



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE
OsPMBP1 (Prenylated Metal Binding Protein 1)
DE ARROZ (*Oryza sativa*)**

Porto Alegre, Fevereiro de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE
OsPMBP1 (Prenylated Metal Binding Protein 1)
DE ARROZ (*Oryza sativa*)

João Braga de Abreu Neto

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Margis-Pinheiro

Porto Alegre
Fevereiro de 2009

Instituição e Fontes Financiadoras

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular Vegetal do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da UFRGS.

As agências de financiamento do Projeto de Pesquisa em que se enquadra o presente trabalho de mestrado foram Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e EMBRAPA Arroz e Feijão.

Agradecimentos

À Professora Doutora Márcia Pinheiro Margis, que me orientou durante minha graduação, meu mestrado que aqui apresento e irá me orientar pelos próximos quatro anos em meu projeto de doutorado. Que, por sua compreensão, força de vontade e integridade, é um exemplo para mim e a todos que a conhecem.

Ao grupo da CSIRO liderado pelo Dr. Narayana Upadhyaya que desenvolveu a metodologia de produção de mutantes utilizada neste trabalho.

À amiga Débora Petry que me apresentou ao Laboratório de Genética Molecular Vegetal e à Dra. Márcia Margis.

A todos os amigos dos laboratórios de Genética Molecular Vegetal e de Genomas e Populações de Plantas, com os quais compartilhei bons e maus momentos ao longo dos anos. Encontrando-os desde domingos pela manhã à sexta-feiras à noite, encarando com bom humor as dificuldades que iam surgindo em nossos projetos.

Aos amigos que seguiram por caminhos diferentes na vida. E que mesmo não entendendo o quê eu fazia ou porque, sempre torceram por mim.

Aos meus pais, Paulo Oliveira de Abreu e Marli Krein de Abreu, pela confiança e apoio durante todos os momentos, e por possibilitarem que eu pudesse estudar e seguir a carreira de minha escolha. Obrigado.

Resumo

O número de genes atualmente identificados no genoma do arroz (*Oryza sativa ssp japonica*) é de cerca de 32.000. Graças aos esforços de diferentes grupos ao redor do globo, o papel de muitos desses genes é melhor compreendido no momento. A função de um gene pode ser inferida principalmente pela análise de seu padrão de expressão, da estrutura da proteína codificada e pela análise de mutantes nos quais o gene se encontra interrompido, silenciado ou super-expresso. Para esse propósito, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo linhagens transgênicas pela inserção de uma construção de T-DNA baseada no sistema de transposons de dois componentes *iAc/Ds*. Uma dessas linhagens (*Ds72*) apresenta estatura reduzida e sua inserção de T-DNA interrompe um locus, cuja função gênica ainda é desconhecida. O objetivo desse trabalho é a identificação e caracterização desse gene, que denominamos de *OsPMBP1* (*Prenylated Metal Binding Protein 1*). Para tal, analisamos a linhagem mutante, a estrutura da proteína prevista, as possíveis relações filogenéticas com outros genes e o padrão de expressão desse gene. Em paralelo, induzimos a mobilização do elemento *Ds* da sua inserção original no T-DNA da linhagem original para gerar novas linhagens mutantes. A proteína codificada por esse gene contém um motivo de associação a metais pesados e um sítio de prenilação. Identificamos esse gene como um membro de um ramo até agora desconhecido da família das Proteínas Farnesiladas (FP), proteínas preniladas que se ligam a íons metálicos. Nossas análises mostram que a expressão de *OsPMBP1* é semelhante em raízes e na porção aérea de plântulas, porém, em condições de excesso de alumínio, a expressão nesses órgãos se altera, sendo induzida em folhas e caules enquanto que em raízes é reprimida. Outros genes da família FP também respondem à estresses por excesso de íons metálicos, e foram caracterizados como diretamente envolvidos no transporte e/ou detoxicação de metais pesados. Em condições normais, esse gene parece ser regulado pelo relógio circadiano, sendo um gene de expressão tardia, com pico de expressão próximo ao entardecer. A análise detalhada da linhagem *Ds72* indicou que não há ligação entre o fenótipo observado e a inserção de T-DNA. Os dados obtidos demonstram que *OsPMBP1* pode estar envolvido na resposta a estresse por metal pesado ou no transporte desses íons, porém ainda são necessários mais estudos para melhor entender a função desse gene na planta.

Abstract

The current number of identified genes in the rice genome (*Oryza sativa ssp japonica*) is about 32,000. Thanks to the efforts of different researchers around the world, the role of many of these genes is currently better understood. The gene function can be inferred mainly by the analysis of its expression pattern, the structure of the encoded protein and by the analysis of mutants where the gene is interrupted, silenced or over-expressed. For that purpose, our research group has developed transgenic lines by the insertion of a T-DNA construction that is based on the two-component *iAc/Ds* system of transposons. One of these lines shows reduced height and has the T-DNA tag interrupting a locus, whose gene function is yet unknown. The aim of the present study is the identification and characterization of this gene, which we named as *OsPMBP1* (*Prenylated Metal Binding Protein 1*). For that, we analyzed the mutant line, the predicted protein structure, the filogenetic relationship with others proteins, and its expression pattern. In parallel, we induced the mobilization of the *Ds* element from the original T-DNA insertion to generate new mutant lines. *OsPMBP1* coded protein has a heavy metal associated domain (HMA) and a prenylation site. We identified this gene as a member of an unknown branch of the Farnesylated Proteins family (FP), composed mostly of prenylated metal binding proteins. Ours analyses showed that the *OsPMBP1* expression is equivalent in seedling roots and shoots, but, under aluminum excess, its expression change in these organs, it was inducted in the shoots and repressed in the roots. Others genes of the FP family also respond to metallic ion stresses and have been characterized as directly involved in heavy metal transport and detoxification. In normal conditions, this gene is apparently regulated by the circadian clock, with expression apices close to the evening/dusk interface. The detailed analysis of the *Ds72* line indicated that there isn't a relationship between the observed phenotype and the T-DNA insertion. The data showed that *OsPMBP1* may be involved in the response to heavy metal stress or in its transport, but more analyses are required to a better understanding of the role of this gene in the plant.

