na manutenção de células tronco germinativas (Zhang et al., 1997; Crittenden et al., 2002). Em adição, PUF-6 e PUF-7, outros dois homólogos PUF idênticos em *C. elegans*, atuam redundantemente na manutenção do ciclo mitótico das células germinativas primordiais (Lublin & Evans, 2007; Stumpf et al., 2008). Ainda em *C. elegans*, a falta de PUF-8, um homólogo mais similar à proteína PUMILIO de *Drosophila* do que a qualquer outro membro

PUF no organismo (Opperman et al., 2005), leva a desdiferenciação das células germinativas e a rápida formação de tumores (Subramaniam & Seydoux, 2003). Em mamíferos, o par de proteínas altamente idênticas PUM1 e PUM2 de humano apresentam expressões que coincidem em tempo e espaço e são relacionados à regulação de um grande número de mensageiros em comum (Galgano et al., 2008). Por outro lado, cinco dos seis homólogos de levedura, que possuem uma significativa divergência em suas seqüências de aminoácidos, apresentam expressões e funções distintas (Gerber et al., 2004). Em *Drosophila*, o único homólogo PUMILIO tem sido relacionado a diferentes processos (Parisi & Lin, 1999; Gamberi et al., 2002; Schweers et al., 2002; Menon et al., 2004; Baines, 2005).

Em *Arabidopsis*, nós mostramos que os homólogos altamente idênticos APUM-1, APUM-2 e APUM-3 possuem padrões de expressão que coincidem em tempo e espaço e são capazes de regular os transcritos *WUSCHEL* e *CLAVATA-1* conjuntamente. Uma vez que as análises computacionais revelaram a presença de outros pares de genes *APUM* apresentando um grau de identidade que pode chegar aos 90% na seqüência da proteína codificada (Tabela 17), nós esperamos que, assim como mostrado para APUM-1, APUM-2 e APUM-3 e também para proteínas PUF de outros organismos, outros homólogos duplicados devem atuar de maneira redundante na planta, sendo a função de cada par de genes prioritariamente distinta de outras duplicações.

5.7 *Arabidopsis thaliana* possui seis homólogos PUF com a mesma especificidade de ligação a RNA

As análises computacionais para identificação de todos os homólogos PUF em *Arabidopsis* mostraram que os homólogos APUM-1, APUM-2 e APUM-3 fazem parte de um grupo de seis proteínas que apresentam a mesma similaridade em relação ao homólogo PUF de

Drosophila (Tabela 18 e Fig. 35). Ensaios de interação mostraram que as proteínas APUM-4, APUM-5 e APUM-6 apresentam a mesma especificidade de ligação a RNA observada para as três primeiras proteínas do grupo (Fig. 38). Dessa forma, os elementos de ligação a APUM inicialmente identificados para APUM-1, APUM-2 e APUM-3 também se mostraram válidos para APUM-4, APUM-5 e APUM-6.

Embora os resultados obtidos tenham levado à conclusão de que as proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 atuam de forma redundante e/ou complementar, a mesma capacidade de interação observada para APUM-4, APUM-5 e APUM-6 é bastante intrigante e algumas questões permanecem em aberto: 1) O padrão de expressão de APUM-4, APUM-5 e APUM-6 coincide em tempo espaço com as expressões de APUM-1, APUM-2 e APUM-3? 2) As seis proteínas poderiam exercer papéis redundantes entre si?

Os resultados de interação mostrando que os domínios PUF dos homólogos APUM-1 a APUM-6 são suficientes para o reconhecimento específico do RNA corroboram com os resultados descritos para *Drosophila*, onde o domínio PUF de PUMILIO é suficiente para regular o transcrito *HUNCHBACK* “*in vivo*” de maneira similar à proteína inteira (Wharton et al., 1998). Dessa forma, se a diferença na região N-terminal de APUM-1, APUM-2 e APUM-3 em relação à mesma região de APUM-4, APUM-5 e APUM-6 não deve ser um fator que especifique uma função diferente para os últimos três homólogos, é possível especular que APUM-4, APUM-5 e APUM-6 poderiam atuar de forma redundante com APUM-1, APUM-2 e APUM-3 caso se encontrassem expressas em mesmo tempo e espaço.

Baseado nos resultados obtidos em nosso laboratório, pode-se sugerir que as seis proteínas não devem atuar na regulação dos mesmos mensageiros ao mesmo tempo, uma vez que a diminuição parcial na expressão de APUM-1, APUM-2 e APUM-3 nas plantas antisense foi suficiente para causar um fenótipo na planta (Fig. 12), o que não pôde ser observado em plantas

nocautes para os três homólogos individualmente (Favaro EC, 2007). Assim, se os seis homólogos atuassem redundantemente, a diminuição da expressão das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 nas plantas antisenso seria contornada pela presença de APUM-4, APUM-5 e APUM-6.

