

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

“Estudo de três metiltransferases da família SABATH e seus possíveis envolvimento com uma via de biossíntese de jasmonatos específica do pistilo de *Nicotiana tabacum*”.

Nilton César Avanci

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP,
como parte das exigências para a obtenção
do título de Doutor em Ciências, Área:
Biologia Comparada

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman

RIBEIRÃO PRETO - SP

- 2010 -

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

*O que vale na vida não é o ponto
de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim
terás o que colher.*

(Cora Coralina)

Dedico este trabalho à minha esposa Adriana

Sempre ouvi falar que POR TRÁS de um grande homem, há uma grande mulher. Mas depois que te conheci, prefiro dizer que AO LADO de um grande homem, há uma grande mulher.

Muito obrigado por toda a sua paciência, compreensão, dedicação e amor devotados a mim, desde de o dia em que nos conhecemos e, principalmente, neste último ano do doutorado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter colocado em meu caminho pessoas muito especiais, que me deram as mais variadas condições, permitindo a chegada desse dia, e a realização desse sonho.

A Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman, minha orientadora, por ter confiado em mim, ter julgado que eu seria capaz de realizar esse trabalho, por me proporcionar toda a condição intelectual e profissional no laboratório, pela paciência, compreensão, dedicação e, principalmente, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Aos meus pais, Osvaldo Avanci e Maria do Carmo da Silveira Avanci pelo apoio, paciência, e, principalmente, por me proporcionarem boas condições de estudo as quais, sem dúvida, foram fundamentais para que eu chegasse até esse dia e concretizasse esse sonho.

Aos meus irmãos, Silvana e Tiago, por serem bons companheiros de caminhada nesta vida, pelos momentos bons, mais ou menos e ruins, mas todos eles muito importantes para o meu crescimento pessoal.

Aos companheiros do laboratório de biologia molecular de plantas, desde os antigos, Alexandre (pensador), Claudinha, Idalete, Jeanne, Lara, Marcela (Rocks), Ricardo Augusto, Ricardo Jardim, Rogério, até os atuais e novatos, Ana Paula (Aninha), Andréa, Cristiane, Douglas, Edward, Fernanda, Greice (Guria), Henrique, Luizão (Zebu, meu filho adotivo), Marcella (Tuiiu), Michael, Paulo, Samantha e Viviane (Vivis). Obrigado por proporcionarem um ótimo ambiente de trabalho, pelos momentos de descontração, pelas “discussões” profissionais, pela amizade e pelas loucuras do dia-a-dia (delírios delirantes).

A Profa. Dra Maria Cristina da Silva Pranchevicius (Cris protein, para os íntimos), pela amizade incondicional, por todo ensinamento relacionado ao assunto proteínas, e pela excelente convivência quando de sua passagem como pós-doc pelo nosso laboratório, e atualmente por suas visitas agradáveis.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman, por disponibilizar alguns equipamentos de seu laboratório para a realização desse trabalho, por eventuais empréstimos de materiais, e pela obtenção dos animais para a produção dos anticorpos.

A Profa. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira pela colaboração, e por ceder alguns equipamentos e reagentes para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes (Beto), por toda a sua paciência com esse biólogo, que resolveu se enveredar pelos caminhos da Química. Eu penso que quaisquer que forem as palavras que eu escrever aqui, ainda serão poucas para demonstrar a gratidão que sinto por toda a ajuda, compreensão, dedicação e solicitude ao longo desses quatro anos de trabalho juntos. Muito obrigado mesmo!

A Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino, por toda a ajuda relacionada à purificação em grande escala da proteína rS-MT1, e por disponibilizar o seu laboratório, colunas e reagentes para a realização das purificações.

Ao Dr. Todd James Barkman, Professor da Western Michigan University, Kalamazoo, Michigan, por todas as dicas valiosas fornecidas quando do início dos trabalhos voltados para a realização dos ensaios enzimáticos *in vitro*, utilizando as diferentes proteínas recombinantes.

Aos professores, alunos e profissionais que me acolheram em todos os laboratórios em que estive, realizando estágio por todo esse tempo. Vocês talvez não leiam esse agradecimento, mas estejam certos que contribuíram, e muito, para a minha formação profissional, me possibilitando, dessa forma, chegar até esse dia.

Aos colegas de pós-graduação, pelas amizades construídas e pelo bom convívio ao longo dessa minha passagem pelo departamento de pós-graduação em Biologia Comparada.

À FAPESP e ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, pelo apoio financeiro concedido ao nosso laboratório, o que tornou possível a realização desse trabalho.

A CAPES, por me conceder a bolsa de estudos ao longo dos quatro anos nos quais esse trabalho foi conduzido.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, por todo o suporte e apoio financeiro recebidos durante a realização desse trabalho.

Aos professores membros da Banca Examinadora, por aceitarem o convite contribuindo, dessa maneira, para o meu crescimento profissional.

Enfim, a todos que, de uma forma ou de outra, com menor ou maior intensidade, contribuíram para a realização e término desse trabalho, o meu muito obrigado e minha eterna gratidão!

LISTA DE ABREVIATURAS

- BAMT – Benzoic acid methyltransferase (metiltransferase do ácido benzóico)
- BLAST – Basic local alignment search tool
- BSMT – Benzoic/salicylic methyltransferase (metiltransferase do ácido benzóico e salicílico)
- BCIP – 5-Bromo 4-cloro 3-indolil-fosfato p-toluidina
- cDNA – DNA complementar
- CG-EM - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
- CVs – Compostos voláteis
- dNTP – deoxi-nucleotídeo trifosfato
- D.O – Densidade óptica
- EST – Expressed sequence tag (“etiqueta” de sequência expressa)
- GC-MS – Gas chromatography-mass spectrometry
- GISH – Genomic *in situ* hybridization (hibridação genômica *in situ*)
- ip – Intraperitonealmente
- IPTG – Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
- JMT – Jasmonic acid methyltransferase (metiltransferase do ácido jasmônico)
- LB – Luria-Bertani
- MEFS - micro-extração em fase sólida
- MT1 – cDNA completo referente ao gene *NtJAMT* de *Nicotiana tabacum*
- NAMT – Nicotinic acid methyltransferase (metiltransferase do ácido nicotínico)
- NBT – Nitroblue tetrazolium
- NTES – tampão utilizado para a extração de RNAs, contendo NaCl, Tris-HCl, EDTA e SDS
- NTR1 – Nectarin1, proteína do nectário floral de *Brassica campestris* L.
- ORF – Open reading frame (fase aberta de leitura)
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- PR-1 – classe de proteínas relacionadas à resistência a patógenos
- PVPP – Polivinil-polipirrolidona
- rMT1 – proteína recombinante produzida a partir da construção pEXP17-MT1
- pS-rMT1 - proteína recombinante produzida a partir da construção pETSUMO-MT1
- r46B11 – proteína recombinante produzida a partir da construção pET28a-46B11
- r134B02 - proteína recombinante produzida a partir da construção pET28a-134B02

RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase, utilizando a enzima transcriptase reversa

SAH – S-adenosil-L-homocisteína

SAM – S-adenosil-L-metionina

SAMT – Salicylic acid methyltransferase (metiltransferase do ácido salicílico)

SAR – Systemic acquired resistance (resistência sistêmica adquirida)

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

SPME – Solid phase micro extraction

TBE – Tampão Tris-borato-EDTA

TBS – Solução salina tamponada com Tris-HCl

TE – Tampão Tris-HCl-EDTA

TES – Tampão Tris-HCl-EDTA com sacarose

TMV – Tobacco mosaic vírus (vírus do mosaico do tabaco)

TOBEST – Tobacco EST (banco de dados do nosso laboratório, contendo ESTs de estigmas/estiletos de *Nicotiana tabacum*)

13-HPOT – Ácido 9, 11,15 octadecatrienóico-13-hidroperoxi

ÍNDICE

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	05
2.1 Aspectos gerais sobre <i>Nicotiana tabacum</i>	05
2.2 Metiltransferases SABATH: uma nova família de enzimas identificadas em plantas.....	07
2.3 Produção e emissão de compostos voláteis metilados em flores.....	11
2.4 Jasmonatos: fitohormônios importantes envolvidos em processos fisiológicos cruciais para as plantas.....	12
2.5 Jasmonatos e o processo reprodutivo em plantas.....	15
2.6 Produção de proteínas recombinantes em sistemas heterólogos.....	16
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo geral.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 Análise dos compostos voláteis emitidos pela flor de <i>Nicotiana tabacum</i>	20
4.2 Isolamento de RNA Total (Dean et al., 1985).....	21
4.3 Síntese de cDNAs.....	22
4.4 Isolamento e clonagem do cDNA MT1, referente ao gene <i>NtJAMT</i>	22
4.4.1 Adenilação do cDNA MT1 amplificado por enzima de alta fidelidade.....	23
4.4.2 Purificação das amostras de DNA utilizando fenol/clorofórmio	24
4.4.3 Ligação dos fragmentos de DNA no vetor de clonagem.....	24

4.5	Reação de sequenciamento de DNA.....	25
4.6	Purificação e precipitação da reação de sequenciamento.....	26
4.7	Alinhamento e comparação das seqüências deduzidas de aminoácidos de diferentes metiltransferases de plantas.....	27
4.8	Sistemas de expressão de proteínas recombinantes utilizados.....	27
4.9	Reações de PCR para a entrada do cDNA MT1 no sistema Gateway.....	29
4.10	Inserção do cDNA MT1 no vetor de entrada do sistema Gateway, via reação BP.....	32
4.11	Recombinação com o vetor de expressão do sistema Gateway, via reação LR.....	33
4.12	Clonagem do cDNA MT1 no sistema de expressão pET-SUMO TA Champion ^R	35
4.13	Confirmação da clonagem do cDNA MT1 no vetor pETSUMO, através de PCR de colônia.....	38
4.14	Clonagem dos cDNAs 46B11 e 134B02 no vetor pET28a.....	38
4.15	Introdução do DNA plasmidial em <i>Escherichia coli</i>	41
4.15.1	Preparo de células quimicamente competentes (choque térmico).....	41
4.15.2	Transformação por choque térmico.....	42
4.15.3	Preparo de células eletrocompetentes.....	43
4.15.4	Transformação por eletroporação.....	43
4.16	Preparações de DNA plasmidial.....	44
4.16.1	Mini-preparação de DNA plasmidial (lisozima).....	44
4.16.2	Mini-preparação de DNA plasmidial utilizando o kit QIAGEN.....	49
4.17	Digestão enzimática do DNA.....	46
4.18	Análise do DNA plasmidial por eletroforese em gel de agarose.....	47
4.19	Purificação dos fragmentos de DNA do gel de agarose.....	47

4.20 Purificação do DNA obtido por PCR, utilizando o método do fenol/clorofórmio.....	48
4.21 Linhagem de <i>E. coli</i> utilizada para a expressão das proteínas metiltransferases heterólogas.....	49
4.22 Indução da expressão das proteínas metiltransferases em <i>E. coli</i>	49
4.23 Lise bacteriana para liberação das proteínas, utilizando sonicador.....	50
4.24 Extração dos compostos metilados com hexano, a partir do meio de cultura e do lisado celular.....	52
4.25 Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	53
4.26 Purificação das proteínas recombinantes pET28a-134B02, pEXP17-MT1 e pETSUMO-MT1 por cromatografia de afinidade em resina de níquel.....	53
4.27 Produção de anticorpos policlonais contra as proteínas recombinantes pEXP17-MT1 e pET28-134B02.....	54
4.28 Ensaio de pré-adsorção dos anticorpos policlonais.....	55
4.29 Extração de proteínas totais dos tecidos da folha, estigma/estilete e ovário de <i>Nicotiana tabacum</i>	55
4.30 Tratamento dos extratos protéicos totais de folhas, estigma/estilete e ovário com N-hexano.....	56
4.31 Análise por Western blot.....	56
4.32 Reação de ELISA.....	57

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Investigando possíveis compostos voláteis metilados emitidos pela flor de <i>N. tabacum</i>	59
5.2 Identificação e clonagem do cDNA completo (MT1) referente ao gene <i>NtJAMT</i>	69
5.3 Alinhamento entre a seqüência de aminoácidos de MT1, os clones de cDNA 46B11 e 134B02, e outras metiltransferases de diferentes espécies vegetais..	73
5.4 Construção dos vetores pEXP17-MT1, pETSUMO-MT1, pET28a-46B11 e pET28a-134B02 para a produção de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	78
5.4.1 Obtenção do vetor de expressão pEXP17-MT1, utilizando o sistema Gateway.....	78

5.4.2 Obtenção do vetor de expressão pETSUMO-MT1, utilizando o sistema pETSUMO Champion ^R	82
5.4.3 Obtenção dos vetores de expressão pET28a-46B11 e pET28a-134B02, utilizando o sistema pET.....	84
5.5 Produção das proteínas recombinantes pEXP17-MT1, pETSUMO-MT1, pET28a-46B11 e pET28a-134B02.....	89
5.5.1 Expressão das construções pEXP17-MT1 e pETSUMO-MT1 em células de <i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta.....	89
5.5.2 Expressão das construções pET28a-46B11 e pET28a-134B02 em células de <i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta.....	97
5.6 Ensaio enzimáticos <i>in vitro</i> , utilizando as proteínas rMT1, r46B11, r134B02 e rS-MT1 na presença de diferentes substratos.....	102
5.6.1 Ensaio enzimáticos em meio de cultura utilizando as proteínas rMT1, r46B11 e r134B02.....	102
5.6.2 Ensaio de competição por diferentes substratos em meio de cultura bacteriana.....	108
5.6.3 Ensaio enzimáticos utilizando as proteínas recombinantes pET28a-46B11 (r46B11) e pET28a-134B02 (r134B02).....	113
5.6.4 Ensaio enzimáticos a partir do extrato bruto de proteínas, obtido após lise da cultura celular de <i>E. coli</i>	120
5.6.5 Ensaio enzimáticos utilizando a proteína rS-MT1, purificada em resina de níquel.....	122
5.7 Ensaio de purificação e produção de anticorpos policlonais contra as proteínas rMT1 e r134B02.....	133
5.7.1 Purificação através de cromatografia de afinidade por resina de níquel das proteínas rMT1 e r134B02.....	133
5.7.2 Produção de anticorpos policlonais contra a proteína rMT1	136
5.7.2.1 Identificação das metiltransferases nativas através de ensaio de ELISA.....	138
5.7.2.2 Análise tecido-específica das metiltransferases nativas através de ensaio de western blot, com o anticorpo anti-rMT1.....	140
5.8 Produção de anticorpo policlonal contra a proteína r134B02.....	142

5.8.1 Análise tecido-específica das metiltransferases nativas através de ensaio de western blot, com o anticorpo anti-r134B02.....	146
5.9 Evidências para a existência de uma via de biossíntese do ácido jasmônico, ocorrendo especificamente nos pistilos da flor de <i>N. tabacum</i>	150
5.10 Jasmonatos e o processo reprodutivo.....	152
6. CONCLUSÕES.....	155
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	157

RESUMO

O pistilo, contido na flor, contém diferentes tecidos especializados. O estudo da expressão gênica neste órgão é fundamental para um melhor entendimento do processo reprodutivo vegetal. Experimentos de RT-PCR, utilizando um “pool” de cDNAs de estigma/estilete de *Nicotiana tabacum*, permitiram a clonagem do cDNA MT1. Este transcrito codifica uma proteína com alta similaridade a metiltransferases da família SABATH, e corresponde à seqüência completa do gene *NtJAMT* (*Nicotiana tabacum* Jasmonic Acid Methyltransferase). Metiltransferases são enzimas capazes de transferir radicais metil, a partir de um substrato doador (SAM – S-adenosil-L-metionina), para grupamentos carboxílicos livres em diversos metabólitos secundários de plantas, tais como os ácidos salicílico, benzóico, jasmônico e dihidro jasmônico. Os compostos metilados resultantes estão envolvidos em processos fisiológicos cruciais para as plantas, como por exemplo, desenvolvimento do vegetal, polinização, respostas de defesa, e sinalização química, entre outros.

Através da abordagem de MEFS, ensaios de captação de compostos voláteis usando flores de *Nicotiana tabacum* no estágio 11 do desenvolvimento floral, foram realizados. Análises por CG-EM mostraram que apenas os compostos MeJa e dihidroMeJa foram identificados, nos três períodos de amostragem (manhã, tarde e noite). Ensaios adicionais *in vivo*, utilizando pistilos inteiros macerados em solução saturada de CaCl₂ 5M, foram realizados. Após análises por MEFS/CG-EM, foi detectada a presença apenas do composto dihidroMeJa, e nenhum traço dos outros três compostos foi identificado.

O cDNA MT1 foi clonado nos vetores pDEST17 e pETSUMO, resultando nas construções pEXP17-MT1 e pETSUMO-MT1 que produziram, respectivamente, as proteínas recombinantes rMT1 e rS-MT1. A proteína rMT1 foi utilizada em ensaios enzimáticos *in vitro*, na presença de diferentes substratos (ácidos salicílico/benzóico/jasmônico/dihidro jasmônico), em quantidades equimolares (10mM). Dois tipos de ensaios foram realizados: 1) os ácidos foram adicionados, separadamente, no meio de cultura bacteriano induzido, e também no lisado celular (ensaio individual); e 2) dois diferentes ácidos foram adicionados, em cada frasco, no meio de cultura bacteriano induzido (ensaio de competição). Análises por CG-EM mostraram que, nos ensaios individuais, a proteína rMT1 foi capaz de produzir o composto metiljasmonato (MeJa) predominantemente, tanto nos ensaios em meio de cultura, quanto nos ensaios utilizando o lisado celular, sendo que neste último obteve-se o melhor resultado. No ensaio em meio de

cultura, o composto metilbenzoato (MeBa) foi obtido em baixa quantidade, o composto metilsalicilato (MeSa) foi produzido em uma quantidade extremamente baixa, e o composto dihidro metiljasmonato (dihidroMeJa) não foi detectado. Nos ensaios de competição enzimática, o composto MeJa foi o único a ser produzido, nos frascos onde o ácido jasmônico foi adicionado juntamente com outro ácido. A proteína rS-MT1, purificada em resina de níquel, foi capaz de produzir apenas os compostos MeJa e dihidroMeJa, como demonstrado pelas análises por CG-EM. Ensaios enzimáticos *in vitro*, utilizando as proteínas r46B11 e r134B02, correspondendo aos putativos transcritos de processamento alternativo do gene NtJAMT, foram realizados. Utilizando os mesmos ácidos como substratos, nas mesmas concentrações daquelas usadas para rMT1, mostrou-se que r46B11 produziu MeJa predominantemente, MeSa e MeBa em quantidades extremamente baixas, e o dihidroMeJa não foi produzido. De acordo com os resultados de CG-EM, a proteína r134B02 foi capaz de produzir apenas o MeJa.

Anticorpos policlonais, produzidos contra a proteína rMT1 em camundongos Balb/C, foram utilizados em ensaios de ELISA e western blot. O anticorpo anti-rMT1 foi capaz de reconhecer as três proteínas, rMT1, r46B11 e r134B02, em ensaios de western blot, demonstrando alta imunoreatividade. Ensaios adicionais de ELISA e western blot, com proteínas totais extraídas dos tecidos do estigma/estilete, ovário e folha, e o anticorpo anti-rMT1 como anticorpo primário, foram capazes de demonstrar a presença de metiltransferases nos tecidos do estigma/estilete e ovário, que estão ausentes em folhas. Esses resultados corroboram os experimentos de northern blot previamente realizados (Ângelo, 2001). A proteína r134B02 foi também utilizada para a produção de anticorpos policlonais em camundongos Balb/C. Em ensaios de western blot, esses anticorpos foram capazes de reconhecer a proteína r134B02, demonstrando alta imunoreatividade. Proteínas totais extraídas dos tecidos do estigma/estilete, ovário e folha foram usadas em um novo ensaio de western blot, com o anticorpo anti-r134B02. O resultado mostrou que esse anticorpo foi capaz de reconhecer uma banda correspondente à proteína MT1 nativa nos tecidos do estigma/estilete e ovário, assim como proteínas adicionais com massas variando de 18kDa a 32kDa nos mesmos tecidos, mas não reconheceu uma banda correspondente a proteína r134B02 nativa.

Análises adicionais, realizadas em nosso banco de dados TOBEST, utilizando o programa TBlastX identificaram os clones TOBS114G06, TOBS040E09, TOBS076D02, codificando proteínas com alta similaridade às enzimas lipoxigenase (LOX), allene oxide cyclase (AOC) e 12-oxophytodienoate reductase (12-OPR), respectivamente, cruciais para

a biossíntese do ácido jasmônico. Nenhum clone com similaridade significativa à enzima AOS foi encontrado durante esta análise. Além disso, uma pesquisa adicional no TOBEST identificou o clone TOBC130F10, codificando uma proteína com alta similaridade a fosfolipases do tipo A₂, que são enzimas fundamentais nos primeiros passos da via de biossíntese do JA.

Tomados juntos, os resultados apresentados aqui sugerem a existência de uma via de biossíntese do ácido jasmônico específica do pistilo, voltada para a produção de compostos jasmonatos nas flores de *N. tabacum*. É sugerido que tais compostos, atuando em sua forma volátil, estariam envolvidos em mecanismos de comunicação entre pistilos e estames da mesma flor, flores diferentes da mesma planta, ou em uma comunicação entre plantas vizinhas. Tal comunicação permitiria um controle temporal de amadurecimento dos órgãos reprodutivos (sincronização), favorecendo um processo de fertilização bem-sucedido.

ABSTRACT

The pistil, enclosed in the flower, contains different specialized tissues. The study of gene expression in this organ is crucial to a better understanding of plant reproductive process. RT-PCR experiments, using a *Nicotiana tabacum* stigma/style cDNA pool from allowed the cloning of the MT1 cDNA. This transcript encodes a protein with high similarity to methyltransferases of the SABATH family and corresponds to the full-length sequence of *NtJAMT* (*Nicotiana tabacum* Jasmonic Acid Methyltransferase) gene. Methyltransferases are enzymes capable of transferring methyl radicals, from a donor substrate (SAM – S-adenosyl-L-methionine), to free carboxylic groups in several plant secondary metabolites such as salicylic/benzoic/jasmonic/dihydrojasmonic acids. The resulting methylated compounds are involved in crucial physiological process to plants as, for example, plant development, pollination, defense responses, and chemical signaling, among others.

Through SPME approach, assays of volatile compounds capture using *Nicotiana tabacum* flowers at stage 11 of floral development were performed. GC-MS analyses have shown that only MeJa and dihydroMeJa compounds were identified, in the three sampling periods (morning, afternoon and evening). Additional *in vivo* assays, using whole pistils ground in a 5M CaCl₂ saturated solution were performed. After SPME/GC-MS, only the dihydroMeJa compound was detected and no trace of the other three compounds was identified.

The MT1 cDNA was cloned in the pDEST17 and pETSUMO vectors resulting in the pEXP17-MT1 and pETSUMO-MT1 constructions, which ge) given produced, respectively, the rMT1 and rS-MT1 recombinant proteins. The rMT1 protein was used in *in vitro* enzymatic assays, in the presence of equimolar amounts (10mM) of the different substrates (salicylic/benzoic/jasmonic/dihydrojasmonic acids). Two different kinds of assays were performed: 1) the acids were added separately in each vial containing the induced bacterial culture medium and also in the cell lysate (individual assay); and 2) two different acids were added, in each vial, in the induced bacterial culture medium (competition assay). GC-MS analyses have shown tha in the individual assays the rMT1 protein was capable of producing the methyljasmonate compound (MeJa) predominantly, in the culture medium assay, as well as in the cell lysate, in which a better result was obtained. In the culture medium assay, the methylbenzoate (MeBa) compound was obtained in low amount, the methylsalicilate (MeSa) compound was produced in an

extremely low amount, and the dihydro methyljasmonate (dihydroMeJa) was not detected. In the competition enzymatic assays, the MeJa was the only compound produced, in the flasks in which jasmonic acid was added along with another acid. The rS-MT1 protein, purified in niquel resin, was capable of producing only the MeJa and dihydroMeJa compounds, as demonstrated by the GC-MS analysis. *In vitro* enzymatic assays, using the r46B11 and r134B02 proteins, corresponding to the putative alternative spliced transcripts from *NtJAMT* gene, were performed. Using the same acids as substrates, in the same concentrations used for rMT1, it was shown that r46B11 produced MeJa predominantly, MeSa and MeBA in extremely low amount and the dihydroMeJa was not produced. According the GC-MS results, the r134B02 protein was capable of producing only MeJa.

Policlonal antibodies produced against the rMT1 protein in Balb/C mice were used in ELISA and western blot assays. The anti-rMT1 antibody was capable to recognize the three proteins, rMT1, r46B11 and r134B02, in the western blot assay, demonstrating a high immunoreactivity. Additional ELISA and western blot assays, with total protein extracts from stigma/style, ovary and leaf tissues using the antir-MT1 as primary antibody were, capable to demonstrate the presence of methyltransferases in the stigma/style tissues, which are absent in leaves. These results corroborate the northern blot experiments previously performed (Ângelo, 2001). The r134B02 protein was also used to produce polyclonal antibodies in Balb/C mice. In western blot assays, this polyclonal antibody was capable of recognizing the r134B02 protein, demonstrating high immunoreactivity. Total protein extracts from stigma/style, ovary and leaf were used in a new western blot assay, using the anti-r134B02 antibody. The result has shown that this antibody is capable to recognize a band corresponding to the native MT1 protein in stigma/style and ovary tissues, as well as additional proteins with masses ranging from 18kDa to 32kDa in the same tissues, but did not recognized a band corresponding to the native 134B02 protein.

Additional analysis, performed in our TOBEST database, using the TBlastX program, identified the TOBS114G06, TOBS040E09, TOBS076D02 clones, encoding proteins with high similarity to lipoxygenase (LOX), allene oxide cyclase (AOC) and 12-oxophytodienoate reductase (12-OPR) enzymes, respectively, crucial to the jasmonic acid (JA) biosynthesis pathway. No clone with significant similarity to the AOS enzyme was found during this analysis. Moreover, an additional search in the TOBEST identified the TOBC130F10 clone, encoding a protein with high similarity to type A₂ phospholipases, which are fundamental enzymes in the first steps of JA biosynthesis pathway.

Taken together, the results presented here suggest the existence of a pistil-specific JA biosynthesis pathway, towards the production of jasmonates compounds in the *N. tabacum* flowers. It is suggested that such compounds, acting in their volatile form, would be involved in a communication mechanism between pistils and stamens of the same flower, different flowers of the same plant, or in a communication between neighboring plants. Such communication would enable a temporal control of the reproductive organs ripening (synchronization), favoring a successful fertilization process.

1.0 Introdução

As Angiospermas são um grupo vegetal amplamente distribuído por todo o planeta, sendo encontrado desde as regiões mais áridas até as regiões mais úmidas, mostrando uma grande força adaptativa. Características especiais como a presença de sementes, flores (onde estão contidos os órgãos reprodutivos), frutos e ciclo de vida distinguem de forma crucial este grupo vegetal de todas as outras plantas (Raven *et al.*, 2001).

A flor é um ramo altamente modificado, constituído de um eixo com uma porção terminal dilatada (receptáculo) e apêndices laterais, chamados de peças florais ou órgãos florais; geralmente, são divididos em órgãos estéreis e órgãos reprodutivos (Figura 1) (Esau, 1974; Apezato-da-Glória & Carmello-Guerreiro, 2006). Sépala e pétala, compondo respectivamente o cálice e a corola, representam as peças florais estéreis. As sépala são freqüentemente verdes, e de aspecto mais folhoso, enquanto as pétala tendem a ser mais coloridas, e de aspecto mais vistoso (Apezato-da-Glória & Carmello-Guerreiro, 2006). O conjunto de estames (androceu), e o conjunto de carpelos (gineceu), compõem as peças reprodutoras, referindo-se aos termos masculino e feminino, respectivamente (Esau, 1974). Os estames têm como função principal a produção dos grãos de pólen (gametófitos masculinos).

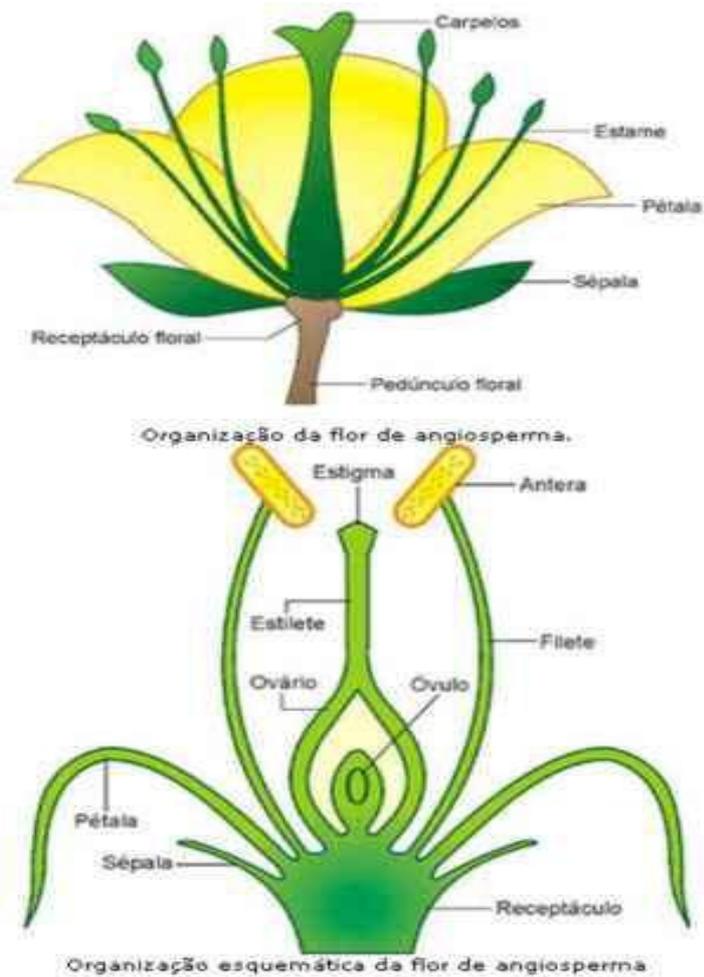


Figura 1. Representação esquemática de uma flor de Angiospermas, e seus diferentes órgãos (www.objetivo.br/colégio/temas_estudos/03.asp?s=).

Uma flor pode conter um ou mais carpelos, os quais podem estar separados ou fundidos parcial ou inteiramente, formando estruturas chamadas de pistilo. Na maioria das flores, este órgão é composto de três regiões distintas: um estigma, que recebe e discrimina os grãos de pólen; um estilete, que sustenta e conecta o estigma ao ovário; e um ovário, no qual estão localizados os óvulos (Raven *et al.*, 2001). No estigma, também são secretadas substâncias que auxiliam na adesão, hidratação e germinação do grão de pólen, estimulando o desenvolvimento do tubo polínico. O estilete contém, em sua região central, uma camada de células diferenciadas, que é especializada na condução dos tubos polínicos em crescimento, denominada de tecido transmissor. O ovário, que representa a porção basal dilatada do carpelo, produz os óvulos, que se desenvolvem a partir de regiões específicas de sua parede, e contêm os gametófitos femininos (sacos embrionários). Dessa

forma, o estigma e o estilete exercem importantes funções no processo de reconhecimento e seleção dos grãos de pólen; por esse motivo, o estudo da expressão gênica, bem como a função das proteínas produzidas nesses tecidos, é crucial para um melhor entendimento do processo reprodutivo vegetal (Apezzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro, 2006). Um gene apresentando expressão específica nos tecidos do pistilo foi identificado (Ângelo, 2001), e tornou-se alvo deste trabalho.

Através da triagem diferencial de uma biblioteca de cDNAs de estigma/estilete de *Nicotiana tabacum*, preparada por Goldman *et al.* (1992), isolou-se o clone de cDNA PA3, que apresentou alta similaridade de seqüência a metiltransferases do ácido salicílico, benzóico e jasmônico (Ângelo, 2001). Experimentos de northern blot, utilizando o cDNA PA3 como sonda, identificaram quatro transcritos distintos, específicos do pistilo de *N. tabacum* (Ângelo, 2001). Uma nova biblioteca de cDNAs de estigma/estilete foi construída e sequenciada, gerando o banco de dados TOBEST (“Tobacco ESTs”) (Quiapim, 2005; Quiapim *et al.*, 2009). Utilizando a seqüência nucleotídica de PA3, foi realizada uma comparação de seqüências utilizando o programa BlastN, dentro do TOBEST, onde foram identificadas 15 seqüências com alta similaridade a trechos do cDNA PA3. Experimentos de RT-PCR e RACE levaram à identificação de seqüências de cDNAs adicionais. A análise das seqüências de cDNAs e genômicas permitiram propor a existência de um gene composto de 8 exons (Figura 2), os quais são processados de forma alternativa, para gerar os vários transcritos identificados (Calixto, 2008). Dentre as seqüências de cDNA disponíveis, duas encontravam-se completas, ou seja, continham o códon ATG de início, e um códon de término de tradução: os clones de cDNA 134B02 e 46B11 (Figura 2), presentes no TOBEST.

Com base no conhecimento acumulado, foi possível definir “primers” específicos para as extremidades dos exons 1 e 8, e, no presente trabalho, clonar o cDNA completo (MT1), contendo os 8 exons, a partir de experimentos de RT-PCR com RNA extraído de estigmas/estiletos. A identificação e clonagem de MT1 foi de grande importância para a pesquisa sobre as metiltransferases do pistilo e seu papel na produção de compostos voláteis aqui relatada. Uma representação esquemática dos cDNAs MT1 (A), 134B02 (B) e 46B11 (C), alvos de estudo dessa tese, pode ser vista na Figura 2.

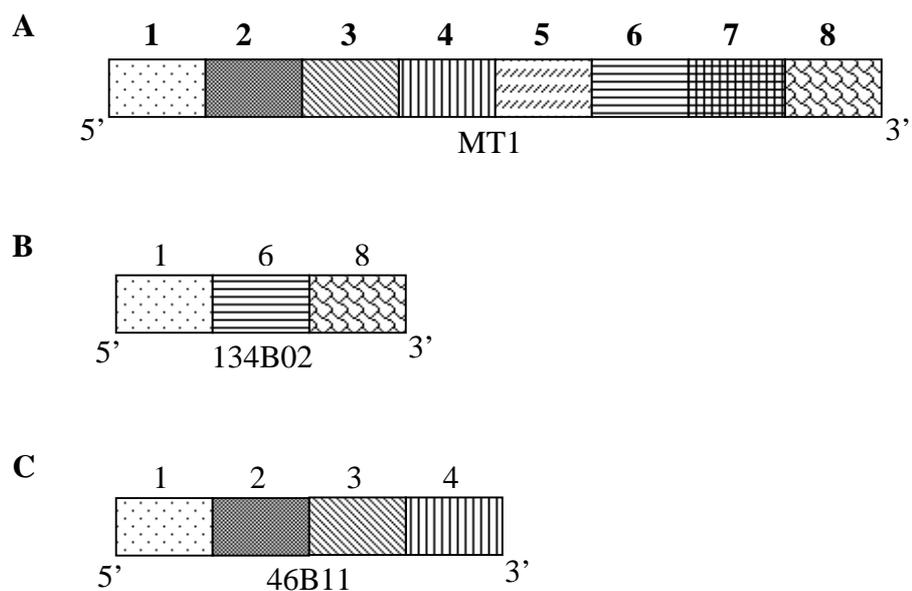


Figura 2. Representação esquemática dos três clones de cDNA utilizados para a realização desse trabalho. Os retângulos diferentemente hachurados correspondem aos diferentes exons, e estão fora de escala. Os números acima dos retângulos representam os exons que formam cada clone de cDNA.

2.0 Revisão de Literatura

2.1 Aspectos gerais sobre *Nicotiana tabacum* L

Nicotiana tabacum é uma angiosperma pertencente à família das Solanáceas, e é popularmente conhecida como planta do fumo (Figura 3). *Nicotiana* L. é o quarto gênero mais amplo na família, com 77 espécies ocorrendo naturalmente, distribuídas primariamente nas Américas e Austrália (Chase *et al.*, 2003). *N. tabacum* pode atingir mais de 2 metros de altura e suas folhas chegam a medir 70 centímetros. Suas flores são completas, ou seja, apresentam os quatro verticilos florais (sépala, pétala estame e pistilo), e perfeitas, apresentando o gineceu e o androceu na mesma flor, sendo os mesmos facilmente identificáveis (Corrêa, 1984).

O desenvolvimento floral em *N. tabacum* foi dividido em 12 estádios (Figura 4), de acordo com características morfológicas (Koltunow *et al.*, 1990). No primeiro estágio, os 4 verticilos florais (sépala, pétala, estame e pistilo) encontram-se completamente diferenciados. No estágio 12, a flor encontra-se totalmente aberta, e apta para o processo de fertilização.



Figura 3. Imagem representativa da planta do fumo (*Nicotiana tabacum*); em destaque, no alto da figura, ramo com inflorescência mostrando flores abertas e fechadas.

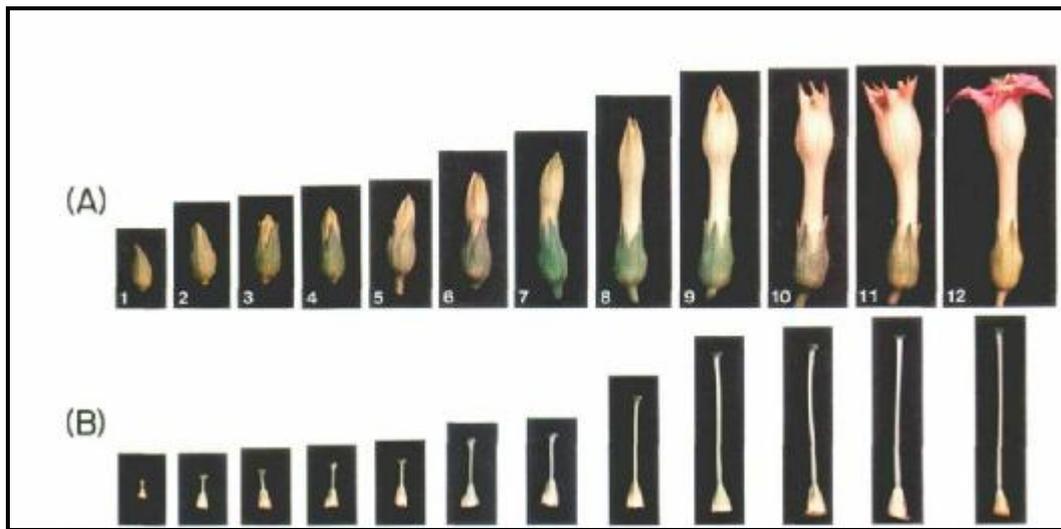


Figura 4. Representação dos 12 estádios do desenvolvimento floral de *N. tabacum*. A figura representa as modificações morfológicas dos botões florais (A) e dos pistilos (estigma, estilete e ovário) (B), durante os 12 estádios. Retirado de Koltunow *et al.* (1990).

Na planta do fumo, o pistilo é composto de dois carpelos fusionados. O estigma é bilobado e coberto com papilas distribuídas de forma esparsa. Quando maduro, o estigma é revestido com um exsudato viscoso, podendo, portanto, ser classificado como “úmido” (Sanchez *et al.*, 2004). Os estigmas do tipo úmido possuem uma superfície glandular (tecido estigmático ou zona secretória) que secreta uma solução contendo polissacarídeos e lipídeos. Esta secreção está envolvida na rejeição de pólenes interespecíficos, na promoção do crescimento do tubo polínico de pólenes intraespecíficos, e no processo adesivo que proporciona a captura dos pólenes provenientes do ar ou de animais polinizadores (Gasser & Robinson-Beers, 1993). O estilete da planta do fumo é sólido, ou seja, é preenchido pelo tecido transmissor. Tanto o estigma, quanto o estilete, são compostos de quatro tecidos elementares: epiderme, córtex, tecidos vascular e transmissor (Bell & Hicks, 1976). O tecido transmissor atua como mediador químico e físico para a fertilização; o tecido estigmático conecta-se ao ovário através do tecido transmissor, que funciona como um caminho para os tubos polínicos em crescimento através do estilete (Cresti *et al.*, 1986; Bacic *et al.*, 1988). A zona secretória do estigma e o tecido transmissor do estilete são tecidos especializados derivados primordialmente da superfície dos carpelos (Gasser & Robinson-Beers, 1993).

A origem evolutiva de *N. tabacum* também tem sido o alvo de muitos estudos que podem ser encontrados na literatura (Lim *et al.*, 2000; Fulnecek *et al.*, 2002; Chase *et al.*, 2003). A planta do fumo seria um alotetraplóide ($2n=48$), com cerca de 5-6 milhões de anos, tendo se originado, provavelmente, por hibridação interespecífica (Volkov *et al.*, 1999; Fulnecek *et al.*, 2002), entre um ancestral de *Nicotiana sylvestris* ($2n=2x=24$) e um ancestral de *Nicotiana tomentosiformis* ($2n=2x=24$) (Lim *et al.*, 2000). Resultados de análises de seqüências genômicas plastidiais e mitocondriais sustentam a hipótese de que o genoma materno de *N. tabacum* originou-se a partir de uma espécie ancestral de *N. sylvestris* (Olmstead & Palmer, 1991), enquanto o genoma paterno teria se originado a partir de uma espécie ancestral de *N. tomentosiformis* (Fulnecek *et al.*, 2002). Contudo, outra origem evolutiva também tem sido proposta, segundo a qual *N. tabacum* teria se originado a partir de um cruzamento envolvendo *N. sylvestris*, e um híbrido entre *N. tomentosiformis* e *N. otophora* (Kenton *et al.*, 1993). Embora não haja uma hipótese definitiva com relação à origem de *N. tabacum*, a literatura nos apresenta trabalhos que corroboram as duas hipóteses.

2.2 Metiltransferases SABATH: uma nova família de enzimas identificadas em plantas

De um modo geral, as metiltransferases são uma grande família de enzimas, que se ligam a um mesmo substrato doador do grupamento metil, a S-adenosil-L-metionina (SAM), e transferem o grupamento metil para um outro substrato, produzindo um produto metilado e S-adenosil-L-homocisteína (SAH) (Kagan & Clark, 1994). Reações de metilação são uma das modificações enzimáticas mais comuns encontradas no metabolismo secundário das plantas. Em geral, a transferência do radical metil é mais comumente observada em um dos quatro átomos a seguir: carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio (D'auria *et al.*, 2003). A metilação pode ocorrer também em grupos carboxílicos livres de moléculas pequenas, como o ácido salicílico, formando compostos metilados voláteis (Ross *et al.*, 1999). Em plantas, há diferentes tipos de metiltransferases, atuando nos mais variados substratos, desde isoflavonas, fenilpropanonas, e compostos fenólicos, até moléculas de DNA e RNA (D'auria *et al.*, 2003). Existe ainda outro grupo de metiltransferases identificado em plantas, as quais formam uma nova família, denominada SABATH (D'auria *et al.*, 2003). A denominação SABATH está relacionada com as três

primeiras enzimas caracterizadas dessa família: SAMT, metiltransferase do ácido salicílico de *Clarkia breweri* (Ross *et al.*, 1999); BAMT, metiltransferase do ácido benzóico de *Antirrhinum majus* (Murfitt *et al.*, 2000); e Theobromine synthase, de *Coffea arabica* (Ogawa *et al.*, 2001). Dentro da família SABATH são encontradas diferentes metiltransferases, atuando em substratos diversos, mas que compartilham similaridades de seqüência entre si. Dentre elas, há também as que atuam sobre o ácido jasmônico (JMT) (Seo *et al.*, 2001); e, mais recentemente, as que atuam sobre dois substratos: os ácidos salicílico e benzóico (BSMT) (Pott *et al.*, 2004).

Ésteres metílicos tais como, metilbenzoato (MeBa), metilsalicilato (MeSa) e metiljasmonato (MeJa), produzidos a partir dos ácidos citados acima, são componentes voláteis comuns em muitas espécies vegetais, que contribuem significativamente para a produção total dos voláteis florais (Murfitt *et al.*, 2000). Recentemente, foi isolada uma metiltransferase com atividade específica voltada para o ácido salicílico, em arroz (Xu *et al.*, 2006), além de uma outra metiltransferase, com alta atividade catalítica voltada para o ácido farnésico, em *Arabidopsis thaliana* (Yang *et al.*, 2006). A análise do padrão de expressão, acompanhada de caracterização bioquímica, mostrou que essas metiltransferases estão envolvidas, ou na biossíntese de compostos voláteis (CVs) nas flores, ou em respostas de defesa das plantas. A natureza do produto e a eficiência de sua formação nas plantas dependem da disponibilidade dos substratos, da eficiência catalítica da enzima, e da regulação transcricional, traducional e pós-traducional em nível enzimático (Effmert *et al.*, 2005).

O metilbenzoato é um dos principais compostos emitidos pelas flores de *N. suaveolens* e *Stephanotis floribunda*. Um estudo da localização da síntese e emissão desse volátil nas flores dessas plantas foi realizado por Rohrbeck *et al.* (2006). Os resultados obtidos mostraram que os lóbulos das pétalas são o local primário de síntese e liberação do metilbenzoato. Entretanto, diferenças significativas foram encontradas, em nível celular, entre as duas plantas. Em flores de *S. floribunda*, uma estrutura glandular (osmóforo – glândula “aromática”) parece ser a responsável pela síntese de metilbenzoato, enquanto células epidermais da pétala seriam o local restrito da síntese desse composto, em flores de *N. suaveolens* (Rohrbeck *et al.*, 2006). O gênero *Nicotiana*, representando uma ampla variedade de espécies, apresenta algumas espécies que emitem compostos à noite para atrair polinizadores noturnos como mariposas. Flores de *N. sylvestris* emitem metilbenzoato de maneira rítmica, verificando-se que um aumento na liberação deste ocorre durante a noite, que é o momento de maior atividade de seu polinizador (Loughrin

et al., 1990a). A emissão de metilbenzoato também foi verificada em flores de outras espécies de *Nicotiana*, além de outras Solanáceas, como *Petunia axillaris* e *P. hybrida* (Loughrin *et al.*, 1990b; Pott *et al.*, 2004; Oyama-Obuco *et al.*, 2005; Underwood *et al.*, 2005).

O metilsalicilato, produto metilado da ação de uma metiltransferase sobre o ácido salicílico, é um componente comum das essências florais e foliares e participa da atração de polinizadores e também no processo de defesa da planta contra ferimentos mecânicos e ataque de patógenos. O metilsalicilato pode funcionar como sinalizador, transportado pelo ar, o qual ativa a resistência a doenças e a expressão de genes relacionados à defesa em plantas vizinhas e em tecidos saudáveis da planta infectada, sendo provavelmente absorvido por tecidos não danificados e reconvertido a ácido salicílico (Shulaev *et al.*, 1997; Ross *et al.*, 1999). A emissão de metilsalicilato em *Lycopersicum esculentum* (atualmente *Solanum lycopersicum*) também foi encontrada. Plantas de tomate infectadas com o Vírus do Mosaico do Tabaco (TMV) apresentaram acúmulo desse composto em suas folhas. Concentrações semelhantes foram verificadas quando tratamento com metilsalicilato exógeno foi utilizado. Esses resultados sugerem que esse composto pode funcionar como um sinalizador químico em plantas de tomate, em resposta ao TMV, assim como já descrito na planta do fumo (Deng *et al.*, 2003). Estudando o desenvolvimento de flores de *S. floribunda*, Pott *et al.* (2003) verificaram um pico de emissão de metilsalicilato em flores jovens ao anoitecer, levando a atração de polinizadores ativos noturnos. A análise dos níveis de expressão de SAMT, em flores de *S. floribunda*, demonstrou que a regulação de sua emissão ocorre em níveis transcricionais e pós-traducionais, indicando uma necessidade do controle em mais de um nível para garantir o tempo preciso da emissão desse composto nessas flores.

O metiljasmonato, originalmente identificado como um composto volátil natural de flores de *Jasminum grandiflorum*, age não só como um mediador químico transportado pelo ar, atuando em vias de sinalização da expressão de genes envolvidos com defesa (Piechulla & Pott, 2003), como também induzindo respostas de defesa das plantas através de interações tritróficas, atraindo predadores naturais de herbívoros que atacam plantas que produzem este composto (Wasternack & Hause, 2002; Arimura *et al.*, 2005). O metiljasmonato ainda atua como um importante regulador celular, mediando diversos processos do desenvolvimento vegetal, tais como germinação de sementes, abscisão foliar, desenvolvimento de flores e frutos, e senescência (Seo *et al.*, 2001). A regulação do desenvolvimento de plantas transgênicas de soja, em função do metiljasmonato, foi

estudada por Xue & Zhang (2007). Os autores construíram plantas de soja transgênicas que superexpressavam o gene NTR1, sobre controle do promotor 35S. Esse gene foi isolado de *Brassica campestris*, e codifica uma metiltransferase do ácido jasmônico, específica do nectário floral dessa planta. A análise dos dados mostrou que as plantas superexpressando NTR1 apresentaram um fenótipo de folha e raiz alteradas, devido a quantidades aumentadas de metiljasmonato (2 a 2,5 maior), encontradas nessas plantas, quando comparadas com plantas de soja selvagens. As folhas mostraram-se levemente alongadas no comprimento, mas com um diâmetro pronunciadamente estreito. Além disso, houve inibição do crescimento da raiz primária, e estímulo do crescimento das raízes laterais das plantas de soja NTR1. A partir desses resultados, concluiu-se que plantas de soja superexpressando o gene NTR1 apresentaram níveis aumentados de metiljasmonato, e que as quantidades aumentadas desse composto influenciaram significativamente o desenvolvimento de folhas e raízes em plantas de soja transgênicas (Xue & Zhang, 2007).

Contudo, para compreender os mecanismos regulatórios fundamentais, envolvidos na emissão dos compostos voláteis florais, primeiro foi necessário isolar e caracterizar os genes e enzimas que controlam a produção dos mesmos (Piechulla & Pott, 2003). Mais de 700 compostos diferentes foram identificados a partir de flores (Knudsen *et al.*, 1993); entretanto, uma observação mais detalhada nos mostra que a maioria destes são derivados metilados, indicando que as reações de metilação, levando a produção de diversos compostos voláteis, são extremamente importantes para as plantas. A preferência para as reações de metilação na síntese dos aromas florais é refletida no isolamento bem sucedido de várias metiltransferases encontradas em flores (Piechulla & Pott, 2003).

2.3 Produção e emissão de compostos voláteis metilados em flores

Em parte, o estabelecimento bem sucedido das plantas no ambiente terrestre, é devido à presença das flores. Há uma grande variedade de formas e cores, fornecendo diferentes mecanismos de liberação, transferência e deposição do pólen, a partir da antera no pistilo (Knudsen *et al.*, 1993; Sanchez *et al.*, 2004). Além disso, elas produzem uma grande variedade de compostos químicos voláteis, que contêm misturas complexas de substâncias, as quais pertencem a diferentes classes químicas (Knudsen *et al.*, 1993). Já foram identificadas mais de 1000 substâncias voláteis, dentre as mais variadas espécies vegetais. Esse número certamente tende a aumentar, conforme novos métodos de detecção

e análise forem desenvolvidos (Pichersky *et al.*, 2006). A emissão de compostos voláteis pelas flores é uma estratégia utilizada para atrair insetos polinizadores, de forma que estudos da variação química desses compostos representam um passo importante para o entendimento da dinâmica adaptativa planta-polinizador (Loughrin *et al.*, 1990a; Knudsen *et al.*, 1993). A polinização garante a manutenção das espécies, podendo também aumentar a diversidade genética favorecendo, com isso, o potencial de se adaptar a novos ambientes (Sanchez *et al.*, 2004). Padrões de variação natural têm sido descritos, incluindo variação individual, variação intrafloral e emissão rítmica de aromas florais (Knudsen *et al.*, 1993). A maioria das plantas emite uma ampla variedade de voláteis florais e vegetativos, contendo isoprenóides, benzenóides e fenilpropanóides. Estes são compostos químicos com baixo peso molecular, baixa polaridade e baixa pressão de vapor, propriedades que facilitam sua volatilização (Piechulla & Pott, 2003). Tais características, inerentes aos compostos voláteis, possibilitaram a introdução da micro-extração em fase sólida (MEFS), como uma ferramenta poderosa para a análise de compostos voláteis em plantas (Yang *et al.*, 2002; Bartak *et al.*, 2003; Vas & Vekey, 2004). Em estudos voltados para o metabolismo de compostos benzenóides, e abordagens aplicando-se micro-extração de fase sólida (MEFS) juntamente com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), mostrou-se que o metilbenzoato é um dos CVs de maior emissão em pétalas de *Petunia hybrida*. Essa liberação apresenta mudanças rítmicas através de ciclos diários luz/escuro, com um nível máximo de emissão ocorrendo no período da noite. Neste mesmo estudo, análises de northern blot mostraram um aumento no nível da expressão de SAM sintase. Esta enzima é responsável pela biossíntese de SAM, o substrato doador do grupamento metil utilizado pelas metiltransferases de plantas, que produzem compostos benzenóides metilados (Kolosova *et al.*, 2001; Verdonk *et al.*, 2003; Boatright *et al.*, 2004).

2.4 Jasmonatos: fitohormônios importantes envolvidos em processos fisiológicos cruciais para as plantas

Diferentemente de outros seres vivos, as plantas não são capazes de se locomover frente a um perigo eminente (Jones & Dangl, 2006). Para se defender dos mais variados desafios que a natureza lhes impõe, as plantas contam com um imenso arsenal de compostos químicos; dentre eles, os fitohormônios estão em lugar de destaque

(Wasternack *et al.*, 2006). Dentre os diversos fitohormônios já identificados, os jasmonatos compõem uma classe de extrema importância e têm recebido certa notoriedade nos últimos anos (Browse, 2009). Esses compostos são amplamente difundidos no reino vegetal, e estão envolvidos em processos fisiológicos cruciais para o desenvolvimento e sobrevivência das plantas, tais como: respostas de defesa direta e indireta, biossíntese de metabólitos secundários, senescência, desenvolvimento do fruto, interações tritróficas, processo reprodutivo, dentre outros (Seo *et al.*, 2001; Arimura *et al.*, 2005; Liechti & Farmer, 2006; Wasternack, 2007).

Bioquimicamente, os jasmonatos são derivados do metabolismo lipídico vegetal, e são moléculas que apresentam um alto potencial regulatório (Delker *et al.*, 2006). O ácido jasmônico (JA), seu éster metílico metiljasmonato (MeJa), o ácido 12-oxofitodienólico (12-OPDA), o ácido jasmônico conjugado a alguns aminoácidos tais como leucina (JA-Le) e isoleucina (JA-Ile), são exemplos desses potentes fitohormônios (Wasternack *et al.*, 2007).

Os jasmonatos são produzidos a partir do ácido α -linolênico (18:3) presente nas membranas do cloroplasto (Liechter & Farmer, 2006). A formação do ácido α -linolênico ocorre a partir da ação de enzimas fosfolipases do tipo A2, e são disparadas por estímulos externos como ferimento ou ataque de patógenos. O envolvimento e a participação das fosfolipases do tipo A2 no início da via de biossíntese do JA são bem documentados na literatura (Leon *et al.*, 1998; Walling, 2001; Mansfeld, 2009). Após ser liberado no interior dos cloroplastos, o ácido α -linolênico sofre a ação da enzima 13-lipoxigenase (LOX), formando o composto 13-HPOT, neste que é considerado o passo inicial na formação do JA pela via Lipoxigenase. O composto 13-HPOT sofre a ação da enzima aleno óxido sintase (AOS), produzindo um composto aleno óxido quimicamente instável, o qual é convertido ao ácido 12-oxofitodienólico (12-OPDA), pela enzima aleno óxido ciclase (AOC) (Delker *et al.*, 2006; Wasternack, 2007). Estudos anteriores realizados por Laudert & Weiler (1998) revelaram que, em *Arabidopsis thaliana*, o gene AOS contém uma sequência sinalizadora para o cloroplasto, e está presente como uma cópia única no genoma. Com isso, foi sugerido que o passo catalisado pela enzima AOS é de extrema importância na regulação da biossíntese do JA.

O ácido 12-oxofitodienólico é o precursor imediato da biossíntese do JA, e o último produto dessa via metabólica produzido no cloroplasto. Nos passos finais da biossíntese do JA, o composto 12-OPDA sofre três passos de β -oxidação (Figura 5) dentro do peroxissomo, que é a única organela conhecida capaz de realizar tais modificações em plantas (Browse, 2009). O transporte de 12-OPDA do cloroplasto para os peroxissomos

ainda é uma questão a ser esclarecida. Evidências indicam que tal transporte é parcialmente dependente de transportadores ABC COMATOSE (CTS) em *A. thaliana* (Rosahl & Feussner, 2005; Browse, 2009). Uma vez formado, o JA pode sofrer diferentes conversões metabólicas originando jasmonatos distintos. Reações de metilação, catalisadas por uma enzima metiltransferase atuando especificamente sobre o JA, produzem o composto MeJa, em um processo ocorrendo possivelmente no citoplasma (Seo *et al.*, 2001).

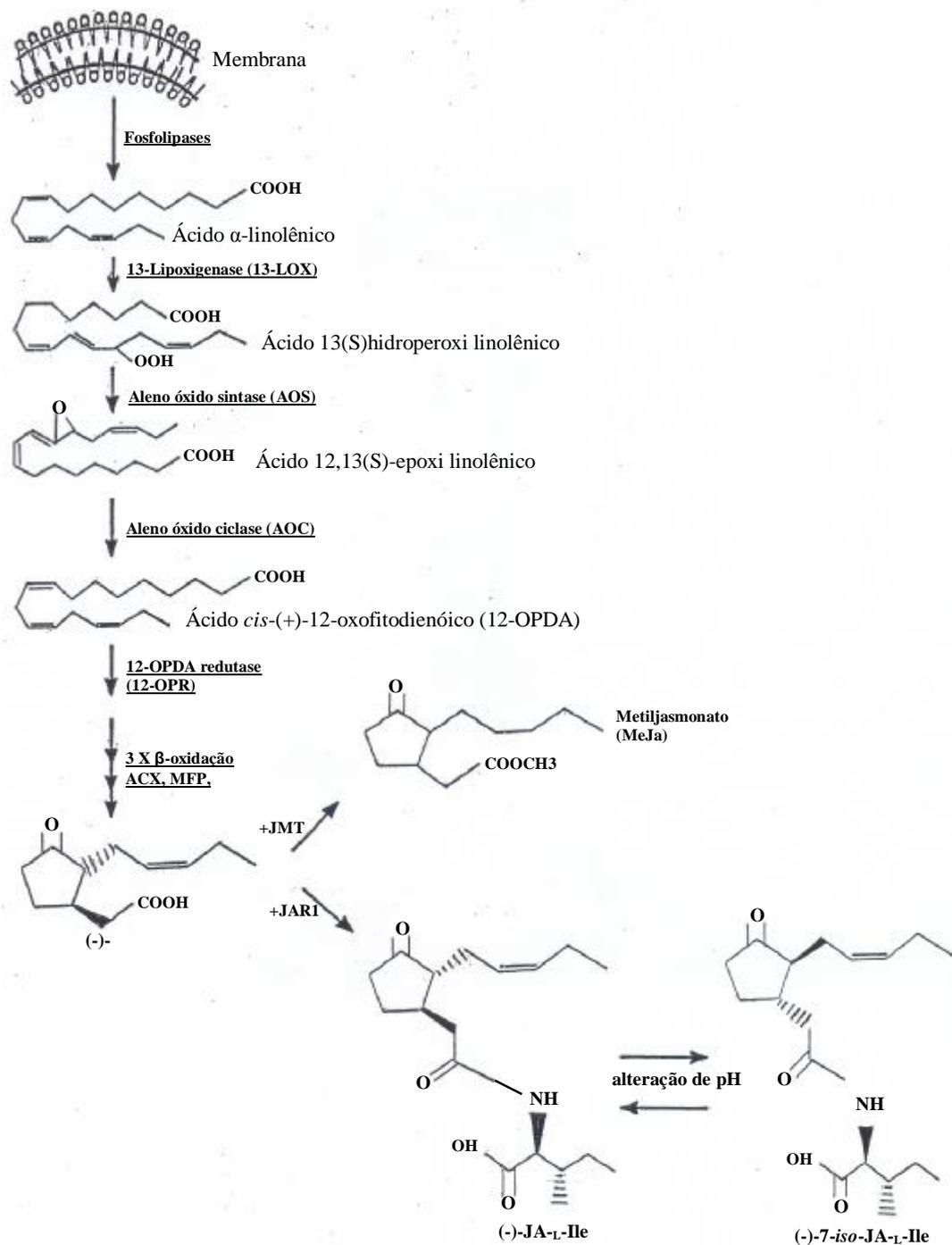


Figura 5. Representação esquemática da via biossintética do JA, incluindo todos os intermediários oxilipinas (modificado a partir de Wasternack, 2007 e Browse, 2009). As principais enzimas, responsáveis pelos passos de conversão dos lipídeos de membrana à JA, estão destacadas em negrito e sublinhadas. JMT é capaz de metilar o JA, formando MeJa (Seo *et al.*, 2001). A síntese começa com o ácido α -linolênico liberado a partir das membranas do cloroplasto, após a ação de enzima fosfolipase A2. Ao final, o composto 12-OPDA é transportado até os peroxissomos, onde sofrerá três passos de β -oxidação levando a formação do JA. Este esquema de síntese é baseado em descobertas feitas em plantas de *A. thaliana*.