Sumário

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
INTRODUÇÃO.....	10
O arroz como ferramenta de genômica funcional de cereais.....	11
A Genômica Funcional de Arroz.....	15
A linhagem Ds72 e o gene <i>OsPMBP1</i>	16
OBJETIVOS	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
i. Caracterização da linhagem mutante Ds72	22
Comparando fenótipo com plantas normais	22
Seleção de plantas sem a inserção	23
Expressão do gene <i>OsPMBP1</i> em plantas mutantes	24
ii. Previsão do Produto Gênico	25
iii. Análises Filogenéticas	25
Identificação das sequências dos genes que codificam potenciais proteínas preniladas de ligação a metais.....	25
Filogenias	26
iv. Obtenção de mutantes.....	26
Obtenção de calos de arroz.....	27
Transformação via <i>Agrobacterium</i>	27
Mobilização do elemento Ds	28
Detecção da fluorescência da GFP	28
Seleção de linhagens estáveis	29
De calo à planta	29
Análises de PCR	30
v. Análise do padrão de expressão do gene <i>OsPMBP1</i>	30
Condições experimentais.....	30
Extração de RNA.....	31

Síntese de cDNA a partir de RNA total.....	31
PCR quantitativo em tempo real.....	32
Análises estatísticas	32
RESULTADOS	33
I. Linhagem Ds72	33
Comparando o fenótipo da linhagem Ds72 com o de plantas não transformadas....	33
Seleção de plantas sem inserção	35
Expressão do gene <i>OsPMBP1</i> em plantas mutantes.....	37
II. Obtenção de Novos Mutantes.....	38
III. Previsão do Produto Gênico	39
IV. Análises Filogenéticas	42
V. Análise do Padrão de Expressão do gene <i>OsPMBP1</i>	45
Expressão em raízes.....	45
Expressão de <i>OsPMBP1</i> em resposta ao excesso de alumínio.....	46
Expressão de <i>OsPMBP1</i> em resposta à Luz.....	47
DISCUSSÃO.....	48
Proteínas preniladas ligantes de metais	48
<i>OsPMBP1</i> responde diferencialmente a estresse por alumínio.....	52
A expressão de <i>OsPMBP1</i> indica regulação pelo ritmo circadiano	55
A Linhagem Ds72.....	57
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	61
ANEXO 1. <i>Primers</i> utilizados.....	67
ANEXO 2. Meios de cultura utilizados na cultura de tecidos.....	68
ANEXO 3. Predição da estrutura secundária de <i>OsPMBP1</i>	69
ANEXO 4. PREPS – Resultado do programa de predição de prenilação para a proteína <i>OsPMBP1</i>	70
ANEXO 5. Árvore filogenética demonstrando relações entre proteínas preniladas ligantes de íons metálicos	71

Lista de Abreviaturas

bar: gene de resistência a fosfotricina. Herbicida Basta® (bialaphos)

bla: gene da enzima β -lactamase (resistência à ampicilina)

CaMV: *cauliflower mosaic virus*- vírus mosaico da couve-flor

cDNA : DNA complementar

CSIRO: *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization* - Australia

DNA: Ácido Desoxiribonucleico

En/I: *Enhancer/Inhibitor* – ativador/inibidor

EST: *expressed sequence tag* –“etiquetas” de sequência expressa

FST: *flanking sequence tag* –“etiquetas” de sequência flaqueadora

GFP: *Green Fluorescent Protein* – proteína fluorescente verde

GUS: gene da enzima β -D-glucuronidase

hph: Gene da higrominica fosfotransferase

iAc/Ds: *Activator imóvel/Dissociation*

IRFGC: *International Rice Functional Genomics Consortium*

IRGSP: *International Rice Genome Sequencing Program*

LP: *Launch Pad*, T-DNA de pMN393b2 sem o *Ds*

NIAS: *National Institute of Ago-biological Science* - Japão

nptII: neomicina fosfotransferase (gene de resistência a canamicina)

ocsT: terminador do gene da octopina sintetase

Ori: origem de replicação de vetor bacteriano

PCR: *polymerase chain reaction*

qRT-PCR: PCR quantitativo em tempo real

RNA: Ácido Ribonucleico

sgfp: *synthetic green fluorescent protein gene*

T-DNA: DNA transferido da *Agrobacterium* ao vegetal infectado

TIGR: *The Institute of Genomic Research*

Ubi 1: gene da ubiquitina 1 de milho

X-Gluc: 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronídeo, substrato para β -glucuronidase em teste histoquímico.

INTRODUÇÃO

Com uma população mundial em crescimento quase exponencial, existe uma necessidade urgente de aumento da produção agrícola, porém essa se encontra ameaçada por diversos fatores, que em sua maioria, são conseqüências das ações de nossa espécie. Entre os fatores que ameaçam a produção estão: a redução de áreas aráveis devido a uma agricultura não-sustentável, que leva à erosão e degradação do solo e à redução de água disponível para a agricultura. Além disso, a previsão é de que as mudanças climáticas globais como secas, tempestades, inundações, ondas de calor e elevações do nível do mar, que não somente afetam o crescimento das culturas, mas também podem ameaçar a conservação dessas áreas cultiváveis ocorram, cada vez, com maior frequência (Takeda e Matsuoka, 2008). E por último, a demanda crescente de lavouras destinadas à produção de ração animal, para atender ao aumento do consumo de carne em economias emergentes, e à produção de biocombustíveis, como fontes alternativas de energia, poderá reduzir a área disponível para lavouras destinadas à produção de alimentos (Edgerton, 2009).

Para superar esses problemas, juntamente com esforços de conservação da água e da terra, novas tecnologias agrícolas serão necessárias, como a melhoria de cultivares para conferir maior tolerância a estresses ambientais e maior produção de biomassa (Takeda e Matsuoka, 2008).

Os cereais da família Poacea, como trigo, arroz, milho, sorgo, cevada, aveia e cana-de-açúcar, são responsáveis por prover cerca de metade das calorias da dieta humana e um crescente papel na geração de biocombustíveis (Paterson *et al.*, 2005). Devido à relativamente recente divergência, cerca de 50 milhões de anos, os membros dessa família apresentam uma grande sintonia, semelhanças tanto em sequências gênicas conservadas, quanto na organização e estrutura do genoma. Por esse motivo, dados obtidos em uma espécie podem ser utilizados para se conhecer melhor as demais (Paterson *et al.*, 2009).