Os genes *APUM-1*, *APUM-2* e *APUM-3* possuem 90% de identidade entre si, porém, seus promotores não apresentam similaridade, indicando que os mesmos podem ser ativados por fatores diferentes. Essa hipótese pôde ser observada em tecido de calo, onde análises do repórter GUS mostraram que o gene *APUM-1* é ativado no período de formação do tecido, mas não quando o mesmo é estabelecido (Fig.10). Essa estratégia pode garantir que a inativação de um fator de transcrição do gene *APUM-1* não resulte em problemas no desenvolvimento da planta, uma vez que as outras duas cópias continuariam sendo ativadas. Da mesma forma, os promotores dos genes *APUM-4*, *APUM-5* e *APUM-6* poderiam estar ativados em tecidos onde as demais proteínas do grupo I não são encontradas. Por exemplo, ensaios de localização com o repórter GUS mostraram que a expressão de APUM-1, APUM-2 e APUM-3 é interrompida quando o meristema de inflorescência é formado (Favaro EC, 2007). Uma vez que os transcritos *WUSCHEL* e *CLAVATA-1* se mantêm expressos nesses meristemas, APUM-4, APUM-5 e APUM-6 são fortes candidatos para a continuidade da regulação traducional desses mensageiros.

Durante o presente trabalho de Doutorado, nós pensamos que seria possível interferir nos seis homólogos APUM do grupo I simultaneamente através da superexpressão da região do transcrito *FAS-2* utilizada nos ensaios de triplo-híbrido (Fig. 28A) em todos os tecidos da planta. Devido à alta afinidade da interação observada entre as proteínas e *FAS-2* (Fig. 28C), esperava-se que essa estratégia resultasse em uma grande quantidade de proteínas APUM ligadas ao transcrito superexpresso, impedindo a regulação de um grande número de mensageiros. Assim, foi gerado um vetor binário com uma construção contendo o promotor constitutivo 35S fusionado a 4 cópias

do transcrito *FAS-2* (32 pb) seguido do terminador NOS. Como controle negativo, uma construção similar foi gerada com 4 cópias do transcrito *FAS-2* clonadas na orientação antisenso.

Após as transformações, foram obtidas 13 plantas contendo a construção do *tetraFAS-2* na posição senso e 6 plantas contendo a construção do *tetraFAS-2* na posição antisenso. Interessantemente, as sementes das plantas F_0 semeadas para a geração de plantas F_1 não germinaram ou geraram plantas com o desenvolvimento interrompido, apresentando um aspecto similar às plantas atribuídas ao fenótipo mais drástico do antisenso para APUM-1, APUM-2 e APUM-3 (Fig. 11) (Favaro EC, 2007). Esse resultado permite especular que a falta de plantas viáveis tenha ocorrido devido ao efeito da construção inserida, no entanto, qualquer estudo ou confirmação dos efeitos dessa construção tornaram-se inviáveis. Com relação às plantas carregando a construção controle, o desenvolvimento das seis plantas obtidas também apresentou algum tipo de retardamento, no entanto, menos drástico do que o observado nas plantas com a construção senso. Analisando a sequência do RNA esperada para a construção inserida nessas plantas, foi observado que o transcrito também possui um motivo de ligação a APUM. Dessa forma, pode-se sugerir que o fenótipo observado nesses casos também seja um resultado da ligação dos homólogos APUM ao transcrito antisenso produzido.

5.8 Proteínas APUM do grupo II falham em reconhecer RNA

Análises computacionais das proteínas do grupo II (APUM-7 a APUM-12) mostraram que esses seis homólogos apresentam características semelhantes às proteínas do grupo I: 1) Todas possuem um domínio PUF contendo oito repetições (Fig. 37). 2) Todas possuem a maioria dos resíduos de aminoácidos responsáveis para ligação ao RNA conservados com um homólogo PUF já estudado (Tabela 19). No entanto, todas as proteínas possuem domínios PUF com repetições que não apresentam as 3 α -hélices características (Fig.4 e Fig. 37). Além disso,

APUM-7 a APUM-11 apresentam uma substituição não conservada no resíduo 13 da repetição 7, sugerindo que essas proteínas devem falhar em reconhecer a guanina no trinucleotídeo UGU, essencial para o reconhecimento do transcrito (Tabela 19) (Cheong & Hall, 2006).

Ensaio de interação no sistema triplo-híbrido mostraram que o domínio PUF-7 é incapaz de reconhecer os transcritos NRE (Fig. 39A). Interessantemente, um ensaio de triplo-híbrido utilizando o domínio PUF-7 como isca não resultou em interações positivas. Experimentos adicionais mostraram que a substituição não conservada de uma Asparagina por uma Histidina na repetição 7 da proteína não é o fator responsável pela ausência de reconhecimento do RNA (Fig. 39B).