2.5 Jasmonatos e o processo reprodutivo em plantas

Além de participar de processos fisiológicos fundamentais para o desenvolvimento e sobrevivência, os jasmonatos também realizam importantes papéis relacionados à reprodução vegetal. O envolvimento efetivo dos jasmonatos no processo reprodutivo tornou-se mais evidente quando mutantes de *Arabidopsis*, incapazes de responder ao JA, apresentaram um fenótipo macho-estéril. A análise desses fenótipos mostrou que os jasmonatos são importantes não apenas para o desenvolvimento adequado do pólen; eles também desempenham funções interessantes relacionadas à elongação do estame e ao tempo correto de liberação do pólen (deiscência da antera) (Liechti & Farmer, 2006).

O mutante *delayed dehiscence 1 (dde1)* de *Arabidopsis*, o qual tem um T-DNA inserido bloqueando a sequência gênica responsável por expressar a enzima 12-oxofitodienoato redutase (12-OPR), mostrou uma deiscência atrasada da antera, resultando em um processo ineficiente de fertilização (Sanders *et al.*, 2000). Interessantemente, a aplicação exógena de JA foi capaz de restabelecer o fenótipo selvagem, permitindo que a planta mutante, originalmente macho-estéril, produzisse sementes (Sanders *et al.*, 2000). Mutantes adicionais para a enzima 12-OPR de *Arabidopsis* foram obtidos, implicando o envolvimento dessa enzima em processos voltados para a indução e coordenação da elongação do filamento da antera, abertura do estômio na ântese, e a produção de pólenes viáveis (Stintzi & Browse, 2000).

A importância dos jasmonatos em regular o processo reprodutivo em plantas não está restrita apenas a *Arabidopsis*. O mutante *jai1 (jasmonic acid-insensitive1)* de tomate, demonstrando falhas na sinalização por jasmonatos, exibiu viabilidade do pólen reduzida e esterilidade, a qual foi causada por um defeito no controle maternal de maturação das sementes (Li *et al.*, 2004). Interessantemente, ao contrário do que ocorre em *Arabidopsis*, trabalhos realizados com plantas de tomate sugerem que nesta espécie os jasmonatos estão envolvidos com um fenótipo fêmea-estéril (Li *et al.*, 2001). Hause e colaboradores (2000) realizaram a clonagem da enzima aleno óxido ciclase (AOC) a partir de plantas de tomate. Esta enzima é responsável pela formação do composto 12-OPDA, que é o precursor imediato do JA, na via de biossíntese desse fitohormônio. Neste trabalho, os autores observaram que pequenas quantidades de RNAm e proteína AOC acumularam nos tecidos do caule, folhas e flores jovens. Por outro lado, quantidades maiores de RNAm e proteínas AOC foram detectadas nos botões florais, hastes florais e raiz. De forma ainda mais interessante, as maiores quantidades de RNAm e proteína AOC observadas nos diferentes

órgão florais se correlacionaram com uma alta atividade de AOC, acontecendo juntamente com um aumento nos níveis de JA, 12-OPDA e JA-L-Ile. Além disso, resultados obtidos a partir de análises imunocitoquímicas mostraram um grande acúmulo da proteína aleno óxido ciclase (AOC) especificamente nos óvulos, tecido transmissor do estilete e nos feixes vasculares dos receptáculos florais. Os resultados obtidos implicam o envolvimento da via de biossíntese do JA na regulação do desenvolvimento floral em plantas de tomate (Hause *et al.*, 2000).

2.6 Produção de proteínas recombinantes em sistemas heterólogos

Atualmente, há uma intensa demanda voltada para a produção de proteínas recombinantes, de forma rápida e em grande escala, em função do grande incremento nos bancos de dados de seqüências genômicas (Tsumoto *et al.*, 2003a). Dessa forma, para se estudar mais detalhadamente as proteínas codificadas por esses diversos genes, uma ferramenta que tem sido muito utilizada é a expressão heteróloga de proteínas, onde se utiliza um organismo (bactéria, por exemplo) para expressar uma proteína de outro organismo (uma planta), que não a possui naturalmente (Glick & Pasternak, 1994). O advento desta técnica tornou possível a produção de grandes quantidades de inúmeros tipos de proteínas, mesmo as que são encontradas naturalmente em pequenas quantidades nas células (Alberts *et al.*, 2004). Com isso, proteínas de grande interesse na medicina, como o hormônio do crescimento e antígenos virais para vacinas, passaram a ser produzidas em quantidades suficientemente grandes, para que fossem utilizadas em estudos mais específicos, como os de estrutura e função (Alberts *et al.*, 2004).

Entretanto, a produção de altos níveis de proteínas recombinantes depende de muitos fatores. Os principais estão relacionados com a escolha do sistema de expressão, que afeta tanto o processo de produção, quanto o rendimento do produto, além de questões relacionadas ao custo e tempo de produção (Makrides, 1996).

Há diferentes sistemas disponíveis para a produção de proteínas heterólogas, tais como células de *Escherichia coli*, leveduras, células de inseto, e células de mamíferos. Dentre esses, *E. coli* tem sido um dos mais amplamente utilizados, por apresentar rápido crescimento em cultura, e manipulação relativamente simples (Tsumoto *et al.*, 2003b; Singh & Panda, 2005), além de sua genética bem conhecida, e um número cada vez maior de vetores de clonagem e linhagens mutantes (Baneyx, 1999). Essas características têm

feito do sistema de expressão em *E. coli* um dos mais utilizados para a produção de proteínas recombinantes, que não necessitam de modificações pós-traducionais, tais como glicosilação, para que a proteína exerça sua função biológica específica (Panda & Singh, 2005). Várias proteínas de interesse farmacêutico estão sendo produzidas em escala comercial, tais como insulina humana, interferon- α e γ , hormônio de crescimento humano (Arora & Khanna 1996; Walsh, 1998), entre outras, através da superexpressão em células de *E. coli* (Bhandari & Gowrishankar, 1997). Entretanto, nem todo gene pode ser eficientemente expresso nesse sistema, devido a características estruturais únicas e sutis presentes na seqüência de interesse (Makrides, 1996).

Um dos fatores que mais podem causar uma diminuição significativa na produção de proteínas recombinantes está relacionado com a presença de códons raros para a *E. coli*, na seqüência do gene clonado (Baneyx, 1999). Um exemplo são os códons AGG e AGA, que codificam arginina (Ivanov *et al.*, 1992). Genes codificando RNAs transportadores para tais códons são encontrados em menor quantidade no genoma de *E. coli*, de forma que a presença deles na seqüência a ser expressa pode afetar, ou até inibir, a síntese protéica e o crescimento celular (Baneyx, 1999). Dessa forma, a co-expressão de RNAs transportadores para os códons raros pode proporcionar uma melhoria na expressão da proteína em estudo (Griswold *et al.*, 2003). Assim, com o objetivo de se tentar solucionar essa questão, algumas linhagens de *E. coli* foram desenvolvidas, de forma a conter plasmídeos adicionais, carregando cópias extras de genes que codificam RNAs transportadores usados com menos freqüência pela maquinaria de tradução em *E. coli* (Jerpseth *et al.*, 1997). Além desses, outros aspectos ainda devem ser considerados quando se usa o sistema heterólogo bacteriano, para a obtenção da proteína recombinante em grande quantidade e de forma solúvel: manutenção e número de cópias do plasmídeo de interesse; utilização de promotores fortes, como os virais (por exemplo, T7 RNA polimerase); estabilidade do RNA mensageiro; seqüências de reconhecimento específicas ao redor do códon ATG, de início de tradução, bem como a seqüência para a ligação ao ribossomo em procaríoto (Shine-Dalgarno) (Baneyx, 1999). Além disso, a utilização de sistemas de expressão de proteínas em fusão, como GST (glutathione-S-transferase) (Yu *et al.*, 2007), thiorredoxina (Yasukawa *et al.*, 1995; Heim *et al.*, 2007), bem como, a co-expressão com chaperonas moleculares do tipo GroEL e GroES (Mitsuda & Iwasaki, 2006), e proteína SUMO (Hippauf *et al.*, 2010), também têm sido amplamente utilizadas para aumentar o nível de expressão, e a solubilidade de proteínas recombinantes. Com isso, os fatores relacionados acima nos dão a idéia de que, na realidade, não há um sistema de expressão universal para

a produção de proteínas heterólogas. Todos os que estão disponíveis apresentam algumas vantagens e desvantagens, que devem ser levadas em conta no momento de se escolher um deles (Rai & Padh, 2001).

Além da utilização de diferentes linhagens de *E. coli*, como a BL21(DE3) Rosetta, outra estratégia empregada para a obtenção de bons níveis de proteínas recombinantes é o uso de diferentes temperaturas de indução. A mudança de temperatura é freqüentemente praticada no cultivo de *E. coli*, com a finalidade de reduzir a formação de metabólitos não desejados e maximizar a síntese de proteínas heterólogas dobradas corretamente (Gadgil *et al.*, 2005). Quando células de *E. coli* são cultivadas a 37°C, que é sua temperatura ótima de crescimento, algumas proteínas podem ser formadas e acumuladas na forma de corpos de inclusão. Entretanto, a utilização de temperaturas mais baixas, como 30°C ou 25°C, pode levar a mudanças fisiológicas nas células, favorecendo a produção de proteínas ativas e solúveis. Em alguns casos, a indução prolongada (por toda a noite, por exemplo), em temperaturas mais baixas (15°C a 20°C), pode se mostrar eficiente para a produção de proteínas solúveis (Schein, 1989; Gadgil *et al.*, 2005).

3.0 Objetivos

3.1 Objetivo geral

O pistilo é um órgão de importância central para a ocorrência de um processo de fertilização bem-sucedido e a subsequente produção de frutos e sementes. Por esse motivo, o estudo da expressão gênica nos tecidos especializados que compõem o pistilo contribui para um melhor entendimento do processo reprodutivo vegetal.

Assim, este trabalho teve como objetivo estudar diferentes proteínas metiltransferases expressas especificamente nos tecidos do pistilo, bem como suas possíveis implicações no processo reprodutivo em *Nicotiana tabacum*.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Análise e comparação da emissão de compostos voláteis metilados liberados pela flor de *Nicotiana tabacum*, em diferentes períodos do dia;
- ✓ Identificação, isolamento e sequenciamento completo do clone de cDNA MT1, referente ao gene *NtJAMT* específico do pistilo de *N. tabacum*;
- ✓ Clonagem e expressão heteróloga dos cDNAs MT1, 134B02 e 46B11 em *Escherichia coli*, visando a realização de ensaios enzimáticos *in vitro*;
- ✓ Produção de anticorpos policlonais em camundongos, contra as proteínas recombinantes produzidas a partir dos cDNAs MT1 e 134B02;
- ✓ Análise da presença de uma possível via de biossíntese do ácido jasmônico (JA), no pistilo de *N. tabacum*.

4.0 Material e Métodos

4.1 Análise dos compostos voláteis emitidos pela flor de *Nicotiana tabacum*

A captação dos voláteis foi realizada em três períodos diferentes ao longo do dia, de acordo com o que segue: manhã (entre 10:00hs e 10:20hs), tarde (entre 16:00hs e 16:20hs) e noite (entre 20:00hs e 20:20hs). Todo o aparato montado para a captação dos compostos voláteis foi uma modificação de Verdonk e colaboradores (2003). Para a análise dos voláteis, foi utilizado um sistema de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), operando com ionização por impacto de elétrons. O equipamento é da Shimadzu, (Japão), modelo QP 2010 Plus, equipado com uma coluna (SGE) bp 1 de 0,25 mm de diâmetro interno, 30 m de comprimento, e filme de 0,25 μ m. Gás hélio foi utilizado como gás de fluxo. A micro-extração em fase sólida (MEFS) foi realizada, utilizando-se uma fibra de polidimetilsiloxano (PDMS - 100 μ m), de baixa polaridade, apropriada para a adsorção de compostos voláteis e semi-voláteis (Supelco, Sigma-Aldrich).

Uma flor de *N. tabacum*, no estágio 11 do desenvolvimento floral, foi acondicionada no interior de um pequeno “coletor” de vidro. Em seguida, uma bomba de vácuo direcionou o fluxo de ar, através do coletor, no sentido da fibra. Esse fluxo, juntamente com os voláteis emitidos pela flor, foram absorvidos pela fibra de MEFS. Após a exposição aos voláteis por 20 minutos, a fibra foi introduzida no equipamento de CG-EM para as análises. A adsorção dos compostos voláteis foi realizada por dessorção térmica, no portal de injeção do cromatógrafo a gás. A temperatura do injetor foi de 250°C, e as amostras foram adsorvidas da fibra por um minuto. A temperatura inicial da corrida foi de 50°C, aumentando 7°C por minuto, até a temperatura final de 220°C. A temperatura de detecção no espectrômetro de massas foi de 250°C. O intervalo de massa m/z analisado foi entre 50 e 600. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 35 minutos. A busca pelos compostos voláteis emitidos pela flor, foi realizada por comparações com os respectivos tempos de retenção dos padrões do metilbenzoato, metilsalicilato, metiljasmonato e dihidro metiljasmonato, obtidos a partir da biblioteca NIST.

Análises adicionais, utilizando pistilos inteiros macerados, foram realizadas. Para tanto, 6 a 8 pistilos, obtidos a partir de flores no estágio 11 do desenvolvimento floral, e coletadas sempre às 10:00h da manhã, foram maceradas juntamente com uma solução saturada de cloreto de cálcio (CaCl₂), 5M. Após a maceração, a solução foi transferida para um tubo de ensaio vedado com Parafilm na parte superior, e mantido a temperaturas

entre 55°C e 65°C, por 5 minutos, para a saturação do ambiente interno do tubo. Ao final dos 5 minutos, a fibra de MEFS foi exposta aos voláteis liberados no interior do tubo de ensaio, e deixada nesse ambiente por 60 minutos. Ao final do ensaio, os compostos adsorvidos na fibra foram analisados por CG-EM.

4.2 Isolamento de RNA Total (Dean et al., 1985)

Inicialmente, todas as soluções para uso com RNA foram preparadas com água tratada com DEPC (dietil pirocarbonato), e as vidrarias tratadas a 180°C (estufa de esterilização), por no mínimo 4 horas.

A extração de RNA total dos tecidos do pistilo (estigma/estilete), foi realizada de acordo com o protocolo que segue. Após as amostras dos tecidos (2 a 10g) serem coletadas e congeladas em nitrogênio líquido, elas foram maceradas em graal de porcelana, até se obter um pó fino. O tecido macerado foi transferido para um tubo Falcon de 50mL, contendo 9mL de tampão NTES (0,1M NaCl, 0,01M Tris-HCl pH7,5, 1mM EDTA, 1% SDS) e 6mL de fenol/clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após agitação, durante pelo menos 10 minutos no vortex, as amostras foram transferidas para um tubo Corex de 30mL e centrifugadas a 8200g, por 10 minutos.

À fase aquosa foram adicionados 1/10 volume de acetato de sódio 2M pH 4,8, e 2 volumes de etanol absoluto. Após agitação leve, as amostras foram mantidas por pelo menos 1 hora a -20°C e, posteriormente, centrifugadas novamente a 8200g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado invertendo-se o tubo, o precipitado foi lavado com etanol 70% e dissolvido em 2,5mL de H₂O tratada com DEPC. Em seguida, foram adicionados 2,5mL de acetato de lítio 4M e as amostras foram mantidas no gelo por 2 dias, sendo o gelo trocado sempre que necessário. O acetato de lítio precipita preferencialmente RNA.

Após dois dias, as amostras foram centrifugadas novamente a 8200 g, por 10 minutos, e o precipitado dissolvido em 1,8mL de H₂O tratada com DEPC. Em seguida, foram adicionados 0,2mL de acetato de sódio 2M pH 4,8, e 4mL de etanol absoluto. Essa mistura foi homogeneizada e incubada a - 20°C durante pelo menos 1 hora. As amostras foram centrifugadas novamente a 8200g durante 10 minutos e, em seguida, o precipitado foi lavado com etanol 70%, e dissolvido em 500µL de H₂O tratada com DEPC. As amostras de RNA foram quantificadas em aparelho Genesis 5 (Spectronics®), onde a

pureza da preparação foi avaliada através da razão DO_{260nm}/DO_{280} . Após a quantificação, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer $-70^{\circ}C$.

4.3 Síntese de cDNAs

As amostras de RNA extraídas dos tecidos do estigma/estilete, foram convertidas em cDNA, por tratamento enzimático. Para tanto, foram adicionados em tubo tipo Eppendorf: 10µl de RNA (20µg), 1 µL oligo dT do Kit GeneRacer (10 µM) (Invitrogen), 1 µL dNTP (10 mM), 4 µL tampão ThermoScript (5 X), 2 µL DTT (0,1 M), 1 µL RNase out (40 U/µL), e 1 µL ThermoScript (15 U/µL), num volume final de 20 µL. O RNA, oligo dT e dNTP, foram incubados a $65^{\circ}C$ durante 5 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada rapidamente, e os demais itens foram adicionados no frasco. A reação foi incubada a $60^{\circ}C$, durante 1 hora. Após esse tempo, foi adicionado 1 µL de RNase H (2 U), e a reação incubada a $37^{\circ}C$, por 20 minutos. Ao final da reação, o frasco foi centrifugado rapidamente e estocados em freezer a $-20^{\circ}C$.

4.4 Isolamento e clonagem do cDNA MT1, referente ao gene *NtJAMT*

Com a finalidade de isolar o clone de cDNA completo referente ao gene *NtJAMT*, fez-se necessário, inicialmente, o desenho de um par de “primers”, baseados nas seqüências consenso dos exons 1 e 8 (Tabela 1). Esses “primers” foram, então, utilizados em uma reação de PCR, onde os cDNAs dos tecidos do estigma/estilete, foram usados como DNA molde. A reação de PCR é mostrada a seguir:

- 1,0µL de cDNAs de estigma/estilete
- 5,0µL tampão 10x High Fidelity com Mg (Triple Master – Eppendorf)
- 1,0µL mistura de dNTP (10mM)
- 1,0µL primer pMT1_8E-Ex1 (10pmol/µL)
- 1,0µL primer pMT1_8E-Ex8 (10pmol/µL)
- 0,7µL enzima Triple Master (5U/µL) (Eppendorf)
- 40,3µL de água MilliQ estéril para volume final de 50µL

A reação de PCR, utilizada para a amplificação dos cDNAs, foi realizada em termociclador T3 Thermocycler (Biometra), que foi programado como descrito a seguir:

Desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos.

94°C por 60 segundos (desnaturação)	}	35 ciclos
60°C por 60 segundos (pareamento)		
72°C por 90 segundos (extensão)		

extensão final por 10 minutos a 72°C e, em seguida, manter a 10°C por tempo indeterminado

Tabela 1. “Primers” utilizados para a amplificação dos cDNAs de estigma/estilete, visando o isolamento do clone de cDNA MT1

Primer pMT1_8E-Ex1 - Senso	Sequência 5' ATG GAA GTT GCT AAA ATA CTT CAC ATG 3'
Primer pMT1_8E-Ex8 - Reverso	Sequência 5' GTT TGT TTT GGT CAA GGA GAC AAC 3'

4.4.1 Adenilação do cDNA MT1 amplificado por enzima de alta fidelidade

A adição de adeninas nas extremidades de cDNAs amplificados com enzimas de alta fidelidade (“proofreading”), foi a estratégia utilizada neste trabalho, para a subclonagem do cDNA de interesse, no vetor de clonagem pCR2.1 do kit TOPO TA (Invitrogen). A reação de adenilação foi realizada conforme descrito abaixo:

- 30,0µL do putativo cDNA MT1 purificado
- 3,0µL tampão 10x BioTools com Mg²⁺
- 1,0µL dATP 250µM
- 1,0 µL enzima Taq BioTools (1U/µL)

Em seguida, a reação foi incubada por 30 minutos, a 72°C.

4.4.2 Purificação das amostras de DNA utilizando fenol/clorofórmio

Após as amostras de DNA serem submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, as bandas do DNA de interesse, ao final da corrida eletroforética, foram excisadas do gel utilizando um bisturi limpo. Uma membrana Millipore tipo VG 0,22 µm foi umidecida com tampão TE, dobrada em forma de cone, e colocada dentro de um tubo de 1,5mL tipo Eppendorf, cortado na parte superior e com um furo na extremidade inferior, feito com uma agulha. O pedaço do gel excisado, contendo o fragmento de DNA amplificado, foi colocado sobre a membrana. Este tubo, contendo a membrana e o pedaço do gel, foi colocado dentro de um outro tubo com a extremidade superior também cortada. Todo o aparato foi centrifugado a 10.000rpm durante 10 minutos.

A solução recuperada no tubo inferior, após centrifugação, foi transferida para um novo tubo, para que fosse efetuada a limpeza do DNA. A seguir, foi adicionado à amostra 1 volume de fenol, sendo vigorosamente agitada em vortex e, posteriormente, centrifugada a 14.000rpm por 3 minutos, promovendo a formação de duas fases. A fase superior foi recuperada e, em seguida, adicionou-se 1 volume de fenol/clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Como na etapa anterior, a mistura foi agitada e centrifugada a 14.000rpm por 3 minutos. Novamente, a fase superior foi recuperada e, em seguida, adicionou-se 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), sendo agitado e centrifugado como na etapa anterior. Após essas três etapas de limpeza, o DNA foi precipitado com 1/10 do volume de acetato de potássio 5M e 1 volume de isopropanol absoluto. A amostra foi centrifugada a 14.000rpm durante 15 minutos, deixada secar em temperatura ambiente, e o precipitado contendo o DNA, foi ressuspensão em 15µL de água destilada estéril.

4.4.3 Ligação dos fragmentos de DNA no vetor de clonagem

Uma vez que o DNA purificado foi ressuspensão, aproximadamente 40ng do mesmo foi utilizado para a reação de ligação no vetor de clonagem (TOPO TA Cloning Kit – Invitrogen), como se segue:

- 1µL de solução salina diluída 1:4 (solução salina estoque: 1.2M NaCl; 0.06M MgCl₂)
- 1µL vetor de clonagem pCR2.1 TOPO TA (10ng/µL)
- 4 µL DNA purificado (~10ng/µL)

Os reagentes foram adicionados em um tubo tipo Eppendorf com capacidade para 200µL e, a seguir, a reação foi incubada a temperatura ambiente, por 30 minutos, para uma maior eficiência de ligação. Em seguida, uma alíquota de 1µL a 2µL da reação de ligação, foi utilizada para a transformação de células DH10B de *E. coli* por eletroporação, para a multiplicação do DNA plasmidial.

4.5 Reação de sequenciamento de DNA

A extração do DNA plasmidial, para a reação de sequenciamento, foi realizada seguindo o protocolo desenvolvido no laboratório do Prof. Dr. Paulo Arruda (CBMEG/UNICAMP), durante o projeto SUCEST. O protocolo detalhado pode ser visto em Quiapim (2005). Com isso, o sequenciamento do DNA foi realizado pelo método de dideoxinucleotídeos, descrito por Sanger *et al.* (1977). As amostras foram preparadas com o kit de reação ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems). Para cada amostra a ser seqüenciada, foram usados aproximadamente 500ng de DNA (1 a 2 µL), 1 µL de “primer” T7 (5 pmoles/µL), 1 µl de “Big Dye” (deoxinucleotídeos, dideoxinucleotídeos fluorescentes, enzima Taq DNA-Polimerase), 3 µL de tampão de diluição do “Big Dye” (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5mM de cloreto de magnésio) e água milli-Q estéril, para completar o volume final de 10 µL. A microplaca foi então selada, levada ao vortex por 1 minuto e centrifugada rapidamente a 1.000rpm. O programa de PCR utilizado é descrito a seguir:

Desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos

96°C por 45 segundos (desnaturação)	} 35 ciclos
50°C por 30 segundos (pareamento)	
60°C por 4 minutos (extensão)	
Ao final, manter a 4°C por tempo indeterminado.	

4.6 Purificação e precipitação da reação de seqüenciamento

Nesta etapa, as amostras, obtidas na reação em cadeia da polimerase (PCR), são precipitadas e limpas dos dideoxinucleotídeos fluorescentes não incorporados durante a síntese de moléculas de DNA. Estes dideoxinucleotídeos livres interferem com a leitura das bases durante o seqüenciamento.

O produto das reações de PCR foi precipitado com 80 µl de isopropanol 75% e, após leve agitação no vórtex, foi incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 45 minutos, a 4.000rpm (Centrífuga Eppendorf 5810R), o sobrenadante foi descartado e, em seguida, o precipitado foi centrifugado rapidamente até 1000rpm, invertido em papel absorvente. Este precipitado foi lavado com 200 µl de etanol 70% e, a seguir, centrifugado a 3.000rpm, por 10 minutos (este passo foi feito duas vezes). Então, o etanol foi removido completamente por centrifugação, com a placa invertida e apoiada em papel absorvente. O precipitado foi incubado a temperatura ambiente por 1 hora.

Após a precipitação das reações de PCR, cada amostra foi ressuspensa em 10µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems), a placa foi levada ao vortex por 1 minuto, centrifugada e colocada a 95°C por 5 minutos, para desnaturação das amostras. As placas foram colocadas no seqüenciador ABI 3100 (Applied Biosystems), que contém 16 capilares preenchidos por poliacrilamida. A corrida eletroforética nos capilares foi realizada em 15h, para cada 96 amostras. O seqüenciador reconhece as bases por meio de diferentes fluorescências, e as informações são transferidas automaticamente para um computador. A leitura das bases foi analisada pelo programa de computador ABI 3100 Data Collection.

4.7 Alinhamento e comparação das seqüências deduzidas de aminoácidos de diferentes metiltransferases de plantas

Após a obtenção do cDNA MT1, realizou-se o alinhamento entre sua seqüência deduzida de aminoácidos, das seqüências deduzidas de aminoácidos dos cDNAs 46B11 e 134B02, além de outras metiltransferases homólogas, de diferentes espécies vegetais. Para tanto, utilizou-se o programa ClustalW, versão 2.0 (Larkin *et al.*, 2007). O alinhamento visou a comparação das diferentes seqüências deduzidas de aminoácidos, com a finalidade de analisar o índice de identidade entre elas.

4.8 Sistemas de expressão de proteínas recombinantes utilizados

O cDNA MT1 foi clonado no sistema Gateway (Invitrogen) (figura 6), no qual o segmento de DNA é transferido entre vetores usando recombinação sítio-específica, baseada no fago lambda, utilizando uma mistura de recombinases (Landy, 1989). Uma característica importante desse sistema é que, enquanto transfere seqüências de DNA entre os vetores, ele é capaz de manter a orientação correta delas.

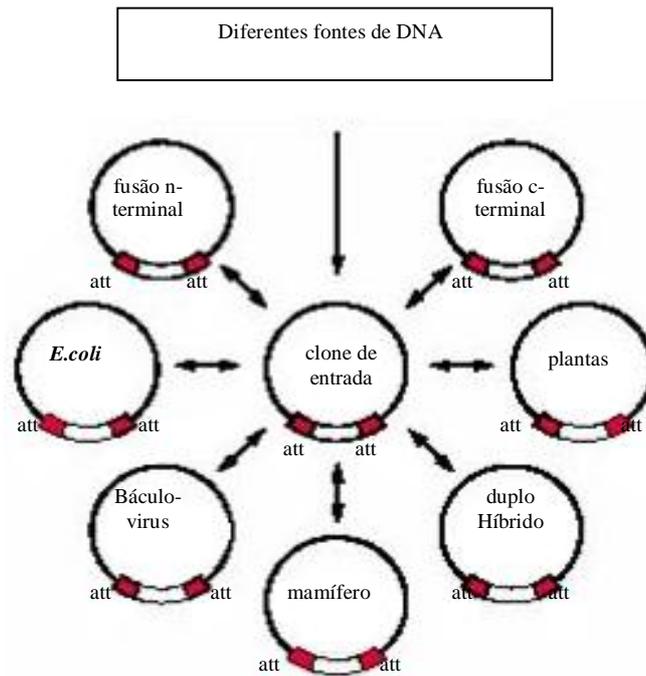


Figura 6. Esquema mostrando possíveis formas de recombinação no sistema Gateway. Depois de clonado dentro do vetor de entrada, o gene de interesse pode ser transferido para diferentes vetores do sistema.

Os cDNAs 46B11 e 134B02 foram clonados no vetor pET28a (Novagen, Inc. Milwaukee, WI). Nesse sistema de clonagem, as seqüências de DNA são ligadas ao vetor, utilizando-se os métodos tradicionais de clonagem, através de enzimas de restrição e DNA ligase (Figura 7).

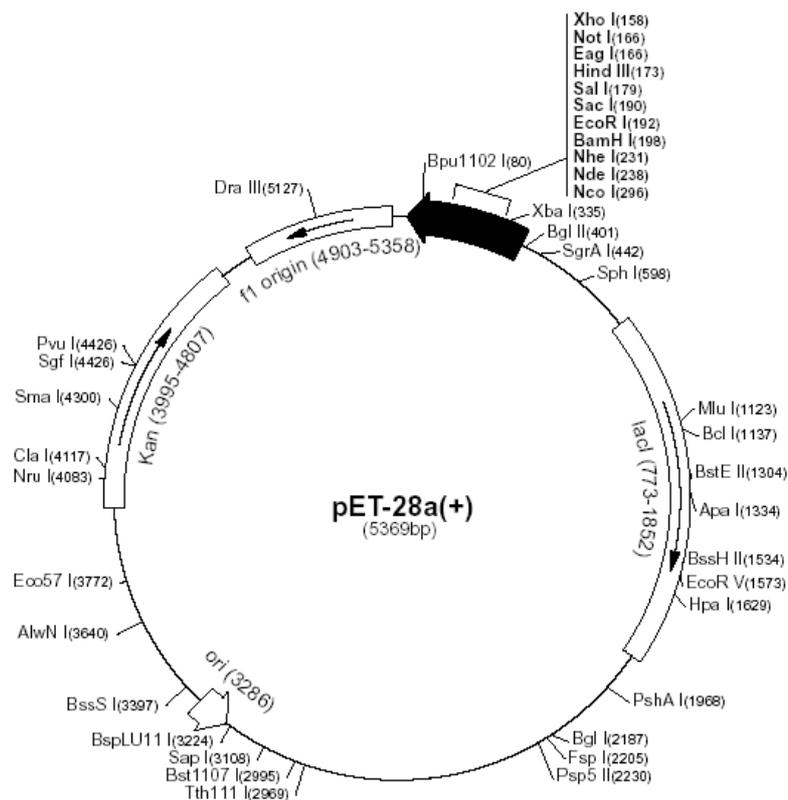


Figura 7. Mapa de restrição do plasmídeo pET28a (Novagen), destinado à formação do vetor de expressão de proteínas recombinantes em fusão com uma “tag” de 6 histidinas na porção N-terminal, sob controle do promotor T7. Neste plasmídeo, a clonagem de insertos se dá via enzimas de restrição. O vetor contém 5369pb, apresenta um gene que confere resistência a canamicina, além de um sítio múltiplo de clonagem. Contém ainda, um sítio de reconhecimento para a enzima Trombina, que permite a separação da proteína recombinante, da “tag” de histidinas, após os procedimentos de expressão.

4.9 Reações de PCR para a entrada do cDNA MT1 no sistema Gateway

Para a introdução do cDNA MT1 no sistema Gateway, foram necessárias a incorporação de seqüências para o reconhecimento na reação de recombinação, o que foi feito por duas reações de PCR. Assim, os “primers” utilizados para a amplificação continham, em suas extremidades, parte das seqüências dos sítios attB1 e attB2, além de quatro resíduos de guanina que aumentam a eficiência da reação de recombinação. Baseado na seqüência consenso de MT1, e nas seqüências de recombinação do sistema Gateway, foram desenhados os “primers” mostrados na Tabela 2. As reações de PCR ocorreram de acordo com o esquema mostrado na figura 8.

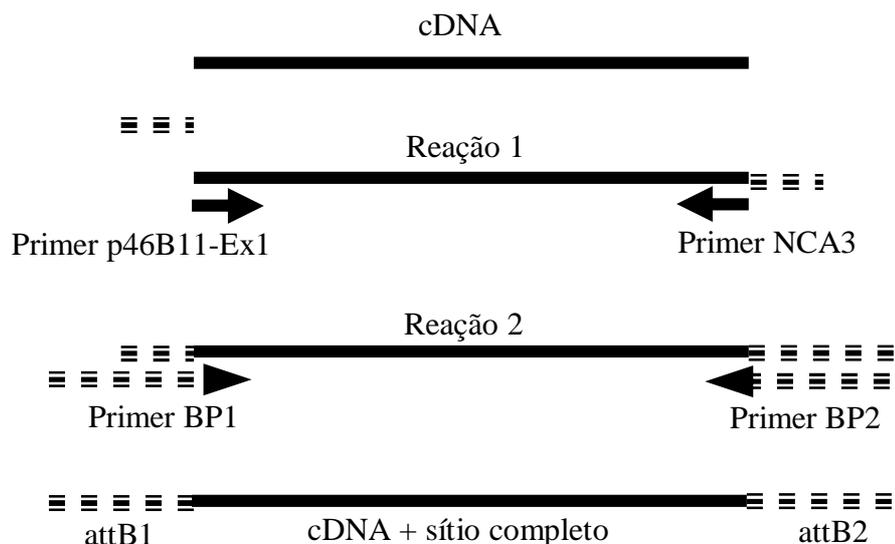


Figura 8. Esquema ilustrativo mostrando como são formados os sítios de recombinação attB1 e attB2 do sistema Gateway, após as duas reações de PCRs iniciais.

Tabela 2. “Primers” utilizados para introdução do cDNA MT1 no sistema Gateway, via reação de PCR. As seqüências sublinhadas correspondem a uma parte dos sítios de recombinação attB; em itálico, parte da seqüência da extremidade 5’ correspondente à MT1; em letras minúsculas, parte da seqüência da extremidade 3’ correspondente à MT1; em negrito, códon de terminação localizado entre o sítio de recombinação attB2 e o final da seqüência na extremidade 3’ de MT1. Os primers BP1 e BP2 correspondem, respectivamente, à seqüência completa dos sítios de recombinação attB1 e attB2.

Primer p46B11-Ex1 – Senso (BP1, 46B11)	Seqüência: 5’ <u>GCA GGC TTC ATG GAA GTT GCT AAA ATA C</u> 3’
Primer NCA3 – Reverso (BP2 e 134B02)	Seqüência: 5’ <u>GAA AGC TGG GTC TA</u> <i>g ttt gtt ttg gtc aag g</i>
Primer BP1 - Senso	Seqüência: 5’ GGGG ACA AGT TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT
Primer BP2 – Reverso	Seqüência: 5’ GGGG ACC ACT TTG TAC AAG AAA GCT GGG TC

Ao final da segunda reação de PCR, o cDNA MT1 estava apto para ser subclonado no vetor de entrada e, em seguida, transferido para o vetor de expressão de proteínas em *E. coli*. As duas reações de PCR foram realizadas como descrito abaixo:

Reação 1:

- 0,5µL do DNA molde (25ng/µL) (cDNA MT1)
- 5,0µL tampão 10x High Fidelity com Mg (Triple Master – Eppendorf)
- 1,0µL mistura de dNTP (10mM)
- 1,0µL primer p46B11-Ex1 (10pmol/µL)
- 1,0µL primer NCA3 (10pmol/µL)
- 0,7µL enzima Triple Master (5U/µL) (Eppendorf)
- 40,8µL de água MilliQ estéril para volume final de 50µL

Reação 2:

- 5,0µL do DNA resultante da primeira amplificação
- 5,0µL tampão 10x High Fidelity com Mg (Triple Master – Eppendorf)
- 1,0µL mistura de dNTP (10mM)
- 1,0µL primer BP1 (10pmol/µL)
- 1,0µL primer BP2 (10pmol/µL)
- 0,7µL enzima Triple Master (5U/µL) (Eppendorf)
- 36,3µL de água MilliQ estéril para volume final de 50µL

As reações de PCR foram realizadas em termociclador T3 Thermocycler (Biometra), que foi programado como descrito a seguir:

Desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos

94°C por 60 segundos (desnaturação)

56°C por 60 segundos (pareamento)

72°C por 90 segundos (extensão)

extensão final por 10 minutos a 72°C

} 35 ciclos

4.10 Inserção do cDNA MT1 no vetor de entrada do sistema Gateway, via reação BP

Após as reações de PCR, o fragmento de DNA de interesse flanqueado com os sítios attB, foi inserido no vetor de entrada (pDONR201 – Figura 9) do sistema Gateway, por recombinação, via reação BP (Gateway BP Clonase Enzyme Mix). A reação de recombinação entre o cDNA MT1, e o vetor de entrada, está descrita abaixo:

- 2,0 μ L produto de PCR (cDNA MT1 com os sítios attB1 e attB2 nas extremidades) (580ng/ μ L)
- 1,0 μ L vetor pDONR201 (250ng/ μ L)
- 4,0 μ L tampão de reação BP (5X)
- 3,0 μ L mix enzima Clonase BP
- 7,0 μ L tampão TE para volume final de 17 μ L

Após a reação ser incubada por 60 minutos, em temperatura ambiente (25°C), foram adicionados 2,0 μ L de solução de proteinase K (2 μ g/ μ L). Em seguida, a reação foi incubada em banho-maria (37°C) por 10 minutos, para que ocorresse a degradação das proteínas presentes na reação enzimática, deixando o DNA livre de possíveis contaminantes. O plasmídeo resultante, agora denominado pENTRY-MT1, foi utilizado para uma nova reação de recombinação, agora com o vetor de expressão.

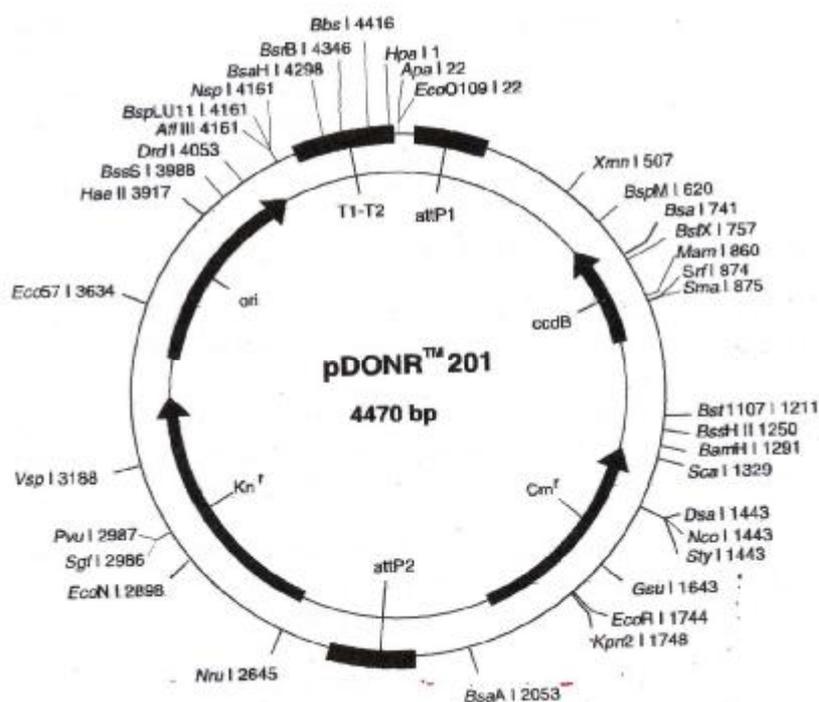


Figura 9. Mapa de restrição do vetor pDONR201 (Invitrogen), destinado a inserção de produtos de PCR por recombinação, na região entre os nucleotídeos 111 e 2352. Este vetor de 4470pb apresenta os genes que conferem resistência a canamicina (Km^r) e ao cloranfenicol (Cm^r). O gene *ccdB* inibe o crescimento quando presente na maioria das linhagens de *E. coli*, o que facilita a seleção dos clones desejados. Os sítios attP1 e attP2 são reconhecidos por recombinases.

4.11 Recombinação com o vetor de expressão do sistema Gateway, via reação LR

Após a obtenção do plasmídeo pENTRY-MT1, ele foi transferido para o vetor pDEST17 de expressão de proteínas, através de nova recombinação, via reação LR (Gateway LR Clonase Enzyme Mix - Invitrogen). Este vetor (Figura 10), possui o promotor para a T7 RNA polimerase viral, uma fusão na extremidade N-terminal com uma “tag” de histidinas (6 resíduos), que é expressa na mesma fase de leitura da proteína de interesse, auxiliando em experimentos de purificação e detecção da proteína recombinante. A reação de recombinação entre os vetores foi realizada de acordo com o que se segue:

Reação:

- 1,0µL do plasmídeo pENTRY-MT1 (345ng/µL)
- 1,0µL vetor pDEST17 (150ng/µL)
- 4,0µL tampão de reação LR (5X)
- 3,0µL mix enzima Clonase LR
- 11µL de TE para volume final de 20µL

Após a reação ser incubada por 90 minutos em temperatura ambiente (25°C), foram adicionados 2,0µL de solução de proteinase K (2µg/µL), deixado em banho-maria (37°C) por 10 minutos, para que ocorresse a degradação das proteínas presentes na reação enzimática, deixando o DNA livre de possíveis contaminantes. O plasmídeo resultante, agora denominado pEXP17-MT1, foi utilizado para transformar células de *E. coli* DH10B por eletroporação. Após confirmação por digestão e sequenciamento, este vetor foi utilizado para transformação da linhagem BL21(DE3) Rosetta, de *E. coli*, apropriada para a expressão de proteínas heterólogas.

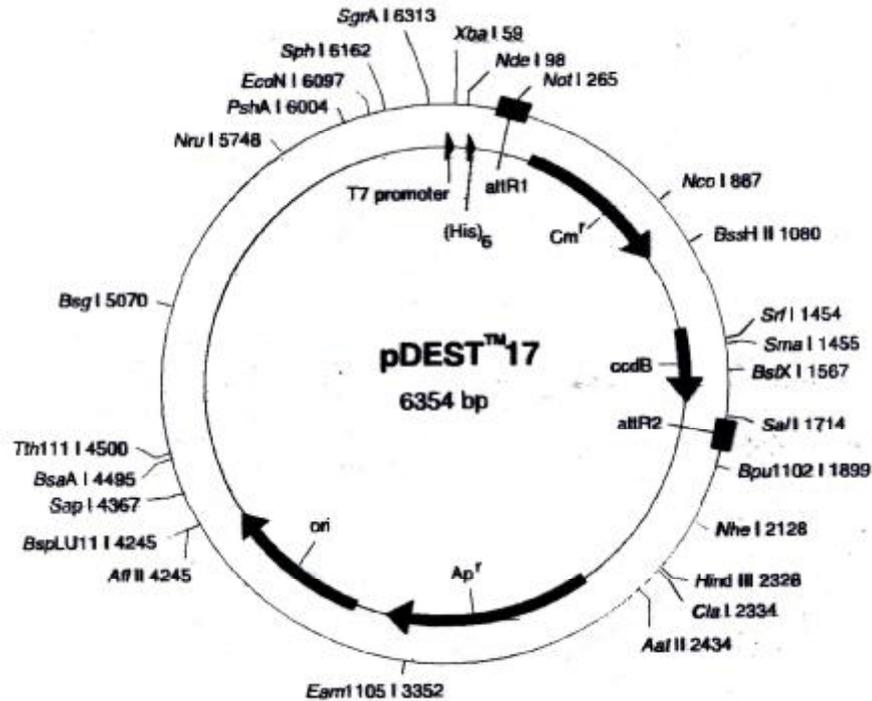


Figura 10. Mapa de restrição do plasmídeo pDEST17 (Invitrogen), destinado à formação do vetor de expressão de proteínas em fusão com uma “tag” de 6 histidinas, sob controle do promotor T7. Este vetor possui 6354pb, e apresenta também os genes que conferem resistência à ampicilina (Ap) e ao cloranfenicol (Cm). O gene *ccdB* inibe o crescimento quando presente na maioria das linhagens de *E. coli*, o que facilita a seleção dos clones desejados. Os sítios *attR1* e *attR2* são reconhecidos por recombinases.

4.12 Clonagem do cDNA MT1 no sistema de expressão pET-SUMO TA Champion^R

O cDNA MT1 foi utilizado para uma clonagem adicional no vetor pETSUMO (Invitrogen). Este vetor (Figura 11), possui o promotor para a T7 RNA polimerase viral, e duas fusões que são expressas na mesma fase de leitura da proteína de interesse: uma cauda de histidinas (6 resíduos), capaz de auxiliar em experimentos de purificação e detecção da proteína recombinante, e uma proteína SUMO, que favorece uma maior solubilidade da proteína a ser expressa. Com isso, foi realizada uma reação de PCR conforme descrito a seguir:

Reação:

- 2,0µL (7,3ng/µL) da construção pEXP17-MT1
- 5,0µL tampão 10x High Fidelity (Invitrogen)
- 1,0µL mistura de dNTP (10mM)
- 2,0µL primer pMT1_8E-Ex1 (5pmol/µL)
- 1,0µL primer pMT1_8E-Ex8 (10pmol/µL)
- 0,3µL enzima Taq Platinum High Fidelity 5U/µL (Invitrogen)
- 2,0µL MgSO₄ 50mM (Invitrogen)
- 36,7µL de água MilliQ estéril para volume final de 50µL

As reações de PCR foram realizadas em termociclador T3 Thermocycler (Biometra), que foi programado como descrito a seguir:

Desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos

94°C por 60 segundos (desnaturação)

55°C por 60 segundos (pareamento)

72°C por 90 segundos (extensão)

} 35 ciclos

extensão final por 10 minutos a 72°C

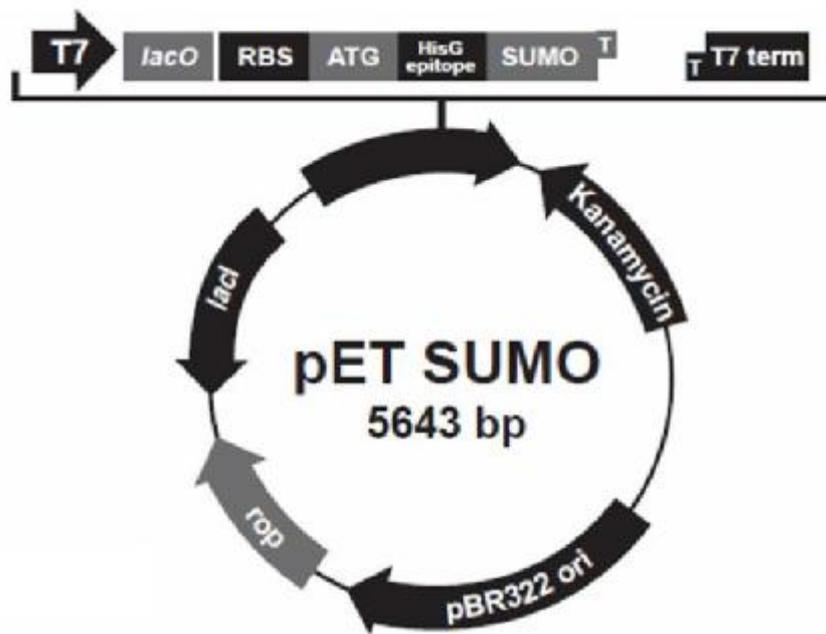


Figura 11. Mapa do plasmídeo pETSUMO (Invitrogen), destinado à formação do vetor de expressão de proteínas em fusão N-terminal com a ORF do cDNA de interesse com uma “tag” de 6 histidinas e uma proteína SUMO, sob controle do promotor T7. Este vetor possui 5643pb, e apresenta também os genes que conferem resistência à canamicina (Kan). Esse vetor foi desenvolvido baseado na tecnologia TA, e permite a clonagem de fragmentos de DNA que contêm adeninas em suas extremidades, que são capazes de se ligar, na presença da enzima T4 DNA ligase, a duas timinas posicionadas nas extremidades do vetor, que é fornecido de forma linearizado.

Ao final da PCR, uma alíquota de 5µL da reação foi aplicada em gel de agarose 1%, confirmando a amplificação do inserto com o tamanho esperado. Após a confirmação, foi realizada uma adição de adeninas nas extremidades do cDNA amplificado, de acordo com o que segue: aos 45µL restantes da PCR, foi adicionado 1µL da DNA Polymerase Biotools (1U/µL), e o tubo da reação foi incubado por 10 minutos, a 72°C. Ao final da reação de adenilação, foi realizada uma limpeza com fenol/clorofórmio, conforme item 2.17 deste trabalho, e o DNA resultante foi utilizado para uma reação de ligação com o vetor pETSUMO, de acordo com o que segue abaixo:

- 2,0µL do cDNA MT1 adenilado
- 1,0µL do tampão de ligação 10X (Invitrogen)
- 2,0µL do vetor pETSUMO (25ng/µL)
- 1,0µL da T4 DNA Ligase (40 Weiss units – Invitrogen)
- Água MilliQ qsp - 10µL

A reação de ligação foi deixada por 18hs, a 10°C, e o vetor resultante, agora denominado pETSUMO-MT1, foi então utilizado para transformar células da linhagem One Shot^R MachTM-T1^R de *E. coli*, quimicamente competentes.

4.13 Confirmação da clonagem do cDNA MT1 no vetor pETSUMO, através de PCR de colônia

Após transformação, colônias de *E. coli* contendo a putativa construção pETSUMO-MT1, foram isoladas em placa de Petri contendo meio seletivo, e utilizadas em reação de PCR de colônia, para confirmar se a clonagem foi bem-sucedida. Para tanto, seis colônias independentes foram recuperadas da placa, utilizando palitos autoclavados, e mergulhadas em seis tubos separados, contendo os reagentes da PCR. A reação de PCR, e o programa utilizado, foram os mesmos descritos no item 2.11 desse material e métodos. Ao final das PCRs, uma alíquota de 5µL de cada reação foi aplicada em gel de agarose 1%, para a confirmação da clonagem.

4.14 Clonagem dos cDNAs 46B11 e 134B02 no vetor pET28a

Para a clonagem dos cDNAs 46B11 e 134B02 ao vetor de expressão pET28a (Figura B), foram desenhados um par de “primers” para cada cDNA, que acrescentaram um sítio para a enzima *NdeI*, na extremidade 5’, e um sítio *BamHI*, na extremidade 3’ do inserto 46B11 (Tabela 3), e um sítio para a enzima *AseI*, na extremidade 5’, e um sítio *BamHI*, na extremidade 3’ do inserto 134B02 (Tabela 3). Esses sítios de restrição foram então incorporados nas extremidades dos clones, de acordo com as reações de PCR a seguir:

- 0,5µL do DNA molde (3,8ng/µL) - cDNA 46B11
- 5,0µL tampão 10x High Fidelity com Mg (Triple Master – Eppendorf)
- 1,0µL mistura de dNTP (10mM)
- 1,0µL primer p46B11F (10pmol/µL)
- 1,0µL primer p46B11R (10pmol/µL)
- 0,7µL enzima Triple Master (5U/µL) (Eppendorf)
- 40,8µL de água MilliQ estéril para volume final de 50µL

A reação foi realizada em termociclador T3 Thermocycler (Biometra), que foi programado como descrito a seguir:

Desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos.	} 35 ciclos
94°C por 60 segundos (desnaturação)	
59°C por 45 segundos (pareamento)	
72°C por 45 segundos (extensão)	

extensão final por 10 minutos a 72°C e, em seguida, manter a 10°C por tempo indeterminado.

- 1,0µL do DNA molde (5,0ng/µL) - cDNA 134B02
- 5,0µL tampão 10x High Fidelity com Mg (Triple Master – Eppendorf)
- 1,0µL mistura de dNTP (10mM)
- 1,0µL primer p134B02-*AseI* (10pmol/µL)
- 1,0µL primer p134B02R (10pmol/µL)
- 0,7µL enzima Triple Master (5U/µL) (Eppendorf)
- 40,8µL de água MilliQ estéril para volume final de 50µL

A reação foi realizada em termociclador T3 Thermocycler (Biometra), que foi programado como descrito a seguir:

Desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos.

94°C por 60 segundos (desnaturação)

55°C por 45 segundos (pareamento)

72°C por 45 segundos (extensão)

35 ciclos

extensão final por 10 minutos a 72°C e, em seguida, manter a 10°C por tempo indeterminado.

As enzimas *NdeI*, *AseI*, e *BamHI* foram escolhidas por estarem presentes no sítio múltiplo de clonagem do vetor pET28a.

Tabela 3. “Primers” utilizados para a amplificação dos cDNAs 46B11 e 134B02, visando a subclonagem no vetor de expressão pET28a. Em letra minúscula, sítio de restrição para a enzima *NdeI*, adicionado na extremidade 5’ do inserto; sublinhado, sítio de restrição para a enzima *BamHI*, adicionado na extremidade 3’ (clone 46B11); em negrito e itálico, sítio de restrição para a enzima *AseI*, adicionado na extremidade 5’; sublinhado e itálico, sítio de restrição para a enzima *BamHI*, adicionado na extremidade 3’ (clone 134B02).

Primer p46B11F – Senso	Sequência 5’ GAG ATT Cca tat gGA AGT TGC TAA AAT ACT TC 3’
Primer p46B11R – Reverso	Sequência 5’ CGG <u>GAT CCC</u> TAC TTA ACA ATA CAA AAG C 3’
Primer p134B02- <i>AseI</i> – Senso	Sequência 5’ GGA ATT CAT TAA TAA AGT TGC TAA AAT ACT TCA CA 3’
Primer p134B02R – Reverso	Sequência 5’ CGG <u>GAT CCC</u> TAG TTT GTT TTG GTC AAG G 3’

Após as PCRs, tanto o vetor pET28a, quanto os cDNAs 46B11 e 134B02, após serem digeridos com as enzimas *NdeI* e *BamHI*, purificados e quantificados, foram utilizados em uma reação de ligação, com a finalidade de se obter os vetores de expressão das proteínas recombinantes pET28a-46B11 e pET28a-1234B02. Assim, as reações de ligação entre os insertos 46B11 e 134B02, e o vetor pET28a, são descritas a seguir:

- 2,0µL do DNA molde (115ng/µL) - cDNA 46B11
 - 1,0µL vetor pET28a – *NdeI/BamHI* - (120ng/µL)
 - 2,0µL tampão 10x T4 DNA Ligase (Invitrogen)
 - 1,0µL enzima T4 DNA Ligase (400U/µL – Invitrogen)
 - 14,0µL de água MilliQ estéril para volume final de 20µL
-
- 2,0µL do DNA molde (175ng/µL) - cDNA 134B02
 - 1,0µL vetor pET28a – *NdeI/BamHI* - (120ng/µL)
 - 2,0µL tampão 10x T4 DNA Ligase (Invitrogen)
 - 1,0µL enzima T4 DNA Ligase (400U/µL – Invitrogen)
 - 14,0µL de água MilliQ estéril para volume final de 20µL

Em seguida, as reações foram incubadas por toda a noite, a 10°C, com o objetivo de se obter uma maior eficiência da ligação.

4.15 Introdução do DNA plasmidial em *Escherichia coli*

4.15.1 Preparo de células quimicamente competentes (choque térmico)

Para multiplicar os plasmídeos de interesse, foi utilizada a transformação de células da cepa DH5α de *E. coli*, previamente tornadas competentes pelo tratamento com MgCl₂ 0,1M e CaCl₂ 0,1M (Sambrook *et al.*,1989), conforme descrito abaixo. Este método também foi utilizado com a linhagem de BL21(DE3) Rosetta usadas para a expressão das proteínas recombinantes.

Utilizando-se uma alça de platina, estriou-se uma suspensão bacteriana da cepa de interesse, em uma placa de Petri, contendo meio Lúria-Bertani – LB (10g de triptona, 10g de NaCl, 5g de extrato de levedura, completar com água destilada para 1000 mL, e ajustar para pH 7,3. Para meio sólido acrescentar 15g de ágar) sólido sem antibiótico (ou com antibiótico, dependendo da cepa) e, em seguida, a mesma foi incubada em estufa, a 37°C, por aproximadamente 16 a 20 horas. Dessa placa, uma colônia isolada foi recuperada e inoculada em um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio LB líquido sem antibiótico (ou com antibiótico adequado à cepa). Após crescimento “overnight” (16-20horas), a 37°C, no Incubator Shaker Innova4000 (New Brunswick), com agitação de 200 rpm, 500µL dessa

pré-cultura foram inoculados em um Erlenmeyer contendo 20mL de meio LB líquido. Essa nova cultura foi incubada por 3 a 4 horas, a 37°C, sob agitação de 200rpm, e, após o crescimento, toda a suspensão bacteriana foi transferida para um tubo Falcon de 50mL. Em seguida, esse tubo foi centrifugado por 6 minutos, a 3500rpm, em centrífuga Eppendorf 5403, a 4°C, sendo o sobrenadante descartado ao final da centrifugação. A seguir, ao precipitado celular, obtido no fundo do tubo, foram adicionados 20 mL de solução gelada de MgCl₂ 0,1M, e as células foram ressuspensas com movimentos suaves. Ao final desse procedimento, as células foram novamente centrifugadas a 3500rpm, durante 6 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e, ao precipitado celular resultante, foram adicionados 10 mL de solução gelada de CaCl₂ 0,1M. As células foram novamente ressuspensas com movimentos suaves e, no final do procedimento, deixadas em gelo por 15 minutos. Em seguida, foram mais uma vez centrifugadas a 4°C, durante 6 minutos, a 3500rpm, o sobrenadante foi removido, e as células foram ressuspensas, suavemente, em 2mL de solução gelada de CaCl₂ 0,1M, e deixadas em gelo por 30 a 60 minutos. Após essa etapa final, foram adicionadas às células, 0,5mL de glicerol 80% gelado. Por fim, foram feitas alíquotas de 100µL em microtubos tipo Eppendorf, e os mesmos foram estocados em freezer -80°C para posterior utilização.

4.15.2 Transformação por choque térmico

Em um tubo Eppendorf, de 1,5 mL, contendo 100 µL de células competentes, foram adicionados 5µL da reação de ligação desejada, e o conteúdo foi cuidadosamente misturado. Em seguida, o tubo contendo a reação foi deixado por 30 minutos no gelo, depois colocado rapidamente a 37°C por 5 minutos em banho-maria, a seguir mais 2 minutos no gelo e, por fim, adicionou-se 500µL de meio LB líquido. O tubo, contendo a reação, foi incubado por 30 minutos, a 37°C, para recuperação celular. Após a incubação, 300µL das células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo o antibiótico adequado, e a placa foi deixada em estufa, a 37°C, por 16 a 20 horas.