Entre esses cereais, o arroz cultivado (*Oryza sativa* L.) foi o eleito como organismo modelo, não somente dos cereais, mas de todas as monocotiledôneas. Essa escolha se deu pelo vasto conhecimento já existente de sua biologia celular, fisiologia e bioquímica, e seu genoma compacto de 389 milhões de pares de bases (Mb), cerca de um sexto do tamanho do genoma do milho e 40 vezes menor que o do trigo (Jung *et al.* 2008). Além de ser

relativamente fácil de ser transformado geneticamente, uma vez que existem protocolos eficientes já estabelecidos, que possibilitam a análise funcional de genes através da expressão modificada (superexpressão, silenciamento ou expressão ectópica) dos mesmos (Upadhyaya, 2006).

A maioria das cultivares de arroz pertence a duas subespécies: *Oryza sativa* ssp. *japonica* e *Oryza sativa* ssp. *indica*, que se diferenciam em caracteres fisiológicos e morfológicos. Plantas do grupo *indica* encontram-se nas terras baixas da Ásia tropical, enquanto as do grupo *japonica* são originais das terras altas do sul da China, noroeste e sudeste da Ásia e Indonésia. As cultivares plantadas no Brasil, selecionadas para as condições do nosso solo e clima, pertencem à subespécie *indica*, enquanto que a variedade mais estudada ao redor do mundo, Nipponbare, pertence ao grupo *japonica*. O genoma desta cultivar foi o primeiro entre os de monocotiledôneas a ser completamente seqüenciado e disponibilizado ao público (IRGSP, 2005). Atualmente, encontram-se disponíveis seqüências genômicas completas das duas subespécies, mapas moleculares saturados, grandes coleções de ESTs (*expressed sequence tags*) e cDNAs, e recursos genéticos e genômicos abundantes, incluindo mutantes e vasto banco de germoplasma com variedades e espécies selvagens.

O arroz como ferramenta de genômica funcional de cereais

Com a conclusão do seqüenciamento do genoma, foi criado o Banco de Dados do Projeto de Anotação do Arroz (Rice Annotation Project Database, RAP-DB) para prover uma anotação com alta precisão e confiabilidade, reunindo não somente seqüências, mas também outras informações relacionadas que pudessem ser úteis a pesquisadores de arroz e outros cereais (Rice Annotation Project, 2008).

Em janeiro de 2007, o banco de dados do Projeto de Anotação do Genoma do Arroz do TIGR (The Institute for Genomic Research) publicou seu 5º *release*, no qual são listados 66.710 modelos de genes (transcritos), correspondentes a 56.278 loci. Desses modelos 33.882 foram validados pelo seqüenciamento de ESTs e transcritos completos (full-length cDNA) e outras evidências de transcrição (Jung *et al.*, 2008).

Muitos dos genes previstos no genoma do arroz ainda não têm função conhecida

(Itoh *et al.*, 2007), e diversos grupos de pesquisa buscam a identificação da função desses genes. O arroz pode ser utilizado com este fim, no estudo desses genes, e em especial dos que parecem ser exclusivos de arroz e de outros cereais. Campbell e colaboradores (2007) identificaram 861 genes altamente conservados e exclusivos da família Poaceae. E ainda existem outros 1.998 genes de arroz que não foram encontrados em *Arabidopsis thaliana*, uma dicotiledônea que possui um genoma ~260Mb menor que o do arroz e que é a planta modelo mais utilizada em estudos genéticos na atualidade (IRGSP, 2005).

A maioria das informações disponíveis sobre a função dos genes anotados nesses bancos de dados é inteiramente especulativa, baseada somente em análises *ab initio* e sem nenhuma comprovação *in vivo* (Itoh *et al.*, 2007). Para realizar uma anotação funcional de um gene, uma das melhores estratégias é a partir do estudo de organismos mutantes que possuam a expressão desse gene alterada, amplificada ou reduzida (nocautes). Os nocautes podem ser gerados de diversas formas: i) Mutagênese direcionada por recombinação homóloga, uma estratégia ainda pouco desenvolvida em plantas; ii) silenciamento da expressão de um gene por RNA de interferência (RNAi) ou por *virus-induced gene silencing* (VIGS); iii) produção de mutantes por inserções aleatórias, que podem ser feitas por inserção de retrotransposons, T-DNA e ou de transposons, tais como os sistemas de dois componentes *iAc/Ds* e *En/I* (Upadhyaya *et al.*, 2006).

O uso de recombinação homóloga e RNAi são aplicáveis somente quando já se conhece a seqüência do gene a ser silenciado. Essa pode ser obtida a partir de busca no GenBank e de dados de outros trabalhos relacionados ao gene de interesse. Por outro lado, para se descobrir a função de genes ainda não estudados, a obtenção de mutantes por inserções aleatórias constitui a ferramenta mais aplicável (CHIN *et al.*, 1999)

Grupos de pesquisa de diversos países seguem esta estratégia, criando coleções de mutantes com a finalidade de descobrir a função de genes de plantas, saturando o genoma de inserções a fim de produzir mutantes nocautes no maior número de genes possível.

O Instituto Nacional de Ciências Agro-biológicas do Japão (NIAS) possui uma coleção de cerca de 50.000 linhagens de mutantes contendo inserções do retrotransposon *Tos17*, cada uma contendo cerca de 10 inserções desse retrotransposon. O *Tos17* é um retrotransposon endógeno do arroz que é ativado pela cultura de tecidos e suas cópias nunca são mobilizadas nas plantas regeneradas, assim gerando somente mutações estáveis (Hirochika, 2001). Coleções semelhantes de mutantes são encontradas em instituições da

Coréia do Sul e da França (Hirochika *et al.*, 2004). A maior vantagem desse sistema é que por utilizar um elemento natural do arroz e não um transgene, os mutantes por inserção de *Tos17* podem ser levados a campo possibilitando um maior *screening* para se detectar fenótipos alterados, o que não pode ser realizado por razões de biossegurança em plantas que contenham construções compostas por transgenes, como T-DNA ou *Ac* e *Ds*.