Assim, nós acreditamos que um possível reconhecimento de mensageiros por APUM-7 deve ocorrer de maneira distinta à observada para os homólogos APUM do grupo I. Uma hipótese plausível é que o reconhecimento do mensageiro ocorra somente quando APUM-7 é ligado previamente a outras proteínas, o que geraria uma mudança em sua conformação que o tornaria capaz de reconhecer seqüências específicas de mensageiros. Esse comportamento poderia garantir a regulação de um número limitado de transcritos em tempo e espaço específicos. Como as proteínas APUM-8, APUM-9, APUM-10 e APUM-11 são bastante próximas a APUM-7 e possuem exatamente os mesmos nucleotídeos nas posições 12, 13 e 16 em todas as repetições, é possível sugerir que esses homólogos apresentem um comportamento semelhante e também não sejam capazes de reconhecer os mensageiros testados. Por outro lado, uma vez que o homólogo APUM-12 possui exatamente os mesmos resíduos de ligação presentes no mutante PUF-7/H→N (Tabela 19 e Fig.39), espera-se que a proteína também não reconheça os transcritos NRE.

6. Conclusões

Através de ensaios de interação no sistema triplo-híbrido, foi mostrado que as proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 de *Arabidopsis thaliana* são homólogos PUF com a função molecular evolutivamente conservada. As três proteínas são capazes de reconhecer o transcrito NRE ligado pelo homólogo PUF de *Drosophila* especificamente. A capacidade de interação independe da região N-terminal dos homólogos, uma vez que a especificidade da ligação ao RNA é a mesma tanto para a proteína APUM-2 inteira quanto para o seu domínio PUF de ligação isolado.

Foi mostrado que o sistema triplo-híbrido de levedura é uma ferramenta bastante útil para a identificação de candidatos a alvo das proteínas PUF, uma vez que as seqüências obtidas podem ser usadas para a dedução de regiões de ligação consenso. Os elementos de ligação a APUM deduzidos a partir das seqüências obtidas nos ensaios de triplo-híbrido são bastante similares aos motivos de reconhecimento ao RNA de homólogos PUF de outros organismos. A utilização dos consensos foi importante na identificação direta de possíveis transcritos ligados pelos homólogos de interesse, descartando a necessidade de novos ensaios de triplo-híbrido. Dessa forma, foi possível identificar a presença de elementos de ligação a APUM nas regiões 3'UTR dos transcritos *FASCIATA-2*, *WUSCHEL*, *ZWILLE* e *CLAVATA-1*, todos relacionados ao desenvolvimento do meristema do caule e/ou à manutenção das células totipotentes nesse meristema. As regiões de ligação deduzidas foram suficientes para o reconhecimento dos quatro transcritos pelos domínios de ligação PUF-1, PUF-2 e PUF-3, mas a afinidade da interação é substancialmente dependente do conjunto de nucleotídeos adjacentes ao motivo ligado.

Plantas com diminuição na expressão das proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3 apresentam reduzida proliferação celular. Foi mostrado que os três homólogos atuam no controle traducional dos mensageiros *WUSCHEL* e *CLAVATA-1*, ambos relacionados à manutenção da

proliferação celular do meristema do caule através de um importante mecanismo de auto-regulação. A quantidade dos dois transcritos é aumentada em plantas com baixa expressão de APUM-1, APUM-2 e APUM-3, resultando também em um aumento da expressão das proteínas traduzidas. Assim, foi proposto que os homólogos APUM devem atuar na desestabilização dos mensageiros regulados.

Os resultados obtidos são os primeiros exemplos de regulação traducional por proteínas de ligação a RNA em plantas. A regulação dos transcritos *WUSCHEL* e *CLAVATA-1* indicam que esse tipo de regulação pode estar relacionada a um amplo aspecto do desenvolvimento vegetal.

A presença dos demais homólogos PUF em *Arabidopsis* foi identificada através de análises computacionais. Foi mostrado que é possível prever a especificidade de ligação de um homólogo PUF com grandes possibilidades de sucesso. Os homólogos APUM-4, APUM-5 e APUM-6 são capazes de reconhecer os mesmos transcritos ligados pelas proteínas APUM-1, APUM-2 e APUM-3, assim como predito nas análises computacionais. Por fim, foi mostrado que os elementos de ligação identificados para APUM-1, APUM-2 e APUM-3 também são válidos para os homólogos APUM-4, APUM-5 e APUM-6. O grande número de transcritos possuindo o elemento de ligação a APUM em suas regiões 3'UTR indica a possibilidade de um amplo mecanismo de regulação da tradução mediado por proteínas PUF ainda não explorado em plantas.

7. Bibliografia

AbuQamar S, Chen X, Dhawan R, Bluhm B, Salmeron J, Lam S, Dietrich RA, Mengiste T. Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in *Arabidopsis* response to Botrytis infection. *Plant J* 48:28-44, 2006.

Ahringer J, Kimble J. Control of the sperm-oocyte switch in *Caenorhabditis elegans* hermaphrodites by the fem-3 3' untranslated region. *Nature* 349:346-348, 1991.

Asaoka-Taguchi M, Yamada M, Nakamura A, Hanyu K, Kobayashi S. Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in *Drosophila* embryos. *Nat Cell Biol* 1:431-437, 1999.

Bailey TL, Elkan C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 2:28-36, 1994.

Baines RA. Neuronal homeostasis through translational control. *Mol Neurobiol* 32:113-121, 2005.