4.15.3 Preparo de células eletrocompetentes

A preparação de células eletrocompetentes também foi realizada. Para tanto, por meio de uma alça de platina, estriou-se uma suspensão bacteriana de *E. coli*, cepa DH10B, em uma placa de Petri, contendo meio LB sólido sem antibiótico e, em seguida, a mesma foi incubada em estufa, a 37°C, por aproximadamente 16 a 20 horas. Dessa placa, uma colônia isolada foi recuperada e inoculada em um tubo de ensaio contendo 2mL de meio LB líquido sem antibiótico. Após crescimento “overnight” (16-20horas), a 37°C, no Incubator Shaker Innova4000 (New Brunswick), com agitação de 200 rpm, toda a cultura (2mL) foi transferida para um Erlenmeyer contendo 200mL de meio LB e, em seguida, essa nova cultura foi incubada a 37°C, durante 03 horas, a 250rpm. Após a incubação, a cultura foi então separada em 04 tubos Falcon com capacidade para 50mL, deixada no gelo por 30 minutos e, em seguida, centrifugada a 4000rpm, durante 10 minutos, a 4°C, em centrífuga Eppendorf 5403. Ao final da centrifugação, todo o sobrenadante foi removido, e o precipitado celular resultante foi ressuspensão gentilmente em 200mL de água MiliQ estéril, gelada. Em seguida, foi feita nova centrifugação a 4000rpm, durante 10 minutos, a 4°C e, após o sobrenadante ser descartado, o mesmo foi novamente ressuspensão, agora em 100mL de água MilliQ autoclavada gelada. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados a 4000rpm, durante 10 minutos, a 4°C, e, o sobrenadante, foi novamente removido. Nessa etapa, o volume de um tubo foi adicionado ao outro, ficando dois tubos até o final do procedimento. Os dois tubos foram, então, novamente centrifugados, a 4°C, durante 10 minutos, a 4000rpm, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado celular, resultante de cada tubo, foi então ressuspensão em 5mL de glicerol 10%, gelado. Após uma nova centrifugação, conforme descrito no passo anterior, o sobrenadante foi novamente removido, e as células, ressuspensas em um volume final de 500µL de glicerol 10%, gelado. Por fim, foram feitas alíquotas de 40µL em microtubos tipo Eppendorf, e os mesmos foram estocados em freezer -80°C, para posterior utilização.

4.15.4 Transformação por eletroporação

A um tubo Eppendorf, contendo 40µL de células eletrocompetentes da cepa DH10B de *E.coli*, foi adicionado o DNA (reação de ligação de interesse) previamente dialisado. A diálise se deu da seguinte forma: o DNA a ser utilizado para a transformação

foi colocado sobre uma membrana Millipore tipo VSWP, com poro de 0,025 μ m, deixado em uma placa de Petri sobre água estéril, durante 30 minutos, com a finalidade de se retirar o excesso de sal presente na reação de ligação, o qual pode interferir no procedimento de eletroporação. Para transformações utilizando-se células quimicamente competentes, a diálise não é necessária. Dessa forma, após a diálise, 1-2 μ L da reação de ligação foram adicionados ao tubo contendo as células eletrocompetentes, gentilmente misturados com pipeta e, em seguida, o conteúdo do tubo foi transferido para uma cubeta (Gene Pulser cuvette 0,1 cm, Bio-Rad), previamente resfriada, e deixado por 30 segundos a 1 minuto no gelo. Em seguida, a cubeta foi colocada no eletroporador (Gene Pulser – Bio-Rad), e um pulso de corrente elétrica (1,8kV/25 μ F), foi aplicado. Imediatamente após o pulso, foi adicionado na cubeta 1mL de meio LB. O conteúdo da cubeta foi transferido para um tubo de ensaio, o qual foi incubado, sob agitação, a 200rpm, por 1 hora a 37°C. A seguir, 300 μ L da cultura foram plaqueados em meio LB sólido contendo o antibiótico desejado, em uma concentração final adequada. As placas foram, então, incubadas invertidas durante a noite, em estufa a 37°C.

4.16 Preparações de DNA plasmidial

4.16.1 Mini-preparação de DNA plasmidial (lisozima)

Colônias isoladas de bactérias transformadas foram retiradas das placas de Petri e adicionadas cada uma em um tubo com 5 mL de meio LB, contendo o antibiótico desejado numa concentração final apropriada. Após 16-20 horas de crescimento a 37°C, a 200rpm, no Incubator Shaker Innova4000 (New Brunswick), 1,5mL de cada cultura foram transferidos para tubo Eppendorf, o qual foi centrifugado a 13200rpm (microcentrífuga Eppendorf 5415C) por 1 minuto (este procedimento foi repetido por três vezes para cada cultura). Em seguida, o precipitado de células de cada tubo foi totalmente ressuspenso em 175 μ L de tampão TES (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM; 15% sacarose; pH 8,0) e misturado delicadamente com 20 μ L de lisozima (10mg/ μ L). Esta mistura foi deixada à temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, incubada em um banho termoestabilizado a 73°C durante 15 minutos, para o rompimento da parede celular das células bacterianas. Posteriormente, os tubos foram submetidos a uma centrifugação a 13.200rpm (microcentrífuga Eppendorf 5415C) por 15 minutos. O sobrenadante foi, então, transferido

para um novo tubo Eppendorf e a ele foram acrescentados 0,1X volume (15 µL) de acetato de sódio 3M, pH 5,2 e 2X volumes (300µL) de etanol absoluto (Merck). Os tubos foram mantidos por 1h a -20°C e, logo em seguida, centrifugados por 15 minutos a 13.200rpm (microcentrífuga Eppendorf 5415C). O precipitado de DNA obtido foi, então, ressuspensão em 50 µL de água MilliQ estéril em vórtex.

4.16.2 Mini-preparação de DNA plasmidial utilizando o kit QIAGEN

Com a finalidade de se preparar um DNA plasmidial de melhor qualidade e em maior quantidade (até 20µg a partir de 1-5 mL de cultura de *Escherichia coli*) foi utilizado o *Plasmid Mini Kit* da QIAGEN. Da placa de Petri contendo colônias crescidas após a transformação, uma colônia isolada foi recuperada e inoculada em um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio LB líquido com o antibiótico adequado. Após crescimento “overnight” (16-20horas), 1,5mL da cultura foi centrifugado por 1 minuto, a 13200rpm, em microcentrífuga Eppendorf 5415C (este procedimento foi repetido até terminar o inóculo). O precipitado celular, resultante das centrifugações, foi ressuspensão em 300µL de tampão P1 (100 µg/mL RNase A, 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) e deixado a temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir, foram adicionados 300µL do tampão P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), que promove a hidrólise alcalina das células. Após 5 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 300µL do tampão P3 (2,55 M acetato de potássio, pH 4,8) com a finalidade de neutralizar a reação de lise, e a reação foi deixada por mais 5 minutos em temperatura ambiente. A fração sobrenadante (fase aquosa), obtida após centrifugação por 15 minutos, a 13200rpm, foi aplicada em uma coluna QIAGEN-tip 20, previamente equilibrada com 1mL de tampão QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, etanol 15%, pH 7,0, 0,15% Triton X-100). Após a aplicação e completa passagem do volume de DNA pela coluna do kit, a mesma foi lavada com 2mL de tampão QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS, etanol 15%, pH 7,0). Em seguida, a coluna foi transferida para um tubo Eppendorf limpo e nela foi acrescentado 800µL de tampão QF (1,25 M NaCl, 50 mM MOPS, etanol 15%, pH 8,2), para eluição do DNA da coluna. Ao tubo Eppendorf, contendo o DNA eluído, foi adicionado um volume de 400µL de isopropanol gelado e, em seguida, este tubo foi centrifugado por 30 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e, ao precipitado de DNA obtido, foi adicionado álcool 70%.

O tubo foi centrifugado por 5 minutos, a 13200rpm, descartando-se o sobrenadante. Após esta última centrifugação, foi realizada a secagem do DNA em temperatura ambiente, e o mesmo foi ressuspenso em 50µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM).

4.17 Digestão enzimática do DNA

As digestões foram realizadas utilizando, em geral, pelo menos 1µg de DNA. Como reagentes das digestões, utilizou-se 1/10 do volume do tampão adequado (solução estoque 10X concentrada) e, pelo menos, uma unidade da enzima de restrição escolhida (quantidade necessária para digerir 1µg de DNA, em uma hora, a 37°C). Para se complementar o volume da reação, foi acrescentado água para um volume final de 20µL, quando o DNA foi obtido a partir de mini-preparações, utilizando o protocolo da lisozima, ou 50µL, quando o DNA foi obtido a partir do método do fenol/clorofórmio, especificamente no caso do vetor pET28a, e dos cDNAs 46B11 e 134B02. O volume final das digestões variou dependendo da concentração de DNA. A reação foi, então, colocada em banho-maria, na temperatura ótima de ação das enzimas, geralmente 37°C, por pelo menos uma hora. As enzimas e tampões usados estão listados na tabela 3. Ao final das reações, as amostras foram submetidas à corrida eletroforética.

Tabela 4. Enzimas e tampões utilizados nas digestões.

Enzimas de restrição	Tampões (10X concentrado)
<i>Pst</i> I (20U/µL) - Biolabs	NEBuffer 3
<i>Nde</i> I (20U/µL) - Biolabs	
<i>Bam</i> HI	NEBuffer 2 + BSA
<i>Eco</i> RI (10U/µL) - Invitrogen	React 03
<i>Ase</i> I (10U/µL) - Biolabs	NEBuffer 3
<i>Xba</i> I (20U/µL) - Biolabs	NEBuffer 2 + BSA

4.18 Análise do DNA plasmidial por eletroforese em gel de agarose

As amostras de DNA (DNAs plasmidiais e originadas de PCR) foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (solução uma vez concentrada) (TBE 5X : 54 g de Tris base; 27,5 g de ácido bórico; 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0 e água destilada para completar o volume para 1000 mL), contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. O brometo de etídeo, que é um agente intercalante de DNA, permitiu a visualização das bandas de DNA, observadas sob luz U.V. A cada uma das amostras foi adicionado um volume adequado de tampão de carregamento 6X (azul de bromofenol 0,25%, xileno ciano 0,25% e ficol tipo 400-DL 15%). O gel de agarose foi colocado em uma cuba, e esta foi preenchida com tampão TBE 1X e ligada a uma fonte gerando uma corrente elétrica que polariza a cuba. O DNA possui carga negativa e migra, entre os poros do gel, do pólo negativo em direção ao pólo positivo da cuba. A velocidade de migração está relacionada ao tamanho dos fragmentos de DNA. Os tamanhos dos fragmentos foram inferidos através de comparação com a migração dos fragmentos do marcador de massa molecular (1 kb DNA Ladder-Plus - Invitrogen), também aplicado no gel, e fotografado ao lado de uma régua para referência. Os fragmentos de DNA de interesse foram recortados do gel, para posterior purificação.

4.19 Purificação dos fragmentos de DNA do gel de agarose

A purificação dos fragmentos de DNA do gel de agarose foi realizada com o kit *GFX PCR DNA and Gel Purification Kit* (GE), de acordo com o descrito a seguir. Utilizando uma lâmina de bisturi, os fragmentos de DNA no gel foram cortados e pesados, removendo-se o máximo possível do excesso de agarose. Após pesagem em tubo Eppendorf, foram adicionados 10µL de tampão de captura [“capture buffer” – (GE)] para cada 10mg de fatia do gel (ex: 300µL de tampão de captura para cada 300mg de gel) e, em seguida, a mistura foi incubada por 15 minutos a 60°C, para a completa dissolução da agarose. Após a fatia do gel estar totalmente dissolvida, o volume total da solução foi transferido para uma coluna GFX, que foi montada sobre um tubo coletor, incubado a temperatura ambiente por um minuto e, logo após, centrifugado por 30 segundos, a 13.200rpm, em microcentrífuga Eppendorf 5415C, para a ligação do DNA na membrana da coluna. Após a centrifugação, a solução recuperada no tubo coletor foi descartada e, à

coluna, foram acrescentados 500µL de tampão de lavagem [Tampão Tris-EDTA(TE) : 10mM Tris-HCl, pH8,0, 1mM EDTA], e a solução foi novamente centrifugada por 30 segundos, a 13.200rpm. Ao final da centrifugação, o tubo coletor foi descartado, e a coluna foi transferida para um tubo novo tipo Eppendorf, com 1,5mL de capacidade, para a eluição do DNA. O DNA, então, foi eluído, aplicando-se 50µL de tampão TE ou água MilliQ autoclavada, ao centro da membrana na coluna, que foi deixada por um minuto a temperatura ambiente e, em seguida, centrifugada por um minuto, a 13200rpm, para a recuperação do DNA.

4.20 Purificação do DNA obtido por PCR, utilizando o método do fenol/clorofórmio

Após a reação de PCR, realizou-se uma corrida eletroforética de uma alíquota dela (5µL), para checar se houve a amplificação do fragmento de DNA com o tamanho de banda esperado. Após a checagem positiva do fragmento amplificado, foi adicionado ao restante da reação de PCR, 155µL de água MilliQ autoclavada, chegando-se à um volume final de 200µL. Ao se obter esse volume, a limpeza do DNA foi realizada da forma que se segue:

Ao tubo contendo a solução acima, adicionou-se 1 volume de fenol. A mistura foi vigorosamente vortexada e, em seguida, centrifugou-se a 13.200 rpm, por 3 minutos. A fase superior aquosa, contendo o DNA, foi transferida para outro tubo Eppendorf, onde se adicionou 1 volume de fenol/clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Como na etapa anterior, a mistura foi vortexada e centrifugada a 13.200rpm, por 3 minutos. Novamente, a fase superior foi recuperada e, em seguida, se adicionou 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), sendo vortexado e centrifugado como na etapa anterior. Após essas três etapas de limpeza, o DNA foi precipitado com 1/10 do volume de acetato de potássio 5M e 1 volume de isopropanol absoluto. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 13.200rpm durante 15 minutos, deixada secar em temperatura ambiente, e o precipitado contendo o DNA, foi ressuspenso em 15 µL de água MilliQ autoclavada, ou tampão TE (Tris 50 mM pH 8,0; EDTA 1 mM).

4.21 Linhagem de *E. coli* utilizada para a expressão das proteínas metiltransferases heterólogas

As construções pET28a-46B11, pET28a-134B02 e pEXP17-MT1 e pETSUMO-MT1 foram utilizadas para a transformação da linhagem BL21(DE3) Rosetta de *E. coli*, adequadas para a expressão de proteínas recombinantes. As particularidades desta cepa são mostradas na tabela 5.

Tabela 5. Algumas características da linhagem de expressão utilizada no trabalho.

Linhagem bacteriana	Antibióticos/ Concentração	Plasmídeo adicional contendo 6 genes que codificam códons raros em <i>E. coli</i>	Promotor	Indutor
BL21(DE3) Rosetta	Cloranfenicol (34mg/mL)	AGG e AGA (Arginina), CCC (Prolina), AUA (Isoleucina), CUA (Leucina), GGA (Glicina)	T7 viral	IPTG

4.22 Indução da expressão das proteínas metiltransferases em *E. coli*

Após serem transformadas com as construções pET28a-46B11, pET28a-134B02 e pEXP17-MT1e pETSUMO-MT1, células da linhagem BL21(DE3) Rosetta de *E. coli* foram submetidas à indução de expressão das proteínas recombinantes, conforme descrito a seguir. Da placa contendo células de *E. coli* transformadas com os plasmídeos de expressão, uma colônia isolada foi recuperada, e um pré-inóculo foi preparado com 5 mL de meio LB suplementado com os antibióticos adequados, nas concentrações apropriadas. Após crescimento por toda a noite (16-20horas), a 37°C, sob agitação (200rpm), foi feita diluição na proporção de 1:100, adicionando-se 500µL do pré-inóculo em um erlenmeyer de 125mL, contendo 50mL de meio LB (indução em pequena escala),ou 5mL em 500mL de meio LB (indução em grande escala) mais os antibióticos apropriados. A seguir, essa nova cultura foi incubada a 37°C, sob agitação (200rpm) por 2 horas, ou até atingir uma D.O.600nm ~ 0,4 – 0,6. Ao se atingir tal densidade, foi retirada uma alíquota de 1mL, que foi utilizada como tempo zero (pré-indução), e adicionou-se 0,4mM de IPTG (para todas as construções), para início de indução da expressão. As temperaturas de indução variaram de 22°C a 37°C, enquanto os tempos de indução variaram de 1h a 20h, para as três proteínas

recombinantes. Ao término das induções, as culturas foram centrifugadas a 4°C, por 15 minutos, a 5.000rpm, para a obtenção dos precipitados celulares. Ao final das centrifugações, o sobrenadante foi descartado, e as células precipitadas foram estocadas em freezer -20°C, para posterior lise celular, e análise dos extratos protéicos em SDS-PAGE.

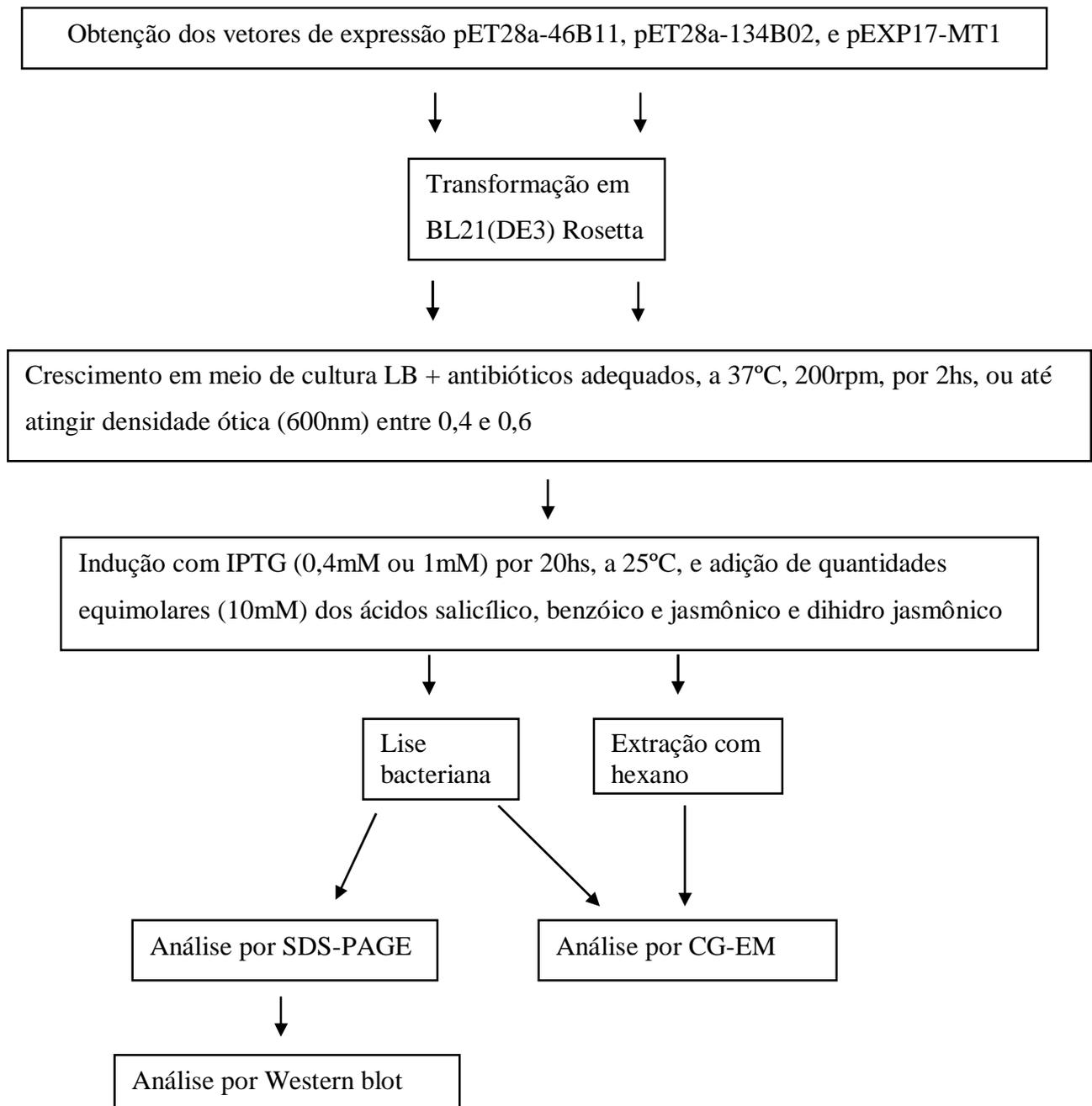
Para os ensaios enzimáticos realizados em meio de cultura, o IPTG foi adicionado para uma concentração final de 1mM. Após 2hs de indução a 37°C, sob agitação (200rpm), foram adicionados ao meio de cultura, 10mM dos ácidos salicílico, benzóico, jasmônico e dihidro jasmônico. Em seguida, as culturas contendo os ácidos foram transferidas para outro “shaker”, e deixadas por 20hs, a 25°C. Ao término dos ensaios, as culturas foram centrifugadas a 4°C, por 15 minutos, a 5.000 rpm, os precipitados celulares descartados, e os sobrenadantes foram recuperados para posterior extração dos compostos metilados com hexano. Um esquema geral das induções pode ser visto no esquema 1. Para a realização do controle negativo foi utilizado o mesmo protocolo descrito para os ensaios enzimáticos, entretanto a construção utilizada foi a pEXP17-PAE1, capaz de produzir uma proteína Pectina Acetil Esterase recombinante, a partir do mesmo vetor em que o cDNA MT1 foi clonado.

Para a proteína pETSUMO-MT1, a indução da expressão ocorreu de acordo com o descrito a seguir: após atingir a D.O adequada (0,4 -0,6, 600_{nm}), foi adicionado a cultura bacteriana 0,4mM de IPTG, e a expressão da proteína foi realizada por 4hs, a 25°C, e 130rpm. Ao final da expressão, a cultura foi centrifugada, o sobrenadante descartado, e o precipitado celular foi deixado a -20°C até a lise celular.

4.23 Lise bacteriana para liberação das proteínas, utilizando sonicador

Após as culturas terem sido induzidas, os precipitados bacterianos foram ressuspensos em volumes adequados de tampão de lise [Tampão L - (Tris-HCl 50mM pH 7,4, NaCl 150 mM)], acrescido do inibidor de proteases [Protease Inhibitor Cocktail for General Use - 1mM (Sigma)], e lisozima (10mg/mL). Para a proteína rMT1-pS foi utilizado o tampão que segue: [Fosfato de sódio 20mM; NaCl 500mM; Lisozima 10mg/mL; Glicerol 10% v/v; inibidor de proteases (Protease Inhibitor Cocktail for General Use - 1mM Sigma)]. Após estes precipitados serem incubados em gelo, nestas soluções de lise, por 30 minutos, deu-se início ao processo de sonicação, para a lise celular. Todas as amostras foram sonicadas, empregando-se 8 a 10 pulsos de 30 segundos cada, a 60W de

potência, com intervalos de 30 segundos, em um Vibracell™ (Sonic & Materials Inc, Dunbury, CT, USA). Ao final, a suspensão celular resultante foi centrifugada por 20 minutos, a 12.000g e 4°C, em centrífuga Eppendorf (modelo 5810R), o sobrenadante transferido para um novo tubo, e o precipitado foi, então, ressuspenso novamente no mesmo tampão de lise. Após o preparo, os extratos protéicos foram quantificados de acordo com o método de Bradford (1976) e, em seguida, submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).



Esquema 1.

Esquema 1. Fluxograma representando um esquema geral dos passos empregados nos procedimentos de expressão das proteínas metiltransferases recombinantes, na linhagem BL21(DE3) Rosetta de *E. coli*.

4.24 Extração dos compostos metilados com hexano, a partir do meio de cultura e do lisado celular

Os sobrenadantes obtidos após a centrifugação, e o lisado celular obtido após sonicação, foram utilizados para a extração dos compostos metilados de interesse, com hexano. Para tanto, foram adicionados, em um tubo tipo Falcon de 50mL, 25mL de cultura, mais 3mL de hexano (Synth). Em seguida, essa solução foi vigorosamente vortexada por 90 segundos formando-se, ao final, duas fases líquidas dentro do tubo. A fase orgânica superior, contendo o hexano e os possíveis compostos de interesse, foi separada da fase inferior, e transferida para um tubo novo. Após a separação, a fase hexano foi deixada em capela de exaustão até que a fase orgânica recuperada chegasse a 200 μ L, ou até a evaporação total do hexano. Nos tubos onde ocorreram a evaporação total, foram adicionados 200 μ L de hexano. Ao final, as frações hexano obtidas foram analisadas por CG-EM, em um equipamento Shimadzu, (Japão), modelo QP 2010 Plus, equipado com uma coluna (SGE) bp 1 de 0,25 mm de diâmetro interno, 30 m de comprimento, e filme de 0,25 μ m, onde a ionização ocorre por impacto de elétrons (IE). A confirmação da identidade dos compostos foi realizada por comparações com os respectivos tempos de retenção dos padrões do metilbenzoato, metilsalicilato e metiljasmonato e dihidrometiljasmonato obtidos a partir da biblioteca NIST.

Obs.. A diferença no tempo de retenção dos compostos MeJa e dihidroMeJa observada em alguns dos ensaios enzimáticos, é devida a troca da coluna do equipamento de cromatografia gasosa que foi utilizado para a realização das análises.

Todas as análises por CG-EM estão sendo feitas em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, vinculado ao Departamento de Química, da FFCLRP/USP.

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

As análises eletroforéticas foram realizadas em gel de poliacrilamida 12,5% em condições desnaturantes, seguindo a técnica de Laemmli (1970). Em tais condições, o SDS (Sodium Dodecyl Sulfate – Dodecyl Sulfato de Sódio), que é um detergente iônico, desnatura as moléculas de proteínas da amostra, e liga-se fortemente a elas. Assim, as moléculas de SDS provocam uma distribuição relativamente uniforme de cargas negativas ao longo das moléculas de proteínas, devido à presença de grupamentos sulfato no SDS. Dessa forma, quando uma corrente elétrica é aplicada na cuba de eletroforese, todas as moléculas de proteínas irão migrar através do gel, do pólo negativo em direção ao pólo positivo, baseadas em seu tamanho. As corridas, com duração de 50 minutos a 200V, foram realizadas no sistema Mini Protean^R Tetra Cell (Bio-Rad), em tampão de corrida Tris-Glicina 1X, diluído a partir de uma solução estoque Tris-Glicina 5X [15,125g Tris-base (125mM); 25mL SDS 10% (0,5%); 72g Glicina (960mM) e água destilada para completar o volume para 1000 mL]. Antes da corrida eletroforética, as amostras foram preparadas, adicionando-se aos extratos protéicos, tampão de amostra 4X [1,25mL Tris-HCl 1M, pH 6,8 (125mM); 4mL SDS10% (4%); 1mL glicerol (10%); 20mg azul de bromofenol (0,2%); 400µL β-mercaptoetanol (4%) e água destilada para completar o volume para 10mL]. Após a aplicação do tampão de amostra, os extratos protéicos foram fervidos a 100°C, por 10 minutos, e, em seguida, aplicados no gel. Ao final da corrida eletroforética, os géis foram corados por azul de Coomassie 0,2% (Metanol 50%; ácido acético 10%; completar volume com água destilada para 100mL; Coomassie Blue R-250 0,2g - 0,2% p/v). Marcadores de baixo peso molecular (LMW Calibration – Amersham) foram utilizados nas corridas, sendo estas proteínas fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), albumina de ovo de galinha (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) α-lactoalbumina (14,4 kDa).

4.26 Purificação das proteínas recombinantes pET28a-134B02, pEXP17-MT1 e pETSUMO-MT1 por cromatografia de afinidade em resina de níquel

Os precipitados celulares obtidos das culturas induzidas (pEXP17-MT1 e pET28a-134B02), foram ressuspensos em tampão Tris, 8M de uréia [Tampão A (Tris-HCl 50mM, pH 8,0, NaCl 150mM, 8M de uréia)]. Esse tubo foi vigorosamente homogeneizado em

vórtex, e deixado a 4°C, por toda a noite. Em seguida, as soluções contendo as proteínas desnaturadas foram aplicadas em coluna cromatográfica de afinidade contendo 1mL de resina de níquel (Ni SepharoseTM High Performance - GE) empacotada e equilibrada, previamente, com tampão A. A coluna foi lavada com 10mL de tampão A e o “flow-through” coletado. As proteínas pEXP17-MT1 e pET28a-134B02 foram eluídas da coluna com tampão A, acrescido de 250µM de imidazol, e frações de aproximadamente 0,5mL foram coletadas.

Para a proteína pETSUMO-MT1, foi utilizada a fração sobrenadante do extrato celular (solúvel), e os mesmos procedimentos de purificação foram empregados. Após ser purificada, a proteína pS-rMT1 eluída com 15mL de tampão E (fosfato de sódio 20mM, pH 7,4, NaCl 300mM, imidazol 250mM) foi concentrada através de um concentrador Centricom (Millipore), que continha uma membrana interna com um valor de corte de proteínas de 10kDa, ou seja, proteínas com massa igual ou menor que dez kiloDaltons seriam descartadas ao final do procedimento. Ao final da concentração, a solução foi concentrada até 2mL, e quantificada pelo método de Bradford. Todas as proteínas foram quantificadas através do método de Bradford e submetidas à análise em SDS-PAGE.

4.27 Produção de anticorpos policlonais contra as proteínas recombinantes pEXP17-MT1 e pET28-134B02

Neste procedimento, foram usados oito camundongos machos, da linhagem BALB/c, pesando aproximadamente 30 gramas cada, com 6 a 8 semanas. Cada camundongo recebeu três doses com aproximadamente 25µg de cada proteína. Para a primeira imunização, o antígeno foi homogeneizado em adjuvante completo de Freund (Harlow & Lane, 1988) e injetado intraperitonealmente (ip). Nas duas doses seguintes (14 e 10 dias após a primeira injeção), o antígeno foi homogeneizado em adjuvante incompleto de Freund (Harlow & Lane, 1988), e injetado ip. Oito dias após a última injeção, os animais foram sangrados. Após a sangria, o plasma contendo os anticorpos foi recuperado através de centrifugação por 20 minutos, a 5000g, a 4°C, em centrífuga Eppendorf, modelo 5810R.

4.28 Ensaio de pré-adsorção dos anticorpos policlonais

Os soros obtidos dos animais, contendo os anticorpos policlonais anti-pET28a-134B02 e anti-pEXP17-MT1, foram submetidos a um ensaio de pré-adsorção. Em tal ensaio, 50µL dos soros contendo os anticorpos foram adicionados em um tubo tipo Eppendorf, juntamente com aproximadamente 32µg do extrato total da linhagem BL21(DE3) Rosetta de *E. coli*, que produziu a proteína recombinante. O tubo contendo essa solução foi deixado em banho-maria, a 37°C, por 1:30hs, sendo levemente homogeneizado nesse período. Ao final da incubação, o tubo foi centrifugado a 15.000g, por 30 minutos, a 4°C. Ao final da centrifugação, o tubo contendo o pellet celular, foi descartado. Os sobrenadantes, contendo os anticorpos que não reagiram com as proteínas da *E. coli*, foram transferidos para um tubo novo, e utilizados em análises de Western blot.

4.29 Extração de proteínas totais dos tecidos da folha, estigma/estilete e ovário de *Nicotiana tabacum*

Para a extração das proteínas totais dos tecidos do estigma/estilete e ovário, foram coletadas aproximadamente 4 flores compreendendo os estágios 8 a 11 do desenvolvimento floral, totalizando 16 pistilos. Amostras de folha, que foram utilizadas como controle negativo, foram coletadas de plantas de *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1, independente do estágio de desenvolvimento do vegetal. Após serem coletadas, as flores foram levadas ao laboratório onde os pistilos foram separados, em seguida desmembrados em estigma/estilete e ovário, congelados em nitrogênio líquido, e mantidos a -80°C até a extração das proteínas. Todos os tecidos foram pesados antes da extração. Todo o procedimento de extração foi realizado em ambiente resfriado. Assim, em um cadinho de porcelana, adicionou-se nitrogênio líquido e o tecido a ser macerado. Após a evaporação total do nitrogênio líquido, adicionou-se PVPP e os tecidos foram vigorosamente triturados com um pistilo também de porcelana, até tornarem-se um pó bem fino. Em seguida, adicionou-se tampão de extração [Tampão E – (Bis-Tris-HCl 50mM, pH 6,9; β-mercaptoetanol 10 mM; metabissulfito de sódio 5 mM; Protease Inhibitor Cocktail for General Use - 1mM (Sigma); glicerol 10% v/v; PVPP 0,1% (p/v); água destilada para um volume final de 10mL)] na proporção de 1:5 p/v (ex. 500mg de tecido, 2,5mL de tampão E). Em seguida, o tecido triturado e ressuspenso em tampão E, foi transferido para um tubo

tipo Falcon de 15mL, centrifugado por 20 minutos, 12.000g, a 4°C, e a fração sobrenadante, contendo o extrato protéico total, foi transferida para um novo tubo, e deixada a -80°C até o momento do ensaio.

4.30 Tratamento dos extratos protéicos totais de folhas, estigma/estilete e ovário com N-hexano

Os tecidos do pistilo de *N. tabacum* contêm grandes quantidades de lipídeos, polissacarídeos, e outros compostos que podem interferir em procedimentos de quantificação de proteínas, análises por SDS-PAGE ou qualquer outro procedimento que necessite de uma certa “pureza” do extrato protéico. Com isso, na tentativa de se obter um extrato protéico o mais livre possível desses “contaminantes”, foi utilizado o reagente N-hexano. Tal reagente possui afinidade por compostos apolares, principalmente lipídeos, e que estão presentes em grande quantidade ao longo dos tecidos do pistilo. Assim, aos extratos protéicos totais, foi adicionado N-hexano na proporção de 1:5 v/v (ex. 0,5mL de extrato, 2,5mL de N-hexano), formando-se 2 fases. Em seguida, as soluções obtidas foram levemente homogeneizadas, manualmente, três vezes a cada 5 minutos. Ao final, a fase inferior contendo os extratos protéicos, foi recuperada, quantificada por reação de Bradford (1976), e utilizada nos ensaios de ELISA e Western blot.

4.31 Análise por Western blot

A transferência das bandas de proteína obtidas no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), para a membrana de nitrocelulose (HybondTM-C extra, Nitrocellulose, 45 Micron – Amersham Life Science), foi realizada no sistema Mini Trans-Blot^R Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Para tanto, imediatamente após a corrida eletroforética, o gel foi incubado por 15 minutos em um recipiente contendo o tampão de transferência gelado (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3; glicina 192mM e 20% de metanol), juntamente com todos os acessórios da transferência, incluindo a membrana, as esponjas e os papéis de filtro. A transferência foi realizada por 1 hora, à 100V. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S (0,5 g de Ponceau, 2,5 ml de ácido acético para 250 ml de água), com o intuito de visualizar as bandas transferidas e avaliar a eficiência do procedimento. Após a

visualização das bandas, a membrana foi lavada em água corrente para retirada do Ponceau e, então, colocada na solução de bloqueio, contendo leite em pó desnatado 5% em tampão TBS (Tris-HCl 20mM, pH 7,5; NaCl 150mM; Tween 0,05%), por pelo menos 1 hora em geladeira. Após sair da solução de bloqueio, a membrana foi submetida a uma lavagem de 7 minutos, com tampão TBS (Tris-HCl 20mM, pH 7,5; NaCl 150mM; Tween 0,05%). Posteriormente, 5 ml da solução de bloqueio, acrescida do leite em pó, como descrito acima, contendo 2 µl (1:2500) do anticorpo primário produzido em camundongo (Monoclonal anti-polyHistidine Clone His 1 – Sigma), ou o mesmo volume do anticorpo produzido contra as proteínas recombinantes (pEXP17-MT1 e pET28a-134B02), foram adicionados sobre a membrana, e a placa foi então incubada por 2 horas, a temperatura ambiente, sob agitação. Após esta incubação, foram efetuadas três lavagens de 7 minutos cada, com o tampão de lavagem (TBS) e a seguir, a mesma foi incubada por mais 1 hora em 5 ml da solução de bloqueio contendo 1 µl (1:5000) do anticorpo secundário, produzido em cabra, contra IgG de camundongo, conjugado com fosfatase alcalina. Após esta incubação, a membrana passou por mais três lavagens de 7 minutos, e foi submetida ao procedimento de revelação. Para tanto, em 10 ml de tampão de revelação (1 ml de Tris-HCl 1M, pH 9,5; 0,2ml de NaCl 5M; 0,05 ml de MgCl₂ 1 M e água para 10 ml), adicionou-se 44 µl de NBT (75mg/mL, em solução de dimetilformamida 70% v/v) e 33 µl de BCIP (50mg/mL, em solução de dimetilformamida 100% v/v) (Gibco-BRL) e, então, esta solução foi adicionada sobre a membrana. Após 1 a 5 minutos de incubação no escuro, sob agitação, a membrana foi revelada por reação cromogênica, e as bandas foram então visualizadas. A análise de Western blot com as proteínas nativas extraídas do pistilo, foi realizada com o kit ECLTM Western Blotting Analysis System (GE), seguindo as especificações do fabricante.

4.32 Reação de ELISA

O ensaio de ELISA foi realizado utilizando como antígeno os extratos protéicos totais dos tecidos do estigma/estilete, ovário, folha (controle negativo) e a proteína pEXP17-MT1 purificada em resina de níquel (controle positivo). Na placa de ELISA contendo 96 poços, o fundo de cada poço foi coberto com 2µg de cada extrato protéico (antígeno), diluídos em 50µl de tampão carbonato, pH 9,6, com tempo de incubação de

aproximadamente 18 horas, à temperatura de 4°C. Em seguida, os poços foram lavados 4 vezes com 50µL de tampão PBS-Tween 0,05% e, após as lavagens, as amostras na placa foram bloqueadas com 50 µL de solução PBS-Tween 0,05%/BSA 1 %, por 1 hora, à 37°C. Após o bloqueio, a placa foi lavada novamente 4 vezes, com 50µL de tampão PBS-Tween 0,05% e, a seguir, realizou-se a incubação com o anticorpo primário anti-pEXP17-MT1, produzido em camundongo, em diferentes diluições. As diluições, que variaram de 1:50 até 1:6400, foram realizadas em tampão PBS-Tween 0,05%/BSA 1%, e 50µL de cada diluição, foi aplicada em cada poço já pré-determinado. Em seguida, a placa foi incubada por 1 hora, à 37°C e, após essa incubação, os poços foram lavados 10 vezes com tampão PBS-Tween 0,05%. Após as lavagens, foram aplicados 50µL do anticorpo secundário, produzido em cabra [Anti-mouse IgG – Peroxidase (Sigma)], na diluição de 1:2000, em tampão PBS-Tween 0,05%/BSA 1%, e a placa foi incubada novamente por 1 hora, à 37°C. Ao final desta incubação, os poços na placa foram lavados 15 vezes com tampão PBS-Tween 0,05%. Em seguida, utilizou-se o método colorimétrico de revelação, aplicando-se 50µL de solução TMB 98% (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine - Sigma) e, após 5 minutos, foram aplicados 50µL de solução 2M de ácido sulfúrico, para parar a reação. Após a revelação, a leitura das amostras nos poços foi feita em leitor de ELISA (Power Wave X, Bio-tech Instruments, Inc.) no comprimento de onda de 450nm.

5.0 Resultados e Discussão

5.1 Investigando possíveis compostos voláteis metilados emitidos pela flor de *N. tabacum*

A seqüência protéica correspondente ao gene *NtJAMT* apresenta alta similaridade com metiltransferases capazes de produzir compostos voláteis metilados tais como metilsalicilato (MeSa), metilbenzoato (MeBa) e metiljasmonato (MeJa), em diferentes espécies vegetais. Ângelo (2001) mostrou que o gene *NtJAMT* é transcrito exclusivamente no pistilo (estigma/estilete e ovário). Com base nessas premissas, foi investigado se a flor de *N. tabacum* é capaz de produzir algum dos três compostos metilados citados acima. Para tanto, foi utilizada uma modificação da abordagem “headspace” (HS), juntamente com SPME (“solid-phase microextraction” – micro-extração em fase sólida, MEFS) e, ao final das captações, as análises dos voláteis foram feitas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) (item 4.1 do Material e Métodos). Uma vez que não se encontra na literatura trabalhos equivalentes utilizando *N. tabacum*, os horários de captação foram escolhidos com base em experimentos semelhantes realizados com outras plantas do gênero *Nicotiana*, bem como outras Solanáceas. Plantas de *N. sylvestris* emitem MeBa ao anoitecer, que é o momento de maior atividade de insetos polinizadores noturnos, tais como as mariposas (Loughrin *et al.*, 1990a). Experimentos *in vivo*, utilizando flores de *P. hybrida*, mostraram que a emissão de MeBa ocorre ao longo do dia, sendo encontrado durante o período de 24hs de amostragem (Verdonk *et al.*, 2003). Com isso, os ensaios foram realizados *in vivo*, utilizando-se flores no estágio 11 do desenvolvimento floral (antes da ântese), em plantas selvagens de *N. tabacum* Petit Havana-SR1, dentro da casa de vegetação. A realização dos experimentos nos períodos distintos (manhã, tarde e noite) teve como objetivo principal, analisar e comparar possíveis diferenças qualitativas ou quantitativas nos padrões de emissão dos voláteis de interesse do estudo. Assim, os resultados obtidos são mostrados a seguir.

A Figura 12 representa os perfis cromatográficos das análises por CG-EM, após a captação dos voláteis pela fibra de MEFS, nos três diferentes períodos do dia, utilizando os métodos “*Full Scan*” e “*SIM*” – “selected ion monitoring” – monitoramento selecionado de íons - de análise. No método “*Full Scan*”, o primeiro a ser utilizado, os cromatogramas são analisados de forma global, sendo que compostos adsorvidos na fibra de MEFS em baixas quantidades podem ter sua detecção comprometida, dificultando a identificação do pico referente ao composto de interesse. Na figura, A corresponde a coleta realizada no período da manhã, B, ao período da tarde, e C, ao período da noite. Ao analisar os cromatogramas, é possível observar a presença de um pico correspondente aos compostos MeJa e dihidroMeJa, que eluiu da coluna no mesmo tempo de retenção do composto MeJa padrão (15,40 minutos, Figura 12D), e do DihidroMeJa padrão (15,24 minutos, Figura 12E), nos três períodos do dia analisados (indicados por um asterisco para MeJa, e por uma seta para dihidroMeJa), nos três cromatogramas. O cromatograma 12F representa a corrida do controle negativo, onde nenhum dos compostos de interesse foi detectado, após a análise por CG-EM. A identificação do composto dihidroMeJA foi uma grande surpresa, uma vez que, até o momento, não é de nosso conhecimento a existência de nenhuma MT da família SABATH capaz de produzir esse composto, seja *in vitro* ou *in vivo*. Os compostos voláteis MeSa e MeBa não foram detectados nos diferentes períodos do ensaio. Quando os picos dos compostos MeJa e dihidroMeJa são comparados nos três cromatogramas, observa-se que, quantitativamente, não há uma diferença significativa entre eles nos períodos da tarde e noite; entretanto, isso não ocorre no período da manhã, onde o pico referente ao composto dihidroMeJa é maior quando comparado ao pico referente ao MeJa (Figura 12A). Adicionalmente, é possível observar que os perfis cromatográficos obtidos nos períodos da tarde e noite apresentam uma certa semelhança entre si, e são diferentes do perfil cromatográfico do período da manhã. Neste momento, vale salientar que os diversos picos observados nos cromatogramas dos diferentes períodos do dia correspondem a diferentes compostos liberados pela flor de *N. tabacum*. Contudo, esses picos não foram analisados, uma vez que o foco da investigação são os compostos metilados citados acima. Entretanto, estudos futuros poderão ser realizados com o objetivo de identificar e analisar essa diversidade de compostos voláteis que são produzidos e emitidos pela flor de *N. tabacum*.

No modo “*SIM*” de análise, a busca pelos compostos de interesse fica mais refinada, pois selecionam-se as massas (m/z) dos principais íons do composto de interesse (nesse caso, os compostos padrões) aumentando, com isso, a especificidade e a

sensibilidade da análise. Neste caso, mesmo que o composto esteja em pequena quantidade, sua identificação torna-se possível, uma vez que a busca restringe-se apenas aos compostos alvos que apresentem os mesmos valores de massas (m/z), que foram selecionados para a análise. Os valores de m/z dos íons escolhidos para cada composto padrão podem ser observados na Figura 13.

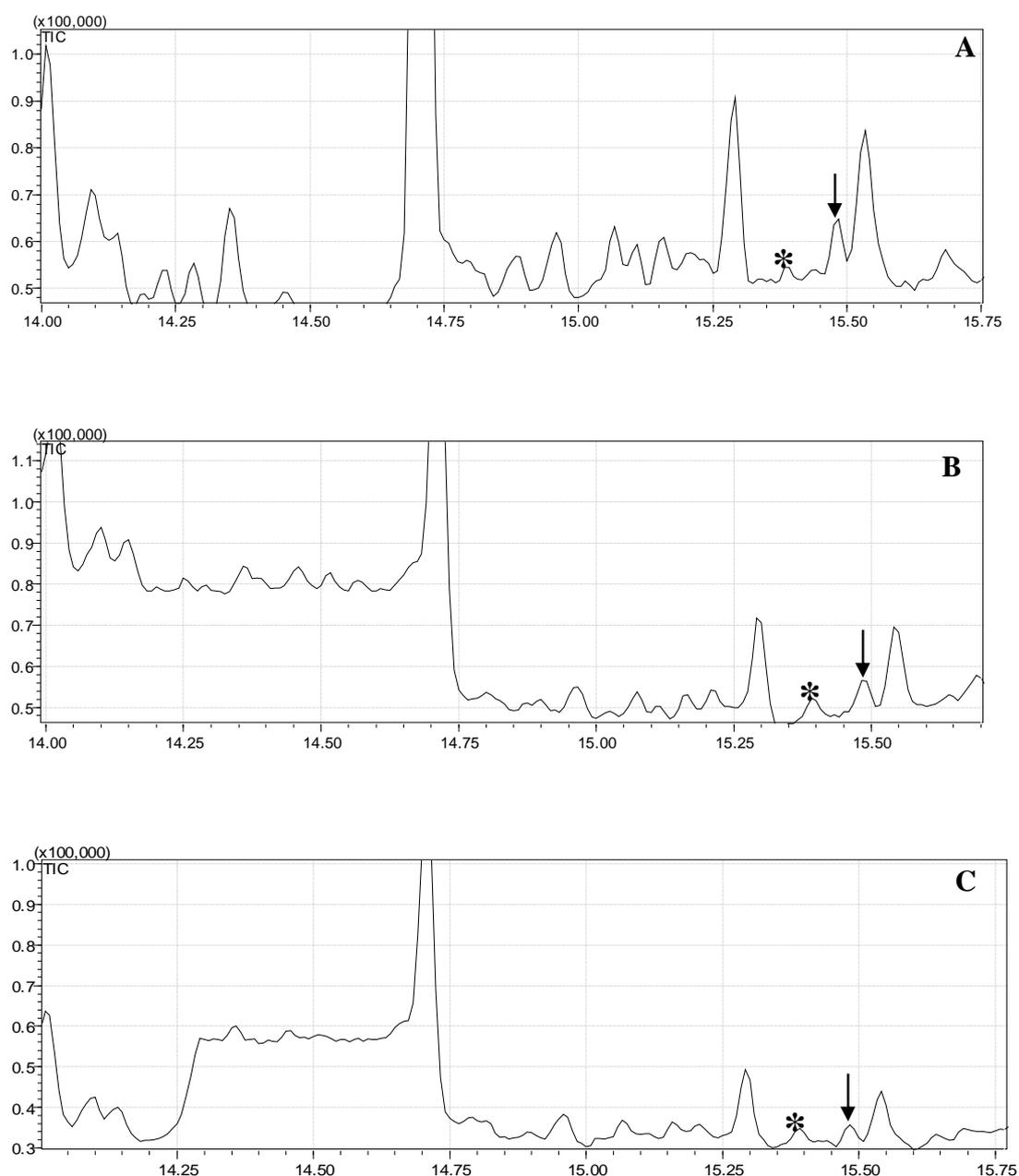


Figura 12.

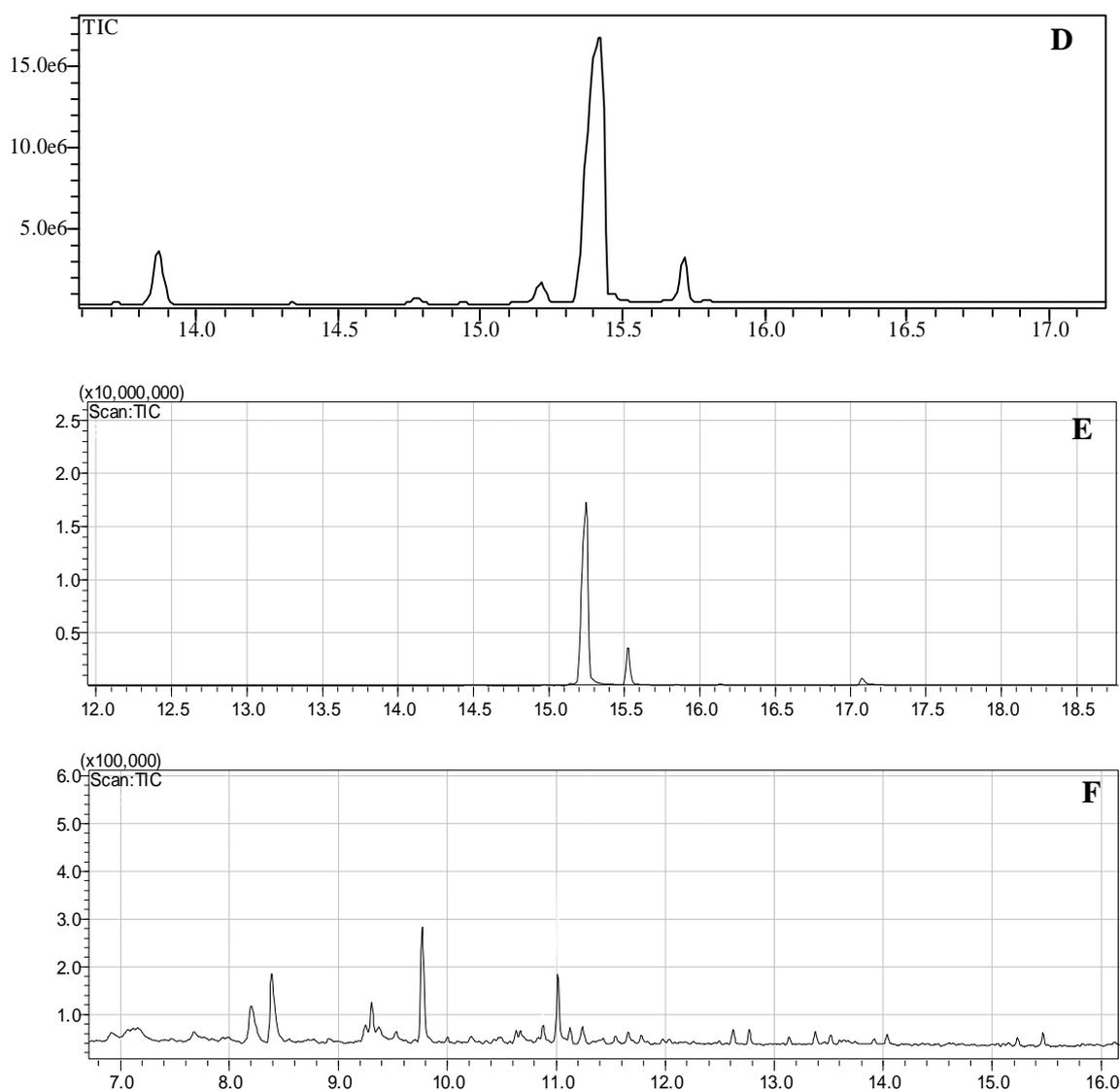


Figura 12. Comparação da emissão *in vivo* dos compostos MeJa e dihidroMeJa pela flor de *N. tabacum* Petit Havana-SR1, em diferentes períodos do dia. Os perfis cromatográficos A, B e C foram obtidos após a coleta de voláteis realizada nos períodos da manhã (10:00hs às 10:20hs), tarde (16:00hs às 16:20hs) e noite (20:00hs às 20:20hs), respectivamente; D e E: perfis cromatográficos dos padrões MeJa e dihidroMeJa, respectivamente, com os picos predominantes que eluem da coluna no tempo de retenção 15,40 minutos (MeJa) e 15,24 minutos (dihidroMeJa); F: perfil cromatográfico obtido após a corrida do controle negativo. Os “*” nos gráficos A, B e C indicam a presença do pico correspondente ao composto MeJa, detectado no mesmo tempo de retenção do MeJa padrão (15,40 minutos). As setas nos gráficos A, B, e C indicam a presença do pico correspondente ao composto dihidroMeJa, detectado no mesmo tempo de retenção do DihidroMeJa padrão (15,24 minutos).

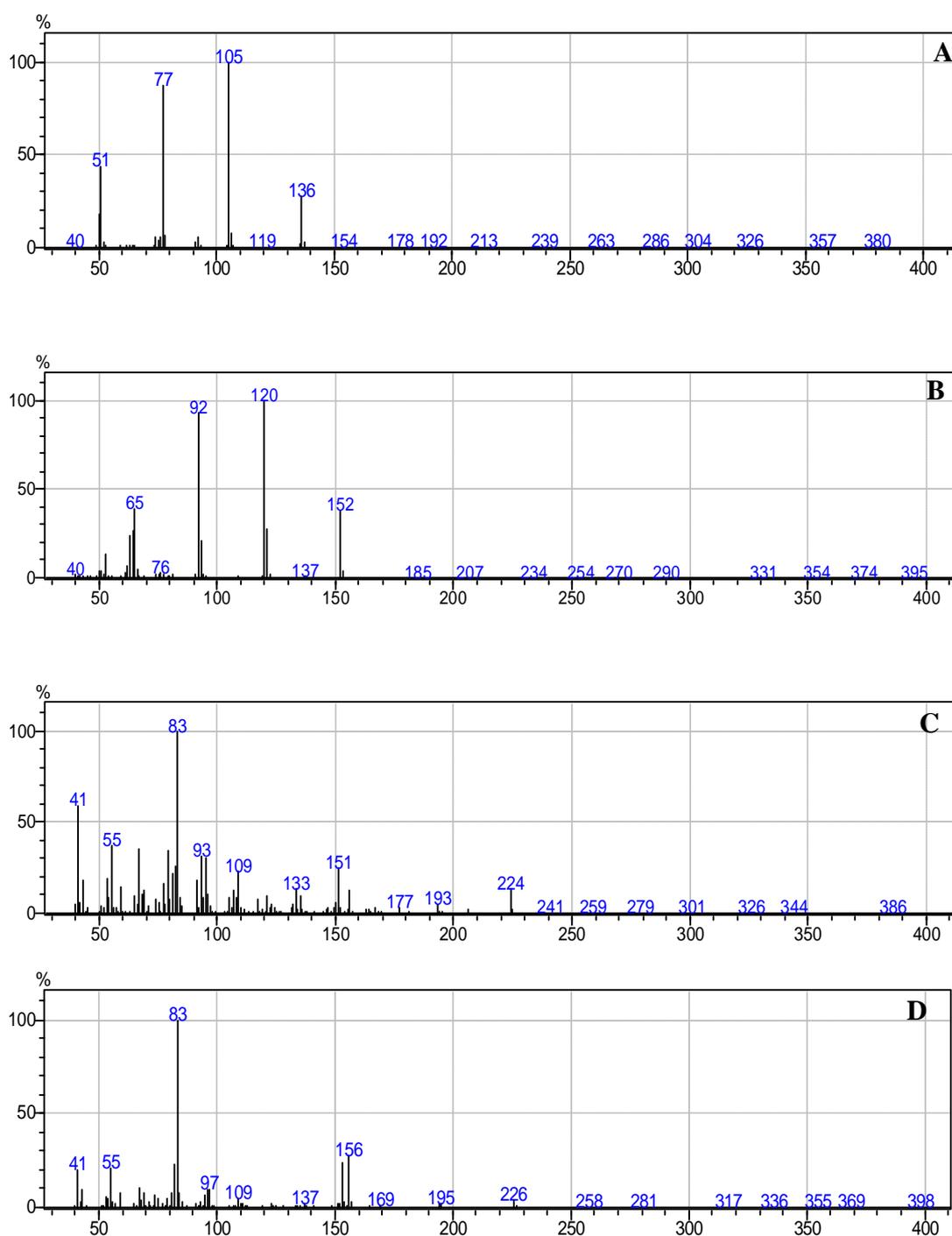


Figura 13. Espectros de massas correspondentes aos padrões metilbenzoato (A), metilsalicilato (B), metiljasmonato (C) e dihidroMeJa (D), mostrando os diversos íons de cada composto. Os valores de massa m/z dos três principais íons escolhidos de cada composto padrão, para a análise no modo “SIM”, podem ser observados: m/z 77, 105 e 136 (A); m/z 92, 120 e 152 (B); m/z 83, 151 e 224 (C); e m/z 83, 156, 226 (D).

Assim, realizou-se uma nova análise escolhendo, agora, três íons específicos dos compostos MeBa (m/z 77, 105, 136), MeSa (m/z 92, 120, 152), MeJa (m/z 83, 151, 224) e dihidroMeJa (m/z 83, 156, 226). Ao se comparar as emissões dos três períodos do dia, com os íons selecionados dos padrões MeBa e MeSa, não foi encontrado nenhum sinal que pudesse ser atribuído à presença desses compostos, indicando que a flor de *N. tabacum* possivelmente não produz nenhum desses dois voláteis, em nenhum dos períodos analisados. Entretanto, quando se comparou com os íons dos padrões MeJa e dihidroMeJa, foi possível identificar a presença dos três íons selecionados para os dois compostos, nos três diferentes períodos amostrados. Contudo, apesar dos dois compostos terem sido identificados nos três períodos de amostragem, nas Figuras 14 e 15 estão representados apenas os cromatogramas referentes às coletas realizadas no período da manhã. Na Figura 14B, observa-se uma grande quantidade de picos no cromatograma, com diferentes valores de massa m/z . Tais sinais adicionais são definidos como “ruídos químicos”, e geralmente aparecem em maior número quando o composto de interesse analisado é detectado em quantidades muito pequenas, alterando significativamente a razão sinal/ruído.

A razão sinal/ruído se dá sempre em função da quantidade do composto de interesse que fica adsorvido na resina da fibra de MEFS, isto é, quanto maior a quantidade do composto de interesse, maior será o seu sinal no cromatograma. Por outro lado, se o composto de interesse estiver em menor quantidade, irá prevalecer os sinais dos íons dos compostos adsorvidos de forma predominante.

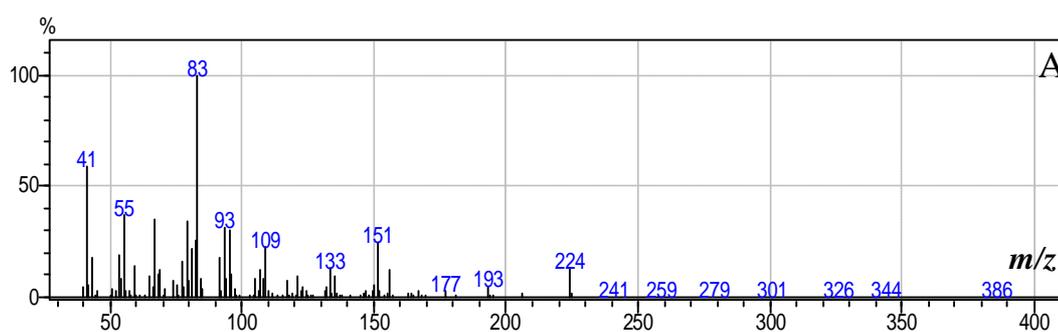


Figura 14.

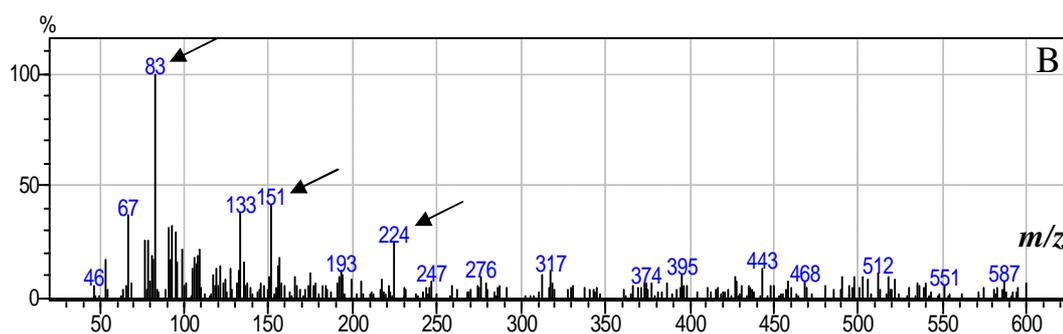


Figura 14. Análise da emissão *in vivo* do composto MeJa pela flor de *N. tabacum* Petit Havana-SR1, utilizando o modo “SIM” de análise no espectrômetro de massas. (A) espectro de fragmentação de massas do padrão MeJa, mostrando os três íons principais escolhidos para a análise no modo “SIM” (m/z 83, 151, 224). (B) perfil cromatográfico obtido após coleta de voláteis no período da manhã (10:00hs às 10:20hs). As setas no gráfico B indicam os três íons principais do composto MeJa padrão, identificados após análise por CG-EM.