Diversos projetos utilizam construções inseridas no genoma por *Agrobacterium tumefaciens*. Por possuírem construções conhecidas, esses T-DNA podem ser utilizados como *gene tags* (“etiquetas de genes”), que permitem o resgate de regiões flanqueadoras das inserções, possibilitando a identificação da seqüência do genoma que foi interrompida (Hiei *et al.*, 1994); essas são denominadas nos trabalhos recentes de *Flanking Sequence Tags* (FSTs). Estes T-DNA normalmente são compostos por genes marcadores, utilizados na seleção de indivíduos mutados, e repórteres que são usados como armadilhas para facilitar a identificação dos genes.

O uso de genes repórteres facilita o estudo de regiões gênicas cujo nocaute não produz um fenótipo visível, e nos informa sobre o padrão de expressão do gene interrompido. Isso porque os genes repórteres produzem um fenótipo facilmente detectável. Os genes repórteres mais utilizados são: o gene *gfp* que codifica a proteína GFP a qual produz uma fluorescência verde sob determinada faixa de luz ultravioleta; e o gene *gus*, cuja expressão faz com que o tecido em contato com o substrato X-Gluc se torne azul. Os genes repórteres podem se encontrar sob a ação de um promotor constitutivo da própria construção evidenciando a integração dessa ao genoma ou sem promotor sendo transcrito sob a ação de promotores da região do genoma onde se inseriu, desta forma ao analisar a expressão desses genes podemos inferir sobre a taxa de transcrição da região interrompida do genoma, e se essa expressão ocorre de forma constitutiva ou se sofre alteração sob determinados estímulos. Outro uso para esses genes é a metodologia de Gene Trap (armadilha para gene) na qual antes do repórter existe um acceptor de splicing (AS). Se essa construção se inserir num intron de gene, o AS fará com que o gene repórter seja transcrito no lugar do próximo exon dessa gene, formando uma proteína fusionada (parte da proteína original juntamente com a proteína repórter). Por se encontrar truncada, a proteína provavelmente se tornará inativa, e por sua perda de função pode gerar um fenótipo na planta. E por estar fusionada com o repórter pode permitir a visualização dos tecidos e situações em que esse gene é expresso e até a sua localização subcelular (Lewis *et*

al.,1998; Upadhyaya *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004).

Os elementos *Ac* e *Ds* de milho foram os primeiros transposons a serem utilizados como ferramentas de mutagênese por inserção em arroz (Izawa *et al.*, 1991). Esse sistema de transposons possui dois componentes, o elemento transponível *Ds* (do inglês *Dissociation*) que é mobilizado somente pela ação da transposase *Ac* (*Activator*). Vetores baseados nesses transposons usualmente são inseridos no genoma vegetal via T-DNA, e são desenhados de forma a funcionar tanto como *gene tags* quanto como *gene traps*, possibilitando que uma grande quantidade de informação seja obtida a partir de uma única inserção (Izawa *et al.*, 1991 e 1997; Chin *et al.*, 1999; Eamens *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004; Kolesnik *et al.*, 2004; Hirochika *et al.*, 2004; Upadhyaya *et al.*, 2000, 2002 e 2006).

Entre as estratégias para aplicação desse sistema estão, i) a criação de linhagens contendo o *Ds* e o cruzamento destas com linhagens que contenham o *Ac* (Izawa *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2004; Kolesnik *et al.*, 2004; Upadhyaya *et al.*, 2002 e 2006), ii) co-transformação de calos com ambas as construções e, iii) super-transformação de linhagens que já contenham o *Ds* com *Agrobacterium* portando o *Ac* (Eamens *et al.*, 2004; Upadhyaya *et al.*, 2002 e 2006). Desta forma são obtidas linhagens com a inserção original do T-DNA (chamada de LP, do inglês *Launch Pad*) e linhagens produzidas a partir da mobilização dos transposons. As linhagens que possuem os dois elementos são altamente mutagênicas, pois nelas, os transposons serão constantemente mobilizados gerando novas inserções. Por outro lado, são obtidas linhagens mutantes estáveis a partir da segregação das inserções nas progênes destas plantas. Originalmente o *Ac* também era móvel, porém construções atuais utilizam uma forma mutada imóvel (*iAc*) para obter inserções estáveis desse elemento. Recentemente foi descrito um método de transformação no qual o elemento *Ds* é mobilizado do LP por uma expressão transiente de um *iAc* que não chega a se incorporar ao genoma (Upadhyaya *et al.*, 2006).

Utilizando dessa metodologia de transformação transiente, Upadhyaya e colaboradores (2006) obtiveram linhagens com inserções únicas de transposon na primeira geração, sem necessidade de segregação. Suas construções permitem a localização do ponto de inserção de modo relativamente simples e preciso, pelo resgate e seqüenciamento de regiões flaqueadoras da inserção (FST). A partir do seqüenciamento dessas FSTs é possível identificar o local do genoma do arroz onde o T-DNA se inseriu ao se comparar a FST com as seqüências de todo o genoma por BLAST (Basic Local Alignment Search

Tool), ferramenta presente em todos os bancos de sequências e que indica qual região do genoma a FST corresponde.

Outra característica a ser destacada é o fato do transposon *Ds* se inserir com uma frequência de 36% a 67% em um ponto do genoma próximo do seu *Launch Pad*, sendo a inserção geralmente localizada a até 1 cM de distância do LP (Upadhyaya *et al.*, 2006). Desta forma é possível saturar com o *Ds* regiões próximas à inserção original do T-DNA/*Ds* e assim direcionar a criação de mutantes em regiões de interesse, para produzir nocautes nos diferentes genes deste ponto do genoma.

A Genômica Funcional de Arroz

Com o aumento das informações a cerca do genoma do arroz e da função dos seus genes, muitos pesquisadores viram a necessidade do estabelecimento de uma estrutura para a produção e o compartilhamento de dados para a análise funcional dos genes de arroz. Devido às grandes dificuldades e à necessidade de análises multi-disciplinares, esse novo passo da genética necessita de uma colaboração internacional ainda mais extensiva do que a requerida para o sequenciamento do genoma. Dessa forma, no ano de 2002, no *Global Rice Gene Machine Workshop*, (realizado em Canberra, Austrália, e organizado pelo Dr. Narayana Upadhyaya, CSIRO, veja <http://www.pi.csiro.au/grgm02/>), foi proposto que o IRRI (*International Rice Research Institute*) deveria estabelecer um consórcio internacional de genômica funcional de arroz (*International Rice Functional Genomics Consortium*, IRFGC) que deveria coordenar e possibilitar o intercâmbio de dados e organismos entre os pesquisadores (Hirochika *et al.*, 2004).