Baurle I, Laux T. Apical meristems: the plant's fountain of youth. *Bioessays* 25:961-970, 2003.

Becerra C, Jahrman T, Puigdomenech P, Vicient CM. Ankyrin repeat-containing proteins in *Arabidopsis*: characterization of a novel and abundant group of genes coding ankyrin-transmembrane proteins. *Gene* 340:111-12, 2004.

Benfey PN, Scheres B. Root development. *Curr Biol* 10:R813-815, 2000.

Bernoux M, Timmers T, Jauneau A, Briere C, de Wit PJ, Marco Y, Deslandes L. RD19, an *Arabidopsis* cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector. *Plant Cell* 20:2252-2264, 2008.

Bernstein DS, Buter N, Stumpf C, Wickens M. Analyzing mRNA-protein complexes using a yeast three-hybrid system. *Methods* 26:123-141, 2002.

Brand U, Fletcher JC, Hobe M, Meyerowitz EM, Simon R. Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* 289:617-619, 2000.

Cadman CS, Toorop PE, Hilhorst HW, Finch-Savage WE. Gene expression profiles of *Arabidopsis* Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. *Plant J* 46:805-822, 2006.

Caro F, Bercovich N, Atorrasagasti C, Levin MJ, Vazquez MP. *Trypanosoma cruzi*: analysis of the complete PUF RNA-binding protein family. *Exp Parasitol* 113:112-124, 2006.

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

- Chen T, Kurjan J. *Saccharomyces cerevisiae* Mpt5p interacts with Sst2p and plays roles in pheromone sensitivity and recovery from pheromone arrest. *Mol Cell Biol* 17:3429-3439, 1997.
- Cheong CG, Hall TM. Engineering RNA sequence specificity of Pumilio repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13635-13639, 2006.
- Clark SE. Cell signalling at the shoot meristem. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:276-284, 2001.
- Clark SE, Jacobsen SE, Levin JZ, Meyerowitz EM. The CLAVATA and SHOOT MERISTEMLESS loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* 122:1567-1575, 1996.
- Clark SE, Running MP, Meyerowitz EM. CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* 119:397-418, 1993.
- Clark SE, Williams RW, Meyerowitz EM. The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* 89:575-585, 1997.
- Crittenden SL, Bernstein DS, Bachorik JL, Thompson BE, Gallegos M, Petcherski AG, Moulder G, Barstead R, Wickens M, Kimble J. A conserved RNA-binding protein controls germline stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 417:660-663, 2002.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 14:1188-1190, 2004.
- Cui L, Fan Q, Li J. The malaria parasite *Plasmodium falciparum* encodes members of the Puf RNA-binding protein family with conserved RNA binding activity. *Nucleic Acids Res* 30:4607-4617, 2002.
- Curtis D, Apfeld J, Lehmann R. nanos is an evolutionarily conserved organizer of anterior-posterior polarity. *Development* 121:1899-1910, 1995.
- Curtis D, Treiber DK, Tao F, Zamore PD, Williamson JR, Lehmann R. A CCHC metal-binding domain in Nanos is essential for translational regulation. *Embo J* 16:834-843, 1997.
- de Moor CH, Meijer H, Lissenden S. Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 16:49-58, 2005.
- Decker CJ, Parker R. Diversity of cytoplasmic functions for the 3' untranslated region of eukaryotic transcripts. *Curr Opin Cell Biol* 7:386-392, 1995.
- Dreyfuss G, Kim VN, Kataoka N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:195-205, 2002.
- Dubnau J, Chiang AS, Grady L, Barditch J, Gossweiler S, McNeil J, Smith P, Buldoc F, Scott R, Certa U, Broger C, Tully T. The staufen/pumilio pathway is involved in *Drosophila* long-term memory. *Curr Biol* 13:286-296, 2003.