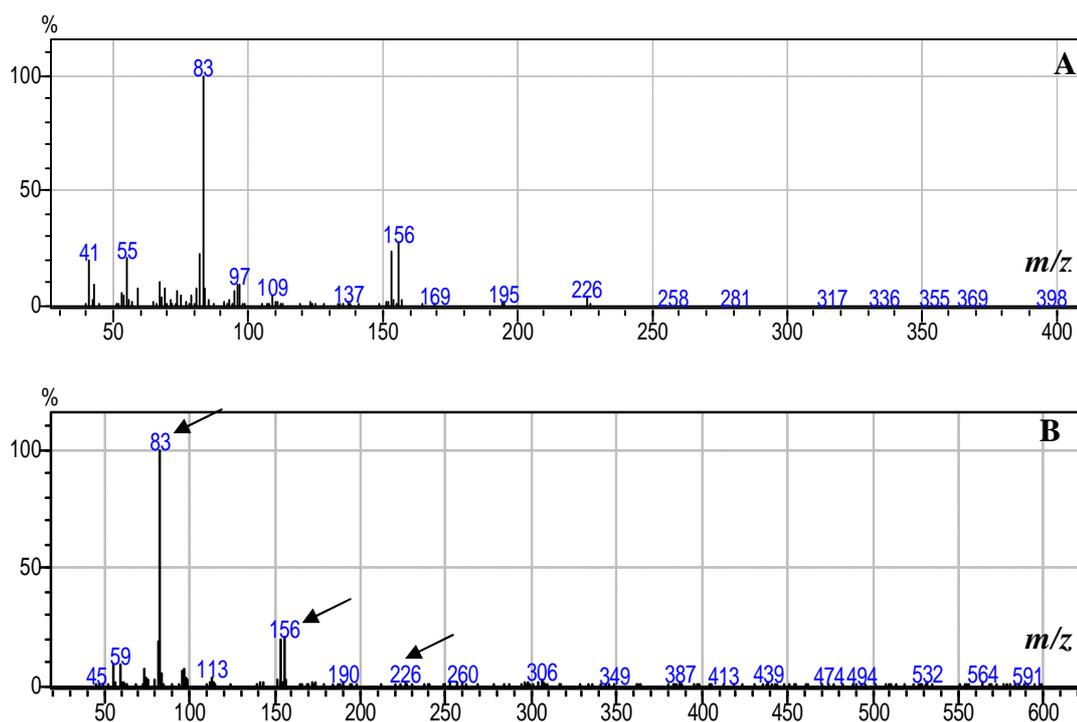
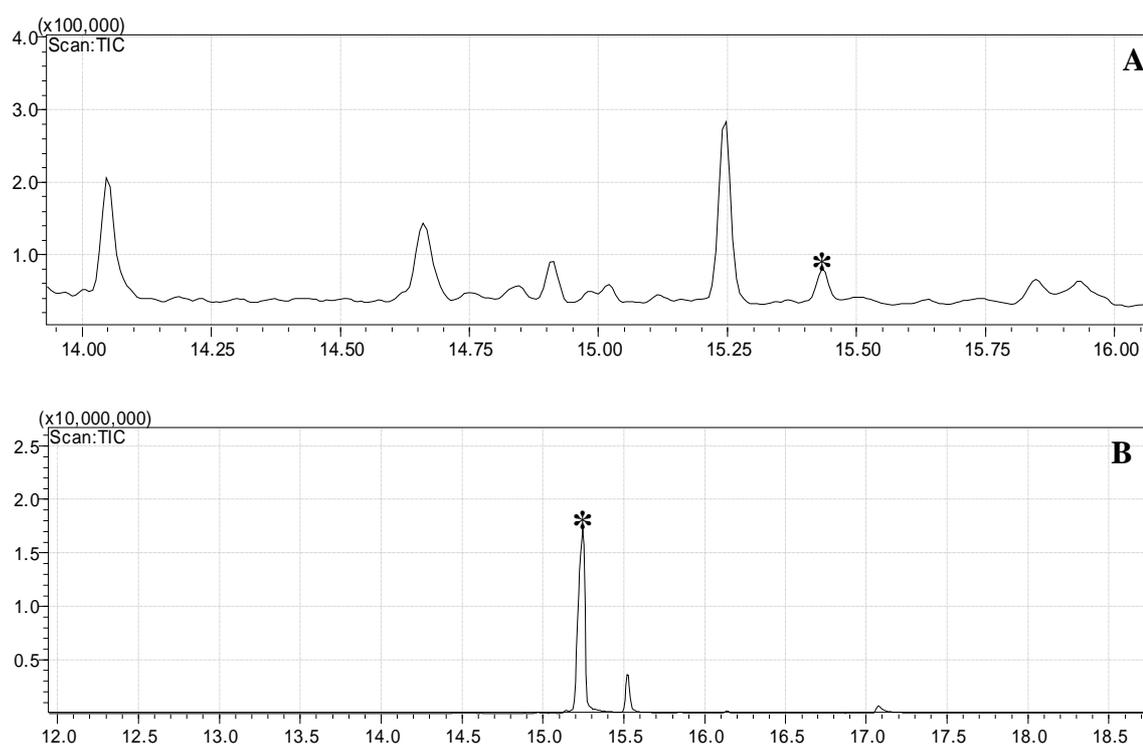


Figura 15. Análise da emissão *in vivo* do composto dihidroMeJa pela flor de *N. tabacum* Petit Havana-SR1, utilizando o modo “SIM” de análise no espectrômetro de massas. (A) espectro de fragmentação de massas do padrão dihidroMeJa, mostrando os três íons principais escolhidos para a análise no modo “SIM” (m/z 83, 156, 226). (B) perfil cromatográfico obtido após coleta de voláteis no período da manhã (10:00hs às 10:20hs). As setas no gráfico B indicam os três íons principais do composto dihidroMeJa padrão, identificados após análise por CG-EM.

Através da mesma abordagem de CG acoplada a EM, e MEFS, ensaios complementares foram realizados utilizando, agora, pistilos inteiros coletados sempre às 10:00h da manhã, e macerados em uma solução saturada de CaCl_2 5M. A escolha do horário de coleta foi baseada nos resultados obtidos após as captações realizadas diretamente na flor, onde os compostos MeJa e dihidroMeJa foram identificados em maior quantidade. Tais ensaios tiveram o intuito de verificar se essa abordagem adicional *in vivo* permitiria a repetição dos resultados obtidos com os ensaios realizados diretamente na flor de *N. tabacum*, com a identificação dos compostos previamente detectados (MeJa e dihidroMeJa). Para tanto, diferentes tempos e temperaturas de amostragem foram empregados, além da quantidade de pistilos utilizados em cada ensaio (item 4.1 Material e Métodos). Após a otimização do ensaio, e das réplicas biológicas, os resultados obtidos podem ser vistos na Figura 16.



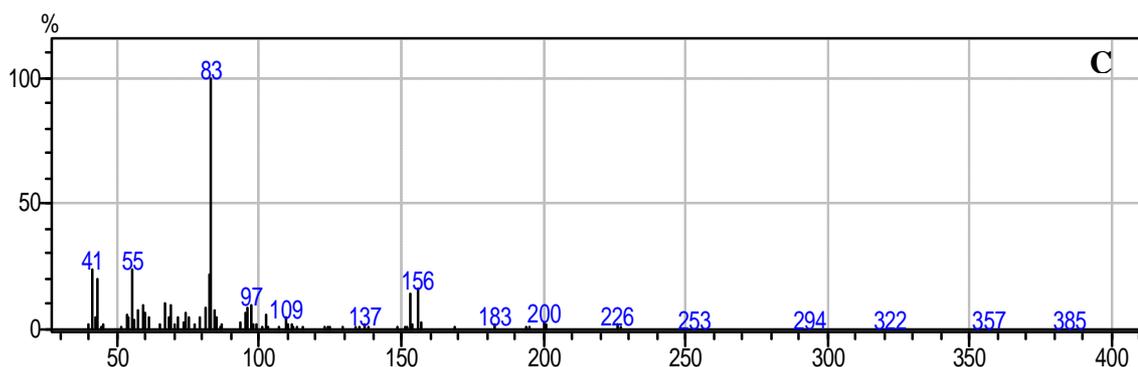


Figura 16. Identificação do composto dihidroMeJa através de CG-EM, após maceração de pistilos inteiros da flor de *N. tabacum*. No cromatograma A, o “*” indica a presença do pico referente ao composto dihidroMeJa, eluindo no mesmo tempo de retenção do dihidroMeJa padrão (“*” no cromatograma B, 15,24 minutos); o cromatograma C corresponde ao espectro de fragmentação dos íons correspondentes ao dihidroMeJa, mostrando os três íons principais e seus respectivos valores de massa m/z (83, 156, 226), confirmando a identidade do composto.

Ao final dos ensaios, foi possível detectar e identificar apenas o composto dihidroMeJa, em todas as análises realizadas. Na Figura 16, A representa o perfil cromatográfico obtido após a corrida no equipamento de CG-EM, mostrando a presença apenas do composto dihidroMeJa, indicado por um “*”, com o tempo de retenção esperado (15,24 minutos). Os cromatogramas B e C correspondem, respectivamente, a corrida do dihidroMeJa padrão, e ao espectro de fragmentação dos íons referentes ao dihidroMeJa. A ausência do composto MeJa nestes ensaios foi de certa forma inesperada, uma vez que ele esteve presente nas três amostragens realizadas nos diferentes períodos do dia, quando da captação dos voláteis diretamente da flor. Os compostos MeSa e MeBa não foram detectados nestes ensaios, repetindo os resultados previamente obtidos.

Apresentada entre o final da década de 80, e início dos anos 90 (Belardi & Pawlisszyn, 1989; Zhang & Pawlisszyn, 1993), a MEFS tem se tornado uma ferramenta poderosa não só para a análise de compostos voláteis emitidos pelas plantas (Oyama-Okubo *et al.*, 2005; Goff & Klee, 2006), como também em áreas distintas da indústria moderna, tais como alimentação, cosmética e aromaterapia (Bartak *et al.*, 2003). Além disso, a combinação entre a MEFS, e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), tem sido amplamente explorada, aumentando de forma quase exponencial o número de trabalhos publicados onde as duas técnicas foram utilizadas de forma integrada (Vas & Vekey, 2004). *P. hybrida* é uma Solanácea que tem grandes flores

brancas, que produzem uma agradável fragrância. Utilizando MEFS, juntamente com CG-EM, Verdonk e colaboradores (2003) estudaram a produção e emissão *in vivo* de voláteis nessa planta, e encontraram compostos diversos tais como benzenóides, aldeídos alifáticos, sesquiterpenos e derivados de ácidos graxos. Ao concluir o trabalho, os autores mostraram que os benzenóides, como o MeBa, são predominantemente produzidos, obedecem a um ritmo circadiano, e sua produção é, possivelmente, regulada em nível transcricional (Verdonk *et al.*, 2003).

O estudo da emissão de compostos voláteis em flores de *S. floribunda* também foi realizado utilizando as abordagens de MEFS, juntamente com CG-EM (Pott *et al.*, 2002). A análise das captações mostrou a presença de 12 compostos voláteis predominantes, pertencentes a diferentes classes químicas como, por exemplo, benzenóides, sesquiterpenos e álcoois. A análise dos resultados mostrou que os compostos 1-nitro-2-feniletano e linalol, e o éster metílico MeBa, foram os compostos mais abundantes, sendo que os seus maiores níveis de emissão foram encontrados ao anoitecer. Os resultados obtidos ainda mostraram que esses voláteis são produzidos de forma coordenada e que, possivelmente, suas emissões também seguem um ritmo circadiano (Pott *et al.*, 2002), como o que foi observado em flores de *P. hybrida*.

Pott e colaboradores (2004) realizaram a caracterização bioquímica e estrutural de duas metiltransferases, envolvidas na produção de compostos voláteis florais. A enzima de *S. floribunda* foi caracterizada como SAMT, e a de *N. suaveolens*, como BSMT. Os resultados obtidos mostraram que, apesar da enzima SAMT de *S. floribunda* apresentar uma acentuada taxa de metilação voltada para o ácido salicílico *in vitro*, as análises *in vivo* mostraram uma alta emissão de MeBa, chegando a ser 15 vezes maior do que a do MeSa. Essa diferença de emissão é justificável, uma vez que a concentração de ácido benzóico chega a ser 1000 a 2000 vezes maior do que a do ácido salicílico nas pétalas de *S. floribunda*. Em flores de *N. suaveolens*, a emissão de MeBa chegou a alcançar níveis quatro vezes maiores, quando comparados com os níveis de MeSa (Pott *et al.*, 2004). Além disso, a atividade de metilação dos extratos protéicos de pétalas de flores de ambas as espécies, frente a substratos diversos tais como derivados do ácido cinâmico, derivados hidroxilados do ácido benzóico, e ácido jasmônico, foi testada. Encontrou-se que o extrato de pétalas de *S. floribunda* teve atividade maior voltada para os derivados hidroxilados do ácido benzóico, enquanto o extrato de pétalas de *N. suaveolens* mostrou alta atividade de metilação voltada para o ácido *o*-anísico. Segundo os autores, essa ampla versatilidade de atuação sobre diferentes substratos, apresentada pelas duas enzimas, pode indicar evolução

recente, ou uma adaptação relacionada a possíveis mudanças de disponibilidade de substratos (Pott *et al.*, 2004).

Dessa forma, como então seria possível a flor de *N. tabacum* estar emitindo MeJa e dihidroMeJa, se a proteína codificada pelo gene *NtJAMT* apresenta uma identidade relativamente baixa ao nível de seqüência de aminoácidos (40%), com uma metiltransferase que atua sobre o ácido jasmônico em *A. thaliana* (Seo *et al.*, 2001)? Uma possível resposta para esta pergunta pode ser encontrada em um trabalho publicado por Martins & Barkman (2005), utilizando uma abordagem filogenética para a reconstrução do gênero Solanaceae. Neste trabalho, os autores mostraram que o aminoácido metionina, quando está presente em uma posição específica de seqüências SAMT (M150 para a SAMT de *Clarkia breweri*), a enzima apresenta alta especificidade de atuação sobre o ácido salicílico. Entretanto, em enzimas que produzem MeBa (BAMT) e MeJa (JMT), nessa mesma posição, existe um aminoácido histidina (Martins & Barkman, 2005). Nesta posição, é observada uma histidina na seqüência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *NtJAMT* (*Nicotiana tabacum* jasmonic acid methyltransferase), o que poderia explicar em parte a produção do composto MeJa, que está sendo emitido pela flor de *N. tabacum*, e identificado nos experimentos de captação de voláteis.

A identificação do composto dihidroMeJa após os ensaios *in vivo* foi, de certa forma, surpreendente e interessante. A literatura referente a esse composto jasmonato não é muito extensa e, em geral, esta associada a mecanismos fisiológicos relacionados à mecanotransdução e percepção ao toque como, por exemplo, na espécie *Bryonia dioica* (Weiler *et al.*, 1992), transdução de sinal em plantas (Blechert *et al.*, 1995) e como indutor da produção de taxano, uma importante droga anti-tumoral, em culturas de células em suspensão de *Taxus chinensis* (Dong & Zhong, 2001). Dessa forma, estudos mais aprofundados deverão ser realizados para se tentar inferir a função deste jasmonato na flor de *N. tabacum*.

5.2 Identificação e clonagem do cDNA completo (MT1) referente ao gene *NtJAMT*

Diversos cDNAs codificando proteínas com alta similaridade a metiltransferases foram identificados (Calixto, 2008) em um banco de dados de ESTs de estigma/estilete de *N. tabacum* (TOBEST – Quiapim *et al.*, 2009). Os cDNAs 46B11 (exons 1, 2, 3 e 4) e

134B02 (exons 1, 6 e 8), foram utilizados em um trabalho prévio (Avanci, 2006) e descritos como sendo produtos de processamento alternativo a partir de um gene que codifica metiltransferases específicas do pistilo (a partir de agora denominado *NtJAMT*), contendo 8 exons (Calixto, 2008). A existência de um transcrito completo para este gene era inferida com base nos resultados de northern blot, mas o cDNA correspondente não estava disponível no TOBEST. Assim, com a finalidade de isolar esta seqüência, foi realizada uma reação de PCR, utilizando como molde uma mistura de cDNAs de estigma/estilete. Para tanto, foram desenhados “primers” baseados nas seqüências dos exons 1 e 8 (Tabela 1, Material e Métodos). O resultado da amplificação dos cDNAs pode ser visto na Figura 17.

A raia 1 da Figura 17 apresenta o resultado da amplificação, via PCR, da mistura de cDNAs dos tecidos do estigma/estilete. Como os “primers” desenhados para a amplificação foram específicos para parear nos exons 1 e 8, não se sabia quantas bandas seriam amplificadas, uma vez que era conhecido apenas o clone de cDNA 134B02 contendo os exons 1 e 8 em sua seqüência. Entretanto, ao analisar a Figura 17, é possível observar 9 bandas distintas, com os tamanhos variando entre 300pb e 1000pb. Ao final da corrida eletroforética, todas as nove bandas foram cortadas do gel e estocadas em freezer a -20°C, para clonagens futuras.

A banda de maior massa molecular (~1100pb), indicada pela seta, foi prontamente utilizada para a purificação e clonagem, por ter o tamanho mais próximo do que seria o clone de cDNA completo, contendo os 8 exons (MT1). Um trabalho adicional, realizado em nosso laboratório pelo aluno de Iniciação Científica Alexandre Palma Boer Martins resultou na clonagem de 5 das bandas intermediárias observadas na Figura 17 (Martins, 2007), as quais, após seqüenciamento, foram confirmadas como codificando diferentes versões do transcrito da metiltransferase.

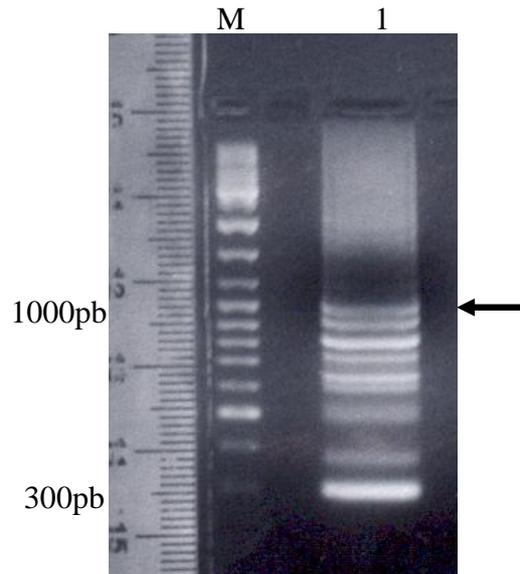


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, contendo diferentes bandas amplificadas a partir da amostra de cDNAs do estigma/estilete, utilizando os “primers” pMT1_8E-Ex1 e pMT1_8E-Ex8. M: marcador de massa molecular Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas); Raia 1: diferentes bandas originadas da amplificação dos cDNAs, via PCR, com os tamanhos dos fragmentos variando entre 300pb e 1000pb. A seta indica a possível banda correspondente ao cDNA completo.

Para a clonagem do fragmento de ~1100pb, este foi purificado do gel (de acordo com o item 2.18 do Material e Métodos) e foi tratado para a adição de adeninas nas extremidades 3’ do fragmento de cDNA (como descrito no item 4.4.1 do Material e Métodos). Esta estratégia foi usada visando a clonagem do fragmento de cDNA amplificado em vetores de clonagem que utilizam a tecnologia TA. Isto foi necessário, pois as enzimas Taq DNA Polimerase de alta fidelidade (“proofreading”), como a que foi utilizada para amplificar os cDNAs, não apresentam atividade de adição de adeninas nas extremidades 3’ de moléculas de DNA amplificadas via reação de PCR (atividade 3’ terminal transferase não dependente de molde), como ocorre com as enzimas Taq Polimerase comuns.

Assim, foi realizada uma reação de ligação do fragmento com o vetor de clonagem pCR2.1 (TOPO TA Cloning – Invitrogen). Células da linhagem DH10B de *E. coli* foram transformadas e plaqueadas em meio seletivo, e colônias isoladas crescidas nessa placa foram utilizadas para mini-preparações de DNA plasmidial. Os DNAs plasmidiais obtidos foram digeridos com a enzima *EcoRI*, e o resultado das digestões pode ser visto na Figura 18. As raias 3 e de 6 a 12 contêm os DNAs plasmidiais que apresentam o padrão de bandas

com os tamanhos esperados (~750pb e ~350pb para o inserto, e 4000pb para o vetor). Esperava-se esse padrão, uma vez que dentro da seqüência do inserto há um sítio de restrição para a enzima *EcoRI*, no meio do exon 3. Nas raias 1, 2, 4 e 5, observa-se a presença de um padrão de bandas diferente do que era esperado, o qual é decorrente, provavelmente, da clonagem de cDNAs menores, presentes no gel da Figura 17. As moléculas menores de DNA podem ter ficado “presas” no gel de agarose, na mesma altura em que a banda maior de ~1000pb foi excisada, resultando nos insertos menores observados nas raias 1, 2, 4 e 5. Portanto, foram escolhidas cinco amostras (raias 2, 3, 5, 6 e 12) para a reação de sequenciamento. Para tanto, foram utilizados os “primers” T7 e M13R, presentes na seqüência do vetor, e os “primers” PA3-2F e Met-6R que pareiam, respectivamente, nos exons 2 e 6 do putativo gene alvo. O resultado do sequenciamento dos cinco clones independentes mostrou que todas as amostras correspondiam a clones que continham seqüências de exons correspondentes ao gene da metiltransferase, sendo que os clones das raias 2 e 5 continham os exons 1, 6, 7 e 8, e 1, 6 e 8, respectivamente. O clone da raia 3 continha a seqüência completa do transcrito, sendo denominado MT1, e foi utilizado no decorrer deste trabalho. A obtenção de MT1 foi um passo importante para a continuidade dos estudos referentes às metiltransferases do pistilo.

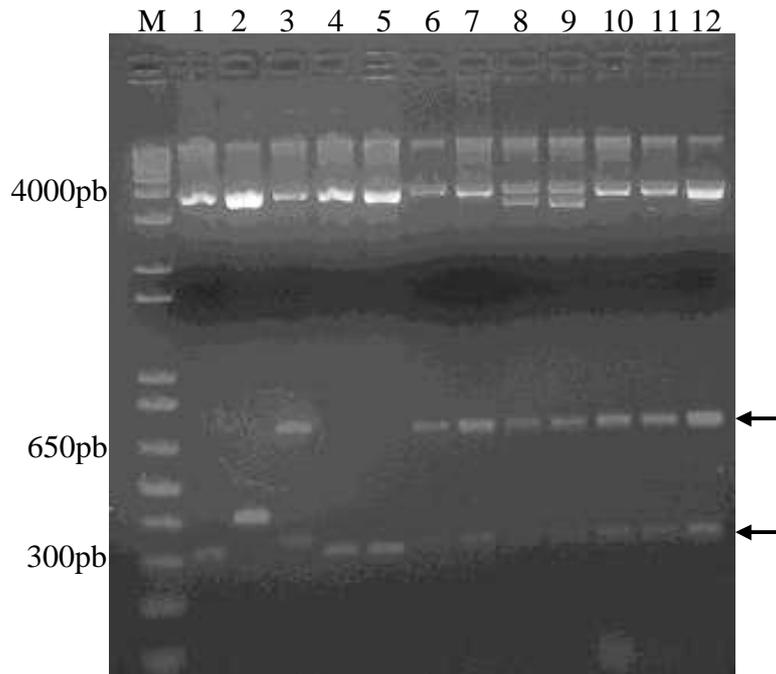


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, contendo mini-preparações de DNA plasmidial do vetor pCR2.1 TOPO-TA, ligado ao provável fragmento de cDNA completo do gene da metiltransferase do pistilo. As amostras de DNA foram digeridas com a enzima *EcoRI*. Raias 1 a 12: DNA plasmidial de 12 colônias independentes. As raias 3 e de 6 a 12 apresentam o padrão de bandas esperado (~750pb e ~350pb). M: marcador de massa molecular 1 kb plus DNA ladder – Invitrogen.

5.3 Alinhamento entre a seqüência de aminoácidos de MT1, os clones de cDNA 46B11 e 134B02, e outras metiltransferases de diferentes espécies vegetais

Após ser obtido com sucesso e completamente sequenciado, o cDNA MT1 foi utilizado para o alinhamento e a comparação de seqüências com os clones 46B11 e 134B02, e com outras metiltransferases de diferentes espécies vegetais, já descritas na literatura.

O resultado do alinhamento entre MT1 e os cDNAs 46B11 e 134B02 pode ser visto na Figura 19.

CLUSTAL W 2.0 multiple sequence alignment

```

A
      #                                     #
MT1  MEVAKILHMNGGIGDTS#HAKNSKLQQKVILMTKPILEEA-SALYRSLSPETICIAELGCS 59
46B11 MEVAKILHMNGGIGDTS#HAKNSKLQQKVILMTKPVLEEAI#SALYRSLSPETICIAELGCS 60
      *****:*****

```

```

                                ##
MT1  SGPNTLLVVTQLISAIREECKSNQQQSPFEFQIYLNDLPGNDFNTIFRSLPEFHEDLRRQ 119
46B11 SGPNTLLVVTQLISAIREECKSNQQQSPFEFQIYLNDLPGNDFNTIFRSLPEFHEDLRRQ 120
*****

                                ##
MT1  NMGGDGI FDPNCFVAGVAGSFYNRLFPSKSLHFVHSSYSLHWLSKVPVGIENKGNIHVA 179
46B11 NMGGDGI FDPNCFVAGVAGSFYNRLFPSKSLHFVHSSYSLHWLSKVCFCIVK----- 172
*****

MT1  STSPLDVIEAYCEQYERDFVNFLKLRSELVKGRMVLTVMGRKNEDRFKASCFLLEPM 239
46B11 -----

MT1  VRALNGLIAEGSIEEEKVVAFNTPICYCPSPAEVKFIIEKEGSFTIDVLNTSEIHMDSSDE 299
46B11 -----

MT1  YNVTQCMRAFIEPLLVS HFGDELNMDQVFHKCREIFVSGIAKEKTTC TNVVVSLTKTN 357
46B11 -----

B
                                #
MT1  MEVAKILHMNGGIGDTS HAKNSK LQQK VILMTKPILEEASALYRSLSPETICIAELGCSS 60
134B02MKVAKILHMNGGIGDTSYAKNSK LQ----- 25
* : ***** : *****

MT1  GPNTLLVVTQLISAIREECKSNQQQSPFEFQIYLNDLPGNDFNTIFRSLPEFHEDLRRQN 120
134B02-----

MT1  MGDDGIFDPNCFVAGVAGSFYNRLFPSKSLHFVHSSYSLHWLSKVPVGIENKGNIHVAS 180
134B02-----

MT1  TSPLDVIEAYCEQYERDFVNFLKLRSELVKGRMVLTVMGRKNEDRFKASCFLLEPMV 240
134B02-----

MT1  RALNGLIAEGSIEEEKVVAFNTPICYCPSPAEVKFIIEKEGSFTIDVLNTSEIHMDSSDEY 300
134B02      GSIQEEKVVAFNTPICYCPSPAEVKFIIEKEGSFTIDVLKTSEIHMDSSDEY 76
*** : ***** : *****

MT1  NVTQCMRAFIEPLLVS HFGDELNMDQVFHKCREIFVSGIAKEKTTC TNVVVSLTKTN 357
134B02NVTQCMR-----AKEKTTC TNVVVSLTKTN 101
*****

```

Figura 19. Alinhamento e comparação de seqüências entre os clones de cDNA 46B11 (A), 134B02 (B), e MT1. É possível observar a grande semelhança entre os aminoácidos dos transcritos menores, quando comparados com MT1. As cerquilhas sobre as seqüências correspondem aos aminoácidos conservados relacionados à ligação ao substrato doador do grupamento metil (SAM); em cinza, aminoácidos conservados envolvidos na ligação aos substratos aceptores do grupamento metil, segundo Zubieta *et al.* (2003). “*“, representa aminoácidos idênticos; “:“, representa substituições conservadas; “.“, representa substituições semi-conservadas.

A Figura 19 representa o resultado do alinhamento entre os clones de cDNA 46B11 e 134B02, mais o cDNA MT1, alinhados separadamente, utilizando o programa ClustalW2.0 (Larkin *et al.*, 2007). Na figura, é possível observar a grande identidade entre as seqüências de aminoácidos dos cDNAs menores (46B11 e 134B02), quando comparados com o cDNA completo (MT1). Esse resultado sustenta mais fortemente a hipótese de que os diferentes transcritos, encontrados no banco de dados TOBEST, seriam gerados a partir de um mecanismo de processamento alternativo, sofrido pelo transcrito do gene *NtJAMT*. Ainda na figura, observa-se que a proteína codificada pelo cDNA 46B11 contém, em sua seqüência, aminoácidos conservados tanto de ligação a SAM (cerquilhas), quanto de ligação aos substratos aceptores do grupamento metil (em cinza). Diferentemente, a proteína codificada pelo cDNA 134B02 apresenta apenas um aminoácido conservado de ligação a SAM, e poucos aminoácidos conservados envolvidos na ligação dos substratos aceptores do radical metil.

Adicionalmente, foi realizado um alinhamento e comparação de seqüências de aminoácidos entre o cDNA MT1, e outras proteínas metiltransferases, de diferentes espécies vegetais. A Figura 20 representa o resultado desse alinhamento, utilizando o programa ClustalW2.0 (Larkin *et al.*, 2007).

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

A

```

                                     #
MT1      MEVAK-ILHMN-GGIGDTSHAKNSKLQQKVILMTKPILEE AISALYR--SLSPETICIAE # 56
SAMT1    MEVAK-ILHMN-GGIGDTSYAKNSKLQQKVILMTKPILEE AISALYR--SLSPETICIAE 56
NAMT     MEVAK-VLHMN-EGIGKASYAKNSLQQKVILMTKSIRDEAIYALYR--SLSPEAICIAD 56
BSMT_Ns  MEVAK-VLHMN-EGIGEASYAKNSLQQKVILMTKSIRDEAIAALYR--SLSPETICIAE 56
BSMT_Na  MEVAK-VLHMN-GGIGEASYAKNSLIAKKVILMTKSIRDEAITALYR--NLSPETICIAE 56
SAMT_Nt  MKVVE-VLHMN-GGIGDISYAKNSLQQKVILMTKPIEQAITDLYC--SLFPQNLCIAD 56
SAMT_Cb  MDVRQ-VLHMK-GGAGENSYAMNSFIQRQVISITKPIEAAITALYSG-DTVTTRLAIAD 57
JMT      MEVMR-VLHMN-KGNGETSYAKNSTAQSNIISLGRVMDEALKKLMMS-NSEISSIGIAD 57
BAMT     MKVMKLLCMNIAGDGETSYANNSGLQKVMMSKSLHVLDLTKDIIGDHVGFPKCFKMMD 60
          * . * . : * * : * * . * * * * : : : : : : : : : : : : : : : :
                                     ##
MT1      LGCSSGPNTLLVVTQLISAIREECKSNGQQQSPEFQIYLNDLPGNDFNTIFRSLPEFHED 116
SAMT1    LGCSSGPNTLLVVTQLISAIREECKSNGQQQSPEFQIYLNDLPGNDFNTIFRSLPEFHED 116
NAMT     LGCSSGPNTFLTISELIKTIYEESKINGQKQSPEFQVFLNDLPGNDFNTIFRWLPAFYED 116
BSMT_Ns  LGCSSGPNTFLVISGLIKTIYEESKINGQKQSPEFHVFLNDLPGNDFNTIFRSLPAFYED 116
BSMT_Na  LGCSSGPNTFLTISRLIQTIYEESKSDGQKQSPEFHVFLNDLPGNDFNTIFRSLPAFYDD 116
SAMT_Nt  LGCSSGANTFIVVSELIKIVEKERKKGHGFQSPEFHFNFNDLPGNDFNTIFQSLDIFQQD 115
SAMT_Cb  LGCSSGPNALFAVTELIKTVVEELRKKMGRENSPEYQIFLNDLPGNDFNAIFRSLP----- 112
JMT      LGCSSGPNSLLSISNIVDTIHNLCPLD-RVPPELRVSLNDLPSNDFNYICASLPEFYDR 116
BAMT     MGCSSGPNALLVMSGIINTIEDLYTEKNINELPEFEVFLNDLPGNDFNLLFKLLS----- 115
          :*****.*::: : : : : : . . . . . ** .. :*****.***** : *

```

```

                                ##
MT1          LRR--QNMGDDGIFDPNCFVAGVAGSFYNRLFPSKSLHFVHSSSYSLHWLSKVPVGIEN-- 172
SAMT1       LRR--QNMGDDGIFDPNCFVAGVAGSFYNRLFPSKSLHFVHSSSYSLHWLSKVPVGIEN-- 172
NAMT        LR---KHMGDG--FGTNCVAGVAGSFYNRLFPSNSVHFVHSSSYSLHWLSRVPHGIEN-- 169
BSMT_Ns     LR---KQMGDG--FDPNCFVTGVAGSFYTRLFPSQSLHFVHSSSYSIHWISQVDPGIED-- 169
BSMT-Na     LR---KQMRDG--FDPNCFVTGVAGSFYTRLFPSKSLHFVHSSSYSLQWISQVPHGIED-- 169
SAMT-Nt     LR---KQIGEE--FGP-CFFSGVSGSFYTRLFPSNSLHFVHSSSYSLMWLSQVPAVEN-- 167
SAMT_Cb     -----IEND--VDGVCFINGVPGSFYGRFLFPRNTLHFVHSSSYSLMWLSQVPIGIES-- 161
JMT         VNNNKEGLGFGRGGGESCFVSAVPGSFYGRFLFPRRSLHFVHSSSSSLHWLSQVPCREAEKE 176
BAMT        -----HENG-----NCFVYGLPGSFYGRLLPKKSLHFAYSSYSIHWLSQVPEGLEDN- 162
                    ** . . : **** * : * . : : * : * : * : * : * : * :
                    .

MT1          -----NKGNIHVASTSPLDVIEAYCEQYERDFVNFLKLRSEIIVKGGRMVLTVMGR 223
SAMT1       -----NKGNIHVASTSPLDVIEAYCEQYERDFVNFLKLRSEIIVKGGRMVLTVMGR 223
NAMT        -----NIGNIHVASTSPQDVVEAYEYERDFLNFLKLRSEIIVKGGRMVLTVMGR 220
BSMT_Ns     -----NKGSIYVSRTPPTTVKAYEYERDFVTFKLYRSKELVKGGRMILTMLGR 220
BSMT-Na     -----NKGNIYVSRTPPTTVKAYELYERDFATFLKLYRSKELVKGGRMILTMLGR 220
SAMT-Nt     -----NKGNIYMASTSPPSVIKAYYKQYKDFSNFLKLYRSEELMKGGKMVLTFLGR 218
SAMT_Cb     -----NKGNIYMANTCPQSVLNAYYKQFQEDHALFLRCRAQEVVPGGRMVLTIILGR 212
JMT         DRTITADLENMGKIYISKTSKSAHKAYALQFQTDFLVFLRSRSEELVPGGRMVLSFLGR 236
BAMT        -----NRQNIYMATESPPEVYKAYKQYERDFSTFLKLRGEEIVPGGRMVLTFNGR 213
                    * . * : : . * . : ** : : * . ** : * . * : : * : * : * : * : * : * :
                    .

MT1          KNEDRFSKASCFLLEPMVRALNGLIAEGSIEEEKVAFNTPIYCPSPAEVKFIIEKEGSF 283
SAMT1       KNEDRFSKASCFLLEPMVRALNGLIAEGSIEEEKVAFNTPIYCPSPAEVKFIIEKEGSF 283
NAMT        NNEDRVSKASCYLLLEPMVMALKELIAEGSIEEEKVAFNIPVYYPSPAEVKYIVEKEGSF 280
BSMT_Ns     NNEDLYSKGCHYVWEPLAMALKELIAMGLIEEEKVNSFNIPYHLSPAEVKYIVEKEGSF 280
BSMT-Na     KNEDLYSKGCYYVLEPLAMALKELVAMGLIEEEKVNSFNIPYSPSPAEVKYIVEKEGSF 280
SAMT-Nt     ESEDPTSKECCYIWELLAMALNELVVEGLIEEEKVDSFNIPQYTPSPADVKYVVEKEGSF 278
SAMT_Cb     RSEDRASTECCLIWQLLAMALNQMVSEGLIEEEKMDKFNIPQYTPSPTEVEAEILKEGSF 272
JMT         RSLDPTTEESCYQWELLAQALMSMAKEGIIIEEKIDAFNAPYAAASSEELKMVIEKEGSF 296
BAMT        SVEDPSSKDDLAIFTLLAKTLVDMVAEGLVKMDDLVSFNIPYSPCTREVEAAILSEGSF 273
                    * : : . : * : * : : : : ** * * . . : : : : * : * : * :
                    .

MT1          TIDVLNTSEIHMD---SSDE-----YNVTQCMR 308
SAMT1       TIDVLNTSEIHMD---SSDE-----YNVTQCMR 308
NAMT        AIDVLKTSEIHMD---SSNE-----YNATQCMR 305
BSMT_Ns     TIDVLETSELHID---VSEDETCNTGRSGVQSDSHLCKDREKATPRDCINSD-NMANSLR 336
BSMT-Na     TIDVLETSELCID---VSEDETCNGTGPSDAQNDLHLRCRVQEMVTPQDCSNGEYNVAHCLR 337
SAMT-Nt     TINQLEATR VHWN---ACNDKYKNVG-----YSVSRQCMR 309
SAMT_Cb     LIDHIEASEIYWS---SCTKDGDDGGGSVEEEG-----YNVARQCMR 309
JMT         SIDRLEISPIDWEGGSISEESYDLAIRSKPEALAS-----GRRVSNTIR 340
BAMT        TLDRLVFRVCWDASDYTDQDPSIFGKQRSG-----KFVADCVR 316
                    : : : : : . . . . . : : * :
                    .

MT1          AFIEPLLVSHFGDELNMDQVFHKCREIFVSGIAKEKTTCINVVVSLTKTN- 358
SAMT1       AFIEPLLVSHFGDELNMDQVFHKCREIFVSGIAKEKTTCINVVVSLTKTN- 358
NAMT        AYTEPLVNVHFGDELNMDQVFHKCTEIFDNIIAKEKTTCINVVVSLTKTN- 355
BSMT_Ns     PLAEPPLLVSHFGTELNMDQVFNKCREIFVNCMAKEKTTFNTNVIISMTKRN- 386
BSMT-Na     AVTESLLVSHFGTELNMDQVFNKCREIFVNCMAKEKTTFNTNVIISMTKRN- 387
SAMT-Nt     AVAEPPLVVSQFGEEL-MDLVFHKYEQIIISECMSKAQTEFTNVIIVSLTKTN- 358
SAMT_Cb     AVAEPPLLDHFGEAI-IEDVFHRYKLLIIERMSKEKTKFINVIVSLIRKSD 359
JMT         AVVEPMLLEPTFGENV-MDELFFERYAKIVGEYFYVSSPRYAIIVLSLVRTG- 389
BAMT        AITEPMLASHFGSTI-MDLLFGKYAKKIVEHLSVENSSYFSIVVSLR-- 364
                    . * : : * : : : * : . . : . . : : * : :
                    .

```

Figura 20.

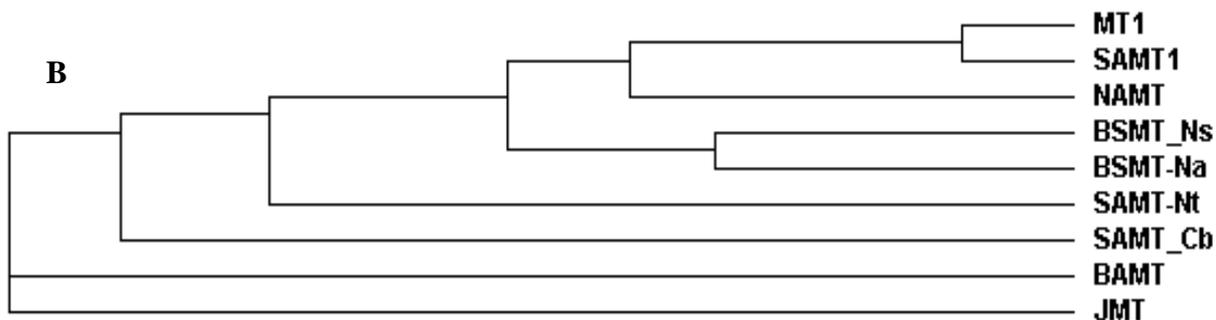


Figura 20. Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do cDNA MT1 (*NtJAMT*) e as sequências de outras metiltransferases de diferentes espécies vegetais. (A) Alinhamento das sequências de aminoácidos de metiltransferases do ácido salicílico de *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi* (SAMT1, número de acesso: FJ015052.1), *Clarkia breweri* (SAMT, número de acesso: AAF00108) e *N. tabacum* (número de acesso: AAW66850); do ácido benzóico: *Antirrhinum majus* (número de acesso: Q9FYZ9); do ácido jasmônico: *Arabidopsis thaliana* (número de acesso: AAG23343); dos ácidos benzóico e salicílico: *Nicotiana suaveolens* (número de acesso: AJ628349.1) e *Nicotiana alata* (número de acesso: GU014483.1) e do ácido nicotínico: *Nicotiana gossei* (número de acesso: GU169286.1). As cerquilhas sobre as sequências correspondem aos aminoácidos conservados relacionados à ligação ao substrato doador do grupamento metil (SAM); em cinza, aminoácidos conservados envolvidos na ligação aos substratos aceptores do grupamento metil, segundo Zubieta *et al.* (2003). “ * “, representa aminoácidos idênticos; “ : “, representa substituições conservadas; “ . “, representa substituições semi-conservadas. (B) Cladograma gerado a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos das metiltransferases, utilizando o programa ClustalW2.0.

O resultado do alinhamento (Figura 20A) mostrou uma alta identidade ao nível de sequência de aminoácidos entre o cDNA MT1 e as diferentes metiltransferases da família SABATH, de outras espécies vegetais, atuando em substratos diversificados. Além disso, é possível observar domínios altamente característicos e conservados, encontrados nessa classe de metiltransferases, tanto de ligação a SAM (cerquilhas, Figura 20A), quanto de ligação aos substratos aceptores do grupamento metil (em cinza, Figura 20A) (Zubieta *et al.*, 2003).

Uma análise *in silico*, realizada no dia 30/03/2010, utilizando o programa BLAST disponível no banco de dados do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), mostrou que a proteína codificada pelo cDNA MT1 apresentou porcentagens de identidade que variaram de 40% (mínima) a 99% (máxima). Alguns dos valores obtidos são mostrados a seguir: 40% para BAMT (*A. majus*), 40% para JMT (*A. thaliana*), 50% para SAMT (*C. breweri*), 60% para SAMT (*N. tabacum*), 81% para BSMT (*N. suaveolens*), e 99% para SAMT1 (*N. tabacum* cv. *Xanthi*). O cladograma representado na Figura 20B foi gerado a

partir do alinhamento observado na Figura 20A, e representa prováveis relações evolutivas entre o cDNA MT1, e as outras MTs SABATH. Ao se analisar a Figura 20B, observa-se que a proteína codificada por MT1 apresenta uma proximidade maior com SAMT1 de *N. tabacum* cv *Xanthi*, e com NAMT de *Nicotiana glauca*, como é demonstrado pela disposição dos clados.

5.4 Construção dos vetores pEXP17-MT1, pETSUMO-MT1, pET28a-46B11 e pET28a-134B02 para a produção de proteínas recombinantes em *E. coli*

5.4.1 Obtenção do vetor de expressão pEXP17-MT1, utilizando o sistema Gateway

O vetor de expressão, para a produção da proteína recombinante MT1 em *E. coli*, foi construído utilizando o sistema Gateway (Invitrogen), que trabalha com recombinação sítio-específica através de uma mistura de recombinases (Landy, 1989). Dessa forma, o sucesso da clonagem depende da incorporação bem-sucedida de seqüências específicas para o reconhecimento na reação de recombinação, flanqueando as extremidades do cDNA alvo. Assim, conforme descrito no item 4.9 do Material e Métodos, foram desenhados “primers” específicos, destinados à amplificação do cDNA MT1, via reação de PCR, para a entrada no sistema Gateway. A Figura 21 representa a corrida eletroforética em gel de agarose 1%, onde é possível visualizar os fragmentos de DNA amplificados após as duas reações de PCR iniciais, para a formação dos sítios attB de recombinação. Nas raias 1 e 2, respectivamente, podem ser visualizados os produtos do primeiro e segundo PCRs, referentes ao cDNA alvo. Na raia 2, o fragmento amplificado, após a segunda reação de PCR, apresenta-se com o tamanho de banda esperado (~ 1100pb), após a inserção dos sítios attB em suas extremidades.

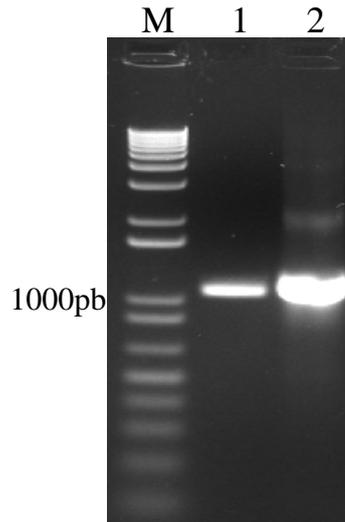
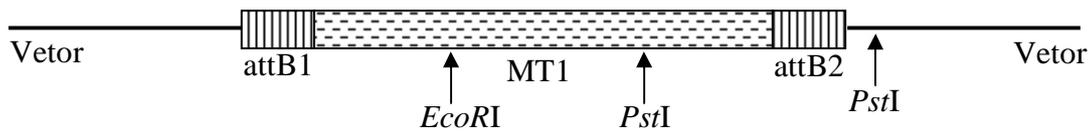


Figura 21. Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, mostrando os fragmentos de cDNA do clone MT1, resultantes das duas reações de PCR iniciais, para a entrada no sistema Gateway. Raia M: marcador de massa molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen); Raia 1: fragmento originado do primeiro PCR, com os “primers” p46B11-Ex1 e NCA3; Raia 2: fragmento originado do segundo PCR, amplificado com os “primers” BP1 e BP2, a partir da primeira reação de PCR, com o tamanho esperado (~1100pb).

Ao final da segunda reação de PCR, o fragmento de cDNA contém, em suas extremidades, as regiões de reconhecimento de recombinação (sítios attB1 e attB2), e pode ser inserido no vetor de entrada (pDONR201) do sistema Gateway, via reação BP. Os plasmídeos resultantes da reação BP foram utilizados para transformar células de *E. coli* DH10B e, após a transformação, mini-preparações de DNA plasmidial foram efetuadas.

Após a obtenção dos DNAs plasmidiais, fez-se a digestão enzimática deles com as enzimas *EcoRI* e *PstI*. Um desenho ilustrativo da digestão enzimática dos DNAs plasmidiais pode ser visto no esquema 2. Na Figura 22, são mostrados os resultados da digestão enzimática, onde é possível observar os tamanhos de bandas esperado (~2500pb, ~500pb e ~400pb), após a corrida eletroforética, em todas as 7 colônias independentes analisadas. Ainda na Figura, observa-se uma pequena diferença relacionada às bandas menores (~400pb e 500pb), quando se compara a amostra da raia 6, com as demais amostras.



Esquema 2. Representação esquemática, mostrando uma visão geral da digestão enzimática dos DNAs plasmidiais originados da reação BP. Vetor: seqüência pDONR201; attB1 e attB2: sítios de recombinação.

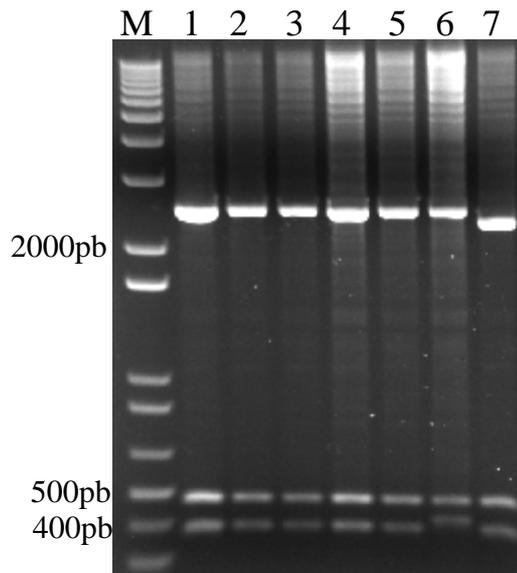
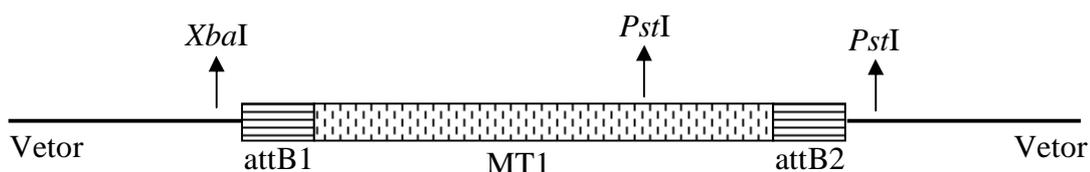


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, mostrando a digestão das mini-preparações de DNA, com as enzimas *EcoRI* e *PstI*. M: marcador de massa molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen). Raias 1 a 7: amostras de DNA plasmidial de 7 colônias independentes, obtidas após transformação de células DH10B, de *E. coli*. Na figura, observam-se os tamanhos de bandas esperados para o plasmídeo pENTRY-MT1 (~2500pb, ~500pb e ~400pb).

Além disso, é possível observar que a banda de tamanho maior (~2500pb), na raia 7, está um pouco mais baixa, quando comparada com a mesma banda das outras 6 amostras. Assim, após analisar as digestões, a amostra contida na raia 1 foi escolhida para a reação de sequenciamento. Ao final do sequenciamento, confirmou-se a recombinação entre o inserto, e o vetor de entrada, além da correta formação dos sítios attB de recombinação. Além disso, não houve nenhuma mutação que poderia acarretar mudança de fase de leitura do vetor obtido que, com isso, passou a ser denominado pENTRY-MT1.

O plasmídeo pENTRY-MT1 foi, então, utilizado para uma nova reação de recombinação do sistema Gateway, denominada de reação LR. Nessa reação, recombina-se o vetor pENTRY com um vetor de destino, nesse caso, o vetor pDEST17 de expressão de

proteínas recombinantes em *E. coli*. Ao final da reação LR, os plasmídeos resultantes foram utilizados para transformar células de *E. coli* DH10B e, após a transformação, mini-preparações de DNA plasmidial foram realizadas. Uma vez obtidos os DNAs plasmidiais, realizou-se a digestão enzimática deles com as enzimas *Xba*I e *Pst*I, cujo resultado pode ver observado na Figura 23. Um desenho ilustrativo da digestão enzimática dos DNAs plasmidiais pode ser visto no esquema 3.



Esquema 3. Representação esquemática, mostrando uma visão geral da digestão enzimática dos DNAs plasmidiais originados da reação LR. Vetor: seqüência pDEST17; attB1 e attB2: sítios de recombinação.

Na Figura 23, observam-se os tamanhos de bandas esperados (~3000pb, ~1600pb e ~900pb) em todas as 7 colônias independentes analisadas, após a corrida eletroforética. Ainda na figura, observa-se uma banda adicional de ~3000pb nas raias 3 e 5, que não aparece nas outras amostras, além de um excesso de DNA nas amostras das raias 2 e 6, que também não ocorre nas outras raias. Dessa forma, mesmo apresentando as três bandas esperadas após a digestão, as amostras das raias 2, 3, 5 e 6, foram descartadas. Após analisar as digestões, a amostra contida na raia 7 foi escolhida para a reação de seqüenciamento, que confirmou a recombinação entre o vetor pENTRY-MT1 e o vetor pDEST17. Além disso, não houve nenhuma mutação que poderia acarretar uma mudança de fase de leitura do plasmídeo obtido. Com isso, após ter sua seqüência confirmada por sequenciamento, tal plasmídeo passou a ser denominado pEXP17-MT1, e foi utilizado para transformar células de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta, adequadas para a expressão de proteínas recombinantes.

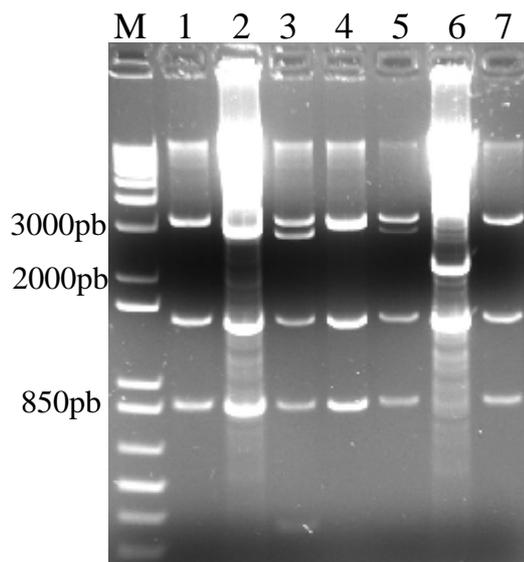


Figura 23. Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, mostrando a digestão das mini-preparações de DNA, com as enzimas *Xba*I e *Pst*I. M: marcador de massa molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen). Raias 1 a 7: amostras de DNA plasmidial de 7 colônias independentes, obtidas após transformação de células DH10B, de *E. coli*. Na figura, observam-se os tamanhos de bandas esperados para o plasmídeo pEXP17-MT1 (~3000pb, ~1600pb e ~900pb).

5.4.2 Obtenção do vetor de expressão pETSUMO-MT1, utilizando o sistema pETSUMO Champion^R

Para a clonagem do cDNA MT1 no vetor pET-SUMO (Invitrogen), inicialmente foi realizada uma reação de PCR utilizando “primers” específicos que pareiam no início do exon 1 (“primer” senso), e no final do exon 8 (“primer” reverso) (Tabela 1 do Material e Métodos). A Figura 24 representa um gel de agarose 1%, onde é possível visualizar o fragmento de cDNA MT1, na raia 1, amplificado após a reação de PCR, mostrando uma banda com o tamanho esperado (~1100pb). Após o resultado positivo da reação de PCR, foi utilizada a mesma estratégia de clonagem descrita no item 4.12 deste trabalho.

Após a clonagem e transformação do vetor recombinante em células de *E. coli* One Shot^R Mach1^{TR}-T1^R quimicamente competentes, foram obtidas colônias isoladas em placas de Petri contendo meio seletivo. Para checar se a clonagem foi bem-sucedida, 6 colônias independentes foram recuperadas da placa de Petri e utilizadas para a realização de PCRs de colônias, utilizando os “primers” pMT1_8E-Ex1 e pMT1_8E-Ex8. O resultado obtido após as PCRs de colônias pode ser visto na Figura 25.

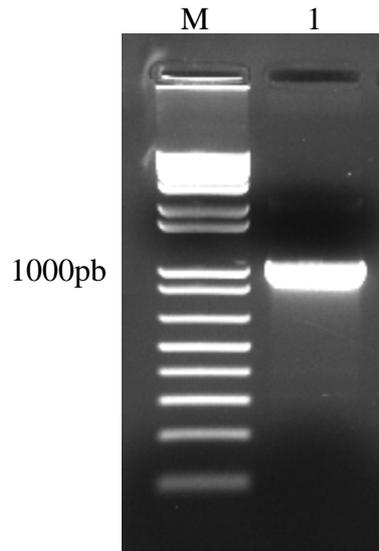


Figura 24. Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, mostrando a amplificação do fragmento de cDNA MT1, visando a clonagem em vetor pET-SUMO. M: marcador de massa molecular 1kb plus DNA ladder - Invitrogen; Raia 1: fragmento originado da reação de PCR, amplificado com os primers pMT1_8E-Ex1 e pMT1_8E-Ex8, com o tamanho de banda esperado (~1100pb).

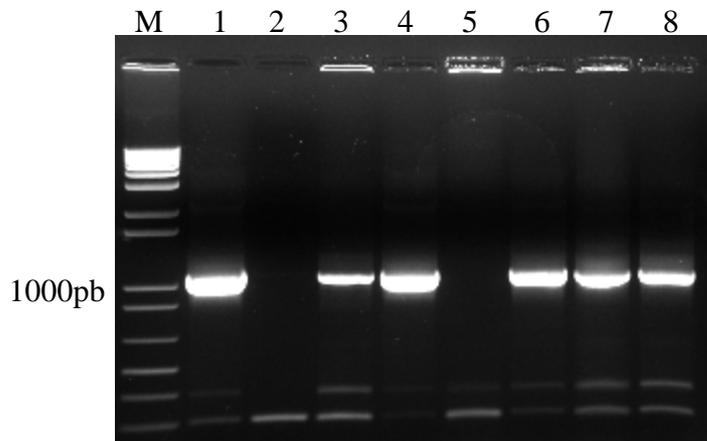


Figura 25. Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, mostrando o resultado das PCRs de 6 colônias independentes, visando checar se a clonagem do cDNA MT1 no vetor pET-SUMO havia sido bem-sucedida. M: marcador de massa molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen). Raia 1: controle positivo (DNA amplificado a partir do vetor pEXP17-MT1); raia 2: controle negativo (água, reagentes, menos o DNA); raias 3 a 8: DNAs amplificados a partir das 6 colônias independentes. É possível observar que apenas a amostra da colônia 3, aplicada na raia 5, não apresentou a banda com o tamanho esperado (~1100pb).

A Figura 25 representa o resultado obtido após as PCRs de 6 colônias independentes, realizadas para a confirmação da clonagem do cDNA MT1 no vetor pET-SUMO. Nas raias 1 e 2 encontram-se os controles positivo e negativo, mostrando a presença e ausência de bandas como o esperado. Nas raias de 3 a 8, estão as amostras de DNA amplificadas a partir das 6 colônias, evidenciando a banda com o tamanho esperado (~1100pb) em todas as amostras, com exceção da colônia 3 (raia 5). As bandas menores observadas na figura, com menos intensidade correspondem, provavelmente, a dímeros de “primers”. Com isso, a amostra aplicada na raia 4, referente à colônia 2, foi escolhida para o sequenciamento e continuidade dos experimentos. Após a reação de sequenciamento, confirmou-se a clonagem bem-sucedida, a construção resultante foi denominada pETSUMO-MT1 e foi, em seguida, utilizada para a transformação da linhagem de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta.

5.4.3 Obtenção dos vetores de expressão pET28a-46B11 e pET28a-134B02, utilizando o sistema pET

Para que os clones de cDNA 46B11 e 134B02 estivessem aptos para serem subclonados no vetor de expressão pET28a, foram necessárias as incorporações, via reação de PCR, de sítios de restrição nas extremidades dos dois insertos. Para tanto, foram desenhados um conjunto de “primers”, de forma que os “primers” senso adicionaram um sítio para a enzima *NdeI* na extremidade 5’ do cDNA 46B11, e um sítio para a enzima *AseI* na extremidade 5’ do cDNA 134B02. O “primer” reverso acrescentou um sítio para a enzima *BamHI* na extremidade 3’ de ambos os clones, após o último aminoácido sintetizado pela sequência dos cDNAs, e antes do códon de terminação. Tais enzimas foram escolhidas por estarem presentes no sítio múltiplo de clonagem do vetor pET28a, e por estarem ausentes nas sequências dos cDNAs 46B11 e 134B02, após verificação utilizando o programa “NEBcutter V2.0” (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>). Ao final das checagens, as subclonagens puderam então efetuadas.