Nosso grupo faz parte desta iniciativa internacional e o projeto aqui apresentado foi desenvolvido como parte de um projeto maior de produção e análise de mutantes do grupo de Genômica Funcional de Arroz do CSIRO Plant Industry (Austrália), coordenado pelo Dr. N. Upadhyaya.

Para a utilização eficiente de mutantes por inserção como ferramenta de genômica funcional é essencial o mapeamento (localização) dessas inserções no genoma e que bancos de dados com as FST sejam criados, possibilitando o estudo desses genes por genética reversa. Ou seja, partindo do conhecimento prévio de qual gene está nocauteado, busca-se determinar a sua função ao analisar o fenótipo do mutante. Desta forma todas as

coleções de mutantes, independente da fonte da mutação, estão ligadas a bancos de dados que contém os genes nelas interrompidos.

Hirochika e colaboradores (2004) estimaram que o número de mutantes insercionais necessários para se analisar cada gene do arroz seria de 180.698 a 460.000 inserções. No momento, existem mais de 2.000.000 mutantes disponíveis em coleções de institutos de pesquisa ao redor do mundo, porém devido a limitações de manipulação e custo na identificação de FSTs, somente 1/1000 desses tiveram seu ponto de inserção no genoma identificado. E entre os 41.753 genes de arroz previstos que codificam proteínas, somente 21.239 (50,8%) tiveram inserções identificadas em suas regiões gênicas (Krishnan *et al.*, 2009). De forma que parte do objetivo do IRFGC já foi realizado. E com os novos métodos *high-throughput* de seqüenciamento e genotipagem, espera-se identificar os pontos de inserção de modo menos custoso, identificando inclusive mutantes derivados de mutações químicas e físicas, de obtenção mais fácil que os por inserção de DNA.

A linhagem Ds72 e o gene *OsPMBP1*

Em trabalho prévio, durante a produção de mutantes insercionais, obtivemos uma linhagem fértil de arroz (*Ds72*) que contém uma única inserção de T-DNA (Abreu Neto, 2006).

Esta linhagem foi obtida em nosso laboratório pela inserção de T-DNA da construção pMN393b2, pertencente ao sistema desenvolvido por Upadhyaya e colaboradores (2006). A transformação ocorreu por co-cultivo de calos embrionários de arroz (*O. sativa* cv. Nipponbare) com *A. tumefaciens* portando esse vetor.

A construção pMN393b2 (Figura 1A) registrada no GenBank sob Acc. No. DQ225749, possui: uma origem de replicação bacteriana (ori RK2); um cassete que confere resistência a espectinomicina (Sp^R) e a sequência de T-DNA. Entre as bordas do T-DNA encontra-se o promotor do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV35S) e o gene da enzima higromicina fosfotransferase (*hph* ou *hpt*). Inserido entre o promotor e o *hph* se encontra o elemento *Ds* que é composto por duas seqüências correspondentes às bordas do transposon *Ds5'* e *Ds3'*, as quais são reconhecidas pela transposase *Ac*. No interior do *Ds*, junto a cada extremidade há um intron do gene da proteína G de *Arabidopsis* (GPA1), que contém sítios aceptores de *splicing* em todas as três fases de leitura (SA). Esta

característica garante que o transcrito do gene repórter contido no interior do *Ds* seja processado corretamente, mantendo a fase de leitura de maneira a produzir uma proteína de fusão correspondente ao gene nocauteado e o gene repórter. Após o SA encontram-se os genes repórteres, próximo à extremidade 5' o *eyfp* (Enhancer Yellow Fluorescence Protein) e próximo à 3', o *gus*, gene da β -glucoronidase (*uid*). No interior do *Ds* há mais dois cassetes, um com o gene *bar*, que fornece ao organismo resistência à fosfotricina (o herbicida Basta®); o outro contém uma origem de replicação bacteriana e o gene de resistência a ampicilina (*bla*) usadas para o sistema de recuperação de seqüências flanqueadoras (FST).