- Dunoyer P, Lecellier CH, Parizotto EA, Himber C, Voinnet O. Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* 16:1235-1250, 2004.
- Edwards TA, Pyle SE, Wharton RP, Aggarwal AK. Structure of Pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motifs. *Cell* 105:281-289, 2001.
- Endrizzi K, Moussian B, Haecker A, Levin JZ, Laux T. The SHOOT MERISTEMLESS gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes WUSCHEL and ZWILLE. *Plant J* 10:967-979, 1996.
- Evans TC, Hunter CP. Translational control of maternal RNAs. *WormBook*:1-11, 2005.
- Favaro, EC. Estudo da função dos genes *PUMILIO* de *Arabidopsis* durante o desenvolvimento vegetal. [Tese de Doutorado]. Instituto de Química. São Paulo, 2007.
- Fletcher JC, Brand U, Running MP, Simon R, Meyerowitz EM. Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* 283:1911-1914, 1999.
- Forbes A, Lehmann R. Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells. *Development* 125:679-690, 1998.
- Galgano A, Forrer M, Jaskiewicz L, Kanitz A, Zavolan M, Gerber AP. Comparative analysis of mRNA targets for human PUF-family proteins suggests extensive interaction with the miRNA regulatory system. *PLoS ONE* 3:e3164, 2008.
- Gallois JL, Woodward C, Reddy GV, Sablowski R. Combined SHOOT MERISTEMLESS and WUSCHEL trigger ectopic organogenesis in *Arabidopsis*. *Development* 129:3207-3217, 2002.
- Gamberi C, Peterson DS, He L, Gottlieb E. An anterior function for the *Drosophila* posterior determinant Pumilio. *Development* 129:2699-2710, 2002.
- Gerber AP, Herschlag D, Brown PO. Extensive association of functionally and cytologically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS Biol* 2:E79, 2004.
- Gerber AP, Luschnig S, Krasnow MA, Brown PO, Herschlag D. Genome-wide identification of mRNAs associated with the translational regulator PUMILIO in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4487-4492, 2006.
- Goldstrohm AC, Hook BA, Seay DJ, Wickens M. PUF proteins bind Pop2p to regulate messenger RNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13:533-539, 2006.
- Goldstrohm AC, Seay DJ, Hook BA, Wickens M. PUF protein-mediated deadenylation is catalyzed by Ccr4p. *J Biol Chem* 282:109-114, 2007.

- Gross SD, Anderson RA. Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell Signal* 10:699-711, 1998.
- Gu W, Deng Y, Zenklusen D, Singer RH. A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev* 18:1452-1465, 2004.
- Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry Method that gives a linear photometric response. *Analytical Chemistry* 48: 422-427, 1972.
- Hook B, Bernstein D, Zhang B, Wickens M. RNA-protein interactions in the yeast three-hybrid system: affinity, sensitivity, and enhanced library screening. *Rna* 11:227-233, 2005.
- Hook BA, Goldstrohm AC, Seay DJ, Wickens M. Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. *J Biol Chem* 282:15430-15438, 2007.
- Jackson JS, Jr., Houshmandi SS, Lopez Leban F, Olivas WM. Recruitment of the Puf3 protein to its mRNA target for regulation of mRNA decay in yeast. *Rna* 10:1625-1636, 2004.
- Jaruzelska J, Kotecki M, Kusz K, Spik A, Firpo M, Reijo Pera RA. Conservation of a Pumilio-Nanos complex from *Drosophila* germ plasm to human germ cells. *Dev Genes Evol* 213:120-126, 2003.
- Jeong S, Trotochaud AE, Clark SE. The *Arabidopsis* CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *Plant Cell* 11:1925-1934, 1999.
- Johnstone O, Lasko P. Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos. *Annu Rev Genet* 35:365-406, 2001.
- Jurgens G. Growing up green: cellular basis of plant development. *Mech Dev* 120:1395-1406, 2003.
- Kadyrova LY, Habara Y, Lee TH, Wharton RP. Translational control of maternal Cyclin B mRNA by Nanos in the *Drosophila* germline. *Development* 134:1519-1527, 2007.
- Kaya H, Shibahara KI, Taoka KI, Iwabuchi M, Stillman B, Araki T. FASCIATA genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell* 104:131-142, 2001.
- Kayes JM, Clark SE. CLAVATA2, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis*. *Development* 125:3843-3851, 1998.
- Keene JD. Organizing mRNA export. *Nat Genet* 33:111-112, 2003.
- Keene JD. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* 8:533-543, 2007.

- Keene JD, Tenenbaum SA. Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Mol Cell* 9:1161-1167, 2002.
- Kennedy BK, Gotta M, Sinclair DA, Mills K, McNabb DS, Murthy M, Pak SM, Laroche T, Gasser SM, Guarente L. Redistribution of silencing proteins from telomeres to the nucleolus is associated with extension of life span in *S. cerevisiae*. *Cell* 89:381-391, 1997.
- Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Lohler J, Stoter M. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal* 17:675-689, 2005.
- Kraemer B, Crittenden S, Gallegos M, Moulder G, Barstead R, Kimble J, Wickens M. NANOS-3 and FBF proteins physically interact to control the sperm-oocyte switch in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 9:1009-1018, 1999.
- Krizek BA, Meyerowitz EM. The *Arabidopsis* homeotic genes APETALA3 and PISTILLATA are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development* 122:11-22, 1996.
- Kuersten S, Goodwin EB. The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet* 4:626-637, 2003.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5:150-163, 2004.
- Kuwabara PE. Gametogenesis: keeping the male element under control. *Curr Biol* 8:R278-281, 1998.
- Laux T, Mayer KF, Berger J, Jurgens G. The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* 122:87-96, 1996.
- Lee TI, Johnstone SE, Young RA. Chromatin immunoprecipitation and microarray-based analysis of protein location. *Nature protocols* 1:729-748, 2006.
- Lenhard M, Jurgens G, Laux T. The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in *Arabidopsis* shoot meristem regulation. *Development* 129:3195-3206, 2002.
- Lin H, Spradling AC. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* 124:2463-2476, 1997.
- Long JA, Moan EI, Medford JI, Barton MK. A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of *Arabidopsis*. *Nature* 379:66-69, 1996.
- Lublin AL, Evans TC. The RNA-binding proteins PUF-5, PUF-6, and PUF-7 reveal multiple systems for maternal mRNA regulation during *C. elegans* oogenesis. *Dev Biol* 303:635-649, 2007.
- Luitjens C, Gallegos M, Kraemer B, Kimble J, Wickens M. CPEB proteins control two key steps in spermatogenesis in *C. elegans*. *Genes Dev* 14:2596-2609, 2000.