Com isso, as Figuras 26 e 27 mostram, respectivamente, os resultados das ampliações por PCR dos cDNAs 46B11 e 134B02.

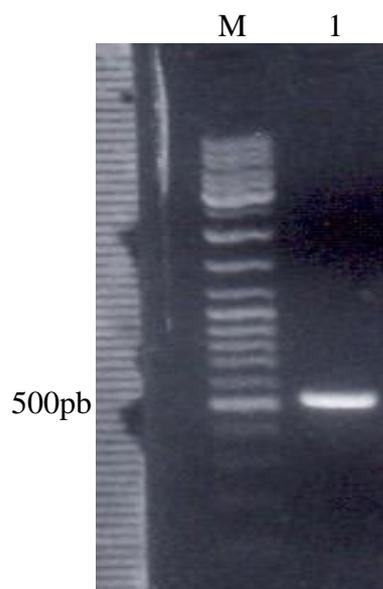


Figura 26. Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, mostrando a amplificação do fragmento de cDNA 46B11, visando a subclonagem em vetor pET28a. M: marcador de massa molecular Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas); Raia 1: fragmento originado por PCR, amplificado com os primers p46B11F e p46B11R, com o tamanho esperado (~500pb).

A Figura 26 apresenta um gel de agarose 1%, onde é possível visualizar o fragmento de cDNA 46B11, amplificado por PCR, que inseriu um sítio para a enzima *NdeI* na extremidade 5', na região do códon ATG de início de tradução, e um sítio *BamHI*, na extremidade 3', após o códon de terminação de tradução do cDNA. Na raia 1, pode ser visualizado o fragmento com o tamanho esperado (~ 500pb).

Na Figura 27 observa-se um gel de agarose 1%, onde é possível visualizar o fragmento de cDNA 134B02, amplificado por PCR que inseriu um sítio para a enzima *AseI* na extremidade 5', e um sítio *BamHI* na extremidade 3'. Na raia 1 pode ser visualizado o fragmento com o tamanho esperado (~ 300pb).

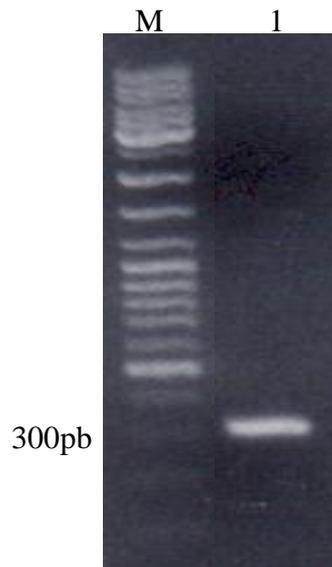


Figura 27. Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, mostrando a amplificação do fragmento de cDNA do clone 134B02, para a introdução dos sítios de restrição para *AseI* e *BamHI*. M: marcador de massa molecular Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas); Raia 1: fragmento originado por PCR, amplificado com os “primers” p134B02AseI e p134B02R, com o tamanho esperado (~300pb).

Após as subclonagens e transformações dos vetores recombinantes em células DH10B de *E. coli*, mini-preparações de DNA plasmidial foram realizadas, a partir de colônias isoladas obtidas em placas de Petri contendo meio seletivo. Os resultados encontrados, após as digestões das construções pET28a-46B11 e pET28a-134B02, podem ser observados nas Figuras 28 e 29.

A análise da Figura 28, correspondente a digestão da construção pET28a-46B11, permite observar, além das bandas com o tamanho esperado (~5300pb para o vetor, e ~500pb para o inserto), três bandas adicionais com tamanhos variando entre 1200pb e 4000pb. Essas bandas adicionais não eram esperadas e, para se confirmar esse resultado, foram realizadas mais duas digestões dessa amostra, utilizando as mesmas enzimas. Entretanto, os resultados das duas digestões adicionais mostraram o mesmo padrão de bandas observado na Figura 28 (dados não mostrados). Esse foi um resultado inesperado, uma vez que as enzimas escolhidas para a subclonagem estavam presentes apenas no sítio múltiplo de clonagem do vetor, e não estavam presentes na sequência do inserto. Com isso, foi realizado o sequenciamento do vetor pET28a-46B11, o qual confirmou a ligação correta do cDNA 46B11 ao vetor pET28a, não havendo nenhuma mutação que alterasse a

fase de leitura da construção, e que impediria a expressão correta da proteína recombinante.

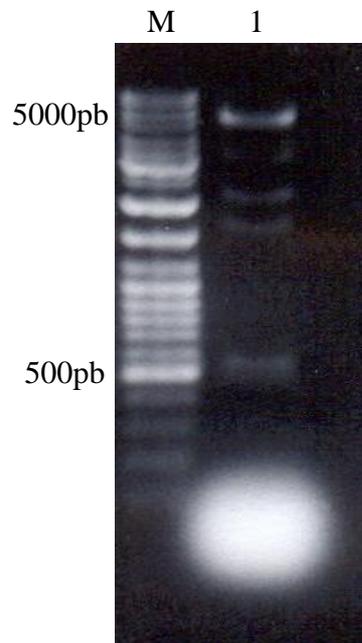


Figura 28. Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, mostrando a digestão do clone pET28a-46B11 com as enzimas *NdeI* e *BamHI*. M: marcador de massa molecular Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas) Raia 1: amostra de DNA plasmidial de uma colônia isolada obtida.

Para a construção pET28a-134B02, inicialmente, foram realizadas digestões com as enzimas de restrição *XbaI* e *PstI* das amostras de DNA plasmidial de 12 colônias independentes, obtidas após a transformação. A eletroforese em gel de agarose 1% permitiu observar a presença do inserto com o tamanho esperado (~300pb) em apenas 3 amostras (8, 9 e 10). Entretanto, provavelmente em função do pequeno tamanho dos insertos liberados, a visualização não estava muito nítida, de forma que uma segunda digestão, somente com as 3 amostras positivas, foi realizada, aumentando-se a quantidade de DNA. O resultado dessa nova digestão pode ser visto na Figura 29, eu confirma a presença das bandas com o tamanho esperado (~5000pb para o vetor, e ~300pb para o inserto), nas raias 2, 4 e 6.

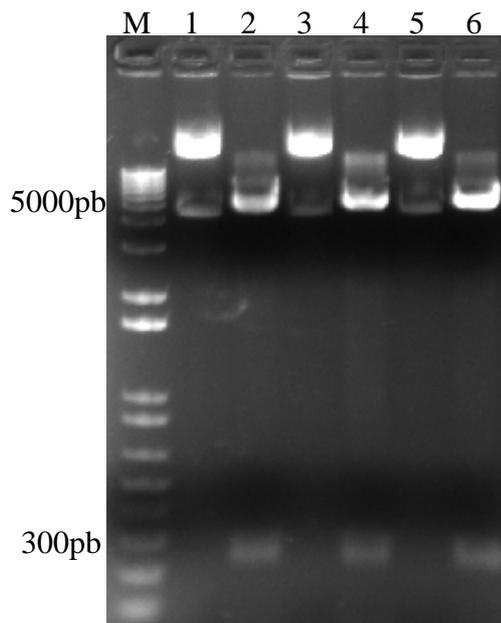


Figura 29. Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, mostrando a digestão das mini-preparações de DNA 8, 9 e 10, referentes ao clone pET28a-134B02. M: marcador de massa molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen). Raias 1, 3 e 5: DNA plasmidial não digerido das amostras 8, 9 e 10; raias 2, 4 e 6: DNA plasmidial das amostras 8, 9 e 10, respectivamente, digerido com as enzimas *XbaI* e *PstI*, onde é possível observar a presença do inserto com o tamanho esperado (~300pb).

A amostra de número 10 (raia 6) foi escolhida para ser seqüenciada e foi denominada pET28a(10)-134B02. Ao final do sequenciamento, constatou-se a inserção correta dos sítios de restrição das enzimas utilizadas, nas extremidades do cDNA 134B02, permitindo a correta ligação com o vetor pET28a, não havendo nenhuma mutação que alterasse a fase de leitura da construção, o que impediria a expressão correta da proteína recombinante.

Assim, as construções pET28a-46B11 e pET28a-134B02 estavam prontas para a transformação de células de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta, apropriadas para a produção de proteínas recombinantes.

5.5 Produção das proteínas recombinantes pEXP17-MT1, pETSUMO-MT1, pET28a-46B11 e pET28a-134B02

5.5.1 Expressão das construções pEXP17-MT1 e pETSUMO-MT1 em células de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta

Os insertos clonados nos vetores pEXP17-MT1, pETSUMO-MT1, pET28a-46B11 e pET28a-134B02 foram submetidos a uma análise quanto à presença, em suas sequências, de códons raramente usados pela maquinaria de tradução de *E. coli* (<http://www.doe-mbi.ucla.edu/~sumchan/caltor.html>). Os resultados das análises indicaram a presença de 34 códons raros nas construções contendo o cDNA MT1, 14 códons raros no cDNA 46B11, e 11 códons raros no cDNA 134B02. Estes resultados foram a base para a escolha da linhagem BL21(DE3) Rosetta de *E. coli* para a expressão das quatro construções acima citadas. A linhagem BL21(DE3) Rosetta possui um plasmídeo adicional, que contém cópias extras de genes para tRNAs utilizados com menor frequência pela maquinaria de tradução da *E. coli*, tais como AGG e AGA para arginina, AUA para isoleucina, CUA para leucina, CCC para prolina e GGA para glicina. É derivada de cepas BL21 mutantes, contendo uma mutação no gene *lacZY* (*lacY1* permease), a qual pode levar todas as células na cultura a níveis ajustáveis de expressão protéica. Tal regulação, associada a temperaturas mais baixas de expressão (ex. 20°C), pode auxiliar e intensificar a solubilidade, favorecendo a manutenção da atividade da proteína de interesse (Novagen, 2002).

Assim, células de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta foram transformadas com os vetores pEXP17-MT1 e pETSUMO-MT1 por eletroporação, e colônias isoladas para as duas construções foram obtidas em meio seletivo. Uma colônia isolada de cada vetor recombinante foi recuperada e cultivada por toda a noite, sob agitação, em 5 mL de meio LB, suplementado com os antibióticos ampicilina e cloranfenicol (pEXP17-MT1) e canamicina e cloranfenicol (pETSUMO-MT1). O antibiótico cloranfenicol é aqui utilizado como marcador de seleção para o plasmídeo contendo os genes para os RNAs transportadores dos códons raros nesta linhagem. Assim, após a indução da expressão e lise celular (itens 4.22 e 4.23 do Material e Métodos), os extratos protéicos foram submetidos à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

A Figura 30 apresenta os resultados obtidos após a aplicação dos extratos protéicos das frações sobrenadante e precipitado, resultantes da indução da expressão da proteína

recombinante pEXP17-MT1 (rMT1), variando-se temperatura e tempo de indução (37°C, por 3hs e 22°C, por 20hs). A análise do gel permite verificar a presença da banda com a massa esperada da proteína recombinante pEXP17-MT1 (~42,7kDa), apenas na fração precipitada, nas raias 1 e 2, conforme indicado pela seta. A massa da proteína foi calculada com base na seqüência do cDNA MT1 (39,9kDa), que juntamente com os aminoácidos do sítio attB1 de recombinação, e da “tag” de histidinas, presentes na região N-terminal da proteína (2,8kDa), resultou em uma massa total esperada de 42,7kDa. Observa-se ainda que na raia 2, correspondente à indução da expressão por 20hs, a 22°C, a quantidade de proteína recombinante é visivelmente maior, quando se compara com a raia 1. Nas raias 3 e 4, correspondentes a fração sobrenadante, não é possível observar a presença da banda da proteína recombinante. Para a confirmação desse resultado, foi realizado um experimento de western blot, por este ser mais sensível e apresentar maior especificidade, utilizando um anticorpo primário anti-histidinas. Entretanto, ao final do experimento de blot, a membrana apresentou uma marcação muito tênue, visível apenas nas raias contendo as amostras da fração precipitada (dados não mostrados). Esse fato pode estar relacionado com uma grande produção da proteína recombinante, provavelmente na forma de corpos de inclusão. Os corpos de inclusão são o resultado da agregação de proteínas recombinantes mal-dobradas, ou dobradas incorretamente, quando produzidas em altas taxas dentro das células de *E. coli* (Sorensen & Mortensen, 2005). A possível formação inadequada da estrutura da proteína pode ter ocultado a “tag” de histidinas, que é expressa em fusão N-terminal com a proteína recombinante. Como para a reação de blot foi utilizado um anticorpo primário anti-histidinas, o dobramento incorreto da proteína recombinante pode ter interferido negativamente na reação antígeno-anticorpo, o que resultou na fraca marcação da membrana após revelação.

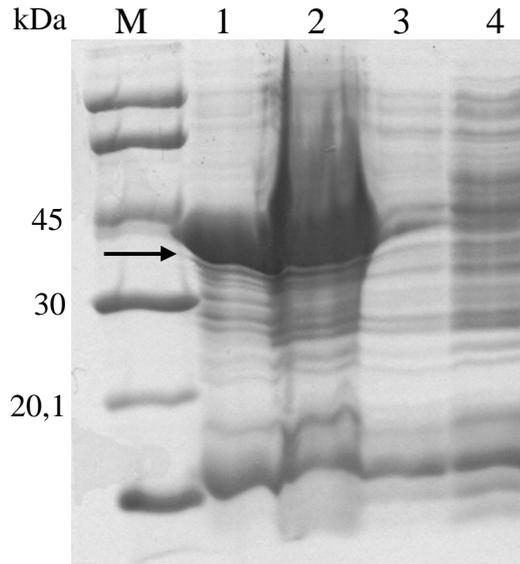


Figura 30. SDS-PAGE 12,5% corado com Coomassie blue, contendo as frações sobrenadante e precipitado, resultantes da indução de expressão do clone pEXP17-MT1, em *E. coli* BL21(DE3) Rosetta. M: marcador de massa molecular (LMW calibration – GE); Raias 1 e 2: frações insolúveis (precipitado), com 3hs de indução, a 37°C, e 20hs de indução, a 22°C, respectivamente; raias 3 e 4: frações solúveis (sobrenadante), com 3hs de indução, a 37°C, e 20hs de indução, a 22°C, respectivamente. A seta indica a presença da proteína MT1 recombinante apenas na fração insolúvel do extrato celular.

A Figura 31 representa os resultados obtidos após a aplicação dos extratos protéicos referentes às frações sobrenadante, resultantes da indução da expressão da proteína recombinante pETSUMO-MT1 (rS-MT1) por 4hs, a 25°C. A análise do gel permite visualizar a presença de uma banda com a massa esperada da proteína recombinante (~53kDa), nas raias 2 e 3, conforme indicado pelas setas. A massa da proteína foi calculada com base na seqüência do cDNA MT1 (39,9kDa), que foi acrescida dos aminoácidos da “tag” de histidinas e da proteína SUMO, expressas em fusão N-terminal com o cDNA MT1, que adicionaram 13kDa, resultando em uma massa total esperada de ~53kDa. Observa-se ainda que, na raia 1, onde foi aplicada a fração correspondente antes da aplicação do indutor (T-0h), a banda indicada pela seta nas raias 2 e 3 não está presente. Para a confirmação desse resultado, foi realizado um experimento de western blot (Figura 32), utilizando um anticorpo primário anti-histidinas.

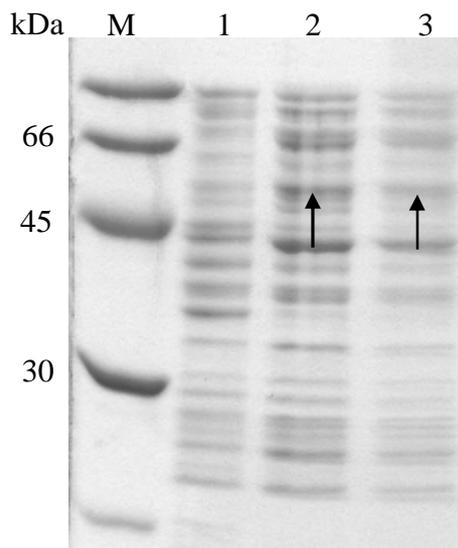


Figura 31. SDS-PAGE 12,5% corado com Coomassie blue, contendo as frações sobrenadante e T-0h (antes do indutor), resultantes da indução de expressão do clone pETSUMO-MT1, em *E. coli* BL21(DE3) Rosetta. kDa: massa em kiloDaltons; M: marcador de massa molecular (LMW calibration – GE); Raia 1: extrato protéico, antes da aplicação do indutor (T-0h); raias 2 e 3: frações solúveis (sobrenadante), com 4hs de indução, a 25°C. As setas indicam a presença da proteína rS-MT1 na fração solúvel do extrato celular.

Na Figura 32, a raia 1 contém o extrato protéico referente ao T-0h, antes da aplicação do indutor. É possível observar a sutil marcação de uma banda na altura esperada para a proteína rS-MT1 e que corresponde, possivelmente, a um “background”, ou a um nível baixíssimo de expressão basal. Nas raias 2 e 3, observa-se a presença das bandas referentes à proteína rS-MT1, com a massa esperada (53kDa), obtida a partir do extrato protéico solúvel, indicado pelas setas. O resultado obtido com a expressão do cDNA MT1 no vetor pET-SUMO foi extremamente satisfatório. Anteriormente, diversos esforços já haviam sido empregados para obter a proteína MT1 recombinante solúvel, utilizando a construção pEXP17-MT1, mas nenhum resultado positivo havia sido alcançado. Dessa forma, ficou evidente que a mudança para o vetor pET-SUMO, além de outras alterações realizadas no protocolo de indução, fez toda a diferença na obtenção da proteína MT1 recombinante de forma solúvel.

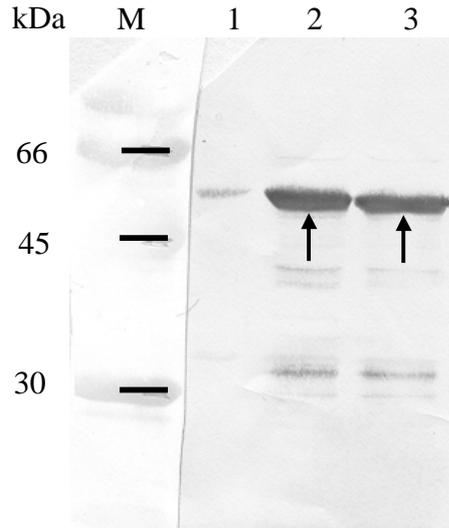


Figura 32. Análise de western blot mostrando a presença das bandas da proteína rS-MT1, obtida por expressão em BL21(DE3) Rosetta. Todas as amostras contêm 1µg de proteína total. kDa: massa em kiloDaltons; M: padrão de massa molecular (LWM calibration - GE); Raia 1: amostra retirada antes da aplicação do indutor, correspondente ao T-0h (pré-indução); Raias 2 e 3: fração sobrenadante (solúvel) após indução por 4hs, a 25°C. As setas indicam a presença da proteína rS-MT1 nas raias 2 e 3.

Após ser expressa, a proteína rS-MT1 foi submetida a um protocolo de purificação. Para tanto, 50mL da fração sobrenadante (solúvel), obtidos após lise da cultura celular, foram aplicados em uma coluna contendo a resina de níquel. Após equilíbrio e lavagem da resina, a proteína rS-MT1 foi eluída em um gradiente de concentração de imidazol, que variou de 150mM a 300mM. Para cada concentração de imidazol, foram coletadas 8 a 9 frações contendo 1,5mL cada, que foram, posteriormente, analisadas em SDS-PAGE. A Figura 33 representa o SDS-PAGE onde foram aplicadas as amostras obtidas após a eluição da proteína recombinante com 150mM de imidazol, como demonstrativo do ensaio. Em todas as outras concentrações de imidazol utilizadas, a proteína rS-MT1 foi eluída com sucesso.

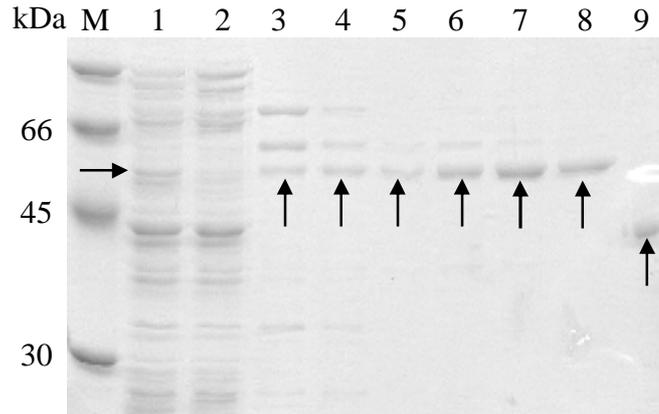


Figura 33. Ensaio de purificação da proteína rS-MT1, através de cromatografia de afinidade por níquel, representado em SDS-PAGE 12,5%, corado com Coomassie blue. kDa: massa em kiloDaltons; M: marcador de massa molecular (LMW calibration – GE); raia 1: extrato protéico antes da passagem pela resina; raia 2: extrato protéico após passagem pela resina, na coluna (“flow-through”); raias 3 e 4: lavagem da resina com 60mM e 100mM de imidazol, onde as setas indicam a prévia presença da banda da proteína eluída da resina; raias 5 a 8: frações ímpares coletadas após a eluição de rS-MT1 com 150mM de imidazol; raia 9: proteína rMT1 (~42,7kDa) utilizada como controle positivo do ensaio. A presença da proteína rS-MT1 é indicada pelas setas, nas raias de 5 a 8.

Na Figura 33, a raia 1 contém a amostra da proteína rS-MT1 antes de passar pela resina de níquel, onde a seta indica a presença da proteína que não é mais observada na raia 2, correspondente a amostra do “flow-through”. As raias 3 e 4 contêm, respectivamente, as amostras obtidas após lavagem da resina com 60mM e 100mM de imidazol, onde é possível observar a presença da banda com a massa esperada para a proteína rS-MT1. Em geral, proteínas contendo cauda de histidinas não são eluídas da coluna de níquel em baixas concentrações de imidazol. Possivelmente, o que ocorreu neste caso é que a resina poderia estar fracamente carregada com níquel, o que diminuiu a força iônica, levando a uma fraca interação entre a cauda de histidinas presente na proteína, e o níquel presente na resina, ocasionando um desligamento prematuro da proteína da resina. As raias de 5 a 8 contêm as frações ímpares, da proteína recombinante rS-MT1 (indicada pela seta), eluída da coluna com 150mM de imidazol, com a massa molecular esperada (~53kDa). A raia 9 contém a amostra da proteína rMT1 (~42,7kDa), utilizada como controle positivo. Os valores de massa diferentes da proteína rS-MT1 e rMT1 ocorrem devido aos diferentes vetores de clonagens utilizados para a expressão do cDNA MT1 e suas respectivas proteínas de fusão. Com isso, para confirmar a identidade das bandas observadas nas raias

3 e 4 da Figura 33, um experimento de western blot foi realizado e o resultado pode ser visto na Figura 34.

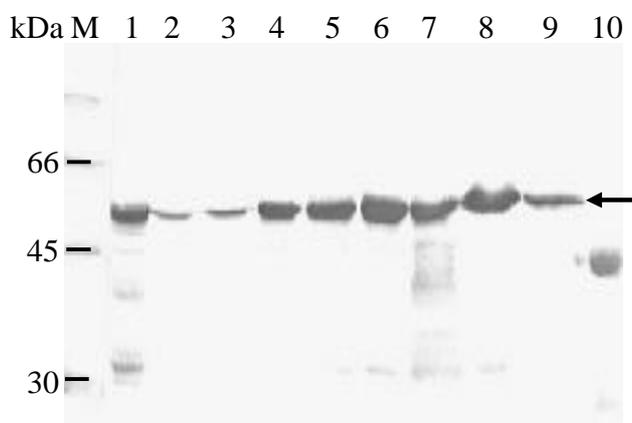


Figura 34. Análise por western blot mostrando a presença das bandas da proteína rS-MT1, obtidas após ensaio de purificação por cromatografia de afinidade em resina de níquel. kDa: massa em kiloDaltons; M: padrão de massa molecular (LWM calibration - GE); raia 1: fração sobrenadante antes de passar pela resina; raia 2: fração sobrenadante após passar pela resina (“flow-through”); raias 3, 4 e 5: lavagem da resina com 40mM, 60mM e 100mM de imidazol, respectivamente; raias 6, 7, 8 e 9: alíquotas da proteína rS-MT1 eluída com 150mM, 200mM, 250mM e 300mM de imidazol, respectivamente; raia 10: proteína rMT1 utilizada como controle positivo da reação. A seta indica a presença da proteína rS-MT1 com a massa esperada (~53kDa) nas raias de 1 a 9.

Na Figura 34, a raia 1 contém a amostra da fração celular sobrenadante, antes da passagem pela resina de níquel. Na raia 2, correspondente a amostra da fração sobrenadante após passagem pela resina (“flow-through”), é possível observar uma banda com a massa esperada da proteína rS-MT1, entretanto com uma fraca intensidade. As raias 3, 4 e 5 contêm as amostras das lavagens da resina com 40mM, 60 mM e 100mM, respectivamente, onde se confirmou a presença da proteína rS-MT1 a partir da lavagem com 40mM (raia 3), apesar da baixa intensidade da marcação quando comparada com as raias 4 e 5. Esse resultado sustenta ainda mais a hipótese de que a resina estava fracamente carregada com níquel, levando a uma fraca interação da cauda de histidinas da proteína com o níquel da resina, o que pode explicar também a presença da proteína rS-MT1 na amostra do “flow-through” (raia 2). As raias de 6 a 9 contêm alíquotas das frações eluídas com 150mM, 200mM, 250mM e 300mM, respectivamente, onde a seta indica a presença da banda da proteína rS-MT1 com a massa esperada, mostrando que o procedimento de purificação foi bem-sucedido. A amostra eluída com 200mM, aplicada na raia 7, apresenta

algumas bandas adicionais com massa molecular menor do que a proteína rS-MT1 correspondendo, possivelmente, a um “background” do ensaio, ou a possíveis proteínas da *E. coli* que possuem aminoácidos histidinas em suas sequências. A raia 10 contém a amostra da proteína rMT1 utilizada como controle positivo, mostrando uma banda com a massa molecular esperada (~42,7kDa). Após o resultado de western blot, as frações totais eluídas com 150mM e 250mM de imidazol (Figura 34, raias 6 e 8, respectivamente), foram reunidas em único frasco e utilizadas em um ensaio de re-purificação. Para este novo ensaio, a resina de níquel foi tratada e posteriormente carregada com íons níquel, para aumentar sua força iônica, visando um aumento na eficiência desse novo procedimento de purificação. Após equilíbrio e lavagem da resina, a proteína rS-MT1 re-purificada foi eluída uma única vez, na presença de 250mM de imidazol. Após a eluição, foi realizado um procedimento de concentração da proteína, utilizando um concentrador Millipore contendo uma membrana com valor de “cut-off” 10, ou seja, toda proteína com massa de 10kDa ou menos seria eliminada, favorecendo a concentração apenas da proteína de interesse. Além disso, o procedimento de concentração visou também eliminar o imidazol presente na solução, uma vez que este composto poderia interferir no ensaio enzimático *in vitro*, no qual a proteína rS-MT1 seria utilizada. O resultado do procedimento de concentração pode ser visto na Figura 35.

Na Figura 35, a raia 1 contém a amostra re-purificada de rS-MT1, eluída com 250mM de imidazol, antes de ser concentrada. As raias 2, 3 e 4 contêm, respectivamente, as amostras da fração eluída da proteína recombinante após passagem pelo concentrador (“flow-through”), e as amostras recuperadas das lavagens 1 e 2 da membrana contida no concentrador. A raia 5 contém a amostra de rS-MT1 após sua concentração, mostrando que este procedimento foi bem-sucedido (compare a intensidade das bandas observadas nas raias 1 e 5, antes e depois da concentração, respectivamente). A raia 6 contém a amostra da proteína rS-MT1, eluída com 300mM de imidazol, utilizada como controle positivo do ensaio. Assim, ao final do ensaio, a proteína concentrada foi quantificada pelo método de Bradford e, em seguida, utilizada nos ensaios enzimáticos *in vitro*.

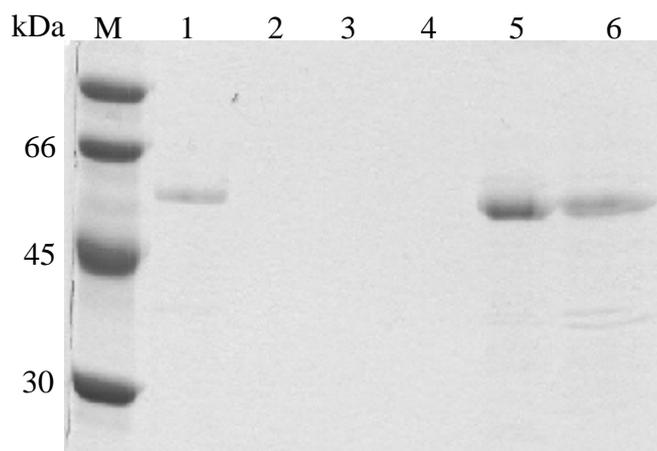


Figura 35. Ensaio de concentração da proteína rS-MT1, após re-purificação e eluição com 250mM de imidazol, representado em SDS-PAGE 12,5%, corado com Coomassie blue. kDa: massa em kiloDaltons; M: marcador de massa molecular (LMW calibration – GE); raia 1: fração eluída da proteína rS-MT1, com 250mM de imidazol, antes da concentração; raia 2: amostra da fração eluída após passar pela membrana do concentrador Millipore (“flow-through”); raias 3 e 4: amostras correspondentes às lavagens 1 e 2 da membrana do concentrador; raia 5: amostra da proteína rS-MT1 após a concentração; raia 6: amostra da proteína rS-MT1, eluída com 300mM de imidazol, utilizada como controle positivo.

5.5.2 Expressão das construções pET28a-46B11 e pET28a-134B02 em células de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta

Células de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta foram transformadas com os vetores pET28a-46B11 e pET28a-134B02 por eletroporação, e colônias isoladas para as duas construções foram obtidas em meio seletivo. Uma colônia isolada de cada vetor recombinante foi recuperada e cultivada por toda à noite, sob agitação, em 5 mL de meio LB, suplementado com os antibióticos canamicina e cloranfenicol. Os extratos protéicos obtidos para as duas construções foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

A Figura 36 representa as frações precipitada (insolúvel) e sobrenadante (solúvel), para os tempos T-0h antes da indução e os tempos T1, T3, T5 e T20hs após a indução, para a proteína recombinante pET28a-46B11 (r46B11). A análise do gel permite visualizar a presença da banda com a massa esperada da proteína recombinante pET28a-46B11 (r46B11, ~21,4kDa), apenas na fração precipitada, nas raias de 6 a 9, conforme indicado pela seta. Ainda é possível observar que, nas raias 7 e 9, as bandas se apresentam mais intensas e correspondem as culturas induzidas por 3hs, a 37°C, e por 20hs, a 20°C,

respectivamente. Nas raias de 2 a 5, correspondentes à fração sobrenadante, não é possível observar a presença da banda da proteína recombinante. A massa da proteína foi calculada com base na seqüência do cDNA 46B11 (19,2kDa), que é produzida como proteína de fusão com alguns aminoácidos da seqüência do vetor e a “tag” de histidinas na região N-terminal da proteína, resultando na adição de 2,2kDa e uma massa total esperada de 21,4kDa. Para a confirmação desse resultado, foi realizado um experimento de western blot, cujo resultado pode ser visto na Figura 37.

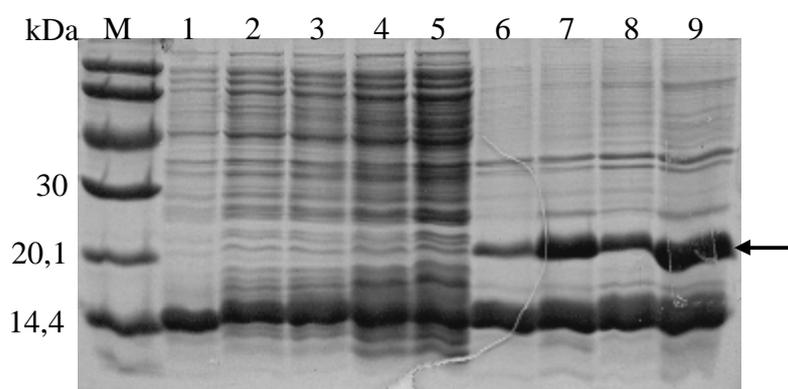


Figura 36. SDS-PAGE 12,5%, corado com Coomassie blue, contendo as frações sobrenadante e precipitada, resultantes da expressão do clone pET28a-46B11 em *E. coli* BL21(DE3) Rosetta. kDa: massa em kiloDaltons; M: marcador de massa molecular (LMW calibration – GE); Raia 1: T-0h, pré-indução (sobrenadante + precipitado); Raias 2 a 5: frações sobrenadante (2 e 3, T1h e T3hs, a 37°C, respectivamente; 4 e 5, T5hs e T20hs, a 20°C, respectivamente); Raias 6 a 9: fração precipitada (6 e 7, T1h e T3hs, a 37°C, respectivamente; 8 e 9, T5hs e T20hs, a 20°C, respectivamente).

Na Figura 37, a raia 1 contém os extratos protéicos das frações precipitada+sobrenadante, obtidas antes da aplicação do indutor, que foram utilizadas como um controle pré-indução, e correspondem ao T-0hs. As raias 2 e 3 correspondem, respectivamente, às amostras de precipitado após a indução por 3hs, a 37°C, e por 20hs, a 20°C. As raias 4 e 5 correspondem, respectivamente, às amostras de sobrenadante, após a indução por 3hs, a 37°C, e por 20hs, a 20°C. A raia 6 contém a amostra da proteína recombinante pEXP17-46B11 produzida em BL21(DE3) Rosetta, por 3hs, a 37°C, e que foi utilizada como controle positivo da reação.

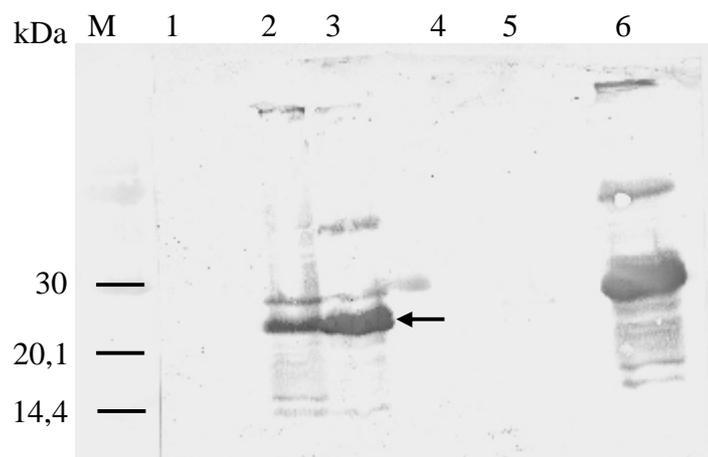


Figura 37. Análise de western blot mostrando a presença das bandas da proteína r46B11, obtidas após a expressão em BL21(DE3) Rosetta. Todas as amostras apresentam 5µg de proteína total. kDa: massa em kiloDaltons; M: padrão de massa molecular (LWM calibration - GE); raia 1: amostra de precipitado+sobrenadante, retirada antes da aplicação do indutor, correspondente ao T-0h (pré-indução); Raias 2 e 3: precipitado após indução por 3hs, a 37°C, e após 20hs, a 20°C, respectivamente; Raias 4 e 5: sobrenadante após indução por 3hs, a 37°C, e após 20hs, a 20°C, respectivamente; Raia 6: amostra de precipitado induzido por 3hs, a 37°C, em BL21(DE3) Rosetta, correspondente a proteína recombinante pEXP17-46B11, utilizada como controle positivo do experimento. A seta indica a presença da banda da proteína r46B11 apenas na fração celular insolúvel, nas raias 2 e 3.

Analisando a figura, é possível observar que a banda correspondente à proteína r46B11 com a massa esperada de (~21,4kDa), encontra-se apenas na fração celular insolúvel (precipitada), nas raias 2 e 3. As raias 4 e 5, correspondentes à fração celular sobrenadante (solúvel), não apresentaram nenhuma marcação na membrana. A análise da membrana de western blot, mostrada na Figura 34, confirma os resultados obtidos após a coloração com Coomassie Blue, onde foi possível detectar a presença da banda da proteína r46B11 apenas na fração celular insolúvel (precipitada), evidenciando a ausência total de bandas da proteína na fração celular solúvel (sobrenadante). Mesmo quando a cultura foi cultivada na temperatura de 20°C, por 20hs, a proteína continuou insolúvel, provavelmente na forma de corpos de inclusão.

As análises de SDS-PAGE e western blot, para a proteína recombinante pET28a-134B02 (r134B02), são apresentadas nas Figuras 38 e 39, respectivamente. A Figura 38 representa os resultados obtidos após a aplicação dos extratos protéicos das frações sobrenadante e precipitado, resultantes da indução da expressão da proteína r134B02,

variando-se temperatura e tempo de indução (37°C, por 3hs e 22°C, por 20hs). A análise do gel nos permite visualizar uma banda, presente em grande quantidade, e com a massa esperada da proteína recombinante (~13,3kDa), na fração precipitada, nas raias 1 e 2, conforme indicado pela seta. A massa da proteína foi calculada com base na seqüência do cDNA 134B02 (11,1kDa), que juntamente com outros aminoácidos presentes no vetor, além da “tag” de histidinas adicionada à região N-terminal da proteína, acrescenta 2,2kDa a proteína recombinante, chegando-se à massa total esperada (13,3kDa).

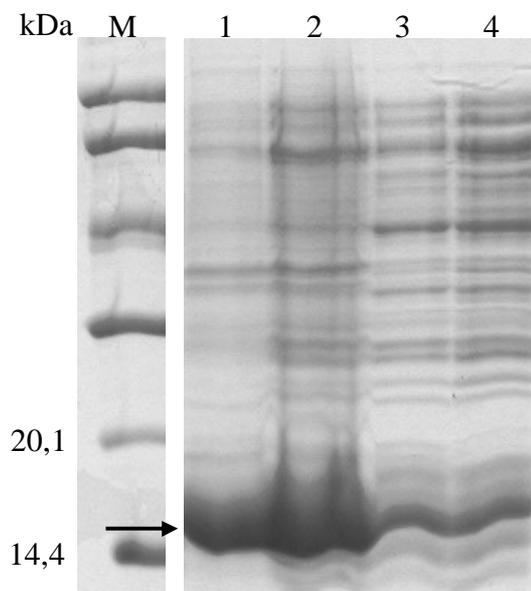


Figura 38. SDS-PAGE 12,5% corado com Coomassie blue, contendo as frações sobrenadante e precipitado, resultantes da indução de expressão do clone pET28a-134B02, em *E. coli* BL21(DE3) Rosetta. kDa: massa em kiloDaltons; M: marcador de massa molecular (LMW calibration – GE); raias 1 e 2: frações insolúveis (precipitado), com 3hs de indução, a 37°C, e 20hs de indução, a 22°C, respectivamente; raias 3 e 4: frações solúveis (sobrenadante), com 3hs de indução, a 37°C, e 20hs de indução, a 22°C, respectivamente. A seta indica a presença da banda correspondente à proteína r134B02.

Observa-se ainda que na raia 2, correspondente à indução da expressão por 20hs, a 22°C, a quantidade de proteína recombinante é visivelmente maior, quando se compara com a raia 1. Nas raias 3 e 4, correspondentes às frações sobrenadante, é possível visualizar bandas com uma intensidade bem menor, mas que estão na mesma altura que era esperada para a banda da proteína r134B02. Para a confirmação desse resultado, foi realizado um experimento de western blot, utilizando um anticorpo primário anti-histidinas, cujo resultado pode ser visto na Figura 39. A análise da figura permite observar

a presença da banda da proteína recombinante tanto na fração celular insolúvel (precipitada), quanto na fração celular solúvel (sobrenadante), conforme indicado pela seta. As maiores quantidades de proteína, entretanto, são observadas nas raias 2 e 3, correspondentes a fração celular insolúvel (precipitada). Adicionalmente, é possível observar que a 37°C, há uma maior quantidade de proteínas na fração precipitada (insolúvel, raia 2), e que a 22°C, a quantidade de proteínas é maior na fração sobrenadante (solúvel, raia 5). A ausência da proteína recombinante na raia 1 era esperada, uma vez que esta amostra corresponde ao extrato protéico celular obtido antes da aplicação do indutor.

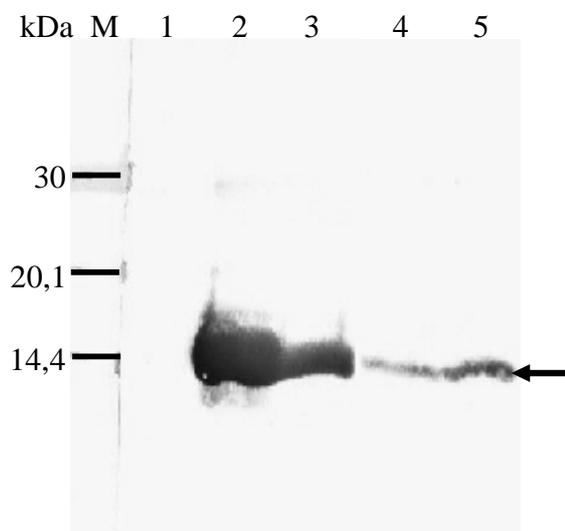


Figura 39. Análise por western blot mostrando a presença das bandas da proteína r134B02, obtidas após a expressão em *E. coli* BL21(DE3) Rosetta. Todas as amostras contêm 1µg de proteína total. kDa: massa em kiloDaltons; M: padrão de massa molecular (LWM calibration - GE); raia 1: amostra de precipitado+sobrenadante, retirada antes da aplicação do indutor, e corresponde ao T-0h (pré-indução); raias 2 e 3: precipitado após indução por 3hs, a 37°C, e após 20hs, a 22°C, respectivamente; Raias 4 e 5: sobrenadante após indução por 3hs, a 37°C, e após 20hs, a 22°C, respectivamente. A seta indica a presença da proteína r134B02 nas raias de 2 a 5.

5.6 Ensaios enzimáticos *in vitro*, utilizando as proteínas rMT1, r46B11, r134B02 e rS-MT1 na presença de diferentes substratos

5.6.1 Ensaios enzimáticos em meio de cultura utilizando as proteínas rMT1, r46B11 e r134B02

Para a realização dos ensaios enzimáticos utilizando a proteína rMT1, foi escolhido um ensaio enzimático simplificado, no qual os diferentes substratos são adicionados diretamente ao meio de cultura (Barkman *et al.*, 2007). Nestes ensaios realizados para outras metiltransferases da família SABATH, pressupõe-se a capacidade do substrato em penetrar na célula, de seu produto ser liberado da célula e a fonte da molécula de SAM é o próprio ambiente interno celular da *E. coli*. Ao final, os compostos metilados de interesse são identificados através das técnicas de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) (Ross *et al.*, 1999; Negre *et al.*, 2002; Barkman *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008).

Para a realização dos ensaios enzimáticos com rMT1, primeiramente realizou-se a expressão heteróloga da proteína recombinante em cultura bacteriana. Células de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta foram transformadas com o vetor pEXP17-MT1 por eletroporação, e colônias isoladas foram obtidas em meio seletivo. Uma colônia isolada foi recuperada e cultivada por toda a noite, sob agitação, em 5 mL de meio LB, suplementado com ampicilina e cloranfenicol. Assim, após a indução da expressão (item 4.22 do Material e Métodos), os diferentes ácidos utilizados nos ensaios (ácidos salicílico, benzóico, jasmônico e dihidrojasmônico), cujas estruturas podem ser observadas na Figura 40, foram adicionados ao meio de cultura em quantidades equimolares (10mM), em frascos erlenmeyers separados. Ao término do ensaio, aos sobrenadantes dos meios de cultura, obtidos após centrifugação, foi adicionado hexano para a extração dos compostos metilados de interesse. Após a extração, a fração hexano foi utilizada para a análise por CG-EM e as corridas foram analisadas nos modos “*Full Scan*” e “*SIM*”. Os cromatogramas, mostrados nas Figuras 41, 42 e 43, foram obtidos após a realização das corridas no modo de análise “*Full Scan*”. Três replicatas biológicas foram realizadas para cada ensaio. Os experimentos foram realizados simultaneamente e de forma idêntica com um controle negativo, constituído de uma cultura bacteriana expressando outra proteína recombinante, sem atividade de metiltransferase, a partir do mesmo vetor, disponível em nosso laboratório (Material e Métodos, item 4.22).

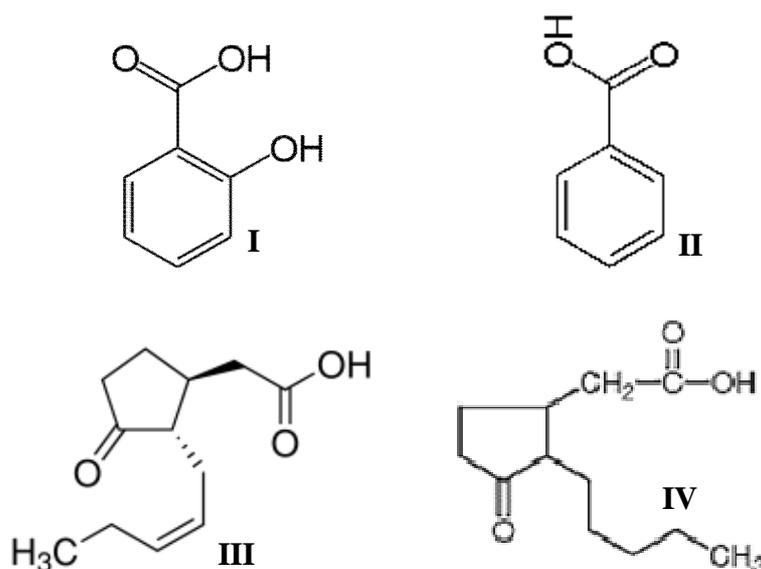


Figura 40. Representação das estruturas químicas dos ácidos salicílico (I), benzóico (II), jasmônico (III) e dihidrojasmônico (IV), utilizados como substratos durante os ensaios enzimáticos realizados com a proteína rMT1.

A Figura 41 representa os perfis cromatográficos das análises por CG-EM obtidos após o ensaio enzimático realizado com o ácido salicílico. No cromatograma 41A, a seta indica a presença de um pico muito pequeno correspondente ao composto MeSa, o qual foi eluído no mesmo tempo de retenção observado para o composto MeSa padrão (9,6 minutos) (41B). No cromatograma 41C observam-se os três íons principais do composto MeSa, e seus respectivos números de massa m/z (92, 120 e 152) (Biblioteca NIST – National Institute of Standard and Technology), confirmando a identidade do composto produzido. O cromatograma apresentado na Figura 41D corresponde a corrida do controle negativo, onde nenhum pico correspondente ao composto MeSa é observado no tempo 9,6 minutos, referente ao composto MeSa padrão, conforme indicado pela seta.

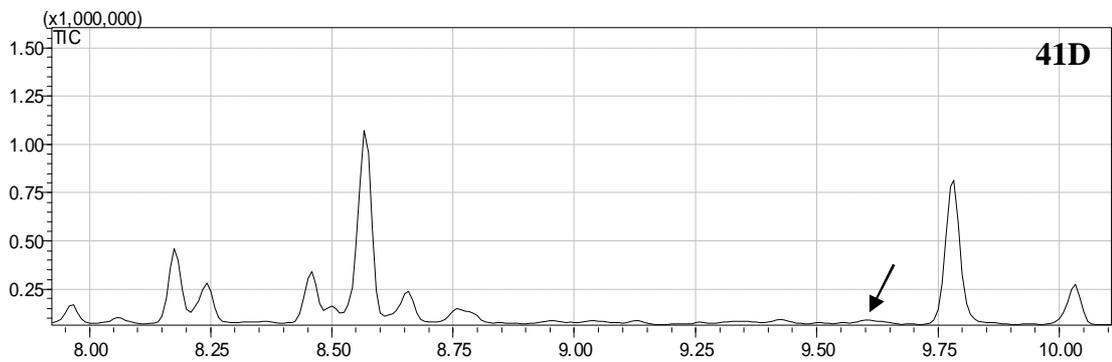
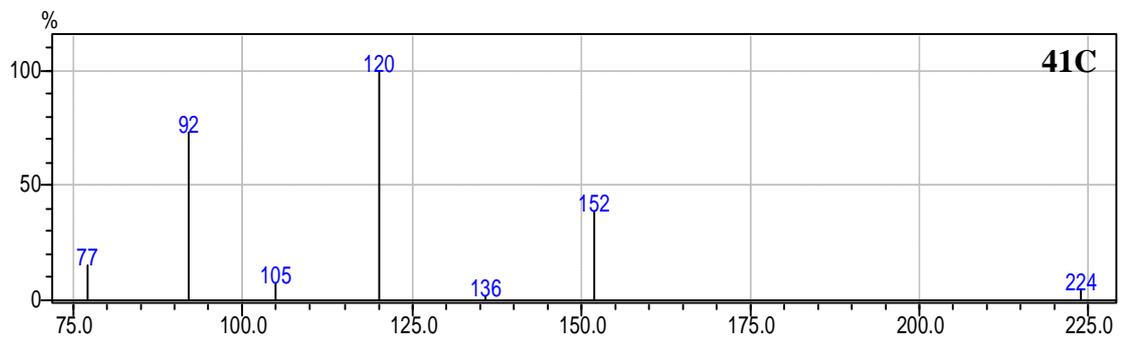
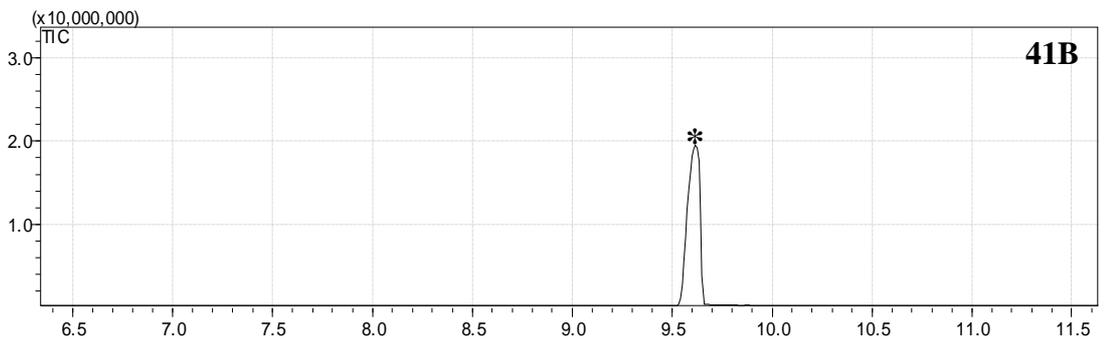
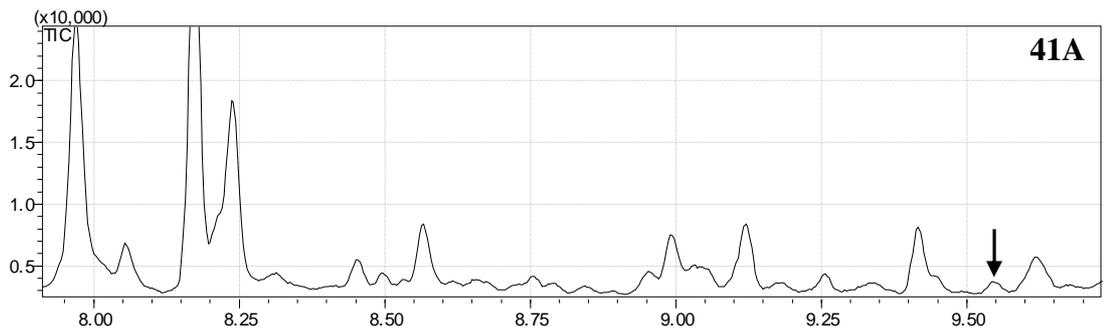
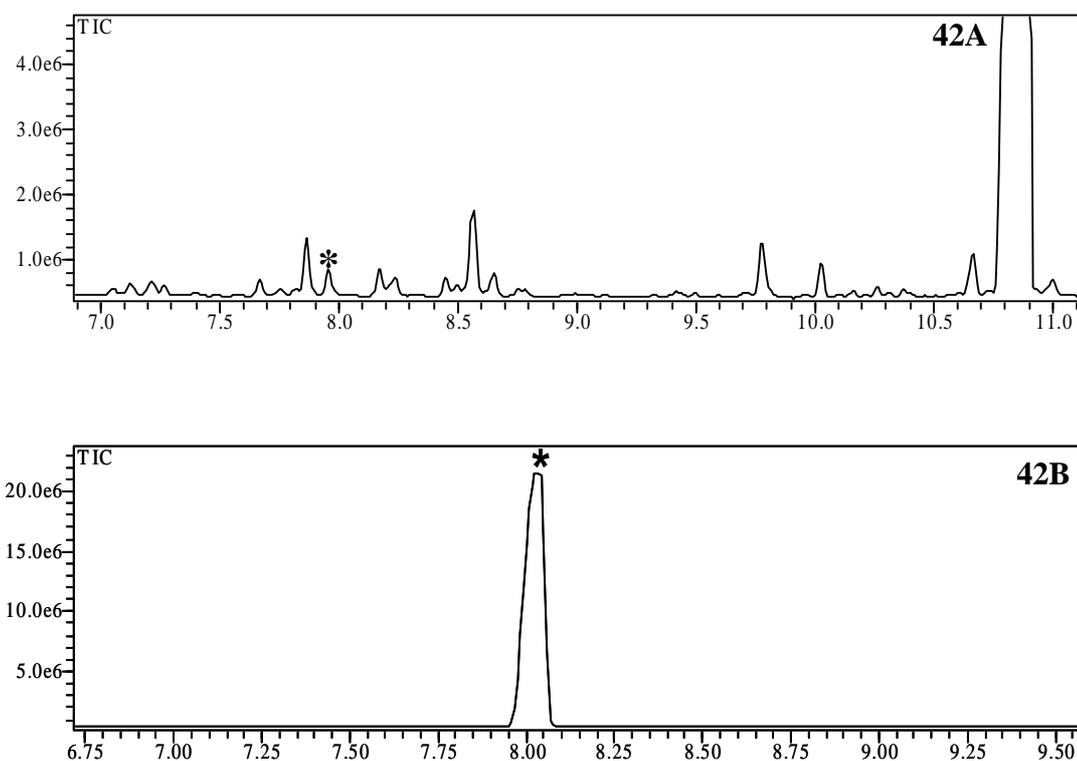


Figura 41.

Figura 41. Identificação do composto MeSa, extraído do meio de cultura celular com hexano, após ensaio enzimático utilizando a proteína rMT1, na presença de 10mM de ácido salicílico. No cromatograma representado em 41A, a seta indica um pico muito pequeno do composto referente ao composto MeSa, no mesmo tempo de retenção do MeSa padrão (9,6 minutos), indicado por um * no cromatograma 41B; 41C corresponde ao cromatograma contendo os três íons principais de massa m/z 92, m/z 120 e m/z 152 do MeSa, confirmando a identidade do composto extraído do meio de cultura. O perfil cromatográfico correspondente ao controle negativo é observado em 41D, onde a seta indica a ausência de um pico referente ao MeSa.

A Figura 42 representa os perfis cromatográficos das análises por CG-EM obtidos após o ensaio enzimático realizado com o ácido benzóico. No cromatograma 42A, o asterisco (*) indica a presença de um pico correspondente ao composto MeBa, obtido após a extração com hexano a partir do meio de cultura celular, no mesmo tempo de retenção observado para o composto MeBa padrão (8,0 minutos – 42B). No cromatograma 42C observam-se os três íons principais do composto MeBa, e seus respectivos números de massa m/z (77, 105 e 136) (Biblioteca NIST), confirmando a identidade do composto. O cromatograma 42D representa a análise realizada para o controle negativo, onde a seta indica a ausência de um pico correspondente ao MeBa, no mesmo tempo de retenção do MeBa padrão.



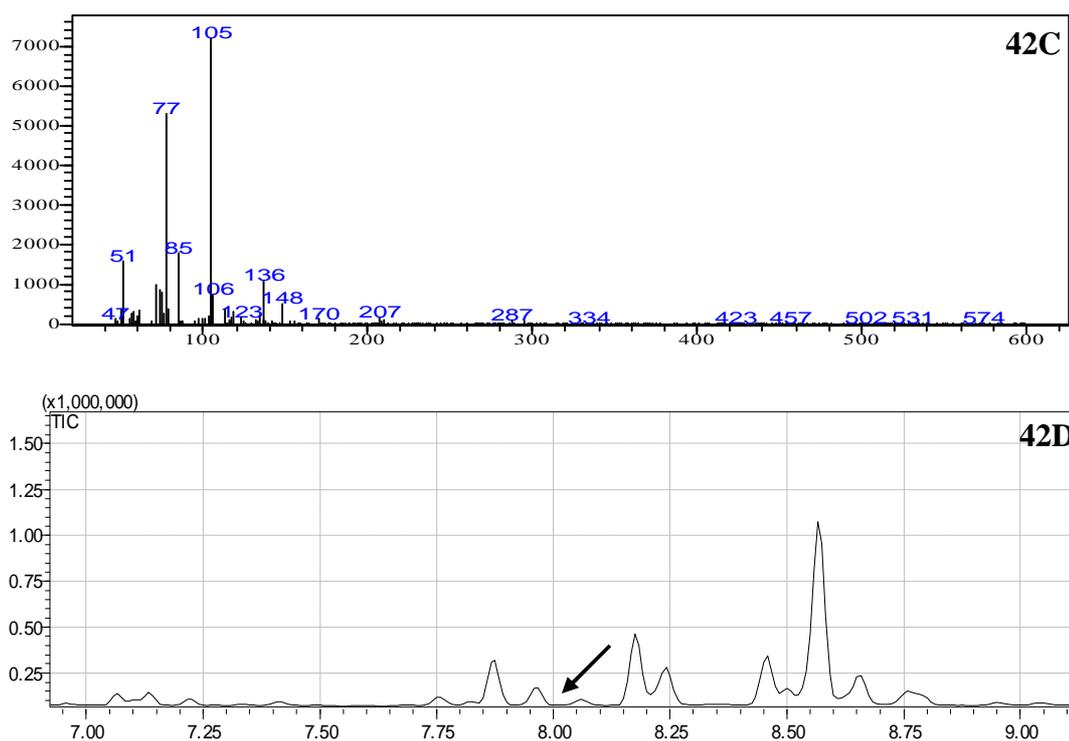


Figura 42. Identificação do composto MeBa, extraído do meio de cultura celular com hexano, após ensaio enzimático utilizando a proteína rMT1, na presença de 10mM de ácido benzóico. No cromatograma representado em 42A, o * indica o pico correspondente ao composto MeBa, no mesmo tempo de retenção do MeBa padrão (8,0 minutos), indicado também por um * no cromatograma 42B; 42C corresponde ao cromatograma contendo os três picos principais de massa m/z 77, m/z 105 e m/z 136 do MeBa, confirmando a identidade do composto extraído do meio de cultura. O perfil cromatográfico correspondente a análise do controle negativo é observado na Figura 42D.

A Figura 43 representa os perfis cromatográficos das análises por CG-EM obtidos após o ensaio enzimático realizado com o ácido jasmônico. No cromatograma 43A, o asterisco (*) identifica a presença de um pico correspondente ao composto MeJa, obtido após a extração com hexano a partir do meio de cultura celular, no mesmo tempo de retenção observado para o composto MeJa padrão (15,40 minutos) (43B). O cromatograma 43C contém os três picos principais do composto MeJa, e seus respectivos números de massa m/z (83, 151 e 224) (Biblioteca NIST), confirmando a identidade do composto. No cromatograma 43D está representado o perfil cromatográfico obtido após a corrida do controle negativo, onde a seta indica a ausência de um pico correspondente ao MeJa, eluindo no mesmo tempo de retenção do composto padrão (15,40 minutos).