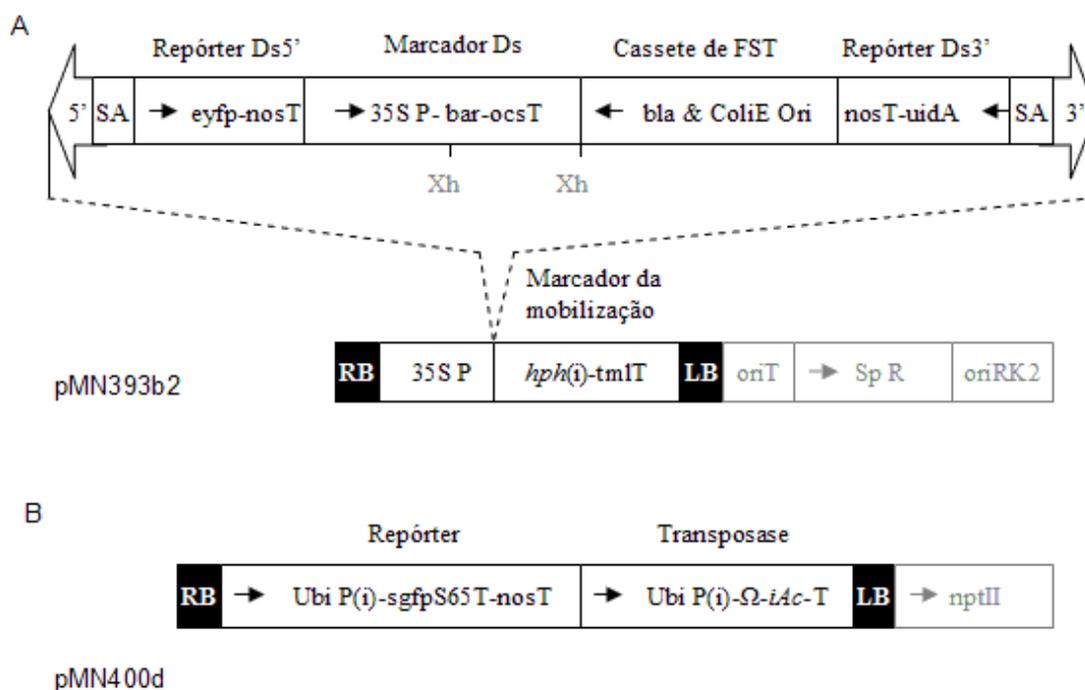


Figura 1. Construções utilizadas no sistema de obtenção de mutantes insercionais: A) pMN393b2 (GenBank Acc. No. DQ225749): constituído de diversos cassetes: um cassete que confere resistência a espectinomicina (Sp R), junto a duas origens de replicação bacteriana diferentes oriRK2 e ori T. Bordas direita (RB) e esquerda (LB) de T-DNA, entre elas o promotor CaMV35S (35S P) e o gene da enzima higromicina fosfotransferase interrompido por intron, *hph(i)*. Inserido entre o promotor e o *hph* se encontra o elemento *Ds* que é composto por um *gene trap* bidirecional dentro do qual há dois cassetes, um com o gene *bar* e o outro que contém uma origem de replicação bacteriana e o gene de resistência a ampicilina (*bla*). O *Ds* possui duas seqüências reconhecidas pela transposase *Ac* como as bordas do transposon, essas são *Ds5'* e *Ds3'*. No interior do *Ds*, junto a cada extremidades há um aceptor triplo de *splice* do intron de GPA1 (SA); após o SA encontramos genes repórteres sem promotores, o *eyfp* (*Enhancer Yellow Fluorescence Protein*) e o *gus* (*uidA*). B) pMN400d (GenBank Acc. No. DQ225752) possui três genes que estão sob o controle de promotores de ubiquitina (Ubi P):, *nptII*, que confere resistência a Canamicina e Geneticina, e, dentro do T-DNA, o gene repórter *sgfp* S65T; e o gene da transposase *Ac* imóvel(*iAc*) devido a substituição de sua extremidade 5' pelo *enhancer* Ω fusionado ao *Ubi1*. Em cinza elementos que não são inseridos no vegetal. Xh, sítio de clivagem para a enzima *XhoI*. (Adaptado de Upadhyaya *et al.*, 2006).

Uma das grandes vantagens dessa construção é a possibilidade de recuperar a seqüência flanqueadora da inserção (*Flanking Sequence Tag*, FST) usando o sistema de resgate de plasmídeo (*Plasmid Rescue System*). Como descrito anteriormente, dentro do elemento *Ds* há um cassete desenhado para essa finalidade. Nele encontramos o gene *bla* que confere resistência a ampicilina e uma origem de replicação de plasmídeo de *E. coli*, pBR322 (ColiE Ori) (Figura 1A).

Para o isolamento das seqüências flanqueadoras da inserção, o DNA genômico da planta transformada é digerido com uma endonuclease de restrição que cliva um ponto específico na borda do cassete de recuperação de plasmídeo. Desta forma, entre os fragmentos obtidos, encontra-se um que começa dentro desse cassete, e termina em um ponto do DNA original da planta onde haja um sítio de clivagem para essa enzima. Ou seja, esse fragmento contém a origem de replicação e o gene de resistência ao antibiótico, além de carregar também uma parte do DNA genômico que flanqueia a inserção. Os fragmentos obtidos são então circularizados pela ação de uma enzima ligase T4 e usados para transformar *E. coli* (Fig. 2A).

As bactérias que receberam o DNA contendo gene *bla* e a origem de replicação produzem colônias em meio contendo ampicilina. Os plasmídeos obtidos são então sequenciados permitindo a identificação da FST. No caso dos plasmídeos descritos por Upadhyaya e colaboradores (2006), o perfil de digestão produzido pela enzima *Alw441* para o resgate do DNA que flanqueia a borda esquerda (LB) do T-DNA consiste de fragmentos de 1616 pb, 1188 pb, 1146 pb, 1006 pb, 492 pb e 324 pb, as demais bandas visualizadas no gel são provenientes do DNA da planta (Fig. 2B).

A análise da FST da linhagem Ds72 mostrou que a inserção se localiza no braço curto do cromossomo 1, na posição 1405845. Esse ponto corresponde ao locus Os01g0125600 (IRGSP e GenBank, denominado de LOC_Os01g03940 no TIGR), mais precisamente 18 nucleotídeos após o códon de parada deste transcrito. Pesquisas em outros bancos de dados com as duas versões do genoma (TIGR e GenBank indicaram a mesma posição (Fig. 3).

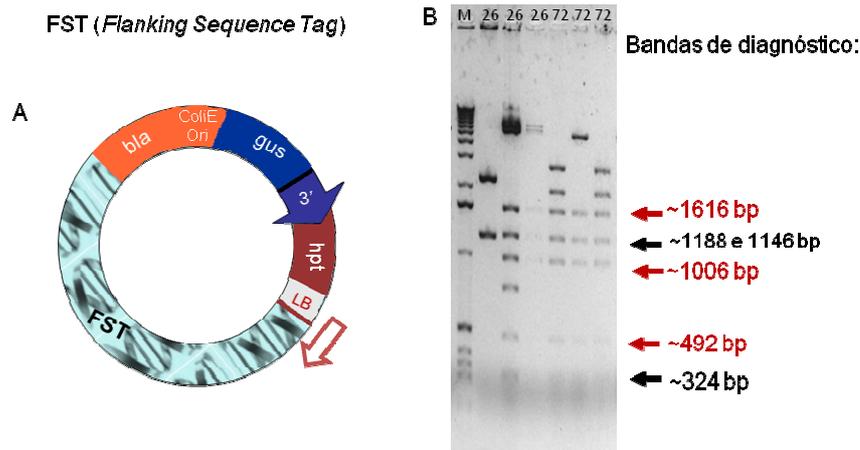


Figura 2. Plasmídeo resgatado contendo uma FST. A) representação de um plasmídeo desejado. Flecha vermelha indica local de início do seqüenciamento. B) Gel de eletroforese em agarose 1% mostrando o perfil de digestão de diferentes plasmídeos, com fragmentos de tamanho esperado que determinam a integridade de cada plasmídeo (Em preto estão os fragmentos esperados somente em linhagens com o Ds não-mobilizado).