- Macdonald P. Diversity in translational regulation. *Curr Opin Cell Biol* 13:326-331, 2001.
- Macdonald PM. The *Drosophila* pumilio gene: an unusually long transcription unit and an unusual protein. *Development* 114:221-232, 1992.
- Malamy JE, Benfey PN. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124:33-44, 1997.
- Mayer KF, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jurgens G, Laux T. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* 95:805-815, 1998.
- Mazumder B, Seshadri V, Fox PL. Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci* 28:91-98, 2003.
- McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16:404-405, 2000.
- Menon KP, Sanyal S, Habara Y, Sanchez R, Wharton RP, Ramaswami M, Zinn K. The translational repressor Pumilio regulates presynaptic morphology and controls postsynaptic accumulation of translation factor eIF-4E. *Neuron* 44:663-676, 2004.
- Meyerowitz EM. Control of cell division patterns in developing shoots and flowers of *Arabidopsis thaliana*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62:369-375, 1997.
- Micklem DR. mRNA localisation during development. *Dev Biol* 172:377-395, 1995.
- Moore FL, Jaruzelska J, Fox MS, Urano J, Firpo MT, Turek PJ, Dorfman DM, Pera RA. Human Pumilio-2 is expressed in embryonic stem cells and germ cells and interacts with DAZ (Deleted in AZoospermia) and DAZ-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:538-543, 2003.
- Murata Y, Wharton RP. Binding of pumilio to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning in *Drosophila* embryos. *Cell* 80:747-756, 1995.
- Nakahata S, Katsu Y, Mita K, Inoue K, Nagahama Y, Yamashita M. Biochemical identification of *Xenopus* Pumilio as a sequence-specific cyclin B1 mRNA-binding protein that physically interacts with a Nanos homolog, Xcat-2, and a cytoplasmic polyadenylation element-binding protein. *J Biol Chem* 276:20945-20953, 2001.
- Nakahata S, Kotani T, Mita K, Kawasaki T, Katsu Y, Nagahama Y, Yamashita M.. Involvement of *Xenopus* Pumilio in the translational regulation that is specific to cyclin B1 mRNA during oocyte maturation. *Mech Dev* 120:865-880, 2003
- Olivas W, Parker R. The Puf3 protein is a transcript-specific regulator of mRNA degradation in yeast. *Embo J* 19:6602-6611, 2000.

- Opperman L, Hook B, DeFino M, Bernstein DS, Wickens M. A single spacer nucleotide determines the specificities of two mRNA regulatory proteins. *Nat Struct Mol Biol* 12:945-951, 2005.
- Ostrowski J, Wyrwicz L, Rychlewski L, Bomszyk K. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein associates with multiple mitochondrial transcripts within the organelle. *J Biol Chem* 277:6303-6310, 2002.
- Pantopoulos K. Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann N Y Acad Sci* 1012:1-13, 2004.
- Parisi M, Lin H. The *Drosophila* pumilio gene encodes two functional protein isoforms that play multiple roles in germline development, gonadogenesis, oogenesis and embryogenesis. *Genetics* 153:235-250, 1999.
- Park S, Han KH. An auxin-repressed gene (RpARP) from black locust (*Robinia pseudoacacia*) is posttranscriptionally regulated and negatively associated with shoot elongation. *Tree Physiol* 23:815-823, 2003.
- Prigge MJ, Otsuga D, Alonso JM, Ecker JR, Drews GN, Clark SE. Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 17:61-76, 2005.
- Raven PH. *Biologia Vegetal*. 6 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001.
- Rosenberg AH, Lade BN, Chui DS, Lin SW, Dunn JJ, Studier FW. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 56:125-135, 1987.
- Saint-Georges Y, Garcia M, Delaveau T, Jourden L, Le Crom S, Lemoine S, Tanty V, Devaux F, Jacq C. Yeast mitochondrial biogenesis: a role for the PUF RNA-binding protein Puf3p in mRNA localization. *PLoS ONE* 3:e2293, 2008.
- Salvetti A, Rossi L, Lena A, Batistoni R, Deri P, Rainaldi G, Locci MT, Evangelista M, Gremigni V. DjPum, a homologue of *Drosophila* Pumilio, is essential to planarian stem cell maintenance. *Development* 132:1863-1874, 2005.
- Sambrook, J., Fritsch, EF., Maniatis, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2^a ed. Plainview, N.Y., USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KF, Jurgens G, Laux T. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* 100:635-644, 2000.
- Schweers BA, Walters KJ, Stern M. The *Drosophila melanogaster* translational repressor pumilio regulates neuronal excitability. *Genetics* 161:1177-1185, 2002.
- Seay D, Hook B, Evans K, Wickens M. A three-hybrid screen identifies mRNAs controlled by a regulatory protein. *Rna* 12:1594-1600, 2006.