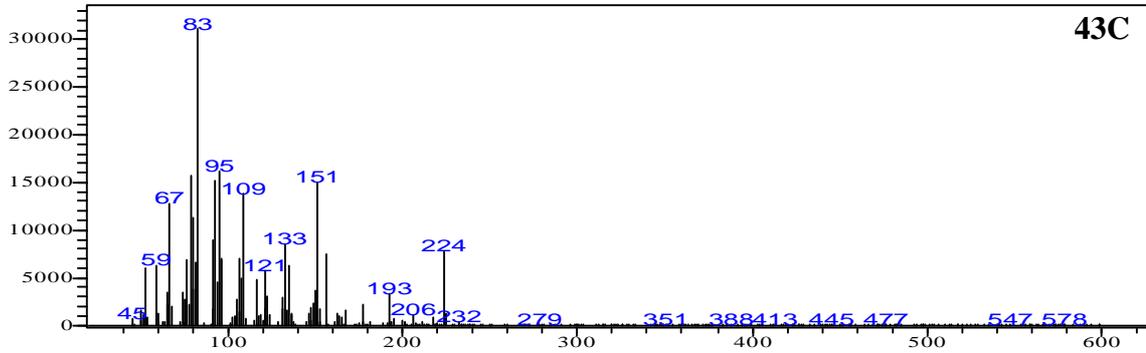
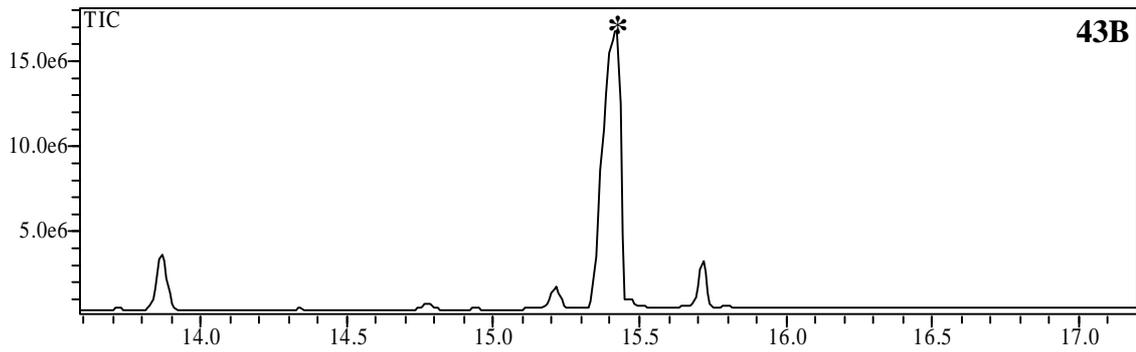
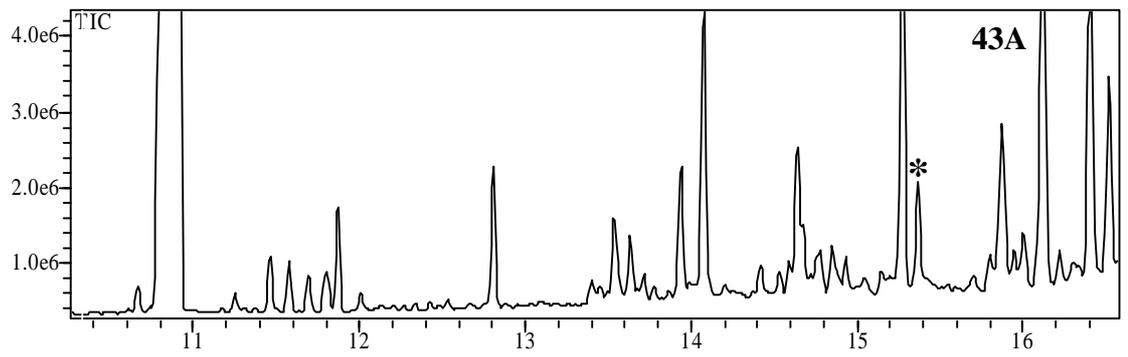


Figura 43.

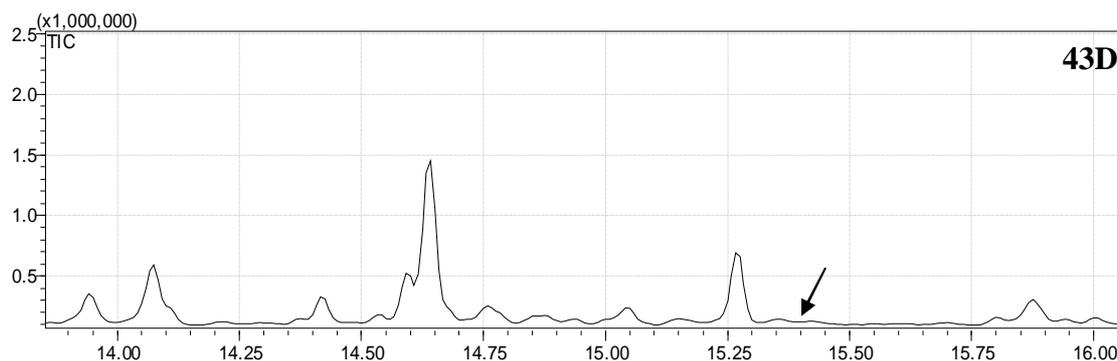


Figura 43. Identificação do composto MeJa, extraído do meio de cultura celular com hexano, após ensaio enzimático utilizando a proteína rMT1, na presença de 10mM de ácido jasmônico. No cromatograma representado em 43A, o * indica o pico correspondente ao composto MeJa, no mesmo tempo de retenção do composto MeJa padrão (15,40 minutos), indicado também por um * no cromatograma 43B; 43C corresponde ao cromatograma contendo os três picos principais de massa m/z 83, m/z 151 e m/z 224 do MeJa, confirmando a identidade do composto extraído do meio de cultura. O cromatograma 43D corresponde ao perfil cromatográfico obtido após a corrida do controle negativo.

Os experimentos também foram realizados utilizando como substrato o ácido dihidrojasmônico. Entretanto, o composto dihidroMeJa não foi detectado em nenhum dos ensaios realizados em meio de cultura, após a análise por CG-EM.

5.6.2 Ensaio de competição por diferentes substratos em meio de cultura bacteriana

Após os resultados satisfatórios obtidos nos primeiros experimentos, ensaios de competição por diferentes substratos foram realizados. Para essas análises, foram adicionados ao meio de cultura, dois ácidos diferentes em cada frasco, após a indução da expressão da proteína rMT1. Estes ensaios foram propostos com base nos resultados obtidos nos ensaios iniciais em meio de cultura, uma vez que MT1 apresenta 99% de identidade com uma metiltransferase que atua sobre o ácido salicílico (SAMT1), mas mostrou maior atividade catalítica quando o ácido jasmônico foi usado como substrato. Neste momento, uma observação se faz necessária: o ácido dihidrojasmônico não foi

utilizado nos ensaios de competição, uma vez que o composto dihidroMeJa não foi detectado em nenhum dos outros ensaios anteriormente realizados.

Assim, nesses novos ensaios foi feita a adição de dois ácidos diferentes em cada frasco, contendo a cultura celular induzida, com o objetivo de analisar a “preferência” de metilação da enzima recombinante na presença de dois substratos distintos e para eliminar possíveis variações ocorridas em diferentes culturas, permitindo comparações entre as quantidades dos produtos liberados. Foram, então, adicionados os ácidos salicílico e benzóico (frasco 1), salicílico e jasmônico (frasco 2), benzóico e jasmônico (frasco 3), além de um quarto frasco, onde foram adicionados os três ácidos juntos. Hexano foi novamente utilizado para a extração dos compostos a partir do meio de cultura. Com isso, a fração hexano foi utilizada para a análise por CG-EM, nos modos “*Full Scan*” e “*SIM*”, e os resultados obtidos são mostrados a seguir.

Na Figura 44A, a linha preta corresponde ao perfil cromatográfico obtido após a corrida no modo de análise “*Full Scan*”, e a linha rosa corresponde ao perfil cromatográfico obtido após a corrida no modo “*SIM*”. Por isso, devido à maior sensibilidade na análise, os compostos de interesse indicados por um asterisco nas Figuras 44 e 45, aparecem com um pico maior representado pela cor rosa, correspondente à análise feita no modo “*SIM*”. Assim, a Figura 44 representa os perfis cromatográficos das análises por CG-EM obtidos após o ensaio enzimático de competição entre os ácidos salicílico e jasmônico, em meio de cultura bacteriano. No cromatograma 44A, é possível observar apenas a presença do pico correspondente ao composto MeJa, representado por um asterisco (*), no mesmo de tempo de retenção do MeJa padrão (15,40 minutos, em 44B). A Figura 44C representa o cromatograma contendo os três principais íons e seus respectivos números de massa (83, 151 e 224), correspondentes ao composto MeJa (Biblioteca NIST), confirmando a identidade do produto. Não há nem um pico visível no cromatograma 44A correspondente ao tempo 9,6 minutos, conforme indicado pela seta, referente ao composto MeSa. O perfil cromatográfico observado em 44D corresponde ao controle negativo, onde a seta indica a ausência do MeJa, no tempo de retenção esperado.

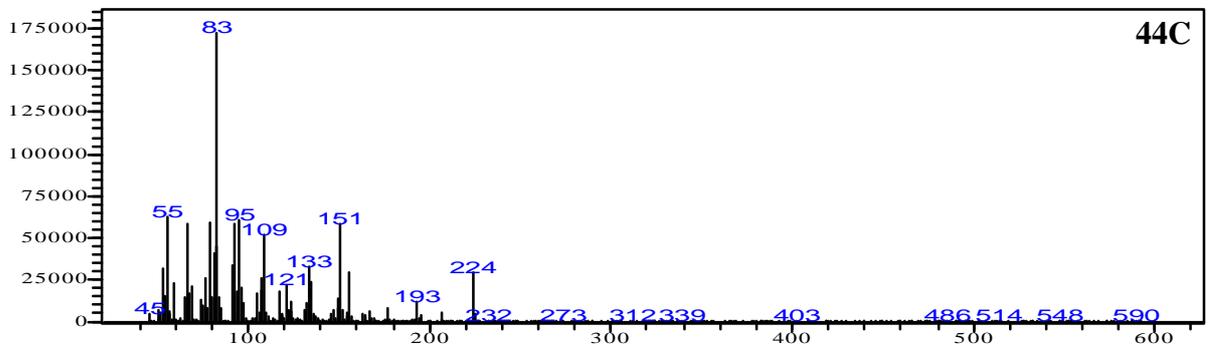
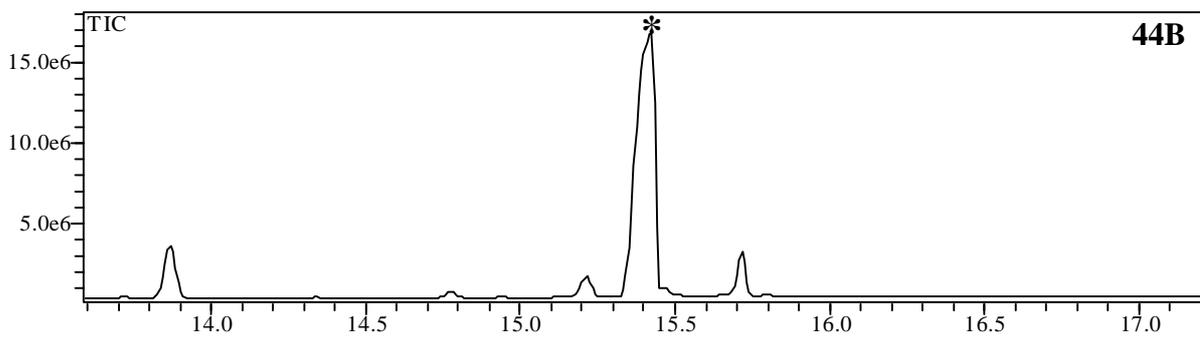
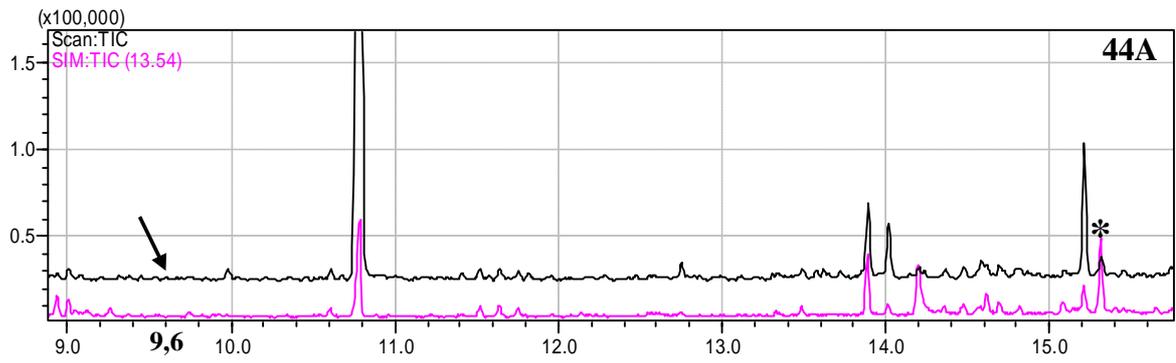


Figura 44.

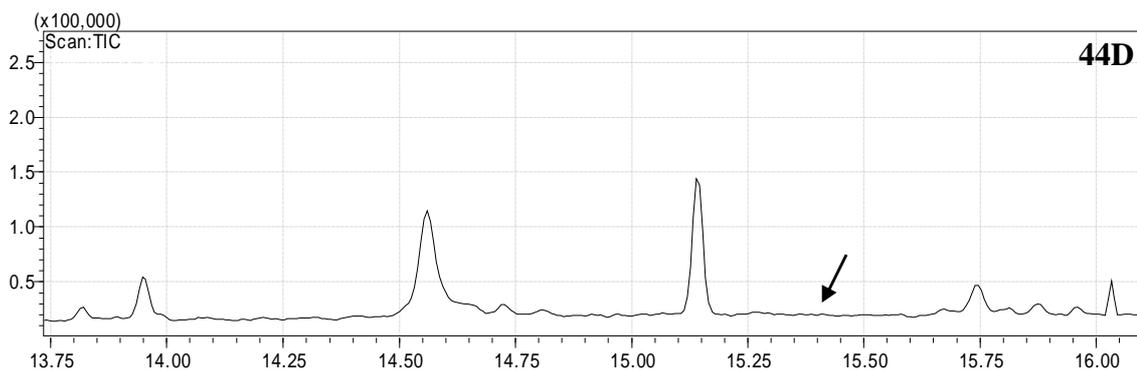


Figura 44. Identificação do composto MeJa, após ensaio de competição enzimática entre os ácidos salicílico e jasmônico, na presença da proteína rMT1. Os dois ácidos foram adicionados ao mesmo frasco, na concentração de 10mM cada e, em seguida, os compostos foram extraídos com hexano a partir do meio de cultura. No cromatograma representado em 44A, o * indica a presença do pico correspondente ao composto MeJa, no mesmo tempo de retenção do MeJa padrão (15,40 minutos), indicado também por um * no cromatograma 44B; 44C corresponde ao cromatograma contendo os três íons principais de massa (m/z 83, m/z 151 e m/z 224), confirmando a identidade do composto MeJa. Não foi identificado nenhum pico no tempo de retenção igual a 9,6 minutos, correspondente ao composto MeSa, conforme indicado pela seta no cromatograma 44A. O cromatograma 44D representa a análise do controle negativo, onde a seta indica a ausência do MeJa.

A Figura 45 representa os perfis cromatográficos das análises por CG-EM obtidos após o ensaio enzimático de competição entre os ácidos benzóico e jasmônico, em meio de cultura bacteriano. No cromatograma 45A, é possível observar a presença apenas do pico correspondente ao composto MeJa, representado por um asterisco (*), no mesmo de tempo de retenção do MeJa padrão (15,40 minutos, em 45B). O cromatograma 45C representa os três principais íons e seus respectivos números de massa (83, 151 e 224), correspondentes ao composto MeJa (Biblioteca NIST), confirmando a identidade do produto. O composto MeBa, que apresenta tempo de retenção igual a 8,0 minutos, não foi detectado ao final da análise por CG-EM, conforme indicado pela seta (Figura 45A). O perfil cromatográfico representado na Figura 45D corresponde ao controle negativo, onde não foi detectado nenhum pico referente ao MeJa, conforme indicado pela seta. No frasco 1, onde foram adicionados os ácidos salicílico e benzóico, não foram detectados por CG-EM os compostos metilados correspondes a ambos os ácidos.

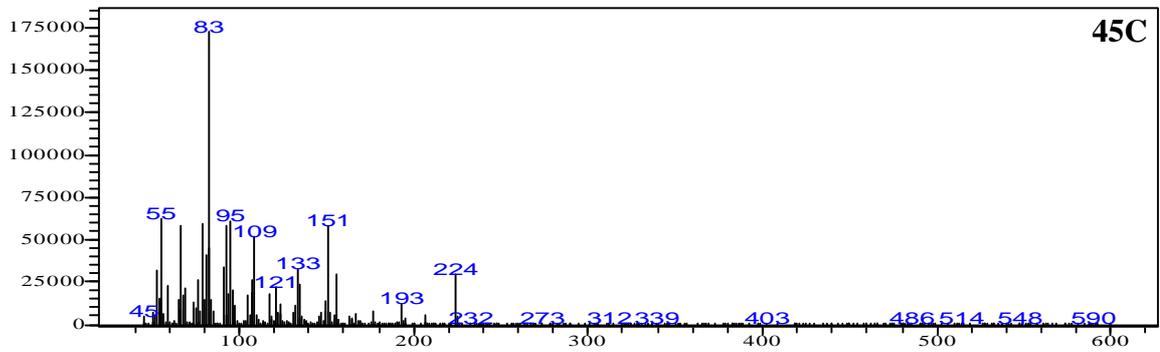
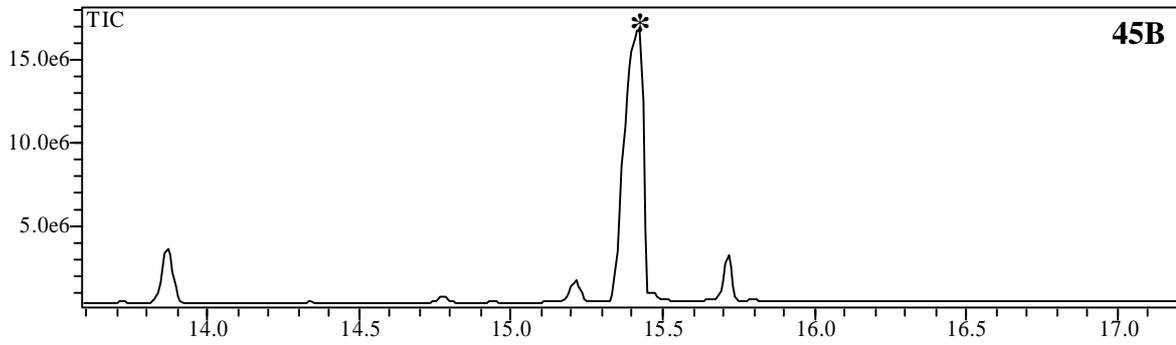
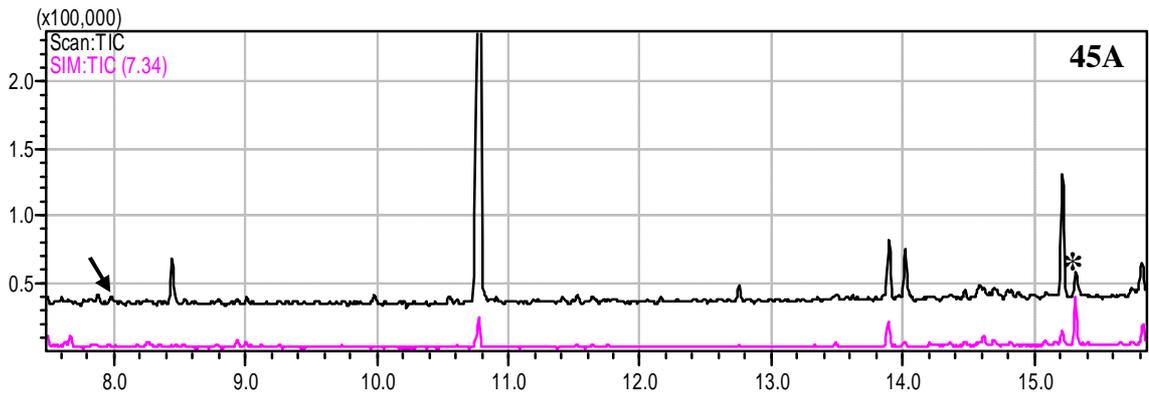


Figura 45.

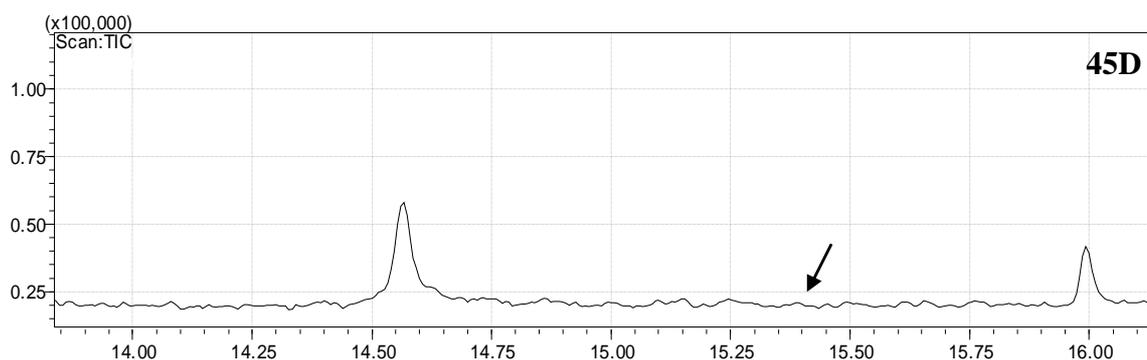


Figura 45. Identificação do composto MeJa, após ensaio de competição enzimática entre os ácidos benzóico e jasmônico, na presença da proteína rMT1. Os dois ácidos foram adicionados ao mesmo frasco, na concentração de 10mM cada e, em seguida, os compostos foram extraídos com hexano a partir do meio de cultura. No cromatograma representado em 45A, o “*” indica a presença do pico correspondente ao composto MeJa, no mesmo tempo de retenção do MeJa padrão (15,40 minutos), indicado também por um “*” no cromatograma 45B; 45C corresponde ao cromatograma contendo os três íons principais de massa m/z 83, m/z 151 e m/z 224, confirmando a identidade do composto MeJa. Não foi identificado nenhum pico no tempo de retenção igual a 8,0 minutos, correspondente ao composto MeBa, conforme indicado pela seta no cromatograma 45A. O cromatograma 45D corresponde a análise do controle negativo, onde a seta indica a ausência do MeJa.

5.6.3 Ensaios enzimáticos utilizando as proteínas recombinantes pET28a-46B11 (r46B11) e pET28a-134B02 (r134B02)

Após os resultados bem-sucedidos obtidos com os ensaios realizados com a proteína rMT1, estes mesmos ensaios foram feitos para as proteínas r46B11 e r134B02. A realização dos ensaios enzimáticos utilizando as proteínas r46B11 e r134B02, juntamente com os ácidos salicílico, benzóico, jasmônico e dihidrojasmônico, na concentração de 10mM, seguiu a mesma metodologia empregada para os ensaios realizados em meio de cultura para a proteína rMT1, e os resultados são apresentados a seguir.

As Figuras 46 e 47 representam os resultados dos ensaios enzimáticos realizados com a proteína r46B11, na presença dos ácidos benzóico e salicílico, respectivamente, utilizando o modo “SIM” de análise, uma vez que não foi possível detectar nenhum pico referente aos compostos MeBa e MeSa no modo de análise “Full Scan”. O asterisco “*” na Figura 46A indica a presença dos três íons principais de massa m/z (77, 105 e 136), característicos do composto MeBa. Os cromatogramas 46B, 46C e 46D representam,

respectivamente, o tempo de retenção do padrão MeBa, o espectro de fragmentação de massas do mesmo, mostrando a presença dos três picos principais de massa m/z , confirmando a identidade do composto MeBa, e a análise referente ao controle negativo da reação. A seta em 46D indica a ausência de um pico correspondente ao composto MeBa.

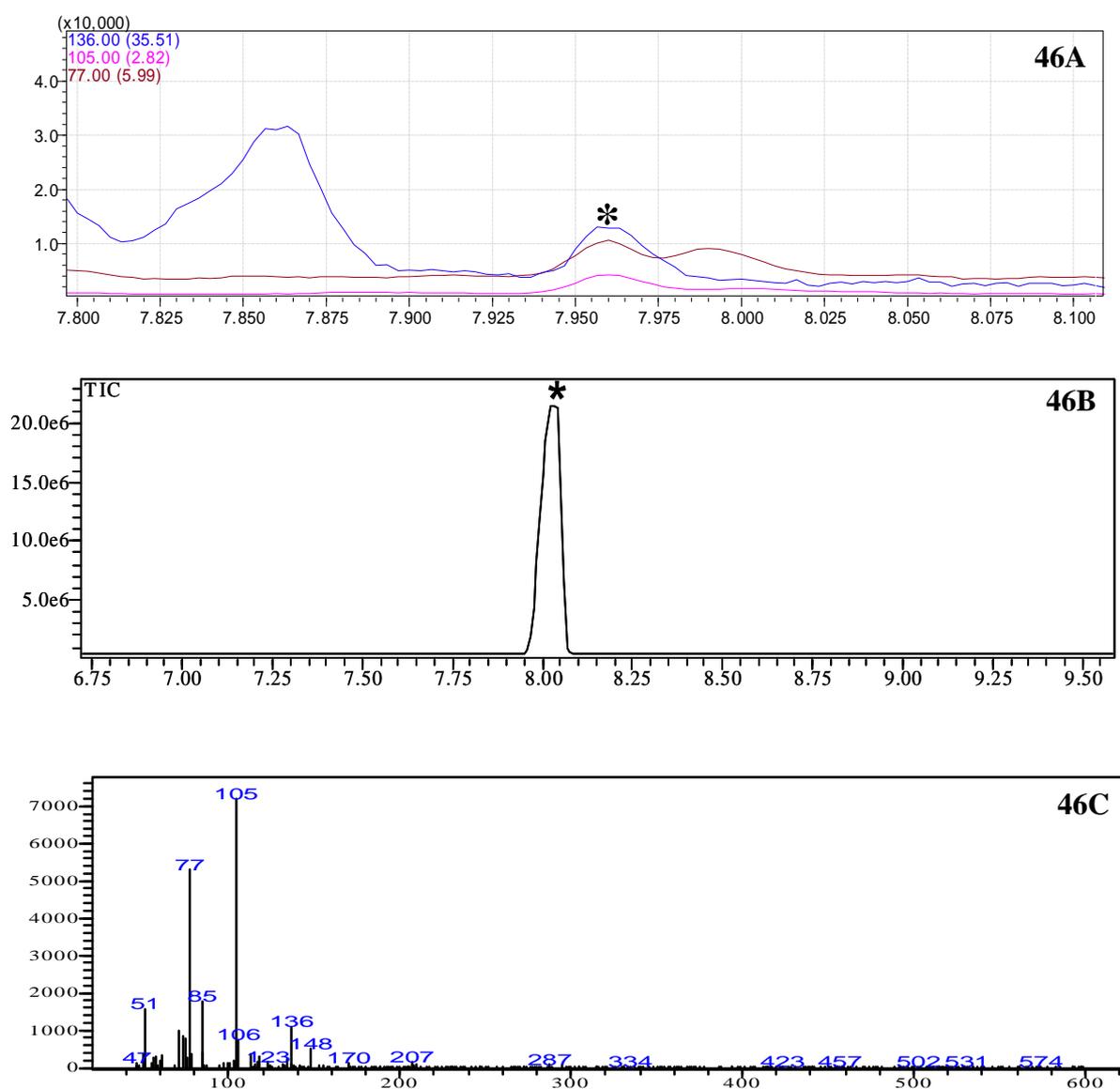


Figura 46.

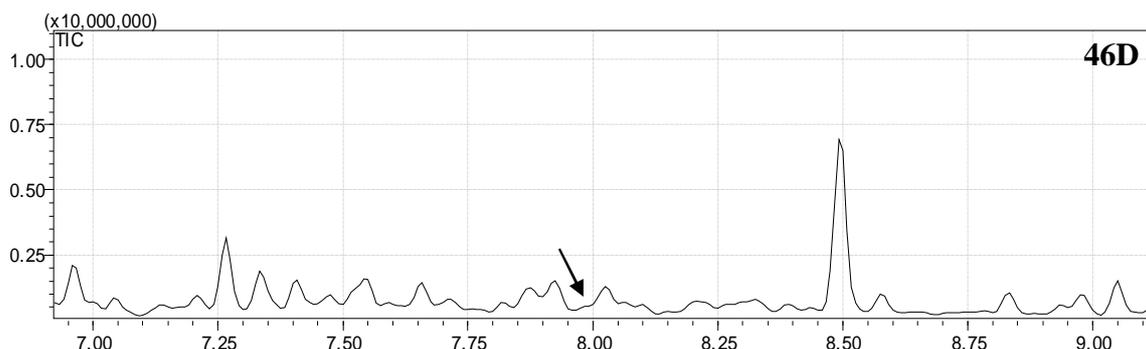


Figura 46. Identificação do composto MeBa, após ensaio enzimático utilizando a proteína r46B11, na presença de 10mM de ácido benzóico, extraído do meio de cultura bacteriano com hexano. No cromatograma representado em 46A, o “*” indica os três picos principais de massa m/z 77, m/z 105 e m/z 136 do MeBa, identificado após análise no modo “SIM”, selecionado no equipamento de CG-EM. Os picos são observados no mesmo tempo de retenção do composto MeBa padrão (8,0 minutos), indicado também por um “*” no cromatograma 46B; 46C corresponde ao cromatograma contendo os três íons principais obtidos após a corrida do composto MeBa padrão (77, 105 e 136), confirmando a identidade do MeBa extraído do meio de cultura. O cromatograma 46D corresponde ao controle negativo da reação, onde a seta indica a ausência de um pico referente ao MeBa.

A Figura 47 representa os resultados obtidos após o ensaio enzimático realizado com a proteína r46B11 na presença do ácido salicílico. O asterisco “*” observado em 47A indica a presença dos três picos principais de massa m/z (92, 120 e 152), característicos do composto MeSa. Os cromatogramas 47B e 47C representam, respectivamente, o tempo de retenção do padrão MeSa, e o espectro de fragmentação de massas do mesmo, mostrando a presença dos três picos principais de massa m/z , confirmando a identidade do composto MeSa, extraído do meio de cultura bacteriano após o ensaio. O cromatograma 47D corresponde ao perfil cromatográfico obtido após a análise do controle negativo, onde a seta indica a ausência de um pico referente ao MeSa.

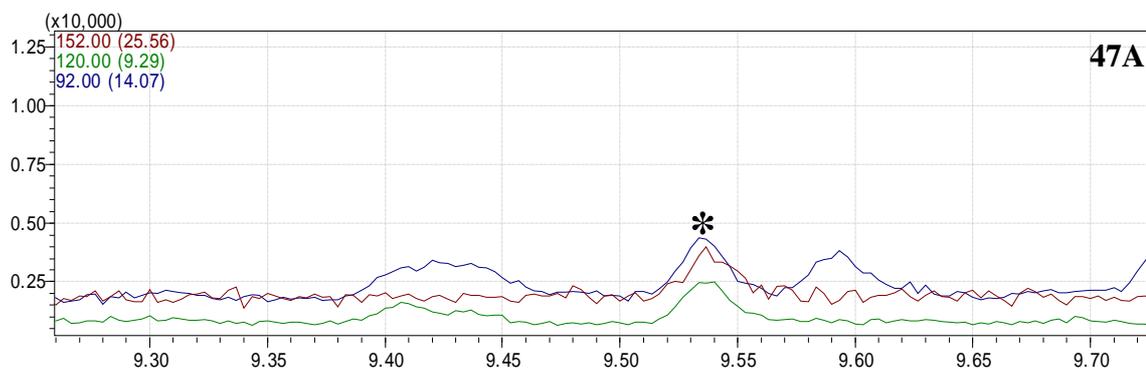


Figura 47.

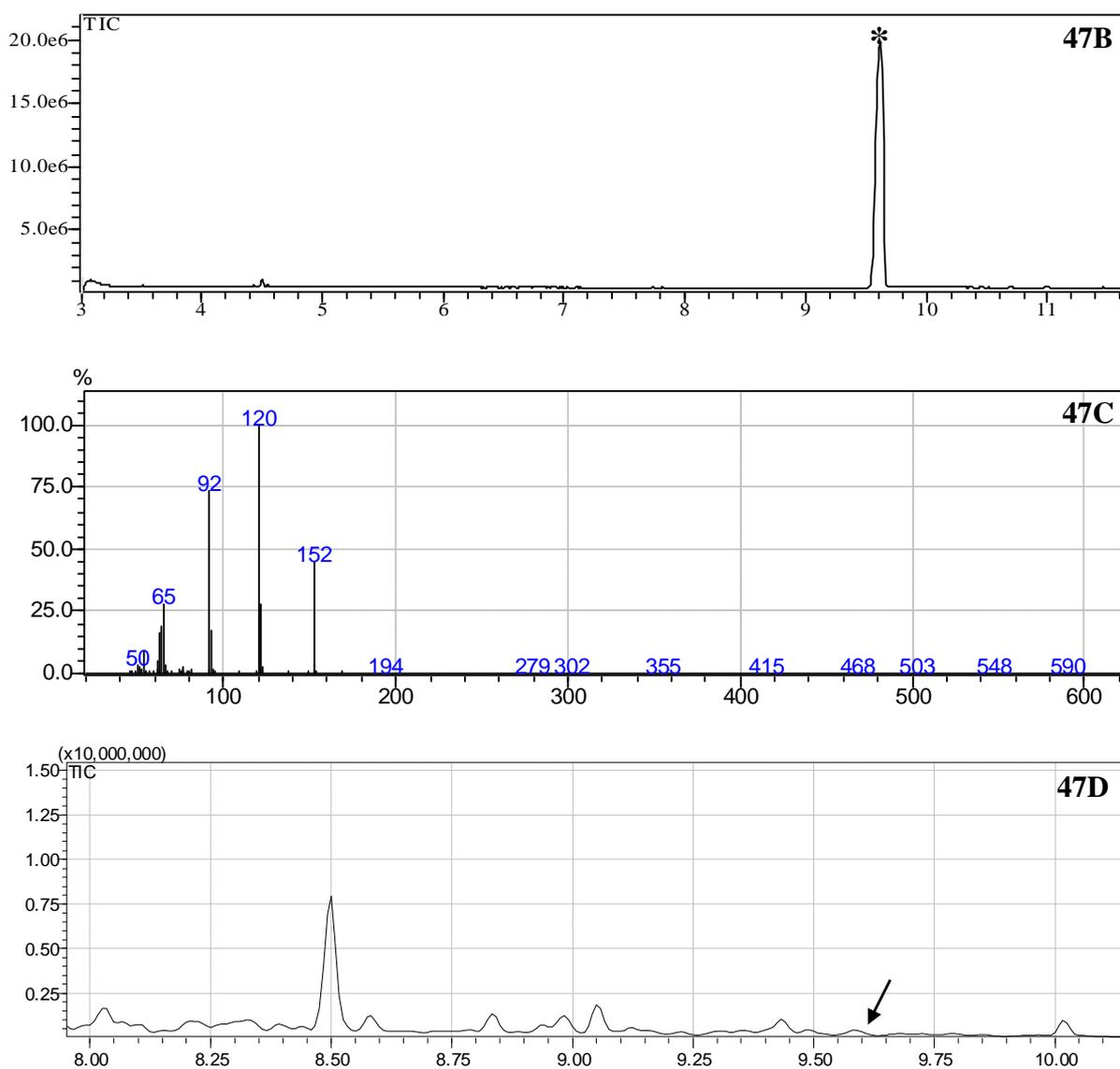


Figura 47. Identificação do composto MeSa, após ensaio enzimático utilizando a proteína r46B11, na presença de 10mM de ácido salicílico, extraído do meio de cultura bacteriano com hexano. No cromatograma representado em 47A, o “*” indica os três picos principais de massa m/z 92, m/z 120 e m/z 152 do MeSa, identificado após análise no modo “SIM”, selecionado no equipamento de CG-EM. Os picos são observados no mesmo tempo de retenção do composto MeSa padrão (9,6 minutos), indicado também por um “*” no cromatograma 47B; 47C corresponde ao cromatograma contendo os três íons principais obtidos após a corrida do composto MeSa padrão (92, 120 e 152), confirmando a identidade do MeSa extraído do meio de cultura. O cromatograma 47D corresponde ao controle negativo da reação, onde a seta indica a ausência de um pico referente ao MeSa.

A Figura 48 representa os resultados obtidos após o ensaio enzimático realizado com a proteína r46B11 na presença do ácido jasmônico. Neste ensaio foi possível identificar o composto MeJa na análise da corrida no modo “Full Scan”, ao contrário do

que ocorreu nos ensaios anteriores com a proteína r46B11, e os ácidos salicílico e benzóico. O asterisco “*” em 48A indica a presença de um pico correspondente ao composto MeJa, com o mesmo de tempo de retenção apresentado pelo composto MeJa padrão, conforme indicado pelo “*” no cromatograma 48B. O cromatograma 48C representa o espectro de fragmentação de massas do composto MeJa, mostrando a presença dos três íons principais de massa m/z (83, 151 e 224) confirmando a identidade do MeJa, extraído do meio de cultura após o ensaio. O perfil cromatográfico representado em 48D corresponde a análise do controle negativo, onde nenhum pico referente ao composto MeJa foi detectado, conforme indicado pela seta.

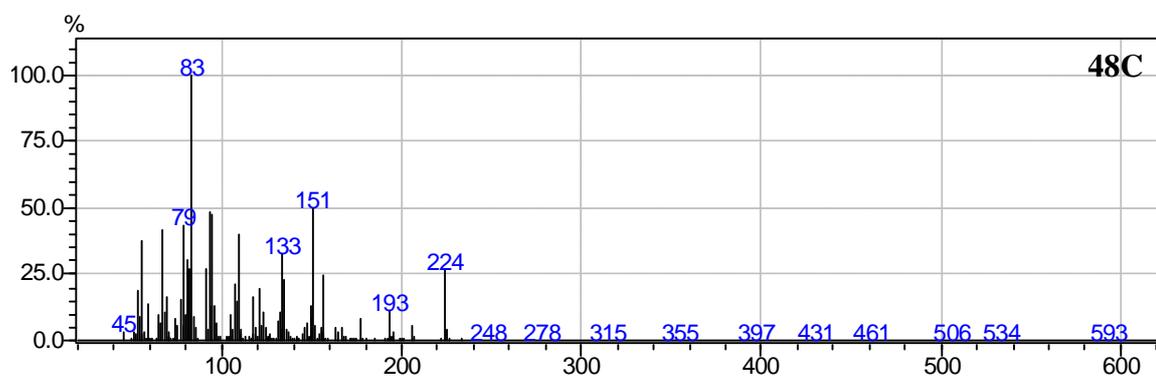
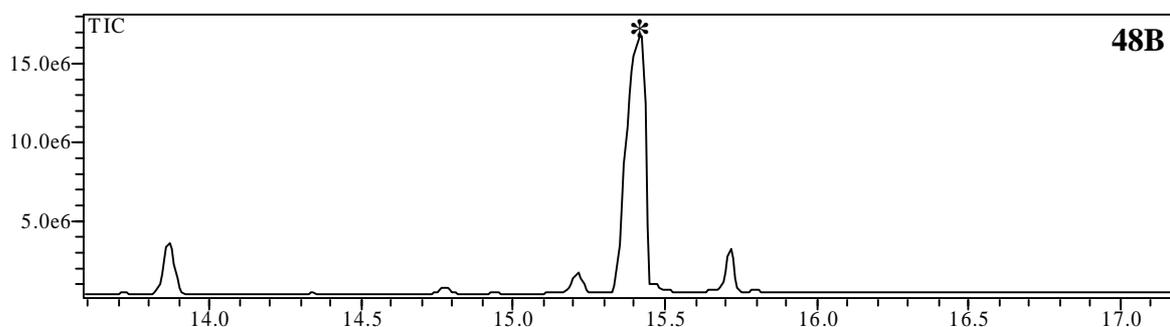
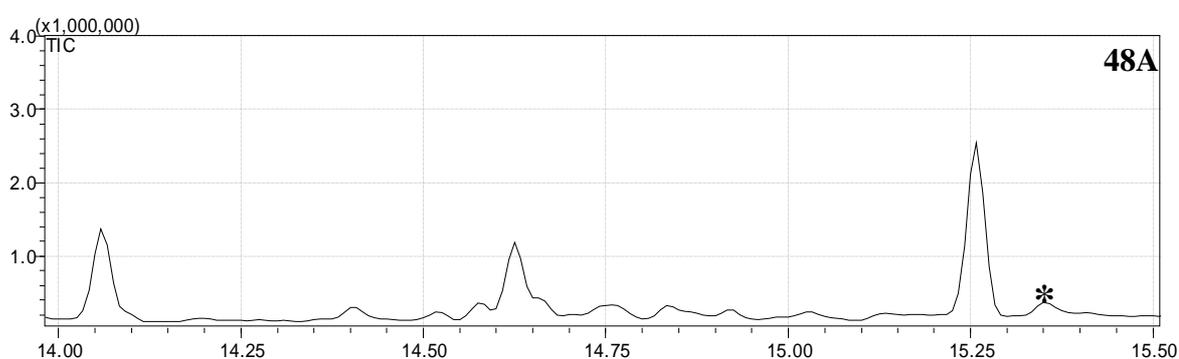


Figura 48.

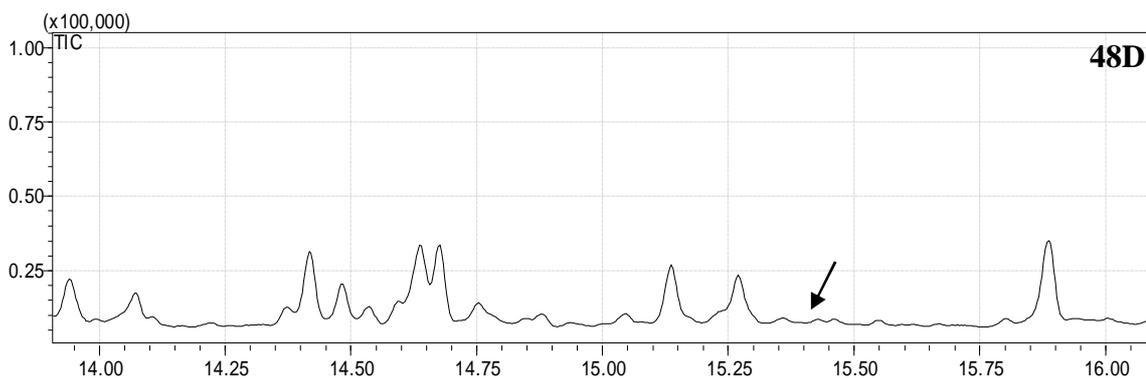


Figura 48. Identificação do composto MeJa, após ensaio enzimático utilizando a proteína r46B11, na presença de 10mM de ácido jasmônico, extraído do meio de cultura bacteriano com hexano. No cromatograma representado em 48A, o “*” indica o pico correspondente ao composto MeJa, no mesmo tempo de retenção do composto MeJa padrão (15,40 minutos), indicado também por um “*” no cromatograma 48B; 48C corresponde ao cromatograma contendo os três íons principais de massa m/z 83, m/z 151 e m/z 224, confirmando a identidade do composto MeJa extraído do meio de cultura. O cromatograma 48D corresponde ao controle negativo da reação, onde a seta indica a ausência de um pico referente ao MeJa.

Para a proteína r134B02, as mesmas condições de ensaio foram realizadas. Entretanto, não foi possível detectar a presença dos compostos MeSa e MeBa em nenhum dos dois métodos de análise empregados (dados não mostrados). Assim, a Figura 49 representa o resultado do ensaio onde o ácido jasmônico foi utilizado como substrato.

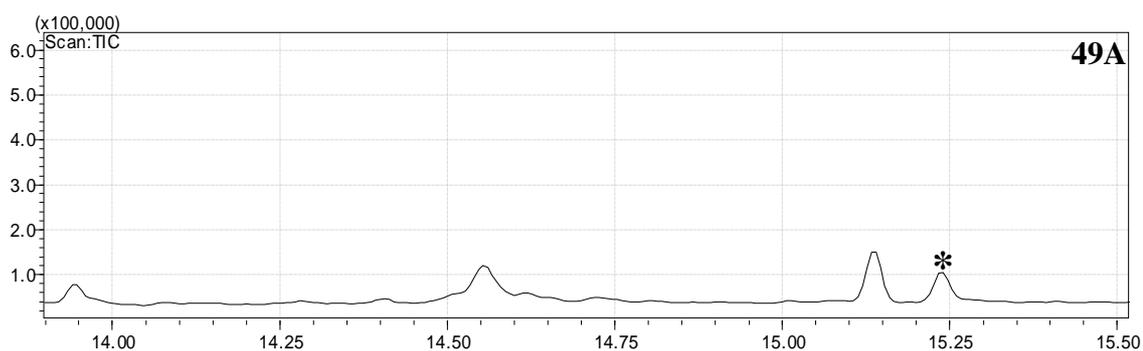


Figura 49.

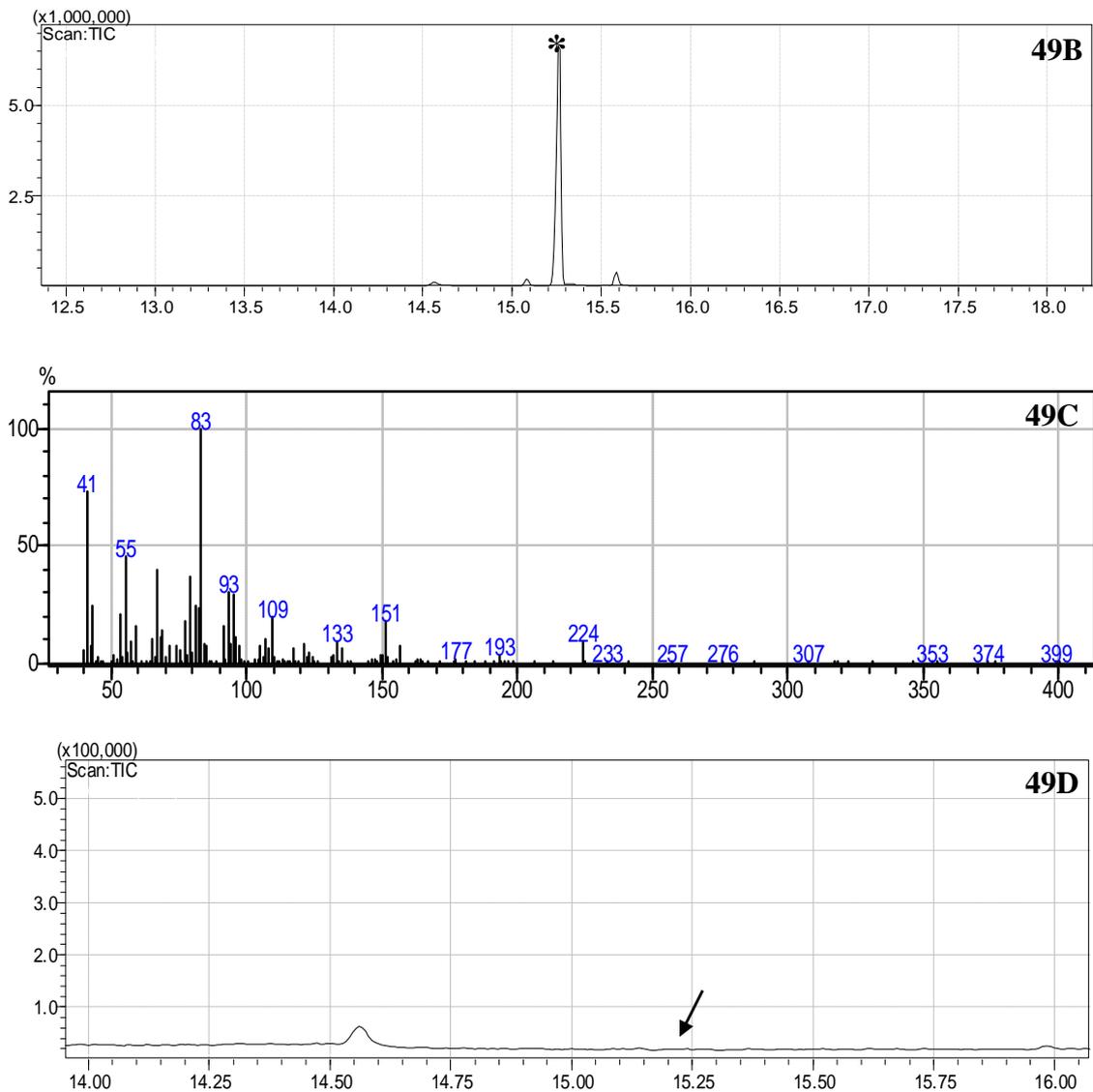


Figura 49. Identificação do composto MeJa, após ensaio enzimático utilizando a proteína r134B02, na presença de 10mM de ácido jasmônico, extraído do meio de cultura bacteriano com hexano. No cromatograma representado em 49A, o “*” indica o pico correspondente ao composto MeJa, no mesmo tempo de retenção do composto MeJa padrão (15,20 minutos), indicado também por um “*” no cromatograma 49B; 49C corresponde ao cromatograma contendo os três íons principais de massa m/z 83, m/z 151 e m/z 224, confirmando a identidade do composto MeJa extraído do meio de cultura. O cromatograma 49D corresponde a análise do controle negativo, onde a seta indica a ausência de um pico correspondente ao MeJa.

Na Figura 49, A corresponde ao cromatograma obtido após análise no modo “*Full Scan*” onde o “*” indica a presença do pico correspondente ao MeJa, eluído no mesmo tempo de retenção do MeJa padrão (15,20 minutos – 49B). O cromatograma 49C representa o espectro de fragmentação de massas do composto MeJa, mostrando a presença dos três íons principais de massa m/z (83, 151 e 224) confirmando a identidade do MeJa, extraído do meio de cultura após o ensaio.

5.6.4 Ensaio enzimático a partir do extrato bruto de proteínas, obtido após lise da cultura celular de *E. coli*

Com o objetivo de promover um contato mais próximo entre os substratos e a enzima recombinante, produzida no citoplasma de *E. coli* em todas as construções usadas neste trabalho, e eliminar dúvidas sobre eventuais dificuldades de penetração dos substratos ou liberação dos produtos metilados, foi decidido testar uma nova metodologia de ensaio. Para isto, foi utilizada a fração sobrenadante (solúvel) do lisado celular. Tal fração foi obtida após a indução da expressão da proteína rMT1 em células da linhagem BL21(DE3) Rosetta de *E. coli*, lise das células via sonicação, e separação das frações sobrenadante e precipitado através de centrifugação. Foi utilizado o mesmo protocolo de indução da expressão da proteína recombinante usado nos ensaios em meio de cultura, com a diferença que após a aplicação do indutor, a cultura foi mantida por toda noite, a 25°C.

Para as reações enzimáticas, os ácidos salicílico, benzóico, jasmônico e dihidrojasmônico foram adicionados separadamente, aos tubos das reações, nas mesmas quantidades equimolares usadas nos ensaios anteriores. Os compostos metilados de interesse foram extraídos com hexano, como nos ensaios realizados em meio de cultura. Após a extração, a fração hexano foi analisada por CG-EM e os resultados obtidos são mostrados a seguir.

A Figura 50 representa os perfis cromatográficos das análises por CG-EM obtidos após o ensaio enzimático realizado com a fração sobrenadante do lisado celular, com o substrato ácido jasmônico. No cromatograma 50A, o asterisco “*” identifica a presença de um pico correspondente ao composto MeJa, no mesmo tempo de retenção observado para o composto MeJa padrão (15,40 minutos – 50B). O cromatograma 50C contém os três picos principais do composto MeJa, e seus respectivos números de massa m/z (83, 151 e 224) (Biblioteca NIST), obtidos após a extração do MeJa do extrato protéico bruto,

confirmando a identidade do composto. O perfil cromatográfico representado no cromatograma 50D corresponde a análise do controle negativo, onde a seta indica a ausência de um pico correspondente ao MeJa, eluindo no mesmo tempo de retenção do MeJa padrão (15,40 minutos) Os compostos MeSa, MeBa e dihidroMeJa não foram detectados em nenhum dos ensaios realizados, após a análise por CG-EM (dados não mostrados).

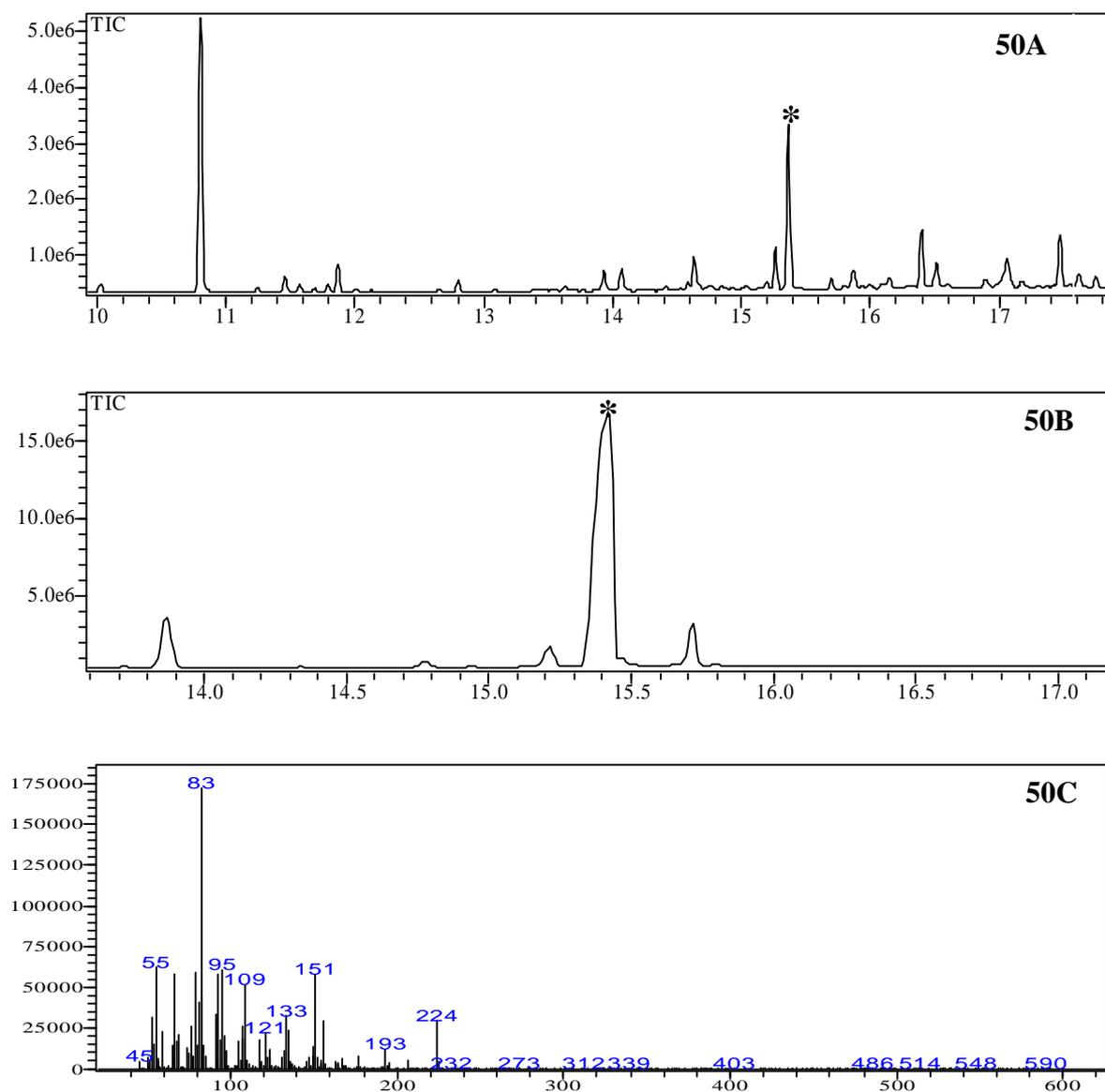


Figura 50.

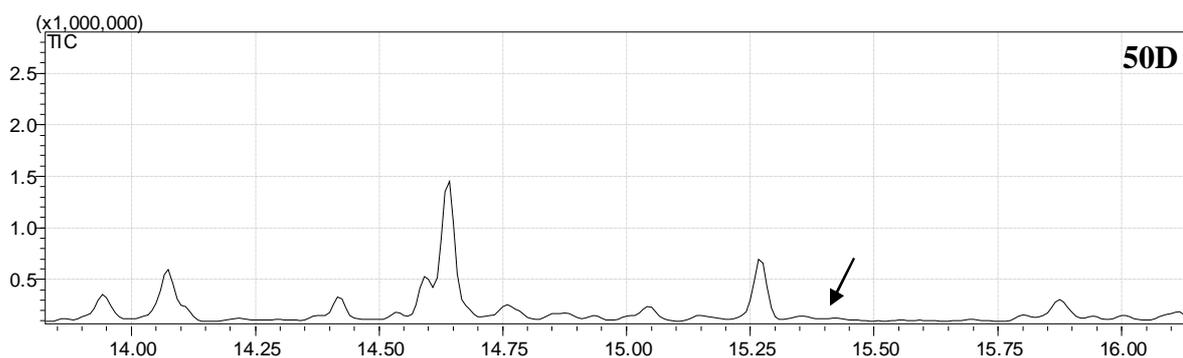


Figura 50. Identificação do composto MeJa, extraído com hexano após ensaio enzimático realizado com a fração sobrenadante obtida a partir lise das células de *E. coli*, produzido pela proteína rMT1 na presença de 10mM de ácido jasmônico. No cromatograma representado em 50A, o “*” indica o pico correspondente ao composto MeJa, no mesmo tempo de retenção do composto MeJa padrão (15,40 minutos), indicado também por um “*” no cromatograma 50B; 50C corresponde ao cromatograma contendo os três íons principais de massa m/z 83, m/z 151 e m/z 224 do MeJa, confirmando a identidade do composto extraído do tubo da reação. O perfil cromatográfico representado em 50D corresponde a análise da corrida do controle negativo.

5.6.5 Ensaios enzimáticos utilizando a proteína rS-MT1, purificada em resina de níquel

A obtenção da proteína MT1 recombinante de forma solúvel e ativa foi de extrema importância para a complementação dos nossos dados sobre os ensaios enzimáticos *in vitro*, uma vez que nessas condições a proteína recombinante estaria, estruturalmente, o mais próximo possível de sua conformação nativa. A obtenção de proteína MT1 recombinante solúvel só foi alcançada no vetor pET-SUMO. Assim, após ser purificada, concentrada e quantificada pelo método de Bradford (item 4.25 do Material e Métodos), a proteína rS-MT1 foi utilizada em novos ensaios enzimáticos *in vitro*, mas agora na presença de SAM fornecido de forma exógena, e de quantidades equimolares (5mM) dos ácidos salicílico, benzóico, jasmônico e dihidrojasmônico. A proteína rS-MT1 foi utilizada em uma concentração conhecida (3 μ g) na reação com os diferentes ácidos, em todas as réplicas biológicas. Ao final dos ensaios, os compostos foram extraídos com hexano e analisados por CG-EM. Os resultados obtidos mostraram a presença apenas dos compostos MeJa e dihidroMeJa (Figuras 51 e 52).

A Figura 51 representa os perfis cromatográficos das análises por CG-EM obtidos após o ensaio enzimático realizado com a proteína rS-MT1 purificada em resina de níquel, na presença do ácido jasmônico. No cromatograma 51A, o asterisco “*” indica a presença de um pico correspondente ao composto MeJa, eluindo no mesmo tempo de retenção observado para o composto MeJa padrão (15,20 minutos – 51B). O cromatograma 51C contém os três íons principais do composto MeJa, e seus respectivos números de massa m/z (83, 151 e 224) (Biblioteca NIST), obtidos após a extração do MeJa do tubo de reação, confirmando a identidade do composto. O perfil cromatográfico representado no cromatograma 51D corresponde a análise do controle negativo. O pico observado em 51D corresponde ao composto propil dodecanoato, que apresenta um tempo de retenção muito próximo ao composto MeJa. Uma investigação em nosso laboratório, concluiu que esse composto é oriundo dos tubos Falcon e Eppendorf, utilizados para a realização dos ensaios (dados não mostrados).