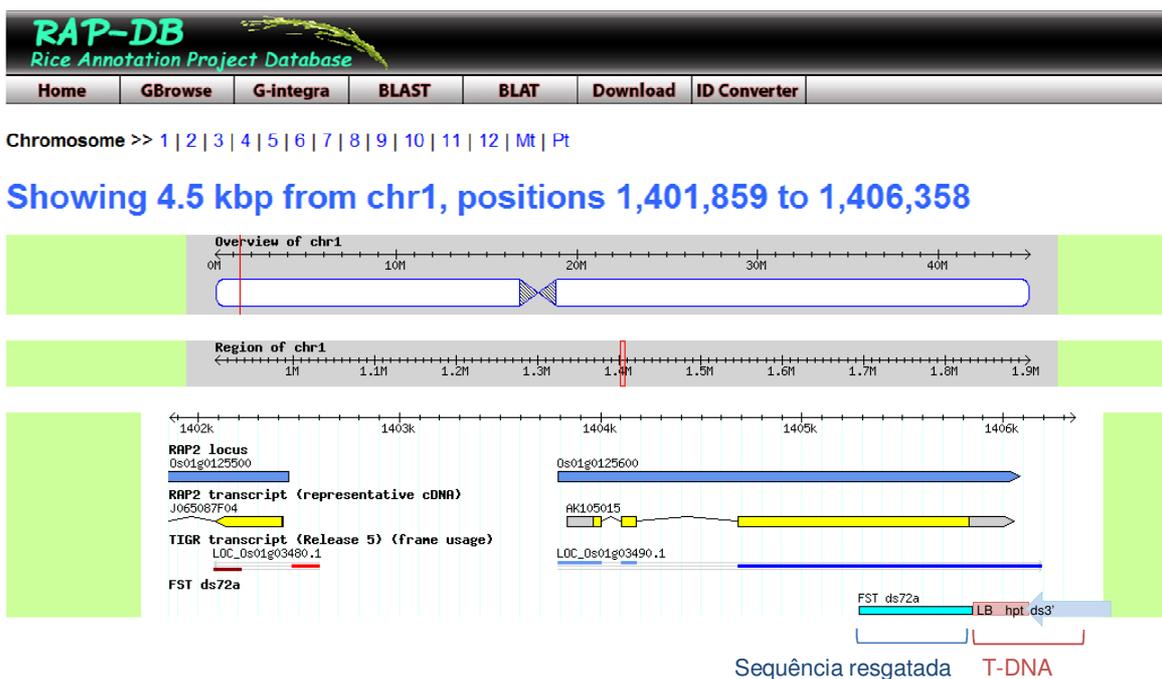


Figura 3. Localização da inserção de T-DNA da linhagem Ds72 obtida por BLAST da FST ds72a contra a seqüência do genoma do arroz. Imagem dada após BLAST no RAP-DB (Rice Annotation Project Database) demonstrando a localização da inserção no cromossomo e mais precisamente no locus Os01g0125600.

Após a anotação desse locus passamos a denominá-lo de *OsPMB1* (*Prenylated Metal Binding Protein 1*). O nome se deve a identificação *in silico* de um domínio de associação a metais pesados (HMA, pfam00403) e um motivo CaaX de prenilação na proteína codificada por esse gene.

A prenilação (ou isoprenilação) de proteínas é uma modificação pós-traducional na qual um grupamento lipídico isoprenóide (prenila) é adicionado através de uma ligação covalente tioéter (-C-S-C-) a um resíduo de cisteína que se encontra a quatro resíduos do terminal carboxílico. Essa ligação pode ser promovida por três enzimas diferentes: a Farnesil transferase (FT), Geranylgeranyl transferase 1 (GGT1) e Rab-geranylgeranyl transferase (Rab-GGT ou GGT2), que podem adicionar farnesil pirofosfato (cadeia insaturada de 15 carbonos) ou geranylgeranyl pirofosfato (de 20 carbonos) à cisteína. Após a prenilação, os três aminoácidos terminais são removidos e a nova carboxila é metilada. Esse processo permite que uma proteína hidrossolúvel se ancore a membranas celulares pela prenila, aumenta sua afinidade funcional com outras proteínas e a protege da degradação. Proteínas preniladas estão, em geral, envolvidas na sinalização celular e transporte, sendo importantes para o ciclo celular, crescimento e desenvolvimento (Galichet e Gruissem, 2003).

A linhagem mutante Ds72 apresenta uma redução de altura em relação a plantas selvagens quando a inserção se encontra em homozigose, tal fato pode indicar que a função do gene interrompido seja importante para o desenvolvimento normal da planta. Porém, até o momento, nenhum estudo abordando qual seria essa função foi publicado sobre esse gene ou seus homólogos em outras espécies vegetais e nenhum outro mutante por inserção de T-DNA ou transposon neste loco foi localizado nas coleções de mutantes disponíveis para que se possa comparar seus fenótipos.

OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho é caracterizar a linhagem Ds72 e o gene *OsPMBP1* no qual se encontra a inserção de T-DNA,

Objetivos específicos:

- i. Caracterizar a linhagem mutante Ds72;
- ii. Realizar análises *in silico* visando caracterizar a estrutura da proteína codificada pelo gene *OsPMBP1*;
- iii. Estabelecer relações filogenéticas de *OsPMBP1* com outros genes, identificando ortólogos e prováveis parálogos;
- iv. Gerar uma subcoleção de mutantes pela mobilização do transposon Ds de sua inserção original na linhagem Ds72;
- v. Avaliar o padrão de expressão do gene em diferentes situações e tecidos por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).

MATERIAL E MÉTODOS

i. Caracterização da linhagem mutante Ds72

Análises iniciais indicaram que plantas dessa linhagem, homozigotas para a inserção de T-DNA, possuem estatura reduzida em relação à plantas não-transformadas.

Comparando fenótipo com plantas normais

Para caracterizar o fenótipo, 50 plantas homozigotas para a inserção *Ds72* tiveram seu desenvolvimento acompanhado, comparando-o com o de 50 plantas não-transformadas (NT) submetidas às mesmas condições da germinação até a idade de três meses.

Foram postas para germinar em papel filtro umedecido com água destilada 51 sementes da planta *Ds72A-A* (homozigota para a inserção e obtida na T1 da planta original) e 51 sementes coletadas no mesmo dia de planta NT com a mesma idade.