- Sengupta DJ, Wickens M, Fields S. Identification of RNAs that bind to a specific protein using the yeast three-hybrid system. *Rna* 5:596-601, 1999.
- SenGupta DJ, Zhang B, Kraemer B, Pochart P, Fields S, Wickens M. A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8496-8501, 1996.
- Sharma VK, Carles C, Fletcher JC. Maintenance of stem cell populations in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1:11823-11829, 2003.
- Sonoda J, Wharton RP. Recruitment of Nanos to hunchback mRNA by Pumilio. *Genes Dev* 13:2704-2712, 1999.
- Sonoda J, Wharton RP. *Drosophila* Brain Tumor is a translational repressor. *Genes Dev* 15:762-773, 2001.
- Souza GM, da Silva AM, Kuspa A. Starvation promotes *Dictyostelium* development by relieving PufA inhibition of PKA translation through the YakA kinase pathway. *Development* 126:3263-3274, 1999.
- Spassov DS, Jurecic R. Cloning and comparative sequence analysis of PUM1 and PUM2 genes, human members of the Pumilio family of RNA-binding proteins. *Gene* 299:195-204, 2002.
- Spassov DS, Jurecic R.. Mouse Pum1 and Pum2 genes, members of the Pumilio family of RNA-binding proteins, show differential expression in fetal and adult hematopoietic stem cells and progenitors. *Blood Cells Mol Dis* 30:55-69, 2003a
- Spassov DS, Jurecic R. The PUF family of RNA-binding proteins: does evolutionarily conserved structure equal conserved function? *IUBMB Life* 55:359-366, 2003b.
- Steeves TA., Sussex, IM. Patterns in plant development. Cambridge:Cambridge University Press, 1989.
- Stumpf CR, Kimble J, Wickens M. A *Caenorhabditis elegans* PUF protein family with distinct RNA binding specificity. *Rna* 14:1550-1557, 2008.
- Subramaniam K, Seydoux G. Dedifferentiation of primary spermatocytes into germ cell tumors in *C. elegans* lacking the pumilio-like protein PUF-8. *Curr Biol* 13:134-139, 2003.
- Sung S, Amasino RM. Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Curr Opin Plant Biol* 7:4-10, 2004.
- Tucker M, Parker R. Mechanisms and control of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem* 69:571-595, 2000.
- Tucker M, Staples RR, Valencia-Sanchez MA, Muhlrud D, Parker R. Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 21:1427-1436, 2002.

- Wang X, McLachlan J, Zamore PD, Hall TM. Modular recognition of RNA by a human pumilio-homology domain. *Cell* 110:501-512, 2002.
- Wang X, Zamore PD, Hall TM. Crystal structure of a Pumilio homology domain. *Mol Cell* 7:855-865, 2001.
- Weigel D.& Glazebrook J. *Arabidopsis*: a laboratory manual. 1^a ed., N.Y., USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- Weigel D, Jurgens G. Stem cells that make stems. *Nature* 415:751-754, 2002.
- Wharton RP, Struhl G. Structure of the *Drosophila* BicardalD protein and its role in localizing the the posterior determinant nanos. *Cell* 59:881-892, 1989.
- Wharton RP, Sonoda J, Lee T, Patterson M, Murata Y. The Pumilio RNA-binding Domain is Also a Translational Regulator. *Molecular Cell* 1:863-872, 1998.
- Wickens M, Anderson P, Jackson RJ. Life and death in the cytoplasm: messages from the 3' end. *Curr Opin Genet Dev* 7:220-232, 1997.
- Wickens M, Bernstein DS, Kimble J, Parker R. A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *Trends Genet* 18:150-157., 2002.
- Wilkie GS, Dickson KS, Gray NK. Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci* 28:182-188., 2003.
- Williams L, Fletcher JC. Stem cell regulation in the Arabidopsis shoot apical meristem. *Curr Opin Plant Biol* 8:582-586, 2005.
- Williams L, Grigg SP, Xie M, Christensen S, Fletcher JC. Regulation of *Arabidopsis* shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its AtHD-ZIP target genes. *Development* 132:3657-3668, 2005.
- Wirta V, Holmberg A, Lukacs M, Nilsson P, Hilson P, Uhlen M, Bhalerao RP, Lundeberg J. Assembly of a gene sequence tag microarray by reversible biotin-streptavidin capture for transcript analysis of Arabidopsis thaliana. *BMC Biotechnol* 5:5, 2005.
- Wreden C, Verrotti AC, Schisa JA, Lieberfarb ME, Strickland S. Nanos and pumilio establish embryonic polarity in *Drosophila* by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA. *Development* 124:3015-3023, 1997.
- Xiong L, Lee H, Ishitani M, Zhu JK. Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 277:8588-8596, 2002.