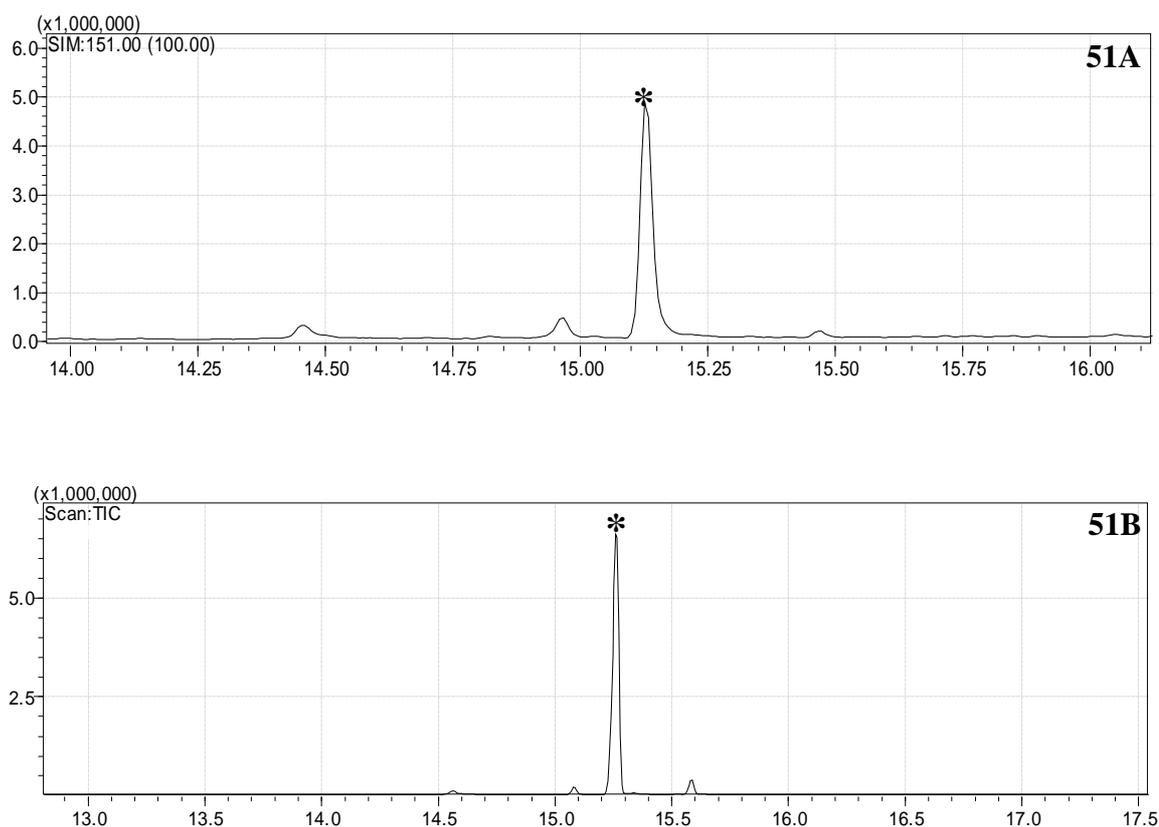


Figura 51.

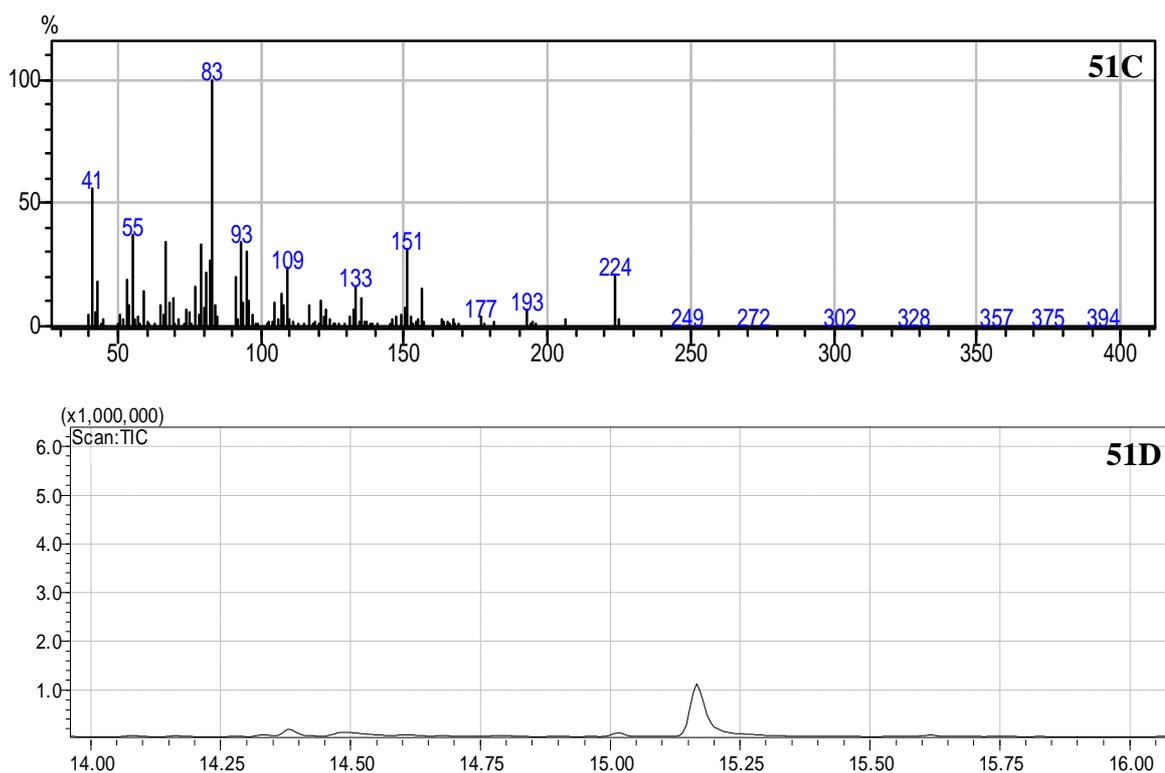


Figura 51. Identificação do composto MeJa, extraído com hexano após ensaio enzimático realizado com a proteína rS-MT1 purificada em resina de níquel, na presença de 5mM do ácido jasmônico. No cromatograma representado em 51A, o “*” indica o pico correspondente ao composto MeJa, no mesmo tempo de retenção do composto MeJa padrão (15,20 minutos), indicado também por um “*” no cromatograma 51B; 51C corresponde ao cromatograma contendo os três íons principais de massa m/z 83, m/z 151 e m/z 224 do MeJa, confirmando a identidade do composto extraído do tubo da reação. O cromatograma 51D corresponde a análise obtida para a amostra referente ao controle negativo. O pico eluído próximo ao tempo de retenção do MeJa (15,20 minutos), corresponde ao composto propil dodecanoato.

A Figura 52 representa os perfis cromatográficos das análises por CG-EM obtidos após o ensaio enzimático realizado com a proteína rS-MT1 purificada em resina de níquel, na presença de 5mM do ácido dihidrojasmônico. No cromatograma 52A, o asterisco “*” indica a presença de um pico correspondente ao composto dihidroMeJa, no mesmo tempo de retenção observado para o composto dihidroMeJa padrão (15,24 minutos – 52B). O cromatograma 52C contém os três picos principais do composto dihidroMeJa, e seus respectivos números de massa m/z (83, 156 e 226) (Biblioteca NIST), obtidos após a extração do dihidroMeJa do tubo de reação, confirmando a identidade do composto.

O perfil cromatográfico representado em 52D corresponde à análise do controle negativo, e o pico nele observado corresponde ao mesmo composto descrito para a Figura 51D.

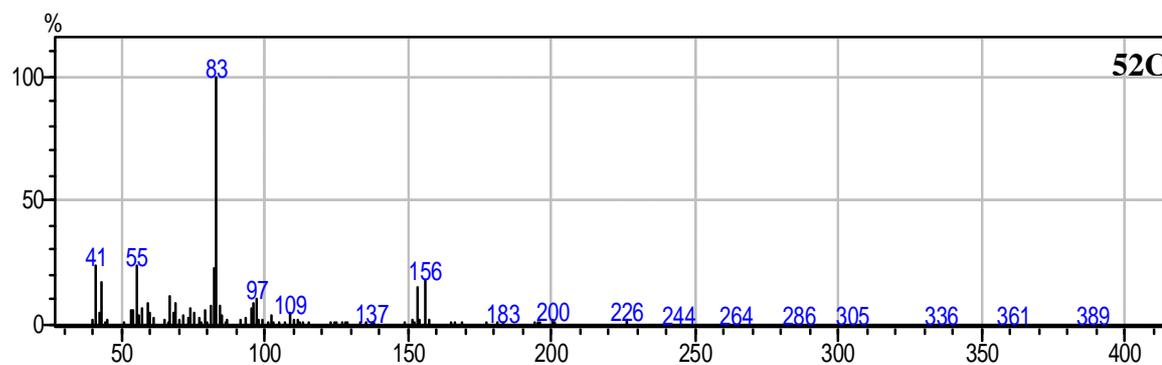
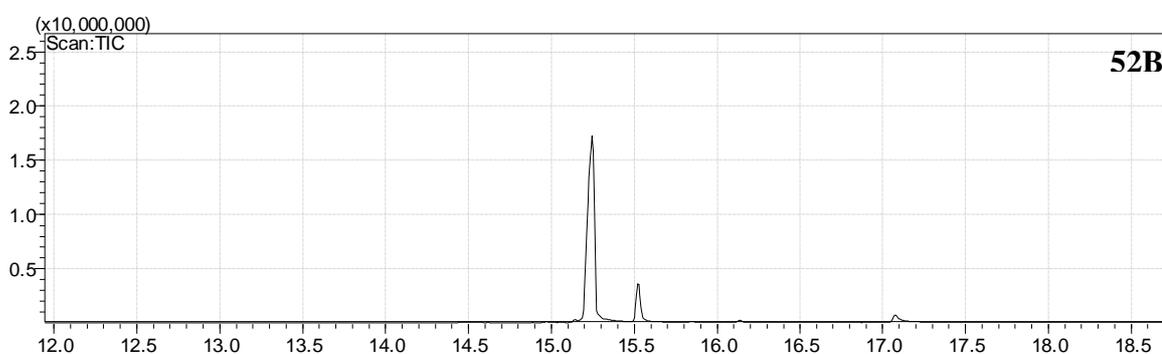
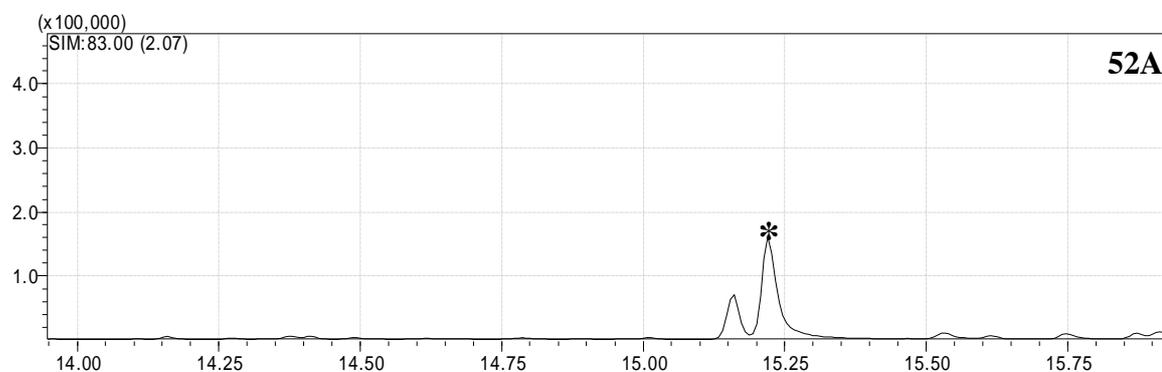


Figura 52.

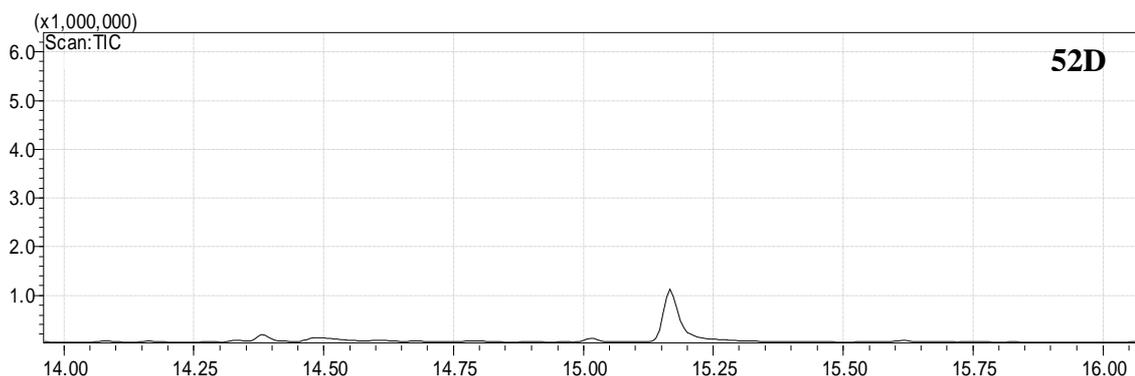


Figura 52. Identificação do composto dihidroMeJa, extraído com hexano, após ensaio enzimático realizado com a proteína rS-MT1 purificada em resina de níquel, na presença de 5mM do ácido dihidroasmônico. No cromatograma representado em 52A, o “*” indica o pico correspondente ao composto dihidroMeJa, no mesmo tempo de retenção do composto dihidroMeJa padrão (15,24 minutos), indicado também por um “*” no cromatograma 52B; 52C corresponde ao cromatograma contendo os três íons principais de massa m/z 83, m/z 156 e m/z 226 do dihidroMeJa, confirmando a identidade do composto extraído. O pico eluído próximo ao tempo de retenção do dihidroMeJa corresponde ao composto propil dodecanoato.

Determinar o substrato, ou substratos, sobre os quais as proteínas metiltransferases codificadas pelos cDNAs MT1, 46B11 e 134B02 têm atividade, é de extrema importância para um melhor entendimento da função destas enzimas nos pistilos da planta do fumo. A identidade de 99% entre as seqüências deduzidas de aminoácidos de MT1 e SAMT1 sugere que a proteína codificada por MT1 teria atividade específica sobre o ácido salicílico. Entretanto, apenas análises computacionais não são o suficiente para se determinar sobre qual substrato uma enzima irá atuar preferencialmente. Na literatura, podem ser encontrados trabalhos onde MTs SABATH, isoladas a partir de flores, demonstram atividade específica sobre um determinado substrato em ensaios realizados *in vitro*, mas liberam compostos voláteis diferentes destes quando as análises são realizadas *in vivo* (Pott *et al.*, 2004). Além disso, a atividade catalítica da enzima é de certa forma dependente da disponibilidade dos substratos nos tecidos florais, o que pode ser dificultado caso estes estejam compartimentalizados ao nível celular (Pott *et al.*, 2004). Assim, ensaios enzimáticos *in vitro*, utilizando proteínas MTs recombinantes, juntamente com diferentes substratos estruturalmente relacionados, têm se mostrado uma eficiente abordagem para se determinar a preferência de atividade de uma MT sobre um substrato específico.

Em 1998, Dudareva e colaboradores descrevem a obtenção bem-sucedida do composto aromático floral benzilacetato, a partir de um ensaio enzimático realizado em meio de cultura bacteriana, na presença da enzima Acetil-CoA: benzilalcool acetiltransferase. Um dos primeiros relatos da realização de ensaios enzimáticos com proteínas MTs SABATH recombinantes, realizados em meio de cultura bacteriana, são encontrados em Ross e colaboradores (1999). Desde então, essa metodologia tem sido utilizada como alternativa a reação enzimática que utilizava a molécula de SAM marcada radioativamente, quando se desejava inferir a especificidade de atuação de uma MT na presença de diferentes substratos química e estruturalmente semelhantes. Com isso, a partir dos resultados positivos obtidos pelos pesquisadores citados acima, foram realizados ensaios com a proteína rMT1 e, da mesma forma, resultados satisfatórios foram obtidos.

A escolha dos diferentes ácidos para a realização dos ensaios foi baseada na similaridade de sequência de MT1, com outras MTs SABATH encontradas nos bancos de dados (SAMT1, 99% de similaridade - Park *et al.*, 2007; BSMT, 81% de similaridade – Pott *et al.*, 2004). Apesar de MT1 apresentar baixa similaridade de sequência de aminoácidos (40%) com uma metiltransferase que atua sobre o ácido jasmônico (JMT – Seo *et al.*, 2001), optou-se por também utilizar este ácido nos ensaios, além do seu isômero estruturalmente semelhante, ácido dihidrojasmônico, uma vez que o composto dihidroMeJa foi encontrado após captura de voláteis diretamente da flor, e nos ensaios utilizando pistilos inteiros macerados na presença de CaCl₂ 5M.

De maneira surpreendente, a enzima rMT1 demonstrou maior atividade catalítica na presença do ácido jasmônico produzindo, assim, o composto MeJa de forma predominante. Desde os ensaios iniciais, o MeJa foi obtido com sucesso tanto nos ensaios em meio de cultura, quanto nos ensaios utilizando o lisado celular. Nos ensaios realizados em meio de cultura, a proteína rMT1 foi capaz de produzir também os compostos MeSa e MeBa; entretanto, o composto MeSa foi identificado em quantidade muito reduzida (Figura 41A), contrariando os resultados obtidos com as análises de similaridade de sequências. Esse resultado levanta algumas questões: 1) O ácido salicílico estaria entrando eficientemente nas células da cultura de *E. coli* para que a reação enzimática acontecesse? 2) Caso essa entrada seja eficiente, as células de *E. coli* estariam conseguindo externar para o meio de cultura, o composto metilado (MeSa) de forma adequada e em quantidade suficiente para ser detectado nos ensaios de CG-EM? Interessantemente, o composto MeSa também não foi produzido nos ensaios com o lisado celular, realizados com as proteínas totais da *E. coli*, nem no ensaio com a proteína rS-MT1 purificada em resina de níquel.

Estes resultados indicam que a baixa produção de MeSa não é um artefato das metodologias usadas nos ensaios enzimáticos, e representam a eficiência da enzima em usar o ácido salicílico como substrato.

Os compostos MeBa e MeJa foram mais facilmente detectados após as análises. Entretanto, o MeJa foi produzido predominantemente nos ensaios em meio de cultura, quando comparado com o MeBa (Figuras 42A e 43A). O maior pico obtido para o composto MeJa foi observado após a análise por CG-EM do ensaio enzimático, onde o lisado celular foi utilizado como fonte da proteína rMT1 (Figura 50A). Nem o MeSa, como anteriormente citado, nem o MeBa, foram identificados após os ensaios com o lisado celular.

Os ensaios enzimáticos de competição mostraram resultados interessantes, uma vez que a enzima rMT1 foi capaz de produzir apenas o composto MeJa, nos frascos onde o ácido jasmônico foi adicionado (frascos 2 e 3). Entretanto, após a análise por CG-EM, os picos observados para o MeJa obtidos nos ensaios de competição foram bem menores (Figuras 44A e 45A), quando comparados com os picos observados para o mesmo composto nos ensaios independentes (Figuras 43A e 50A). Interessante também foi a não produção dos compostos MeSa e MeBa, que haviam sido produzidos nos ensaios iniciais, mesmo que em pequenas quantidades. Possivelmente, a diminuição da atividade catalítica da enzima, refletida na produção de quantidades menores de MeJa nestes ensaios, pode estar relacionada com a presença de outro ácido no meio de cultura. A presença de dois ácidos no mesmo frasco de cultura pode ter provocado um fenômeno químico conhecido como inibição por competição de substratos. A inibição por competição geralmente ocorre quando dois substratos parecidos estruturalmente entre si acabam competindo pelo sítio ativo da mesma enzima. Infelizmente, não há muitas descrições na literatura onde ensaios de competição enzimática, realizados com enzimas da mesma classe que MT1 (MT SABATH), são encontrados. Durante o levantamento bibliográfico, foi encontrado apenas um trabalho datado de 2007, realizado por Barkman e colaboradores, onde foram usados apenas dois substratos, sendo eles os ácidos salicílico e benzóico. Neste trabalho, os autores realizaram a clonagem e expressão heteróloga de um cDNA, capaz de produzir uma enzima do tipo SAMT, isolada a partir dos tecidos de flores de *Datura wrightii*. A proteína recombinante resultante foi capaz de produzir MeSa com uma eficiência 10 vezes maior, quando comparada com a produção de MeBa. Em seguida, foi realizada uma mutação sítio-dirigida na sequência nativa de SAMT, substituindo o aminoácido metionina, pelo aminoácido histidina, em uma posição específica da sequência

(Met156His). A enzima recombinante mutada foi capaz de produzir quantidades equivalentes dos compostos MeSa e MeBa, após os ensaios de competição. Os resultados obtidos indicam que a mudança do aminoácido metionina, para o aminoácido histidina, foi crucial para o aumento na produção do composto MeBa. Além disso, a presença do aminoácido metionina, nessa posição específica da sequência, confere alta especificidade catalítica voltada para a produção do composto MeSa (Barkman *et al.*, 2007). Análises filogenéticas, realizadas por Martins & Barkman (2005), mostraram que o aminoácido histidina é encontrado nessa posição específica da sequência, em enzimas do tipo BAMT (Benzoic acid methyltransferase) e JMT (Jasmonic acid methyltransferase). Essa observação fortalece ainda mais os resultados obtidos após os ensaios enzimáticos com rMT1, onde os compostos MeJa e MeBa foram claramente detectados, quando comparados com o composto MeSa, uma vez que MT1 apresenta o aminoácido histidina nessa posição específica da sequência.

Os resultados obtidos para os ácidos salicílico e benzóico, utilizando a proteína rMT1 se mostraram, de certa forma, surpreendentes. Enzimas do tipo SAMT exibem atividade catalítica específica voltada para o ácido salicílico, como já demonstrado em trabalhos anteriores (Ross *et al.*, 1999; Pott *et al.*, 2002; Hippauf *et al.*, 2010). Adicionalmente, enzimas do tipo BSMT apresentam atividades enzimáticas *in vitro* apenas com os ácidos salicílico e benzóico, e seus derivados. A enzima BSMT de *Nicotiana suaveolens* é capaz de produzir tanto MeSa quanto MeBa *in vitro* e, nessas condições, possui uma eficiência catalítica quatro vezes maior voltada para o ácido salicílico. Contudo, flores de *N. suaveolens* produzem e emitem apenas MeBa *in vivo*, possivelmente porque a concentração de ácido benzóico nas pétalas mostrou-se 2.000 vezes maior que a do ácido salicílico. Esse fato sugere que a produção do composto metilado volátil está amplamente relacionada à disponibilidade interna de cada substrato (Pott *et al.*, 2004). Além disso, como demonstrado para as enzimas BSMT de *A. thaliana* e *Arabidopsis lyrata*, diferenças na eficiência catalítica não se devem apenas a fatores relacionados ao sítio ativo da enzima. Diferenças em outros locais da sequência protéica podem afetar a estrutura e/ou dinâmica da enzima em solução (Chen *et al.*, 2003). Com relação ao ácido jasmônico, é interessante notar que este ácido foi testado como substrato nas reações enzimáticas realizadas na presença das enzimas BSMTs recombinantes de *N. suaveolens* e *Arabidopsis*, mas o composto MeJa não foi produzido por estas enzimas (Chen *et al.*, 2003; Pott *et al.*, 2004), característica esta levada em consideração quando da denominação destas enzimas como BSMTs.

Apesar de apresentar uma baixa similaridade de seqüência, ao nível de aminoácidos (40%), a uma metiltransferase que atua sobre o ácido jasmônico (Seo *et al.*, 2001), bioquimicamente não há nada que impeça rMT1 de produzir MeJa. Em enzimas capazes de utilizar substratos com diferentes estruturas químicas, a capacidade de ligação a estes substratos, e a formação do produto correspondente, está fortemente relacionada com as características moleculares dos diferentes aminoácidos encontrados não só no sítio ativo, mas também ao redor deste (Effmert *et al.*, 2005). Essa premissa pode ser claramente aplicada a esta classe distinta de metiltransferases, uma vez que análises comparativas dos aminoácidos localizados nos sítios ativos mostram que os aminoácidos relacionados ao sítio de ligação a SAM são altamente conservados. Por outro lado, os sítios de ligação aos diferentes substratos aceptores do grupamento metil de SAM apresentam uma maior variabilidade, dentre as diferentes espécies vegetais analisadas (Effmert *et al.*, 2005). Sob um ponto de vista evolutivo, tal diversidade de substratos utilizados por algumas dessas enzimas, pode trazer vantagens adaptativas para as plantas. Como essas enzimas atuam no metabolismo secundário vegetal, a capacidade de atuar sobre substratos diferentes permite ao organismo responder rapidamente a mudanças ocorridas em seu ambiente, através da síntese de compostos químicos que permitem uma adaptação mais rápida a uma nova condição ambiental (Pott *et al.*, 2004). Um exemplo deste cenário pode ser observado na espécie *Stephanotis floribunda*, onde suas flores são capazes de emitir MeSa e MeBa, sendo ambos produzidos por uma enzima que foi descrita como do tipo SAMT (Effmert *et al.*, 2005). Contudo, conforme discutido acima, um composto produzido eficientemente nos ensaios enzimáticos *in vitro*, não necessariamente será produzido com a mesma eficiência na planta, que depende da disponibilidade interna de cada substrato.

Após os resultados obtidos com os ensaios enzimáticos realizados com a proteína rMT1, algumas questões interessantes surgiram: 1) Como uma proteína que apresenta uma similaridade de 99% ao nível de seqüência de aminoácidos, com uma metiltransferase do ácido salicílico (SAMT), produziu quantidades quase indetectáveis do composto MeSa? 2) Porque mesmo apresentando alta identidade de seqüência de aminoácidos com uma enzima BSMT (81%), a quantidade de MeBa produzida foi bem menor que a do MeJa? 3) Quais características estruturais e bioquímicas possibilitaram que a enzima MT1, que apresenta a menor identidade de seqüência ao nível de aminoácidos (40%) com uma enzima JMT, mostrasse uma eficiência catalítica maior voltada para o ácido jasmônico? Vale ressaltar que, ao nível de estrutura química, o ácido jasmônico é bem diferente quando comparado com os ácidos salicílico e benzóico (Figura 40).; 4) Finalmente, porque nos ensaios de

competição enzimática, a enzima rMT1 não foi capaz de produzir o composto MeBa, que já havia sido produzido nos ensaios iniciais?

Outro dado adicional muito interessante foi obtido após os ensaios enzimáticos realizados com a proteína rS-MT1 purificada. A produção do composto MeJa nestes ensaios só veio a confirmar que a proteína recombinante, codificada pelo cDNA MT1, tem “preferência” de atuação sobre o ácido jasmônico, uma vez que o MeJa foi produzido em todos os ensaios anteriores de forma destacada. Contudo, de forma ainda mais surpreendente, pela primeira vez está sendo relatada a produção do composto dihidroMeJa em ensaios enzimáticos *in vitro*. Nenhuma MT da família SABATH tinha sido previamente descrita como sendo capaz de produzir este composto neste tipo de ensaio. Entretanto, ainda não há uma explicação clara para o fato desse composto não ter sido produzido nos ensaios anteriores, onde o ácido dihidrojasmônico foi utilizado como substrato (ensaios em meio de cultura e com o extrato protéico total de *E. coli*). É possível que este ácido e/ou seu éster metilado tenha mais dificuldade de passar pela membrana das células de *E. coli*.

Os resultados alcançados nos ensaios enzimáticos realizados com as proteínas r46B11 e r134B02 foram muito interessantes. Muito provavelmente, ambos os cDNAs são transcritos alternativos produzidos a partir do mesmo gene que codifica a sequência MT1 (Calixto, 2008). O cDNA 46B11 tem apenas quatro (exons 1, 2, 3 e 4), e o cDNA 134B02 tem apenas três (exons 1, 6 e 8), dos oito exons que compõem MT1. Entretanto, apesar de o cDNA 46B11 ser um transcrito curto, ele contém em sua sequência todos os aminoácidos descritos como importantes para a ligação a SAM, que é o substrato doador do grupamento metil nas reações de metilação (cerquilhas, Figura 19A). A proteína codificada por este cDNA também possui alguns dos aminoácidos descritos como necessários para a ligação ao substrato acceptor do grupamento metil, que estão localizados dentro da sequência do exon 4 (em cinza na Figura 19A). Por outro lado, outros sete aminoácidos importantes para a ligação ao substrato acceptor não estão presentes, como pode ser observado logo após o domínio HSSYSLH assinalado em cinza na Figura 19A, e que foram relatados como importantes para determinar a especificidade ao substrato acceptor (Zubieta *et al.*, 2003).

O resultado obtido após o ensaio enzimático com a proteína r134B02 foi, sem dúvida, o mais surpreendente. A proteína r134B02 é codificada pelo menor transcrito de processamento alternativo (exons 1, 6 e 8), a partir do gene que codifica a sequência do cDNA MT1, e que contém o menor número de aminoácidos conservados referentes aos diferentes sítios de ligação. Na Figura 19B, é possível observar a presença de apenas um

aminoácido conservado referente à ligação a SAM (serina, cerquilha) dos seis descritos como necessários. Adicionalmente, dos catorze aminoácidos descritos como necessários para a ligação ao substrato aceptor, de acordo com Zubieta *et al.* (2003), apenas cinco estão presente nessa sequência (cinza na Figura 19B). As atividades enzimáticas das proteínas rMT1, r46B11 e r134B02 aqui apresentadas e a diversidade de transcritos descritos para o gene *NtJAMT*, contendo diferentes combinações de exons (Calixto 2008), levantam algumas questões: Qual a vantagem, ou necessidade, que a planta tem para produzir tantos transcritos diferentes de um mesmo gene (ou genes com sequências muito semelhantes), todos expressos apenas no pistilo?

A capacidade de metilação apresentada pela proteína r46B11 mostrou-se um tanto surpreendente. Além de ter produzido preferencialmente o composto MeJa, como já mostrado anteriormente para o cDNA MT1, ela também foi capaz de produzir os compostos MeSa e MeBa, ainda que em quantidades muito baixas, somente detectáveis no modo de análise “SIM”, no equipamento de CG-EM. No nosso conhecimento, não existem relatos de outras metiltransferases que produzam transcritos menores, por processamento alternativo, e que tenham atividade enzimática. No momento, não é possível estabelecer uma comparação entre a eficiência na produção do MeJa pelas três proteínas recombinantes. Para que isto seja possível, será necessário realizar experimentos com quantidades equimolares das três proteínas recombinantes purificadas.

Os resultados aqui apresentados representam um grande avanço no estudo das metiltransferases da família SABATH, sendo a primeira vez que uma enzima completa (rMT1) é descrita como capaz de produzir os compostos MeSa, MeBa, além dos jasmonatos MeJa e dihidroMeJa. Adicionalmente, é a primeira vez que são descritas proteínas menores (r46B11 e r134B12), sem todos os aminoácidos descritos nos sítios doador e aceptor do grupamento metil, mas que, apesar disto, possuem atividade enzimática.

5.7 Ensaios de purificação e produção de anticorpos policlonais contra as proteínas rMT1 e r134B02

5.7.1 Purificação através de cromatografia de afinidade por resina de níquel das proteínas rMT1 e r134B02

As proteínas rMT1 e r134B02 foram purificadas em resina de níquel para a produção de anticorpos policlonais em camundongos. Tais proteínas apresentam uma “tag” com 6 resíduos de histidinas, que é expressa em fusão N-terminal com a região codificadora dos referidos cDNAs. As histidinas apresentam uma grande afinidade por níquel, fazendo com que essa seja uma estratégia muito utilizada para se recuperar proteínas recombinantes do extrato protéico celular total, quando produzidas em fusão com esta “tag” (Arnau *et al.*, 2006; Whitney & Sharwod, 2007; Walz *et al.*, 2008).

Após os procedimentos cromatográficos descritos no item 4.26 do Material e Métodos, foram coletadas 24 frações com aproximadamente 500µL cada, para a proteína rMT1. Em seguida, as alíquotas de 1 a 18 foram aplicadas em SDS-PAGE, para verificar se o ensaio de purificação havia sido bem sucedido (Figura 53). As raias 1 e 2 da Figura 53A contêm, respectivamente, as alíquotas do “flow-through” e da lavagem da resina. As raias de 3 a 9 contêm as frações ímpares de 1 a 13 da proteína rMT1 eluídas da coluna, com a massa molecular esperada (~42,7kDa). As bandas intensas observadas nas raias 1 e 2 estão relacionadas, possivelmente, com a grande quantidade de proteínas presentes no precipitado celular utilizado para a purificação. Nas raias 3 e 4, correspondentes às frações 1 e 3 eluídas da coluna, a baixíssima intensidade das bandas está relacionada com o início da cromatografia onde, em geral, as primeiras frações coletadas apresentam uma quantidade muito pequena da proteína de interesse. Nas raias 5 e 9, correspondentes às frações 5 e 13, respectivamente, é possível observar uma quantidade um pouco maior da proteína recombinante.

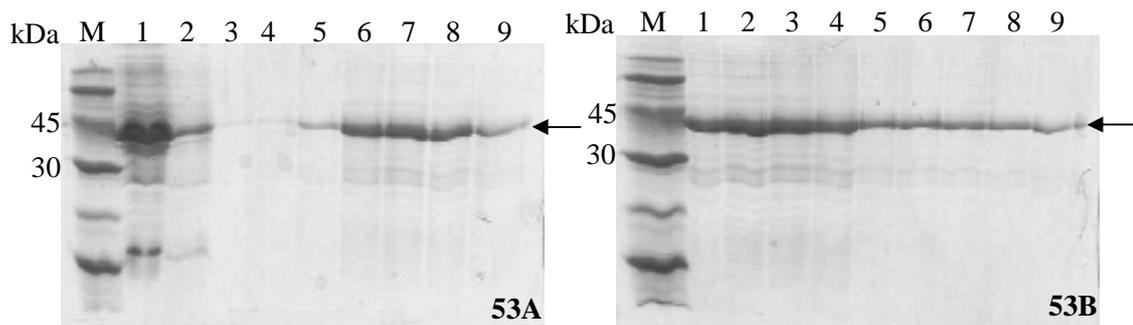


Figura 53. Ensaio de purificação da proteína rMT1, após cromatografia de afinidade por níquel, analisado por SDS-PAGE 12,5%, corado com Coomassie blue. **53A:** M: marcador de massa molecular (LMW calibration – GE); raia 1: extrato protéico não ligado após passagem pela resina de níquel na coluna (“flow-through”); raia 2: extrato protéico recuperado após a lavagem da resina; raias 3 a 9: frações ímpares de 1 a 13; **53B:** M: marcador de massa molecular (LMW calibration – GE); raias 1 a 4: frações pares de 6 a 12; raias 5 a 9: frações pares e ímpares de 14 a 18. A presença da proteína recombinante com a massa molecular esperada (42,7kDa) é indicada pelas setas.

As raias 6 a 8 contêm as frações ímpares 7, 9 e 11, respectivamente, podendo-se observar que nessas alíquotas a quantidade de proteína eluída foi muito maior quando comparada com as outras frações aplicadas nas raias 3, 4, 5 e 9. Em 53B, as raias 1 a 4 correspondem às frações pares de 6 a 12, e as raias de 5 a 9, correspondem às frações pares e ímpares de 14 a 18. Neste gel, é possível observar que as bandas visualizadas nas raias de 1 a 4 são mais intensas quando comparadas com as bandas observadas nas raias de 5 a 9. A aplicação das frações eluídas da resina, na forma de amostras pares e ímpares, tem como finalidade identificar em qual intervalo das frações a proteína recombinante irá sair em maior quantidade. Com isso, a partir da análise dos géis mostrados na Figura 53, foram estabelecidos três grupos diferentes de amostras, de acordo com a intensidade das bandas visualizadas, que foram reunidas (“pools”) e, em seguida, quantificadas por reação de Bradford. As frações coletadas de 6 a 12 (raias 6 a 8 em 53A, e raias 1 a 4, em 53B), apresentaram a maior concentração de proteínas recombinantes, e formaram o “pool 1”. As frações coletadas 5, e 13 a 18 (raias 5 e 9 em 53A, e raias 5 a 9, em 53B), apresentaram uma menor concentração de proteínas recombinantes, e formaram o “pool 2”. As demais amostras coletadas, correspondentes às frações 19 a 24, e não analisadas em SDS-PAGE, apresentaram uma concentração muito baixa de proteínas recombinantes, e formaram o “pool 3”.

A Figura 54 representa o resultado obtido após o ensaio de purificação para a proteína r134B02. Na figura, as raias 1 e 2 contêm, respectivamente, as alíquotas de maior

concentração (“pool 1”), e menor concentração (“pool 2”), obtidas ao final da cromatografia. A diferença de intensidade das bandas observadas no SDS-PAGE, quando são comparadas as raias 1 e 2, vem confirmar o que a reação de Bradford já havia mostrado inicialmente. As raias 3 e 4 correspondem, respectivamente, ao extrato protéico liberado após três passagens pela resina de níquel (“flow-through”), e a proteína recombinante purificada, após lavagem da resina. O excesso de proteína recombinante que não se ligou à resina e ainda está presente no “flow-through” (raia 1 na Figura 53A e raia 3 na Figura 54), pode ser explicado por diferentes fatores: (1) Como foram experimentos iniciais de purificação, a quantidade de resina utilizada pode não ter sido suficientemente adequada, em relação à quantidade de proteínas aplicadas; (2) A uréia, usada durante o procedimento (item 2.25 do Material e Métodos), pode ter desnaturado uma grande quantidade de proteínas dos corpos de inclusão, levando à saturação da resina; (3) Por ser uma amostra proveniente da fração celular insolúvel, provavelmente na forma de corpos de inclusão, uma parte das moléculas não foram desnaturadas, o que pode ter interferido na reação de ligação das histidinas, com o níquel presente na resina; (4) Podem ter ocorrido interações inespecíficas com outras proteínas diminuindo, ou mesmo, impedindo, a reação de ligação entre as histidinas da “tag”, com o níquel contido na resina.

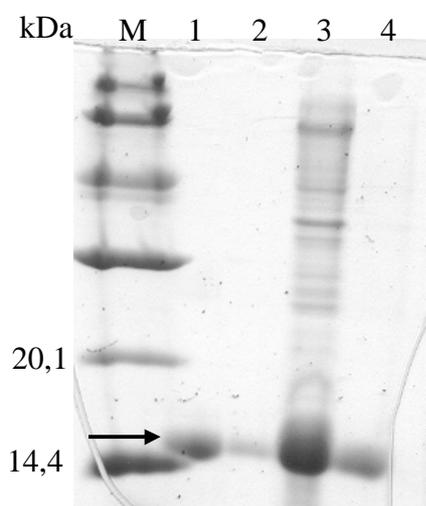


Figura 54. Ensaio de purificação da proteína r134B02, através de cromatografia de afinidade por níquel, representado em SDS-PAGE 12,5%, corado com Coomassie blue. kDa: massa em kiloDaltons; M: marcador de massa molecular (LMW calibration – GE); raia 1: alíquotas de 4 a 9, referentes ao “pool 1”, com maior concentração de proteínas; raia 2: alíquotas de 10 a 14, referentes ao “pool 2”, com menor concentração de proteínas; raia 3: extrato protéico não ligado após 3 passagens pela resina (“flow-through”); raia 4: proteína purificada, liberada após a lavagem da resina. A presença da proteína recombinante é indicada pela seta.

Assim, ao final dos ensaios cromatográficos, as proteínas purificadas foram utilizadas para a imunização de camundongos, objetivando a produção de anticorpos policlonais anti-rMT1 e anti-r134B02.

5.7.2 Produção de anticorpos policlonais contra a proteína rMT1

Camundongos da linhagem Balb/C, com 6 a 8 semanas de vida, foram utilizados para a produção de anticorpos policlonais, anti-rMT1. Para tanto, a proteína recombinante, purificada em resina de níquel, foi homogeneizada com uma solução estimuladora não-específica da resposta imune (adjuvante completo de Freund), na proporção de 1:1, ou seja, 50% v/v (ex. 200µL da proteína recombinante purificada + 200µL de adjuvante). Os adjuvantes de Freund são emulsões água-em-óleo, preparada com óleos não metabolizáveis. Quando essa emulsão contém células mortas de *Mycobacterium tuberculosis* é referida como adjuvante completo de Freund. Se não contém as células da bactéria, é então referida como adjuvante incompleto de Freund. A mistura entre os adjuvantes e o antígeno deve ser muito bem homogeneizada, utilizando uma seringa de vidro, até que ela se apresente bem espessa, que é a condição adequada para o procedimento de imunização. Após esse procedimento, aproximadamente 300µL da mistura imunogênica, correspondendo a aproximadamente 25µg a 30µg de antígeno, foram utilizados para a imunização dos animais. Após 14 dias da primeira aplicação, foi realizada a segunda imunização com a proteína rMT1 purificada, na proporção de 1:1, entretanto, agora, com o adjuvante incompleto de Freund. A terceira imunização foi realizada 10 dias após a segunda, utilizando a mesma mistura imunogênica preparada para a segunda dose. Após as três imunizações, foi realizada a sangria dos animais, 8 dias após a terceira imunização.

Após a sangria, o soro dos animais contendo o anticorpo policlonal anti-rMT1, foi utilizado para uma análise de western blot, como anticorpo primário, na diluição de 1:1000. Neste ensaio, foram utilizadas as proteínas r46B11 e r134B02, ambas produzidas em sistemas de expressão diferentes (sistema Gateway - Invitrogen, e sistema pET - Novagen), e as frações sobrenadante e precipitada da proteína rMT1. Esse experimento foi proposto para testar a imunoreatividade e a especificidade de reconhecimento do anticorpo, uma vez que as proteínas r46B11 e r134B02 possuem sequências de aminoácidos em comum com a sequência de rMT1.

Na Figura 55, a raia 1 contém os extratos protéicos referentes à linhagem BL21(DE3) Rosetta de *E. coli*, cultivada sem o plasmídeo de expressão, utilizada como controle negativo. Nas raias 2 e 3, é possível observar a presença das bandas referentes à proteína r46B11 com as massas esperadas (~22,7kDa), produzida no sistema Gateway, e (~21,4kDa), produzida no sistema pET, respectivamente. Nas raias 4 e 5 foram aplicadas as amostras da proteína recombinante r134B02, com as massas esperadas ~13,9kDa, produzida no sistema Gateway, e 13,3kDa, produzida no sistema pET, respectivamente. A amostra aplicada na raia 4 apresentou uma fraca marcação na membrana, enquanto é possível visualizar facilmente a banda presente na raia 5, referente à proteína r134B02, produzida no sistema pET. Nas raias 6 e 7, foram aplicadas as amostras de precipitado e sobrenadante, respectivamente, da proteína rMT1, produzida no sistema Gateway. É possível observar a presença da banda da proteína recombinante apenas na fração celular precipitada (insolúvel), na raia 6, com a massa molecular esperada (42,7kDa). A não detecção da proteína rMT1 na raia 7, correspondente a fração sobrenadante, sugere que ela foi produzida apenas em sua forma insolúvel, provavelmente como corpos de inclusão. A raia 8 contém a amostra da proteína rMT1 purificada em resina de níquel, utilizada como controle positivo da reação. Os resultados obtidos mostram que o anticorpo anti-rMT1 apresenta boa imunoreatividade e capacidade de reconhecimento. Esse fato é sustentado pela capacidade do anticorpo em reconhecer as proteínas r46B11 e r134B02. Assim, os resultados obtidos com o anticorpo anti-rMT1 permitiram a sua utilização como ferramenta para a detecção de proteínas nativas extraídas do pistilo de *N. tabacum*, em ensaios de ELISA e western blot, cujos resultados são apresentados a seguir.

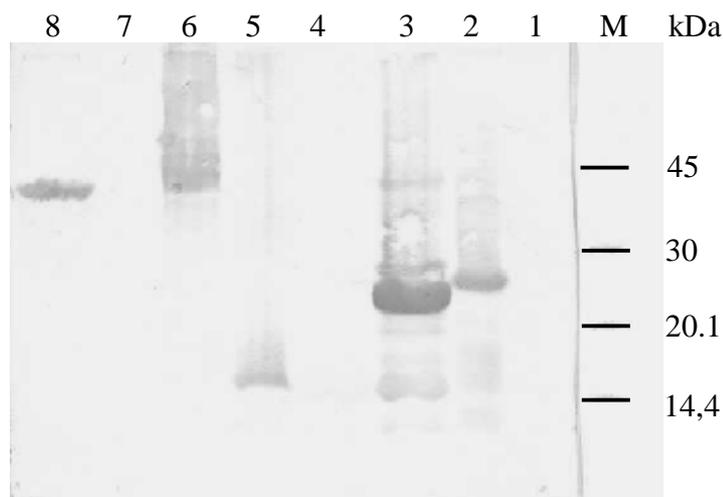


Figura 55. Análise de western blot, utilizando o anticorpo anti-rMT1 como anticorpo primário (1:1000), mostrando a presença das bandas das proteínas metiltransferases recombinantes (r46B11, r134B02 e rMT1), obtidas após a expressão em *E. coli* BL21(DE3) Rosetta. kDa: massa em kiloDaltons; M: padrão de massa molecular (LWM – GE); 1: extrato protéico de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta, sem plasmídeo (controle negativo); 2 e 3 extratos protéicos da proteína r46B11, produzida no sistema Gateway e pET, respectivamente; 4 e 5: extratos protéicos da proteína r134B02, produzida no sistema Gateway e pET, respectivamente; 6 e 7: extratos protéicos das frações precipitada e sobrenadante, respectivamente, correspondentes a proteína rMT1, produzida a partir do sistema Gateway; 8: proteína rMT1, obtida após purificação em resina de níquel (controle positivo).

5.7.2.1 Identificação das metiltransferases nativas através de ensaio de ELISA

Após o resultado satisfatório, obtido com o anticorpo anti-rMT1 no reconhecimento das metiltransferases recombinantes, o anticorpo anti-rMT1 foi utilizado como anticorpo primário em ensaios de ELISA, além de extratos protéicos do pistilo (estigma/estilete e ovário), para confirmar a tradução *in planta* dos transcritos das metiltransferases. A técnica de ELISA (“Enzyme-linked immunosorbent assay” – Engvall & Perlman, 1971), permite identificar uma proteína específica presente em uma população de outras proteínas, utilizando-se preparações cruas ou semipurificadas. Ensaio de ELISA apresentam alta sensibilidade, facilidade na preparação dos reagentes, rapidez e alta reprodutibilidade dos resultados. Tais características, aliadas à variedade dos tipos de ensaio, fizeram com que essa técnica fosse amplamente adotada na análise de reações envolvendo antígeno-anticorpo (Brasileiro & Carneiro, 1998). Os extratos protéicos foram preparados a partir de estigmas/estiletos e ovários, coletados de flores de *N. tabacum* entre os estádios 8 e 11 do

desenvolvimento floral. Foram utilizados também, extratos protéicos de folha de *N. tabacum* SR1, como controle negativo, além da proteína rMT1 purificada em resina de níquel, como controle positivo. Além disso, este ensaio visou também determinar uma diluição ótima de uso do anticorpo em experimentos de western blot.

Os resultados obtidos no ensaio de ELISA foram muito interessantes (Figura 56). É possível observar que a imunoreatividade do anticorpo contra a proteína rMT1 foi extremamente alta, em todas as diluições apresentadas (barras pretas no gráfico). Essa enorme capacidade de reconhecimento manteve-se alta até na diluição de 1:6400 (dados não mostrados), e é explicada pelo fato de que o anticorpo foi produzido utilizando a proteína rMT1 purificada em resina de níquel, para a imunização dos camundongos. A amostra do extrato protéico de folhas, e que foi utilizado como controle negativo, apresentou-se com valores de leitura muito baixos, próximos ao branco, principalmente a partir da diluição 1:200 (barras pontilhadas no gráfico). Os resultados mais interessantes foram obtidos com as amostras do estigma/estilete e ovário (barras com linhas diagonais e barras lisas, respectivamente, no gráfico), onde pode ser observado que o anticorpo anti-rMT1 foi capaz de reconhecer as proteínas nativas, em ambos os tecidos. Estes resultados corroboram os dados de northern blot previamente obtidos, onde esse gene apresentou uma expressão específica nos tecidos do estigma/estilete e ovário (Ângelo, 2001).

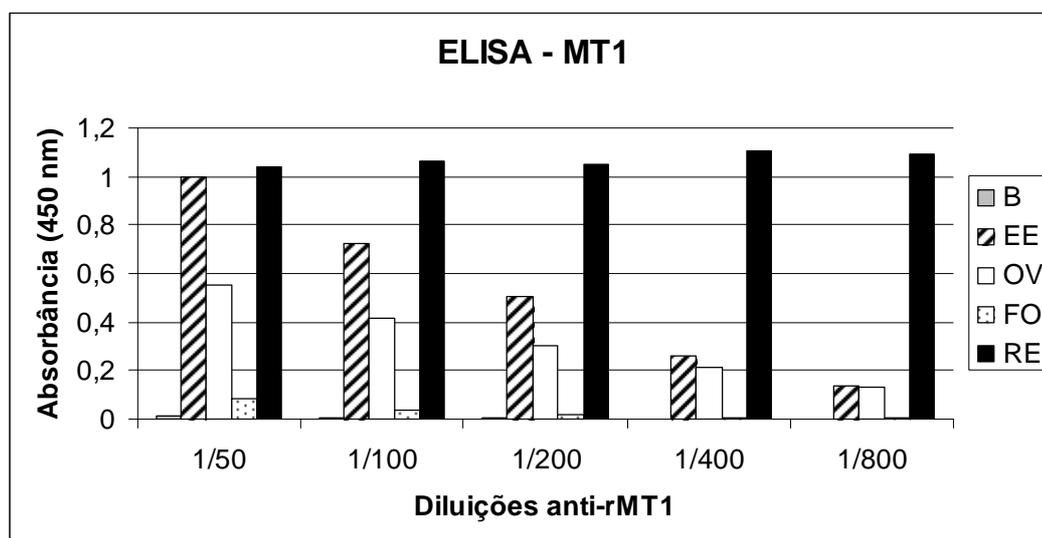


Figura 56. Gráfico representativo dos resultados obtidos no ensaio de ELISA utilizando o anticorpo anti-rMT1 como anticorpo primário, e os extratos totais de proteínas do estigma/estilete (EE), ovário (OV), folha (FO), e a proteína rMT1, purificada em resina de níquel (RE). (B) branco. É possível observar que o anticorpo anti-rMT1 foi capaz de reconhecer proteínas nativas, presentes apenas nos tecidos do estigma/estilete e ovário (barra com linhas diagonais e barra lisa, respectivamente, no gráfico).

Quando os resultados obtidos para o extrato protéico dos tecidos do estigma/estilete e da proteína rMT1 são comparados, na diluição 1:50, é possível observar que os valores obtidos são quase os mesmos. Entretanto, a leitura obtida para a amostra de rMT1 na concentração de 1:50 do anticorpo anti-rMT1 apresenta uma possível saturação, uma vez que foram aplicados 2µg de proteína rMT1 purificada, enquanto, por outro lado, foram aplicados 2µg de extrato total de proteínas do estigma/estilete. Ainda na diluição de 1:50, é possível observar que o anticorpo foi capaz de reconhecer proteínas nativas no extrato protéico total do ovário, entretanto em uma quantidade menor, aproximadamente metade, quando comparada com as proteínas do estigma/estilete.

5.7.2.2 Análise tecido-específica das metiltransferases nativas através de ensaio de western blot, com o anticorpo anti-rMT1

O ELISA é um ensaio quantitativo e foi realizado com um anticorpo capaz de reconhecer pelo menos as proteínas codificadas pelos cDNAs 46B11, 134B02 e MT1, ou seja, um somatório das proteínas MTs. Adicionalmente, existem diversos transcritos alternativos codificando proteínas MTs, identificados em nosso banco de dados TOBEST. Assim, para verificar se um ou diversos transcritos são traduzidos em células vegetais, o anticorpo anti-rMT1 foi utilizado como anticorpo primário em ensaios de western blot com as mesmas amostras protéicas utilizadas no ensaio de ELISA. O SDS-PAGE, representado na Figura 57A, nos mostra que a extração de proteínas nativas foi altamente eficiente. Na Figura 57B, os resultados obtidos mostraram que o anticorpo anti-rMT1 foi capaz de reconhecer a banda da proteína MT1 recombinante, produzida em *E. coli* (42,7kDa – Figura 57B, raia 6), e uma banda com um tamanho muito semelhante a rMT1, provavelmente correspondente a proteína MT1 nativa, nos tecidos do estigma/estilete e ovário (39,9kDa – Figura 57B, raias 2 a 5). Na raia 1, onde foram aplicados os extratos de proteínas nativas dos tecidos de folha, nenhuma banda corresponde à proteína MT1 nativa (39,9kDa) foi identificada, confirmando os resultados obtidos no ensaio de ELISA. Nas raias 7 e 8 foram aplicadas as amostras das proteínas r46B11 e r134B02 purificadas em resina de níquel, respectivamente. Nenhuma banda de tamanho aproximado a essas proteínas menores foi detectada nas amostras dos tecidos do estigma/estilete e ovário (raias 2 a 5). A seta na Figura 57B indica a presença da proteína r134B02, que foi fracamente reconhecida pelo anticorpo. A diferença observada entre as massas das proteínas MT1

recombinante e nativa são devidas à adição de alguns aminoácidos na região 5' da proteína MT1 recombinante, a partir do vetor utilizado para a expressão em *E. coli* (pDEST17). Nas raias 4 e 5 da Figura 57B, correspondentes aos extratos protéicos dos tecidos do ovário, as quantidades de proteínas detectadas pelo anticorpo foram sutilmente maiores, quando comparadas com as amostras das raias 2 e 3, correspondentes aos extratos protéicos dos tecidos do estigma/estilete. Esse resultado é diferente do que foi encontrado no ensaio de ELISA, onde parecia haver quase duas vezes mais proteína(s) MT(s) no estigma/estilete do que no ovário. Estes resultados confirmam que pelo menos o transcrito completo, referente ao cDNA MT1, é traduzido nas células do pistilo. Assim, persiste a dúvida se os transcritos menores (46B11, 134B02 e outros) são traduzidos ou não nas plantas. Por outro lado, é possível que sejam traduzidos, mas que o anticorpo anti-rMT1 não seja capaz de reconhecer as proteínas nativas menores.

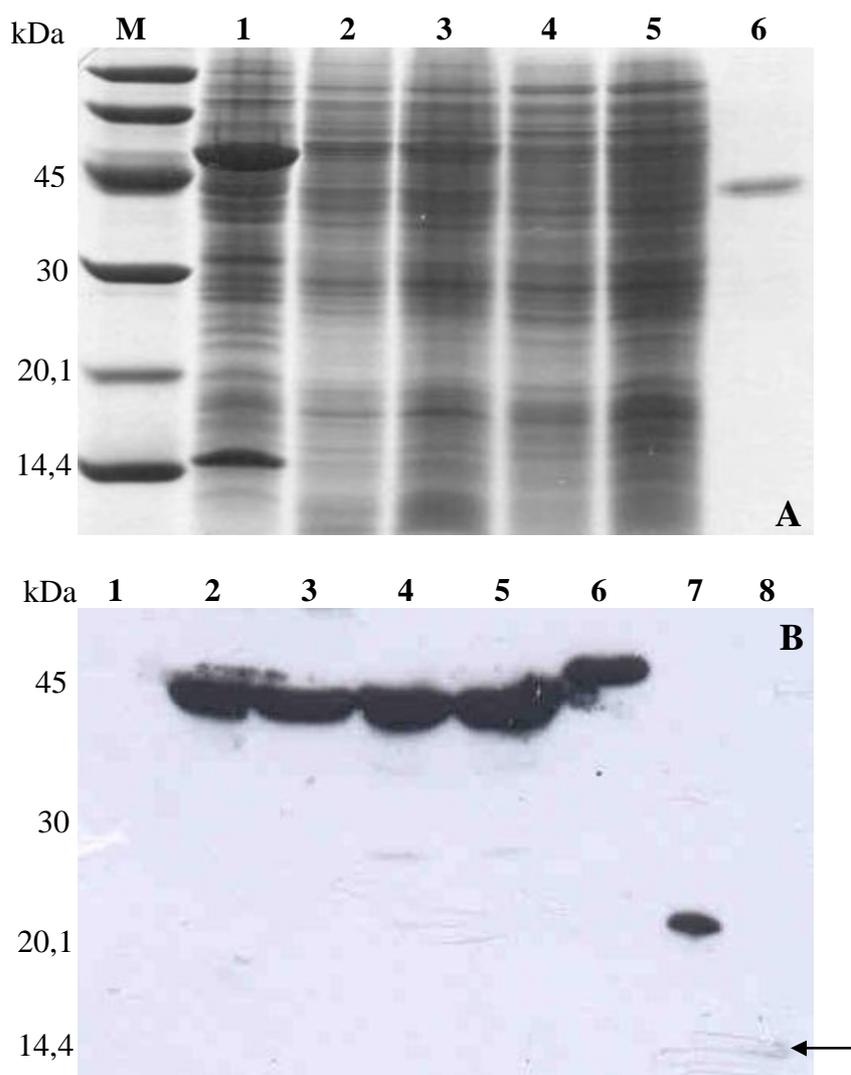


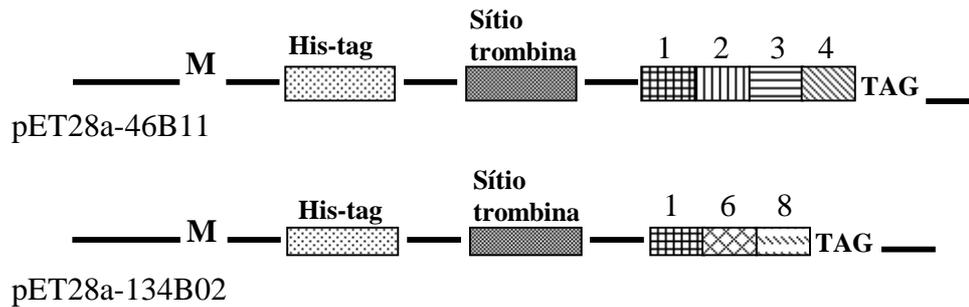
Figura 57.

Figura 57. Análise das proteínas extraídas dos tecidos do pistilo da flor de *N. tabacum*. **(A)** SDS-PAGE 12,5% contendo os extratos protéicos totais das amostras utilizadas nas análises: kDa, massa em kilodaltons; M: marcador molecular LMW (GE); 1) proteínas extraídas de folha (50µg); 2 e 3: proteínas extraídas do estigma/estilete com 25µg e 50µg, respectivamente; 4 e 5: proteínas extraídas do ovário, com 25µg e 50µg, respectivamente; 6: proteína rMT1 purificada em resina níquel (controle positivo). **(B)** Análise de western blot. Membrana obtida após transferência das proteínas que foram aplicadas no gel idêntico ao representado na Figura 57A. Os sinais mais intensos correspondem às proteínas MT1 nativas, que foram reconhecidas pelo anticorpo policlonal anti-rMT1. kDa, massa em kilodaltons; 1) proteínas extraídas de folha (50µg); 2 e 3: proteínas extraídas do estigma/estilete com 25µg e 50µg, respectivamente; 4 e 5: proteínas extraídas do ovário com 25µg e 50µg, respectivamente; 6: proteína rMT1 purificada em resina níquel (controle positivo). A seta na Figura 57B indica um sinal fraco referente à proteína r134B02.

5.8 Produção de anticorpo policlonal contra a proteína r134B02

Camundongos da linhagem Balb/C, com 6 a 8 semanas de vida, foram utilizados para a produção de anticorpos policlonais anti-r134B02. Todos os procedimentos utilizados para o preparo da amostra a ser imunizada nos animais foram os mesmos que estão descritos no item 4.27 deste trabalho. Entretanto, antes de ser utilizado nos experimentos de western blot, o soro dos animais, contendo os anticorpos, foi submetido a um ensaio de pré-adsorção (item 4.28, do Material e Métodos), com o extrato protéico celular da linhagem de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta, utilizada na expressão heteróloga. Este ensaio permite que anticorpos, que possam ter sido produzidos contra proteínas da *E. coli*, reajam com as proteínas do extrato celular bacteriano, deixando o anticorpo anti-r134B02 livre destes possíveis contaminantes.

