

Instituto de Biociências
 Departamento de Genética
 Laboratório de Genética Vegetal - Núcleo de Genômica Funcional de Plantas

Determinação da localização subcelular de Ascorbate Peroxidase-Related (APX-R) em *Arabidopsis thaliana*

Piovesana, M*, Margis-Pinheiro, M.

Peroxidases são amplamente distribuídas em todos os organismos, sendo de fundamental importância para a sobrevivência e adaptação. Estas enzimas agem reduzindo o peróxido de hidrogênio a água, minimizando danos celulares e modulando respostas a diferentes estímulos e condições através da regulação dos níveis de peróxido de hidrogênio. Análises em bancos de dados públicos levaram à identificação de uma nova heme-peroxidase (**Ascorbate Peroxidase-Related** or **APX-R**), exclusiva de plantas e presente de espécies basais a vasculares (Figure 1).

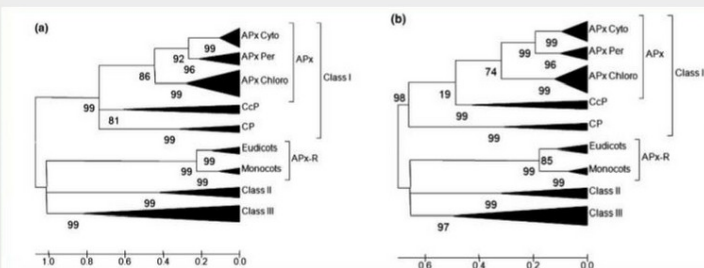


Figura 1. Árvores filogenéticas consenso construídas utilizando-se 69 sequências proteicas representativas de cada clado de heme peroxidases em plantas. Análises foram conduzidas (a) após a remoção de peptídeos de direcionamento e domínios transmembrana nas porções N- a C-terminal, ou (b) pela comparação de quatro boxes conservados entre todas as peroxidases (Lazzarotto et al., 2011).

APX-R

Arroz (*Oryza sativa*)

- Plantas transgênicas com **expressão reduzida**:
Estresse oxidativo, atraso na germinação, modulação da expressão de enzimas envolvidas na regulação do peróxido de hidrogênio.
- Protoplastos: **localização subcelular cloroplastídica**.

Arabidopsis thaliana

- Mutantes com **perda de função do gene**:
 Sensibilização a estresse oxidativo, **atraso e diminuição na taxa de germinação**.
- Plantas transgênicas de **superexpressão**:
Atraso e diminuição das taxas de germinação, morte dos embriões nas sementes.

Banco de dados de *Arabidopsis* (TAIR): anotada como proteína citosólica

Chen et al. (2014): envolvimento de APX-R na proteção de sementes maduras e dessecadas de *Arabidopsis thaliana*, e papel na manutenção do vigor das sementes.

Localização subcelular de APX-R em *Arabidopsis thaliana*:

?

Objetivo

Determinar a **localização subcelular de APX-R em *Arabidopsis thaliana*** através da obtenção de linhagens transgênicas superexpressando o produto de fusão AtAPX-R-EYFP, visando a obtenção de plantas estávelmente transformadas para posterior análise em microscopia de fluorescência e confocal.

Metodologia e Resultados

- Extração de RNA e síntese de cDNA de *Arabidopsis thaliana*
- Amplificação de AtAPX-R (Figura 2a)
- Clonagem de AtAPX-R no vetor de entrada pENTR /D-TOPO® (Figura 2b)
- Clonagem de AtAPX-R em vetor binário de expressão pEarleyGate101 (Figura 2c)
- Floral dip* (Clough & Bent, 1998) (Figura 3)
- Seleção das sementes transgênicas
- Análise preliminar das plântulas transgênicas em microscópio de fluorescência
- Análise das plantas transgênicas em microscópio de fluorescência (Figura 4)

Como resultado, **linhagens transgênicas superexpressando a proteína recombinante de maneira estável foram obtidas**, e serão futuramente analisadas em microscopia confocal de forma a determinar a localização subcelular de APX-R em *Arabidopsis thaliana*.

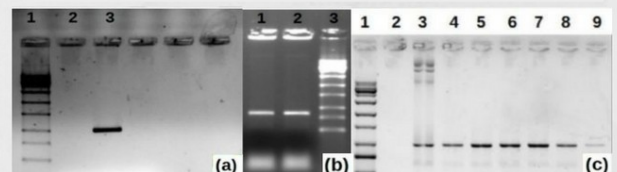


Figura 2. (a) Amplificação da CDS de AtAPX-R por PCR resolvida em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1. Marcador de Peso Molecular; 2. Controle negativo; 3. Amplicon de AtAPX-R. (b) PCR de colônia de *E. coli* TOP10 transformada com pENTR /D-TOPO® - AtAPX-R. 1 e 2: colônias testadas; 3: Marcador de Peso Molecular. (c) PCR de colônias de *E. coli* TOP10 transformadas com pEarleyGate101 - AtAPX-R. 1: Marcador de Peso Molecular; 2: Controle negativo; 3: Controle positivo; 4 a 9: colônias testadas.



Figura 3. (a) *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 contendo o plasmídeo pEarleyGate101 - AtAPX-R foi ressuspenso em solução 5% sacarose e 0,02% Silwet L-77. (b) Plantas saudáveis no estágio apropriado para a transformação (c) foram mergulhadas na solução por 10 segundos sob sutil agitação. (d) As plantas foram cobertas com sacos plásticos e (e) mantidas na posição horizontal por 24 horas.

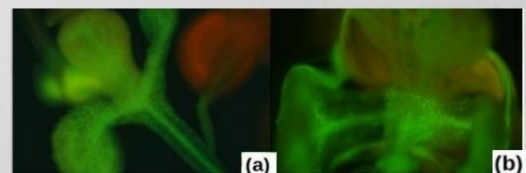


Figura 4. Plântulas resistentes (a - b) ao agente de seleção foram analisadas em microscópio de fluorescência (filtro FITC; excitação 470 nm e emissão 520 nm) antes de serem transferidas para meio não seletivo.