Yamaguchi Shinozaki, K., Koizumi, M., Urao, S., Shinozaki, K. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation to *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant and cell physiology* 33: 217-X, 1992.

Zamore PD, Williamson JR, Lehmann R. The Pumilio protein binds RNA through a conserved domain that defines a new class of RNA-binding proteins. *Rna* 3:1421-1433, 1997.

Zanetti ME, Chang IF, Gong F, Galbraith DW, Bailey-Serres J. Immunopurification of polyribosomal complexes of *Arabidopsis* for global analysis of gene expression. *Plant Physiol* 138:624-635, 2005.

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

Zik M, Irish VF. Flower development: initiation, differentiation, and diversification. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:119-140, 2003a.

Zik M, Irish VF. Global identification of target genes regulated by APETALA3 and PISTILLATA floral homeotic gene action. *Plant Cell* 15:207-222, 2003b.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Carlos William Francischini

Local e data de nascimento: Londrina, 25 de novembro de 1979.

EDUCAÇÃO

Ensino médio: Colégio de aplicação, Londrina-PR, 1997.

Graduação: Universidade Estadual de Londrina, 2002.
Curso: Licenciatura em Química

OCUPAÇÃO

- Professor da Universidade Paulista (UNIP), desde outubro de 2008.
- Bolsista de Doutorado, CNPq (08/2003 a 07/2008).
- Estagiário bolsista do Programa de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE) na disciplina QBQ 316 –Bioquímica Experimental, sob a supervisão do Prof. Sandro Roberto Marana, 2006.
- Estagiário bolsista do Programa de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE) na disciplina QBQ 116 – Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo, sob a supervisão da Profa. Dra. Glaucia Mendes Souza, 2005.
- Estagiário bolsista do Programa de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE) na disciplina QBQ 116 – Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo sob a supervisão da Profa. Dra. Maria Julia Alves Manso, 2004
- Estagiário bolsista do Programa de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE) na disciplina QBQ 116 – Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo, sob a supervisão da Profa. Dra. Maria Julia Alves Manso, 2004

Publicações (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

- Francischini, C.W., Favaro, E.C., Quaggio, R.B. “PUF RNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*: Regulation of translation through binding to 3’UTR”. Apresentação de pôster. XXXVI Reunião Anual da SBBq e 10th IUBMB Conference, Salvador – BA, 2007. Resumos da XXXVI Reunião Anual da SBBq e 10th IUBMB Conference, 2007.

- Favaro, E.C., Francischini, C.W., Quaggio, R.B. **“Arabidopsis thaliana has three highly identical PUF proteins related to developmental processes”**. Apresentação de pôster. XXXVI Reunião Anual da SBBq e 10th IUBMB Conference, Salvador – BA, 2007. Resumos da XXXVI Reunião Anual da SBBq e 10th IUBMB Conference, 2007.
- Francischini, C.W., Quaggio, R.B. **“Characterization of PUMILIO-binding RNA of Arabidopsis thaliana”**. Apresentação de pôster. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia-SP, 2005. Resumos da XXXIV Reunião Anual de SBBq, 2005.
- Miranda, H.C., Sandra, O.V.N., Calvo, E., Sartori, F., Francischini, C.W. **Diagnóstico Molecular do Vírus da Borna (VDB) em Pacientes com Esquizofrenia e Depressão Grave**. XI Encontro Anual de Iniciação Científica, Maringá – PR, 2002. Resumos do XI Encontro Anual de Iniciação Científica, 2002.
- Tamanini, C., Francischini, C.W., Oliveira, A.S., Camargo, R.F., Haully, M.C.O. **Produção de dextrana por Leuconostoc mesenteroides e Leuconostoc spp em meios sintéticos de M.R.S. e A.P.T.** Apresentação de pôster. 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas – MG, 2001. Resumos da 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, artigo QB – 026, 2001.
- Francischini, C.W., Sato, A., Haully, M. C. O., Oliveira, A.S. **Determinação de dextrana nas cepas de cana-de-açúcar da indústria de açúcar e álcool COROL Rolândia- PR**. Apresentação oral. IX Encontro Anual de Iniciação Científica, Londrina- PR, 2000. Resumos do IX Encontro Anual de Iniciação Científica, pág. 229, volume 2, 2000.
- Sato, A., Francischini, C.W., Oliveira, A.S., Haully, M.C.O. **Isolamento de bactérias produtoras de dextrana na região de plantio de cana-de-açúcar da COROL Rolândia-PR**. IX encontro Anual de Iniciação Científica, Londrina-PR, 2000. Resumos do IX Encontro Anual de Iniciação Científica, pág. 230, volume 2, 2000.
- Sato, A.M., Francischini, C.W., Miyahira, T., Oliveira, A.S. **Fermentação láctica em batelada desenvolvida pelo L. curvatus, em melaço de cana-de-açúcar**. Apresentação de pôster. 3º Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos, Campinas – SP, 1999. Resumos do 3º Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos, artigo 269, pág. 76, 1999

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)