Assim, após o ensaio de pré-adsorção, foi realizada uma análise de western blot, utilizando os extratos protéicos das proteínas r46B11 e r134B02, e o anticorpo anti-r134B02, como anticorpo primário. Esse experimento foi realizado para testar a especificidade de reconhecimento do anticorpo, uma vez que tais proteínas recombinantes possuem em comum o exon 1 do gene *NtJAMT*, a cauda de histidinas, um sítio de corte para a enzima trombina, além de alguns aminoácido presentes no vetor pET28a (esquema 4).



Esquema 4. Representação esquemática das regiões em comum entre as proteínas recombinantes pET28a-46B11 e pET28a-134B02. TAG: códon de terminação. Os números acima dos retângulos, diferentemente hachurados, correspondem à numeração dos exons nos cDNAs. M: metionina, onde se inicia a tradução. As barras pretas correspondem à parte da seqüência do vetor pET28a.

Entretanto, antes da realização deste experimento, foi realizada outra análise de western blot, com os extratos protéicos das proteínas recombinantes citadas acima, em diferentes concentrações (0,5µg, 1µg e 5µg). Este experimento objetivou confirmar a presença das proteínas r46B11 e r134B02 para o ensaio de western com o anticorpo anti-r134B02, uma vez que ambas são expressas com uma “tag” de histidinas em fusão N-terminal com a região codificadora dos clones de cDNAs. Dessa forma, o resultado desse ensaio pode ser visto na Figura 58.

Na Figura 58, a raia 1 contém os extratos protéicos referentes à linhagem BL21(DE3) Rosetta de *E. coli*, cultivada sem o plasmídeo de expressão, utilizada como controle negativo. Nas raias 2, 3, e 4, é possível observar as bandas referentes à proteína r134B02 (~13,3kDa), nas diferentes concentrações utilizadas. A raia 5 contém a amostra utilizada como controle positivo, para a presença da proteína r134B02. Este controle positivo corresponde à amostra da fração sobrenadante da proteína induzida por 20hs, a 22°C. O mesmo resultado pode ser observado nas raias 6, 7, e 8, agora para a proteína r46B11 (~21,4kDa). A raia 9 contém a amostra utilizada como controle positivo, para a presença da proteína r46B11. Este controle positivo corresponde à amostra da fração precipitada da proteína induzida por 3hs, a 37°C.

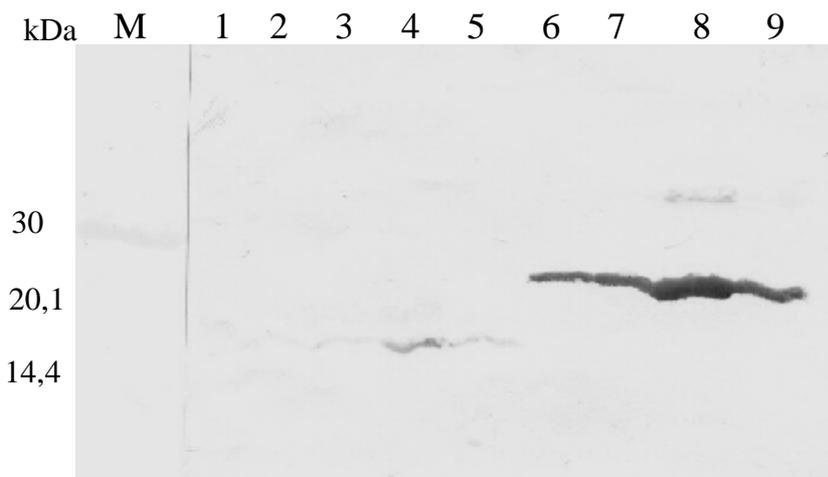


Figura 58. Análise de western blot, utilizando o anticorpo anti-histidinas como anticorpo primário (1:2500), mostrando a presença das bandas das proteínas r46B11 e r134B02, obtidas após a expressão em *E. coli* BL21(DE3) Rosetta. kDa: massa em kiloDaltons; M: padrão de massa molecular (LWM calibration – GE); raia 1: extrato protéico de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta, sem plasmídeo; raias 2, 3, 4: correspondem, respectivamente, aos extratos com 0,5 μ g, 1 μ g e 5 μ g de proteína total contendo a proteína r134B02; raia 5: controle positivo r134B02 (sobrenadante de amostra induzida por 20hs, a 22°C), com 1 μ g de proteína total; raias 6, 7, 8: correspondem, respectivamente, aos extratos com 0,5 μ g, 1 μ g e 5 μ g de proteína total, contendo a proteína r46B11; raia 9: controle positivo r46B11 (precipitado de amostra induzida por 3hs, a 37°C), com 1 μ g de proteína total.

Ainda na figura, além da diferença de marcação entre as diferentes concentrações aplicadas, observa-se uma grande diferença de marcação entre os extratos das duas proteínas recombinantes. Certamente, este fato está relacionado com as diferentes frações utilizadas no blot (sobrenadante, para a proteína r134B02, e precipitado, para a proteína r46B11). Em geral, se a lise celular para a obtenção das proteínas recombinantes não é muito eficaz, pode ocorrer maior acúmulo delas na fração celular insolúvel (precipitada), quando comparadas com proteínas localizadas na fração celular solúvel (sobrenadante). No caso da proteína r46B11, a amostra de precipitado foi utilizada, uma vez que ainda não se obteve esta proteína na fração sobrenadante do extrato celular. Com base nestes resultados, foi realizado um experimento equivalente, utilizando agora, como anticorpo primário, o anticorpo anti-r134B02, sendo que os resultados podem ser vistos na Figura 59.

Na Figura 59, as amostras foram aplicadas na mesma ordem das amostras observadas na Figura 58. Entretanto, na raia 4, observa-se que a banda da proteína não se apresenta de forma definida, aparecendo como uma mancha na membrana. Possivelmente, isso ocorreu durante a montagem do aparato de transferência das proteínas do gel para a

membrana. Ao se analisar a figura, é possível observar que o anticorpo anti-r134B02 foi capaz de reconhecer, em princípio, as duas proteínas recombinantes. Os cDNAs 46B11 e 134B02 possuem uma combinação de exons bem diferentes, tendo em comum apenas o exon 1 do gene *NtJAMT* (exons 1, 2, 3 e 4, para o 46B11, e exons 1, 6 e 8, para o 134B02). Entretanto, como os dois cDNAs foram clonados no mesmo vetor de expressão (pET28a), as proteínas recombinantes produzidas têm em comum, além do exon 1 do gene *NtJAMT*, cerca de ~20 aminoácidos do vetor de expressão. Dentre esses aminoácidos adicionais do vetor, estão a cauda de histidinas (6 resíduos), e o sítio de corte para a enzima trombina (6 resíduos), que são expressos em fusão N-terminal com as proteínas recombinantes. Essa identidade de ~45 aminoácidos entre as duas proteínas (20 aminoácidos do vetor de expressão + 25 aminoácidos do exon 1), pode ter ocasionado o reconhecimento pelo anticorpo de epítomos semelhantes, promovendo tal reação cruzada observada. Com isso, podemos concluir que o anticorpo anti-r134B02 é capaz de reconhecer a proteína r134B02 superexpressa em *E. coli* de forma eficiente, e um trecho contendo 45 aminoácidos em comum com a proteína r46B11, e não a proteína r46B11 toda. A boa imunoreatividade apresentada faz desse anticorpo uma ferramenta importante para estudos de identificação de proteínas nativas extraídas dos tecidos do pistilo.

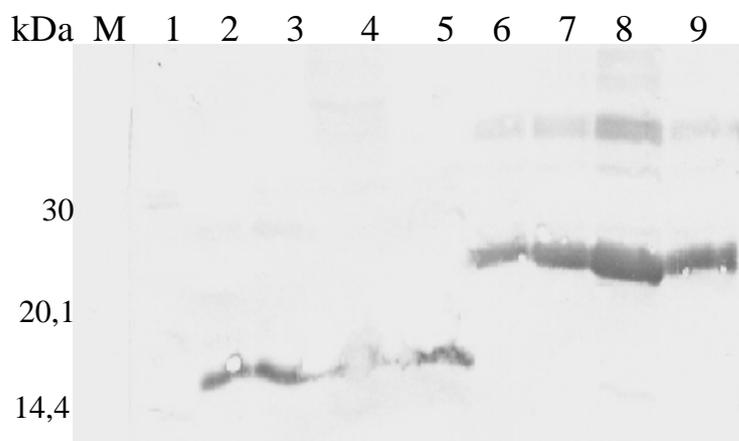


Figura 59. Análise de western blot, utilizando o anticorpo anti-r134B02 como anticorpo primário (1:2500), mostrando a presença das bandas das proteínas r46B11 e r134B02, obtidas após a expressão em *E. coli* BL21(DE3) Rosetta. kDa: massa em kiloDaltons; M: padrão de massa molecular (LWM calibration – GE); raia 1: extrato protéico de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta, sem plasmídeo; raias 2, 3, 4: correspondem, respectivamente, aos extratos protéicos com 0,5µg, 1µg e 5µg, referentes à proteína r134B02; raia 5: controle positivo (sobrenadante de amostra induzida por 20hs, a 22°C) para esta proteína (1µg); raias 6, 7, 8: correspondem, respectivamente, aos extratos protéicos com 0,5µg, 1µg e 5µg, referentes à proteína r46B11; raia 9: controle positivo (precipitado de amostra induzida por 3hs, a 37°C) para esta proteína (1µg).

5.8.1 Análise tecido-específica das metiltransferases nativas através de ensaio de western blot, com o anticorpo anti-r134B02

Com base na boa imunoreatividade apresentada pelo anticorpo anti-r134B02, como observado na Figura 59, este anticorpo foi utilizado em novos ensaios de western blot, utilizando agora proteínas totais extraídas dos tecidos do pistilo e de folhas. O objetivo deste novo ensaio foi analisar se a sequência correspondente ao cDNA 134B02 está sendo traduzida em proteína e pode ser identificada nos tecidos do pistilo. Na Figura 60, os resultados obtidos mostraram que o anticorpo anti-r134B02 foi capaz de reconhecer a banda da proteína 134B02 recombinante produzida em *E. coli* (~13,9kDa, raia 4), além de uma banda correspondente a proteína rMT1 (~42,7kDa, raia 5). Na raia 1, onde foram aplicados os extratos de proteínas extraídas dos tecidos de folha, nenhuma banda foi identificada, corroborando os resultados de northern blot previamente obtidos (Ângelo, 2001), de que o gene *NtJAMT* não se expressa nas folhas. Nas raias 2 e 3, onde foram aplicados os extratos protéicos do estigma/estilete e ovário, respectivamente, nenhuma banda correspondente a proteína 134B02 nativa foi identificada. Entretanto, o anticorpo anti-r134B02 foi capaz de reconhecer uma banda correspondente à proteína MT1 nativa (~39,9kDa), conforme observado no estigma/estilete (raia 2) e ovário (raia 3). Além disso, esse anticorpo foi capaz de reconhecer também três bandas adicionais no ovário, com massas variando de ~18kDa e 32kDa, e duas bandas adicionais no estigma/estilete, com massas que variaram de ~22kDa e 32kDa, conforme indicado pelas setas. É possível notar que as bandas adicionais, presentes no ovário, mostraram um sinal um pouco mais intenso, do que o sinal das bandas adicionais presentes estigma/estilete. O resultado mais significativo desse ensaio foi que, pela primeira vez, foi demonstrada a presença de várias proteínas metiltransferases nos extratos protéicos de tecidos do pistilo, provavelmente traduzidas a partir das sequências dos diversos cDNAs encontrados em nosso banco de dados (TOBEST). Entretanto, experimentos adicionais deverão ser realizados para identificar, especificamente, quais seriam esses transcritos, e suas possíveis implicações no processo reprodutivo em *N. tabacum*.

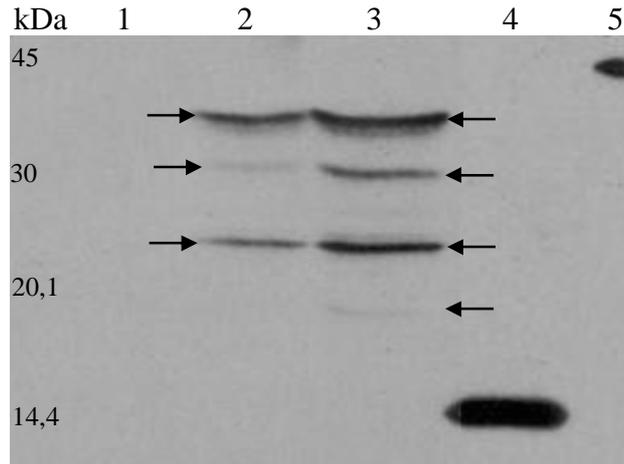


Figura 60. Análise de western blot utilizando proteínas nativas extraídas dos tecidos do estigma/estilete, ovário e folhas, com o anticorpo anti-r134B02. kDa, massa em kilodaltons; 1) proteínas extraídas de folha (50µg); 2 e 3: amostras de proteínas extraídas do estigma/estilete e ovário, respectivamente, contendo 50µg de proteína total; 4: proteína r134B02 (~13,9kDa), purificada em resina níquel (controle positivo); 5: proteína rMT1 (~42,7kDa), purificada em resina níquel (controle positivo). As setas na figura indicam a presença da banda correspondente a proteína MT1 nativa (raias 2 e 3, ~39,9kDa), e outras bandas adicionais variando de ~22kDa a 32kDa (raia 2), e 18kDa a 32kDa (raia 3).

A linhagem de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta foi escolhida para a expressão das construções pEXP17-MT1, pETSUMO-MT1, pET28a-46B11 e pET28a-134B02 devido à análise de códons raros realizada nestas sequências e aos bons resultados alcançados em um trabalho anterior de expressão heteróloga, quando se utilizou essa linhagem para a expressão das proteínas recombinantes pEXP17-46B11 e pEXP17-134B02 (Avanci, 2006).

Proteínas recombinantes, com características e funções diferentes, têm sido obtidas com sucesso quando se utiliza a linhagem BL21(DE3) Rosetta para a expressão. Esses estudos vão desde proteínas utilizadas em experimentos de cristalografia (Moreland *et al.*, 2005), até proteínas relacionadas à morte celular (Lee *et al.*, 2005), onde há uma grande necessidade das proteínas serem produzidas em suas formas solúveis e ativas, para que os estudos de determinação estrutural, e interação proteína-proteína, em cascatas de sinalização, sejam bem-sucedidos. Visando desenvolver um método de otimização da expressão e purificação de uma proteína transmembrana recombinante, envolvida na sinalização de receptores de células T de camundongos, Brenac e colaboradores (2006) utilizaram três linhagens diferentes de *E. coli* [(BL21(DE3), BL21(DE3) pLysS e BL21(DE3) Rosetta] para a expressão heteróloga, em duas temperaturas diferentes (37°C e 15°C). As maiores quantidades, de proteína recombinante solúvel, foram obtidas quando

ela foi produzida com uma “tag” de histidinas em fusão C-terminal com a região codificadora, na temperatura de 37°C, utilizando a linhagem BL21(DE3) Rosetta. Proteínas recombinantes com alto potencial terapêutico também têm sido produzidas com sucesso em BL21(DE3) Rosetta. Romanello e colaboradores (2006) realizaram a clonagem, expressão, purificação e caracterização de uma protease IgA1 de *Streptococcus pneumoniae*. Esta protease é uma das proteínas recombinantes com maior atividade já produzidas em *E. coli*. Essa característica fez dessa proteína uma forte candidata para a produção de vacinas contra a infecção por esta bactéria, uma vez que a protease IgA1 está presente em quase todos os sorotipos de *S. pneumoniae* (Romanello *et al.*, 2006).

Sistemas de expressão heteróloga baseados em células de *E. coli* têm sido amplamente utilizados como fonte para a obtenção de antígenos, visando a imunização de animais para a produção de anticorpos. Em geral, os antígenos obtidos dessa forma são capazes de induzir boa resposta imune (Harlow & Lane, 1988). Essa estratégia foi utilizada por Cao e colaboradores (2007), para a produção de um anticorpo policlonal em coelhos, contra uma fosfolipase do tipo C, de *Arabidopsis*. Os resultados obtidos mostraram a alta especificidade do anticorpo produzido, mesmo quando foram utilizadas outras proteínas fosfolipases recombinantes de *A. thaliana*, em ensaios de western blot. Xu e colaboradores (1999) produziram um anticorpo policlonal em coelhos, utilizando como antígeno uma proteína recombinante purificada, produzida em *E. coli*. Esta proteína é expressa a partir de um gene específico de células gaméticas masculinas, encontrado em plantas de lírio. Após a confirmação da especificidade do anticorpo produzido, em experimento de western blot, o anticorpo foi utilizado para a identificação da proteína nativa, no extrato protéico total das células germinativas. Os resultados obtidos mostraram que o anticorpo policlonal foi capaz de identificar a proteína nativa, indicando a eficiência de reconhecimento do anticorpo produzido contra a proteína recombinante expressa em *E. coli* (Xu *et al.*, 1999). Ensaios de ELISA também são utilizados para a detecção de proteínas de plantas. Youm e colaboradores (2008) utilizaram plantas transgênicas de tomate para a obtenção de uma proteína β -amilóide humana, envolvida na progressão da doença de Alzheimer. Os extratos protéicos, obtidos das plantas transgênicas, foram analisados através de ensaio de ELISA, para a detecção da proteína β -amilóide. O resultado do ensaio mostrou grandes quantidades da proteína produzida nas plantas transgênicas, indicando que tais plantas se apresentam como um sistema promissor para a produção da enzima β -amilóide humana, podendo ser usada como antígeno para a produção de vacinas (Youm *et al.*, 2008). Utilizando camundongos Balb/C, Leblanc *et al.* (1999) produziram um anticorpo monoclonal contra

uma proteína de ligação a auxina de *N. tabacum*. Quando esse anticorpo foi usado em abordagens imunológicas, os autores conseguiram demonstrar que essa proteína está presente na membrana plasmática, e está envolvida na ativação de pelo menos uma das respostas de auxina relacionadas à membrana plasmática em células de *N. tabacum* (Leblanc *et al.*, 1999).

Os resultados obtidos com o anticorpo anti-rMT1 nos ensaios de ELISA e western blot, utilizando proteínas extraídas do pistilo de *N. tabacum*, se mostraram bem expressivos. Antes da obtenção deste anticorpo, dois outros já haviam sido produzidos, sendo um contra a proteína r46B11 (Avanci, 2006), e outro neste trabalho, contra a proteína r134B02. Estes dois últimos anticorpos já foram utilizados em várias análises de western blot, utilizando os extratos protéicos dos tecidos do estigma/estilete e ovário. Entretanto, apenas em um desses ensaios foi possível detectar uma banda correspondente à proteína nativa relativa ao cDNA 46B11, quando se utilizou o anticorpo anti-r46B11 (dados não mostrados). O anticorpo policlonal produzido contra a proteína rMT1 apresentou uma alta imunoreatividade e capacidade de reconhecimento, tanto da proteína recombinante, utilizada como antígeno, quanto a proteína nativa, presente nos extratos protéicos do pistilo. Assim, esse anticorpo constituiu-se em uma excelente ferramenta voltada para a análise funcional das metiltransferases do pistilo de *N. tabacum*.

A escolha do sistema pET para a expressão dos clones de cDNA 46B11 e 134B02 neste trabalho, baseou-se em relatos da literatura onde a combinação desse sistema de expressão, com a linhagem de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta, permitiu a obtenção de proteínas recombinantes solúveis, de forma eficaz (Brenac *et al.*, 2006; Sheng *et al.*, 2007). Além disso, tem-se mostrado que a partir de poucas horas após a indução, é possível obter mais de 50% da proteína de interesse, em relação às proteínas celulares totais (Novagen, 2003). Entretanto, a combinação entre o sistema pET e a linhagem BL21(DE3) Rosetta não se mostrou suficiente para que fosse possível obter a proteína recombinante r46B11 de forma solúvel, mesmo quando se utilizou uma temperatura mais baixa (20°C), por longos períodos de tempo. Apesar desse resultado, a quantidade de proteínas r46B11 produzidas pelo vetor pET28a foi substancialmente maior (Figura 36, raias 6 a 9), quando se comparou com a produção da proteína recombinante produzida a partir do mesmo cDNA, clonado em um outro vetor (Avanci, 2006).

Por outro lado, os resultados obtidos com a expressão do cDNA 134B02 no vetor pET28a, utilizando a linhagem BL21(DE3) Rosetta, foram extremamente satisfatórios. Apesar de todos os esforços previamente empregados para a obtenção desta proteína

solúvel em *E. coli* (Avanci, 2006), esse resultado ainda não havia sido alcançado. Os resultados aqui apresentados, mostrando a presença da proteína r134B02 na fração sobrenadante (solúvel) do extrato celular (Figura 39, raias 4 e 5), mesmo em quantidade menor quando comparada com a fração insolúvel (Figura 39, raias 2 e 3), abrem novas perspectivas para a expressão de outras proteínas metiltransferases recombinantes. Adicionalmente, os resultados referentes ao anticorpo policlonal produzido contra a proteína r134B02, mostraram-se bem expressivos. O anticorpo apresentou uma alta capacidade de reconhecimento da proteína r134B02, utilizada como antígeno. Dessa forma, esse anticorpo será utilizado em experimentos futuros, com o objetivo de se identificar a proteína nativa codificada pelo cDNA 134B02, nos extratos protéicos do pistilo da flor de *N. tabacum*.

5.9 Evidências para a existência de uma via de biossíntese do ácido jasmônico, ocorrendo especificamente nos pistilos da flor de *N. tabacum*

A partir da demonstração que o ácido jasmônico é o substrato preferencial das enzimas codificadas pelos cDNAs em estudo, foi realizada uma busca em nosso banco de dados TOBEST (Quiapim *et al.*, 2009), com o objetivo de identificar sequências codificadoras das enzimas pertencentes a via de biossíntese do JA. As sequências de aminoácidos das enzimas lipoxigenase (LOX – número de acesso: At1G17420.1), aleno óxido sintase (AOS – número de acesso: At5G42650.1), aleno óxido ciclase (AOC – número de acesso: At1G13280.1) e 12-OPDA redutase (12-OPR – número de acesso: At1G09400.1) de *Arabidopsis*, foram usadas para realizar uma pesquisa no banco de dados TOBEST, utilizando o programa TBlastX. As sequências identificadas após essa análise foram, então, analisadas pelo programa BLAST disponível no banco de dados do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), visando confirmar sua anotação como enzimas da via de biossíntese dos jasmonatos. Os resultados obtidos podem ser vistos na Figura 61.

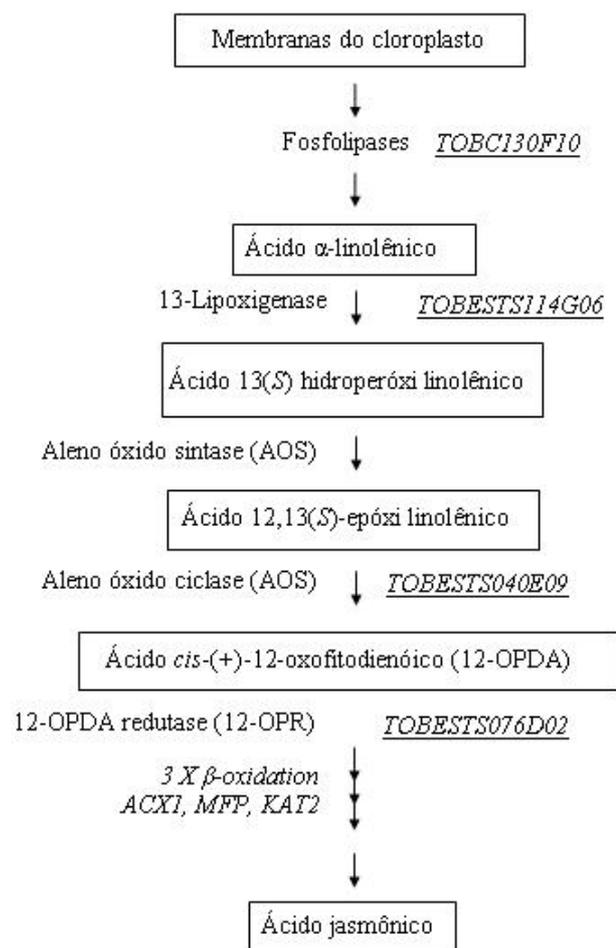


Figura 61. Análise das principais enzimas da via de biossíntese dos jasmonatos, identificadas no banco de dados TOBEST. Modelo simplificado da via de biossíntese do JA. Os clones do TOBEST são mostrados no lado direito da figura, e estão destacados em negrito e sublinhados, lado a lado com suas enzimas correspondentes.

Foram encontrados clones de cDNA correspondentes às enzimas LOX (TOBS114G06), AOC (TOBS040E09) e 12-OPR (TOBS076D02) (Avanci *et al.*, 2010). Entretanto, não foi encontrado nenhum clone com similaridade significativa à enzima AOS. Tal resultado pode indicar uma forte regulação da biossíntese do JA nos pistilos de *N. tabacum*, ocorrendo neste passo crucial da via, como previamente sugerido (Laudert & Weiler, 1998). Adicionalmente, foi encontrado o clone TOBC130F10 que apresenta alta similaridade a um gene que codifica uma enzima fosfolipase do tipo A2 (Quiapim *et al.*, 2009). Tais enzimas são fundamentais no início da via de biossíntese do JA, atuando nas membranas dos cloroplastos, liberando moléculas de lipídeos que sofrerão a ação de enzimas lipoxigenase (Jung & Kim, 2000). Assim, a identificação do clone TOBC130F10, a ocorrência das enzimas LOX, AOC e 12-OPR, indispensáveis para a biossíntese do JA,

juntamente com uma metiltransferase capaz de atuar preferencialmente sobre JA, (Avanci *et al.* em preparação), sugere fortemente o envolvimento da via de biossíntese do JA em processos fisiológicos, e relacionados ao desenvolvimento dos pistilos de *N. tabacum*. Trabalhos realizados em tomate, outra espécie de Solanaceae, reforçam esta hipótese (Hause *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004).

5.10 Jasmonatos e o processo reprodutivo

Os jasmonatos são produzidos a partir do ácido α -linolênico presente nas membranas do cloroplasto (Figura 5) (Liechter & Farmer, 2006), e os passos finais de sua síntese ocorrem dentro dos peroxissomos (Browse, 2009). Além de participar de processos fisiológicos fundamentais para o desenvolvimento e sobrevivência, os jasmonatos também realizam importantes papéis relacionados à reprodução vegetal (Wasternack, 2007; Delker *et al.*, 2006).

O envolvimento efetivo dos jasmonatos no processo reprodutivo tornou-se mais evidente quando mutantes de *Arabidopsis*, incapazes de responder ao JA, apresentaram um fenótipo macho-estéril. A análise desses fenótipos mostrou que os jasmonatos são importantes não apenas para o desenvolvimento adequado do pólen; eles também desempenham funções interessantes relacionadas à elongação do estame e ao tempo correto de liberação do pólen (deiscência da antera) (Liechti & Farmer, 2006).

O mutante *delayed dehiscence 1 (dde1)* de *Arabidopsis*, o qual tem um T-DNA inserido bloqueando a sequência gênica responsável por expressar a enzima 12-oxofitodienoato redutase (12-OPR), mostrou uma deiscência atrasada da antera, resultando em um processo ineficiente de fertilização. Interessantemente, a aplicação exógena de JA foi capaz de restabelecer o fenótipo selvagem permitindo que a planta mutante, originalmente macho-estéril, produzisse sementes (Sanders *et al.*, 2000). Mutantes adicionais de *Arabidopsis*, com um fenótipo macho-estéril, foram obtidos para enzimas responsáveis pela conversão do ácido α -linolênico a JA (Stintzi & Browse, 2000; von Malek *et al.*, 2002). Uma das mutações ocorreu no gene codificando a enzima 12-OPR, o qual foi denominado *OPR3* (Stintzi & Browse, 2000). Plantas *opr3* mutantes mostraram-se estéreis, um fenótipo que pôde ser recuperado pela aplicação exógena de JA, mas não OPDA, o precursor imediato do JA. Assim, foi sugerido que o próprio JA é capaz de

induzir e coordenar a elongação do filamento da antera, a abertura do estômio na ântese, e a produção de polens viáveis em *Arabidopsis* (Stintzi & Browse, 2000).

A importância dos jasmonatos em regular o processo reprodutivo em plantas não está restrita apenas a *Arabidopsis*. O mutante *jai1* (*jasmonic acid-insensitive1*) de tomate, demonstrando falhas na sinalização por jasmonatos, exibiu viabilidade do pólen reduzida e esterilidade, a qual foi causada por um defeito no controle maternal de maturação das sementes (Li *et al.*, 2004). Interessantemente, ao contrário do que ocorre em *Arabidopsis*, trabalhos realizados com plantas de tomate, pertencente à família das Solanáceas assim como *N. tabacum*, sugerem que nesta espécie os jasmonatos estão envolvidos com um fenótipo fêmea-estéril (Li *et al.*, 2001). Hause e colaboradores (2000) realizaram a clonagem da enzima aleno óxido ciclase (AOC) a partir de plantas de tomate. Esta enzima é responsável pela formação do composto 12-OPDA, que é o precursor imediato do JA, na via de biossíntese desse fitohormônio. Neste trabalho, os autores observaram que pequenas quantidades de RNAm e proteína AOC acumularam nos tecidos do caule, folhas e flores jovens. Por outro lado, quantidades maiores de RNAm e proteínas AOC foram detectadas nos botões florais, hastes florais e raiz. De forma ainda mais interessante, as maiores quantidades de RNAm e proteína AOC observadas nos diferentes órgãos florais se correlacionaram com uma alta atividade de AOC, acontecendo juntamente com um aumento nos níveis de JA, 12-OPDA e JA-L-Ile. Além disso, resultados obtidos a partir de análises imunocitoquímicas mostraram um grande acúmulo da proteína aleno óxido ciclase (AOC) especificamente nos óvulos, tecido transmissor do estilete e nos feixes vasculares dos receptáculos florais. Os resultados obtidos implicam o envolvimento da via de biossíntese do JA na regulação do desenvolvimento floral em plantas de tomate (Hause *et al.*, 2000).

Assim, os resultados apresentados e discutidos neste trabalho, sugerem fortemente a presença de uma via metabólica ativa e específica voltada para a biossíntese do ácido jasmônico (JA), acontecendo exclusivamente no órgão reprodutivo feminino de *N. tabacum*. O JA, uma vez produzido, é capaz de sofrer diversas modificações bioquímicas, resultando em diferentes jasmonatos, capazes de atuar em diversos processos fisiológicos importantes para as plantas. Reações de metilação, como as que são catalisadas pelas metiltransferases, produzem o composto volátil MeJa, a partir do JA. A presença de um sinalizador químico volátil, sendo produzido a partir do pistilo, poderia levar a implicações voltadas para um processo de fertilização. Isto poderia ocorrer através de uma comunicação entre pistilos maduros e estames da mesma flor, estames de flores diferentes

presentes na mesma planta, ou entre estames de plantas diferentes, fazendo com que a dehiscência das anteras ocorresse de forma sincronizada com o amadurecimento dos pistilos.

Com isso, independente se as funções desempenhadas pelos jasmonatos acontecem no órgão reprodutivo masculino ou feminino, não há dúvidas de que esses fitohormônios desempenham papéis cruciais voltados para a ocorrência de um processo reprodutivo bem-sucedido nas plantas.

6.0 Conclusões

1. A análise por CG-EM mostrou que a flor de *N. tabacum* é capaz de emitir os compostos metiljasmonato (MeJa) e dihidro metiljasmonato (dihidroMeJa), nos diferentes períodos do dia analisados (manhã, tarde e noite);
2. O cDNA MT1, contendo todos os 8 exons putativos, foi identificado, clonado e sequenciado com sucesso;
3. Os clones de cDNA MT1, 134B02 e 46B11, tiveram suas proteínas recombinantes correspondentes obtidas com sucesso em *E. coli*, tornando possível a realização dos ensaios enzimáticos *in vitro*;
4. Os ensaios enzimáticos mostraram que a proteína MT1 recombinante (pEXP17-MT1, rMT1) produziu o composto MeJa predominantemente, pouco MeBa, e quantidades ínfimas de MeSa; uma outra proteína MT1 recombinante (pETSUMO-MT1, rS-MT1), purificada em resina de níquel, produziu apenas os compostos MeJa e dihidroMeJa, nos ensaios enzimáticos;
5. A proteína 46B11 recombinante (r46B11) produziu o composto MeJa, e quantidades muito baixas dos compostos MeBa e MeSa, em ensaios enzimáticos; a proteína 134B02 recombinante (r134B02) produziu apenas o composto MeJa após os ensaios enzimáticos;
6. Os anticorpos policlonais, produzidos contra a proteína rMT1 (anti-rMT1), apresentaram alta imunoreatividade, sendo capazes de reconhecer as proteínas rMT1, r134B02, r46B11, além da proteína MT1 nativa extraída dos tecidos do estigma/estilete e ovário, como demonstrado nos ensaios de ELISA e Western blot;

7. Os anticorpos policlonais, produzidos contra a proteína r134B02 (anti-r134B02), apresentaram também alta imunoreatividade, sendo capazes de reconhecer a proteína r134B02. Utilizando extratos de proteínas totais do estigma/estilete e ovário, este anticorpo foi capaz de reconhecer uma banda correspondente a proteína MT1 nativa e bandas adicionais variando de 18kDa a 32kDa de massa, mas não reconheceu uma proteína de tamanho correspondente ao de 134B02 nativa;

8. Utilizando o programa TBlastX, e as seqüências das enzimas lipoxigenase, aleno óxido ciclase, aleno óxido sintase e 12-oxofitodienoato redutase de *Arabidopsis thaliana*, foram identificadas no banco de dados TOBEST seqüências parciais correspondentes as enzimas lipoxigenase, aleno óxido ciclase e 12-oxofitodienoato redutase; uma pesquisa adicional, identificou o clone TOBC130F10, codificando uma proteína com alta similaridade a enzimas fosfolipase do tipo A₂. Essas são enzimas fundamentais para a biossíntese do ácido jasmônico, e a presença delas em nosso banco de dados sugere a existência de uma via de biossíntese desse ácido ocorrendo especificamente no pistilo de *N. tabacum*.

7.0 Referências bibliográficas

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. (2004). **Biologia Molecular da Célula**. Quarta edição, Editora Artmed, São Paulo, Brasil.

ÂNGELO, P.C.S., (2001). Identificação e análise de genes expressos exclusivamente no pistilo de *Nicotiana tabacum* L. Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em genética, **FMRP-USP**. 161p.

APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.E., CARMELL-GUERREIRO, S.M., (2006). **Anatomia vegetal**. 2ª ed., UFU, Viçosa, 438p.

ARIMURA, G., KOST, C., BOLAND, W., (2005). Herbivore-induced, indirect plant defences. **Biochimica et Biophysica Acta 1734**: 91-111.

ARNAU, J., LAURITZEN, C., PETERSEN, G.E., PEDERSEN, J., (2006). Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. **Protein Expression and Purification 48**: 1-13.

ARORA, D., KHANNA, N., (1996). Method for increasing the yield of properly folded recombinant human gamma interferon from inclusion bodies. **Journal of Biotechnology 52**: 127-133.

AVANCI, N.C., (2006). Análise das metiltransferases do pistilo de *Nicotiana tabacum*: expressão heteróloga em sistema recombinante, e comparação de seqüências genômicas em *N. tabacum*, e seus prováveis parentais, *Nicotiana sylevstris* e *Nicotiana tomentosiformis*. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia Comparada, **FFCLRP,USP**. 143p.

AVANCI, N.C., LUCHE, D.D., GOLDMAN, G.H., GOLDMAN, M.H.S., (2010). Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including defense and plant reproduction. **Genetics and Molecular Research 9**: 484-505.

BACIC, A., GELL, A.C., CLARKE, A.E. (1988). Arabinogalactan proteins from stigmas of *Nicotiana glauca*. **Phytochemistry 27**: 679-684.

BANEYX, F., (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, **10**: 411-421.

BARKMAN, T.J., MARTINS, T.R., SUTTON, E., STOUT, J.T., (2007). Positive selection for single amino acid change promotes substrate discrimination of a plant volatile-producing enzyme. **Molecular Biology and Evolution 24(6)**: 1320-1329.

BARTAK, P., BEDNAR, P., CAP, L., ONDRAKOVA, L., STRANSKY, Z., (2003). SPME: A valuable tool for investigation of flower scent. **Journal of Separation Science 26**: 715-721.

BELARDI, R.P., PAWLISZYN, J.B., (1989). Application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. **Water Quality Research Journal of Canada 24**: 179.

BELL, J., HICKS, G. (1976). Transmitting tissue in the pistil of tobacco: light and electron microscopic observation. **Planta 131**: 187-200.

BHANDARI, P., GOWRISHANKAR, J., (1997). An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. **Journal of Bacteriology 179**: 4403-4406.

BLECHERT, S., BRODSCHELM, W., HOLDER, S., KAMMERER, L., KUTCHAN, T.M., MUELLER, M.J., XIA, Z-Q., ZENK, M.H., (1995). The octadecanoid pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. **Proc. Natl. Acad. Sci 92**: 4099-4105.

BOATRRIGHT, J., NEGRE, F., CHEN, X., KISH, C.M., WOOD, B., PEEL, G., ORLOVA, I., GANG, D., RHODES, D., DUDAREVA, N., (2004). Understanding in vivo benzenoid metabolism in *Petunia* petal tissue. **Plant physiology** **135**: 1993-2011.

BRADFORD, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem.** **72**: 248-254.

BRASILEIRO, A.C.M., CARNEIRO, V.T.C., (1998). Manual de Transformação Genética de Plantas. **Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária)**, 1^a Edição: 239-242.

BRENAC, V., MOUZ, N., SCHAPMAN, A., RAVAUULT, V., (2006). Expression optimization and purification process development of an engineered soluble recombinant mouse linker of activation of T-cells using surface enhanced laser desorption/ionization-mass spectrometry. **Protein, Expression and Purification** **47**: 533-541.

BROWSE, J., (2009). Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. **Annu. Rev. Plant Biol.** **60**: 183-205.

CALIXTO, C.P.G., (2008). Estudo do processamento alternativo e análises do silenciamento das metiltransferases específicas do pistilo de *Nicotiana tabacum* L. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Genética, **FMRP,USP**. 176p.

CAO, Z., ZHANG, J., LI, Y., XU, X., LIU, G., BHATTACHARYA, M.K., YANG, H., REN, D., (2007). Preparation of polyclonal antibody specific for *At*PLC4, an *Arabidopsis* phosphatidylinositol-specific phospholipase in rabbits. **Protein, Expression and Purification** **52**: 306-312.

CHASE, M.W., KNAPP, S., COX, A.V., CLARKSON, J.J., BUTSKO, Y., JOSEPH, J., SAVOLAINEN, V., PAROKONNY, A.S., (2003). Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). **Annals of Botany** **92**: 107-127.

CHEN, F., D'AURIA, J.C., THOLL, D., ROSS, J.R., GERSHENZON, J., NOEL, J.P., PICHERSKY, E., (2003). An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. **The Plant Journal** **36**: 577-588.

CORRÊA, M.P., (1984). **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 646p.

CRESTI, M., KEIJZER, C.J., TIEZZI, A., CIAMPOLINI, F., FOCARDI, S. (1986). Stigma of *Nicotiana*: ultrastructural and biochemical studies. **American Journal of Botany** **73**: 1713-1722.

D'AURIA, J.C., CHEN, F., PICHERSKY, E., (2003). The SABATH family of methyltransferases in *Arabidopsis thaliana* and other species. **Recent Advances in Phytochemistry Chapter 11**: 253-283. Ed. J. T. Romeo. Oxford: Elsevier Science Ltd.

DEAN, C., VAN den ELZEN, P., TAMAKI, S., DUNSMUIR, P., BEDBROOK, L., (1985). Differential expression of the eight genes of the petunia ribulose biphosphate carboxylase small subunit multi-gene family. **The EMBO Journal** **4**: 3055-3061.

DELKER, C., STENZEL, I., HAUSE, B., MIERSCH, O., FEUSSNER, I., WASTERACK, C., (2006). Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: Enzymes, products, regulation. **Plant Biol.** **8**: 297-306.

DENG, C., ZHANG, X., ZHU, W., QIAN, J., (2003). Gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase microextraction method for determination of methyl salicylate and other volatile compounds in leaves of *Lycopersicon esculentum*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** **378**: 518-522.

DONG, H-D, ZHONG, J-J., (2001). Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by combining elicitation with sucrose feed. **Biochemical Engineering Journal** **8**: 145-150

DUDAREVA, N., D'AURIA, J.C., NAM, K.H., RAGUSO, R.A., PICHERSKY, E., (1998). Acetyl-CoA: benzylalcohol acetyltransferase – an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. **The Plant Journal** **14(3)**: 297-304.

EFFMERT, U., SASCHENBRECKER, S., ROSS, J., NEGRE, F., FRASER, C.M., NOEL, J.P., DUDAREVA, N., PIECHULLA, B. (2005). Floral benzenoid carboxyl methyltransferases: From in vitro to in planta function. **Phytochemistry** **66**: 1211-1230.

ENGVALL, E., PERLMAN, P., (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry** **8**: 871-879.

ESAU, K., (1974). **Anatomia das plantas com sementes**. Ed. Edgard Blucher LTDA, São Paulo, Brasil.

FULNECEK, J., LIM, K.Y., LEITCH, A.R., KOVARIK, A., MATYASEK, R., (2002). Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species. **Heredity** **88**: 19-25.

GADGIL, M., KAPUR, V., HU, W-S., (2005). Transcriptional Response of *Escherichia coli* to Temperature Shift. **Biotechnol. Prog.** **21**: 689-699.

GASSER, C.S., ROBINSON-BEERS, K. (1993). Pistil development. **Plant Cell** **5**: 1231-1239.

GLICK, B.R., PASTERNAK, J.J., (1994). **Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA**. American Society of Biology, Washington, DC, AMS Press.

GOFF, S.A., KLEE, H.J., (2006). Plant volatile compounds: sensory cues for health and nutritional value? **Science** **311**: 815-819.

GOLDMAN, M.H., PEZZOTTI, M., SEURINCK, J., MARIANI, C., (1992). Developmental expression of tobacco pistil-specific genes encodes novel extensin-like proteins. **The Plant Cell** **4**: 1041-1051.

GRISWOLD, K.E., MAHMOOD, N.A., IVERSON, B.L., GEORGIU, G., (2003). Effects of codon usage versus putative 5'-mRNA structure on the expression of *Fusarium solani* cutinase in the *Escherichia coli* cytoplasm. **Protein Expression and Purification** **27**: 134-142.

GRODBERG, J., DUNN, J.J., (1988). OmpT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. **J Bacteriol.** **170(3)**:1245-53.

HIPPAUF, F., MICHALSKY, E., HUANG, R., PREISSNER, R., BARKMAN, T.J., PIECHULLA, B., (2010). Enzymatic, expression and structural divergences among carboxyl *O*-methyltransferases after gene duplication and speciation in *Nicotiana*. **Plant Molecular Biology** **72**: 311-330.

IVANOV, I., ALEXANDROVA, R., DRAGULEV, B., SARAFFOVA, A., ABOUHAIIDAR, M.G., (1992). Effect of tandemly repeated AGG triplets on the translation of CAT-mRNA in *E. coli*. **FEBS Lett.** **307**: 173-176.

JERPSETH, B., CALLAHAN, M., GREENER, A., (1997). **Strategies** **10(2)**: 37-38.

KAGAN, R.M., CLARK, S., (1994). Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosyl-L- methionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. **Archives of Biochemistry and Biophysics** **310**: 417-427.

KENTON, A., PAROKONNY, A.S., GLEBA, Y.Y., BENNETT, M.D., (1993). Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. **Molecular and General Genetics** **240**: 159-169.

KNUDSEN, J.T., TOLLSTEN, L., BERGSTROM, L.G., (1993). Floral scents – A checklist of volatile compounds isolated by headspace techniques. **Phytochemistry** **33**: 253-280.

KOLTUNOW, A.M., TRUETTNER, J., COX, K.H., WALLROTH, M., GOLDBERG, R.B., (1990). Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. **The Plant Cell** **2**: 1201-1224.

KOLOSOVA, N., GORENSTEIN, N., KISH, C.M., DUDAREVA, N., (2001). Regulation of circadian methyl benzoate emission in diurnally and nocturnally emitting plants. **The Plant Cell** **13**: 2333-2347.

LAEMMLI, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **148**: 680-685.

LANDY, A., (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. **Annu. Rev. Biochem.** **58**: 913-949.

LARKIN, M.A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., McGETTIGAN, P.A., McWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., HIGGINS, D.G., (2007). ClustalW2 and ClustalX version 2. **Bioinformatics** **23(21)**: 2947-2948.

LEBLANC, N., DAVID, K., GROSCLAUDE, J., PRADIER, J.M., BARBIER-BRYGOO, H., LABIAU, S., PERROT-RECHENMANN, C., (1999). A novel immunological approach establishes that the auxin-binding protein, *Nt-abp1*, is an element involved in auxin signaling at the plasma membrane. **The Journal of Biological Chemistry** **274(40)**: 28314-28320.

LEE, H.W., LEE, S.H., LEE, H.W., RYU, Y.W., KWON, M.H., KIM, Y.S., (2005). Homomeric and heteromeric interactions of the extracellular domains of death receptors and death decoy receptors. **Biochemical and Biophysical Research Communications** **330**: 1205-1212.

LEÓN, J., ROJO, E., TITARENKO, E., SÁNCHEZ-SERRANO, J.J., (1998). Jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways are differentially regulated by Ca²⁺/calmodulin in *Arabidopsis thaliana*. **Mol Gen Genet** **258**: 412-419.

LI, L., LI, C., HOWE, G.A., (2001). Genetic analysis of wound signaling in tomato. Evidence for a dual role of jasmonic acid in defense and female fertility. **Plant Physiology** **127**: 1414-1417.

LI, L., ZHAO, Y., McCAIG, B.C., WINGERD, B.A., WANG, J., WHALON, M.E., PICHERSKY, E., HOWE, G.A., (2004). The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate signaled defense responses, and glandular trichome development. **The Plant Cell** **16**: 126-143.

LIECHTI, R., FARMER, E.E., (2006). Jasmonate biochemical pathway. **Sci. STKE** **322**: 1-3.

LIM, K.Y., MATYASEK, R., LICHTENSTEIN, C.P., LEITCH, A.R., (2000). Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section Tomentosae. **Chromosoma** **109**: 245-258.

LOUGHRIN, J.H., HAMILTON-KEMP, T.R., ANDERSEN, R.A., HILDEBRAND, D.F., (1990a). Volatiles from flowers of *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana otophora* and *Malus x domestica*: headspace components and day/night changes in their relative concentrations. **Phytochemistry** **29**: 2473-2477.

LOUGHRIN, J.H., HAMILTON-KEMP, T.R., ANDERSEN, R.A., HILDEBRAND, D.F., (1990b). Headspace compounds from flowers of *Nicotiana tabacum* and related species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **38**: 455-460.

MAKRIDES, S.C., (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **American Society of Microbiology** **60(3)**: 512-538.

MANSFELD, L., (2009). Plant phospholipases A2: perspectives on biotechnological applications. **Biotechnol Lett** **31**: 1373-1380.

MARTINS, T.R., BARKMAN, T.J., (2005). Reconstruction of Solanaceae phylogeny using the nuclear gene SAMT. **Systematic Botany** **30(2)**: 435-447.

MARTINS, A.P.B., (2007). Isolamento e análise de clones genômicos e de cDNAs do gene *NtPMT* de *Nicotiana tabacum* L. Trabalho de iniciação científica, desenvolvido na **FFCLRP, USP**, para a obtenção do título de Bacharel em ciências biológicas. 75p.

MITSUDA, M., IWASAKY, M., (2006). Improvement in the expression of CYP2B6 by co-expression with molecular chaperones GroES/EL in *Escherichia coli*. **Protein and Purification Expression 46**: 401-405.

MORELAND, N., ASHTON, R., BAKER, H.M., IVANOVIC, I., PATTERSON, S., ARCUS, V.L., BAKER, E.N., LOTT, J.S., (2005). A flexible and economical medium-throughput strategy for protein production and crystallization. **Acta Crystallographica Section D 61**: 1378-1385.

MURFITT, L.M., KOLOSOVA, N., MANN, C.J., DUDAREVA, N., (2000). Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: benzoic acid carboxyl methyltransferase, the enzyme responsible for biosynthesis of the volatile ester methyl benzoate in flowers of *Antirrhinum majus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics 382**: 145-151.

NEGRE, F., KOLOSOVA, N., KNOLL, J., KISH, C.M., DUDAREVA, N., (2002). Novel S-adenosyl-L-methionine: salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme responsible for biosynthesis of methyl salicylate and methylbenzoate, is not involved in floral scent production in snapdragon flowers. **Archives of Biochemistry and Biophysics 406**: 261-270.

NOVAGEN (2002). Competent cells – expression hosts: host strain competent cell: selection guide. Pp 1-3.

OGAWA, M., HERAI, Y., KOIZUMI, N., KUSANO, T., SANO, H., (2001). 7-Methylxanthine methyltransferases of *Coffea* plants. Gene isolation and enzymatic properties. **The Journal of Biological Chemistry 276**: 8213-8218.

OLMSTEAD, R., PALMER, J.D., (1991). Chloroplast DNA and systematics in the solanaceae. In: HAWKES, J.G., LESTER, R.N., NEE, M., ESTRADA, N., (eds) Solanaceae III. Taxonomy, chemistry and evolution. **Kew, Royal Botanic Gardens, for the Linnean Society of London**, pp 161-168.

OYAMA-OKUBO, N., ANDO, T., WATANABE, N., MARCHESI, E., UCHIDA, K., NAKAYAMA, M., (2005). Emission mechanism of floral scent in *Petúnia axillaris*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry** **69**: 773-777.

PARK, S-W., KAIMOYO, E., KUMAR, D., MOSHER, S., KLESSIG, D.F., (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. **Science** **318**: 113-116.

PICHERSKY, E., NOEL, J.P., DUDAREVA, N., (2006). Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science** **311**: 808-811.

PIECHULLA, B., POTT, M.B., (2003) Plant scents – mediators of inter-and intraorganismic communication. **Planta** **217**: 687-689.

POTT, M.B., PICHERSKY, E., PIECHULLA, B., (2002). Evening specific oscillations of scent emission, SAMT enzyme activity, and SAMT mRNA in flowers of *Stephanotis floribunda*. **Journal of Plant Physiology**: **159**: 925-934.

POTT, M.B., EFFMERT, U., PIECHULLA, B., (2003). Transcriptional and post-translational regulation of S-adenosyl-L-methionine: salicylic acid carboxyl methyltransferase (SAMT) during *Stephanotis floribunda* flower development. **Journal of Plant Physiology** **160**: 635-643.

POTT, M.B., HIPPAUF, F., SASCHENBRECKER, S., CHEN, F., ROSS, J., KIEFER, I., SLUSARENKO, A., NOEL, J.P., PICHERSKY, E., EFFMERT, U., PIECHULLA, B., (2004). Biochemical and structural characterization of benzenoid carboxyl methyltransferases involved in floral scent production in *Stephanotis floribunda* and *Nicotiana suaveolens*. **Plant Physiology** **135**: 1946-1955.

QUIAPIM, A.C., (2005). Estudo comparativo da expressão gênica nos órgãos vegetativos e reprodutivos de *Nicotiana tabacum* L. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia Comparada, **FFCLRP,USP**. 106p.

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

RAI, M., PADH, H., (2001). Expression systems for production of heterologous proteins. **Current science** **80**: 1121-1128.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E., (2001). **Biologia Vegetal**. 6^a ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.

ROHRBECK, D., BUSS, D., EFFMERT, U., PIECHULLA, B., (2006). Localization of methyl benzoate synthesis and emission in *Stephanotis floribunda* and *Nicotiana suaveolens* flowers. **Plant Biology** **8**: 615-626.

ROMANELLO, V., MARCACCI, M., DAL MOLIN, F., MOSCHIONI, M., SENSINI, S., COVACCI, A., BARITUSSIO, A.G., MONTECUCCO, C., TONELLO, F., (2006). Cloning, expression, purification and characterization of *Streptococcus pneumoniae* IgA1 protease. **Protein, Expression and Purification** **45**: 142-149.

ROSS, J.R., NAM, K.H., D'AURIA, J.C., PICHERSKY, E. (1999). S-adenosyl-L-methionine: salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferases. **Archives of Biochemistry and Biophysics** **367**: 9-16.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., (1989). **Molecular cloning, a laboratory manual**. 2^o ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

SANCHEZ, A.M., BOSCH, M., BOTS, M., NIEUWLAND, J., FERON, R., MARIANI, C., (2004). Pistil factors controlling pollination. **The Plant Cell** **16**: 98-106.

SANDERS, P.M., LEE, P.Y., BIESGEN, C., BOONE, J.D., BEALS, P.T., WEILER, E.W., GOLDBERG, R.B., (2000). The Arabidopsis DELAYED DEHISCENCE1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. **The Plant Cell**. **12**: 1041-61.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R., (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **74**: 5463-5467.

SEO, H.S., SONG, J.T., CHEONG, J.J., LEE, Y.H., LEE, Y.W., HWANG, I., LEE, J.S., CHOI, Y.D., (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **98**: 4788-4793.

SCHEIN, C.H., (1989). Production of soluble recombinant proteins in bacteria. **Bio/Technology** **7**: 1141-1149.

SHENG, J., YU, H., LI, J., SHENG, G., ZHOU, L., LU, Y., (2007). Cloning and expression of the human augments liver regeneration at low temperature in *Escherichia coli*. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods** **XX**: 1-6.

SHULAEV, V., SILVERMAN, P., RASKIN, I., (1997). Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. **Nature** **385**: 718-721.

SINGH, S.M., PANDA, A.K., (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering** **99(4)**: 303-310.

SORENSEN, H.P., MORTENSEN, K.K., (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology** **115**: 113-128.

STINTZI, A., BROWSE, J., (2000). The Arabidopsis male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **97**: 10625-10630.

TSUMOTO, K., EJIMA, D., KUMAGAI, I., ARAKAWA, T., (2003a). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. **Protein, Expression and Purification** **28**: 01-08.

TSUMOTO, K., UMETSU, M., KUMAGAI, I., EJIMA, D., ARAKAWA, T., (2003b). Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginine. **Biochemical and Biophysical Research Communications** **312**: 1383-1386.

ULLAND, S., IAN, E., MOZURAITIS, R., BORG-KARLSON, A.K., MEADOW, R., MUSTAPARTA, H., (2008). Methyl salicylate, identified as primary odorant of a specific receptor neuron type inhibits oviposition by the moth *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera, Noctuidae). **Chemical Senses** **33**: 35-46.

UNDERWOOD, B.A., TIEMAN, D.M., SHIBUYA, K., DEXTER, R.J., LOUCAS, H.M., SIMKIN, A.J., SIMS, C.A., SCHMELS, E.A., KLEE, H.J., CLARK, D.G., (2005). Ethylene-regulated floral volatile synthesis in *Petunia* corollas. **Plant Physiology** **138**: 255-266.

VAS, G., VEKEY, K., (2004). Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. **Journal of Mass Spectrometry** **39**: 233-254.

VERDONK, J.C., RIC de VOS, C.H., VERHOEVEN, H.A., HARING, M.A., van TUNEN, A.J., SCHUURINK, R.C., (2003). Regulation of floral scent production in *Petunia* revealed by targeted metabolomics. **Phytochemistry** **62**: 997-1008.

VOLKOV, R.A., BORISJUK, N.V., PANCHUK, I.I., SCHWEIZER, D., HEMLEBEN, V., (1999). Elimination and rearrangement of parental rDNA in the allotetraploid *Nicotiana tabacum*. **Mol. Biol. Evol.** **16(3)**: 311-320.

VON-MALEK, B., VAN der GRAAFF, E., SCHNEITZ, K., KELLER, B., (2002). The Arabidopsis male-sterile mutant *dde2-2* is defective in the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. **Planta** **216**:187-92.

XU, H., SWOBODA, I., BHALLA, P.I., SINGH, M.B, (1999). Male gametic cell-specific gene expression in flowering plants. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **96**: 2554-2558.

XU, R., SONG, F., ZHENG, Z., (2006). *OsBISAMT1*, a gene encoding S-adenosyl-L-methionine: salicylic acid carboxyl methyltransferase, is differentially expressed in rice defense response. **Molecular Biology Reports** **33**: 223-231.

XUE, R., ZHANG, B., (2007). Increased endogenous methyl jasmonate altered leaf and root development in transgenic soybean plants. **Journal of Genetics and Genomics** **34(4)**: 339-346.

WALLING, L.L., (2001). Induced resistance: from the basic to the applied. **Trends in Plant Science** **6**: 445-447.

WALZ, A., SELDEL, C., RUSAK, G.,PARK, S., COHEN, J.D., LUDWIG-MULLER, J., (2008). Heterologous expression of IAP1, a seed protein from bean modified by indole-3-acetic acid, in *Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula*. **Planta** **227**: 1047-1061.

WALSH, G., (1998). **Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology**. London: Wiley, 94-99.

WASTERNAK, C., HAUSE, B., (2002). Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. **[Prog Nucleic Acid Res Mol Biol](#)**.**72**:165-221.

WASTERNAK, C., (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annals of Botany** **100**: 681-697.

WEILER, E.W., ALBRECHT, T., GROTH, B., XIA, Z-Q., LUXEM. M., LIB, H., ANDERT, L., SPENGLER, P., (1993). Evidence for the involvement of jasmonates and their octadecanoid precursors in the tendril coiling response of *Bryonia dioica*. **Phytochemistry** **32**: 591-600.

WHITNEY, S.M., SHARWOOD, R.E., (2007). Linked rubisco subunits can assemble into functional oligomers without impeding catalytic performance. **The Journal of Biological Chemistry** **282**: 3809-3818.

YANG, S.S., HUANG,C.B., SMETENA, I., (2002). Optimization of headspace sampling using solid-phase microextraction for volatile components in tobacco. **Journal of Chromatography A** **942**: 33-39.

YANG, YUE., YUAN, J.S., ROSS, J., NOEL, J.P., PICHERSKY, E., CHEN, F., (2006). An *Arabidopsis thaliana* methyltransferase capable of methylating farnesoic acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics** **448**: 123-132.

YASUKAWA, T., KANEI-ISHII, C., MAEKAWA, T., FUJIMOTO, J., YAMAMOTO, T., ISHII, S., (1995). Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. **The Journal of Biological Chemistry** **270(43)**: 25328-25331.

YOUM, J.W., JEON, J.H., KIM, H., KIM, Y.H., KO, K., JOUNG, H., KIM, H., (2008). Transgenic tomatoes expressing human beta-amyloid for use as a vaccine against Alzheimer's disease. **Biotechnol. Lett** **30**: 1839-1845.

YU, S., XIA, D., LUO, Q., CHENG, Y., TAKANO, T., LIU, S., (2007). Purification and characterization of carbonic anhydrase of rice (*Oryza sativa* L.) expressed in *Escherichia coli*. **Protein, Expression and Purification** **52**: 379-383.

ZHANG, Z., PAWLISZYN, J.B., (1993). Headspace solid-phase microextraction. **Analytical chemistry** **65**: 1843-1852.

ZHAO, N., FERRER, J-L., ROSS, J., GUAN, J., YANG, Y., PICHERSKY, E., NOEL, J.P., CHEN, F., (2008). Structural, biochemical, and phylogenetic analyses suggest that indole-3-acetic acid methyltransferase is an evolutionarily ancient member of the SABATH family. **Plant Physiology** **146**: 455-467.

ZUBIETA, C., ROSS, J.R., KOSCHESKI, P., YANG, Y., PICHERSKY, E., NOEL, J.P., (2003). Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family. **The Plant Cell** **15**: 1704-1716.

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](#)