Após três dias no escuro a 28°C, as sementes germinadas foram transferidas para potes contendo vermiculita e solução nutritiva composta pelos sais do meio MS a meia força (Murashige e Skoog, 1962), colocando três sementes em cada pote. As plântulas foram mantidas em câmara de crescimento a 28°C com regime de luz de 16h luz/dia, tendo a altura entre o substrato e a folha mais alta medida a cada semana de forma a acompanhar seu desenvolvimento.

Após um mês, as plantas foram transferidas para a terra e mantidas em casa de vegetação com temperatura e foto-período médio semelhante ao da câmara de crescimento. Durante todo o tempo, as plantas foram mantidas nos mesmos grupos de três indivíduos e distribuição de grupos de plantas NT e *Ds72*, de forma a normalizar as condições ambientais às quais foram submetidas. Nesta etapa a altura passou a ser medida de forma mensal.

Seleção de plantas sem a inserção

O arroz é uma planta diplóide ($2n$) de autofecundação. A planta que deu origem à linhagem Ds72 (indivíduo Ds72A) possuía somente uma inserção de T-DNA em um de seus cromossomos 1, de forma que seus descendentes podem ser homocigotos ou heterocigotos para a inserção ou não a possuem (homocigoto nulo).

Plantas homocigotas nulas são um controle mais apropriado a ser utilizado na análise de fenótipos gerados pela inserção de T-DNA por serem mais semelhantes às plantas testadas que as NT, diferenciando-se somente pela inserção.

Para descobrir a qual dessas três categorias cada indivíduo pertence realizamos reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) com *primers* especificamente para a linhagem Ds72 de forma a permitir inferir se uma planta ou calo dessa linhagem é homocigota ou heterocigota para a inserção do T-DNA. Isso é realizado com duas reações simples, uma contendo o *primer* de seqüenciamento a partir da borda esquerda do T-DNA (TTLBnest3) em conjunto o *primer* Ds72f1, e a outra reação é utilizando os *primers* Ds72f1 e Ds72r1, que se localizam a 404 pb a montante e 302 pb a jusante do ponto de inserção, respectivamente. Dessa forma, se a primeira reação gerar fragmentos de DNA de 449 pb, a inserção se encontra no ponto esperado em pelo menos um dos cromossomos, e, se a segunda reação gerar fragmentos de 706 pb, então no outro cromossomo 1 desse indivíduo não há a inserção desse T-DNA e ele será heterocigoto para a inserção. E caso a segunda reação não consiga amplificar esse fragmento, será porque o organismo é homocigoto para a inserção (Fig.4, procedimentos do PCR encontram-se descritos na seção “Análises por PCR” e seqüências dos *primers* em Anexo 1).

Para obter plantas sem a inserção, germinamos sementes de plantas heterocigotas, 15 de Ds72A-I e 5 de Ds72A-F. Após crescidas e transferidas para a terra, as plantas tiveram DNA extraído de suas folhas e realizamos as reações de PCR descritas acima.

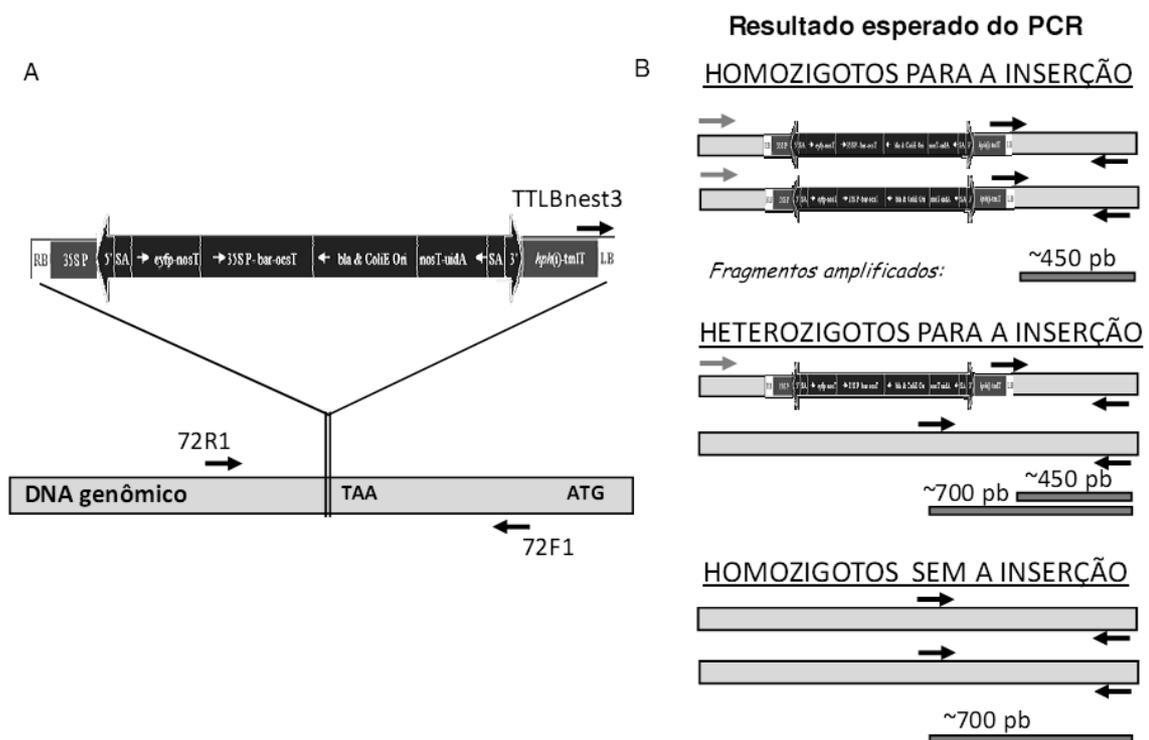


Figura 4. Metodologia de identificação de indivíduos homozigotos e heterozigotos para a inserção de T-DNA da linhagem ds72. A) Locais de anelamento dos *primers* TTLBnest3 (LB), 72R1 e 72F1 no T-DNA e no genoma. B) Situações e produtos de PCR esperados. Representação dos dois cromossomos 1 de arroz, se o cromossomo possui a inserção LB+72F1 a reação de PCR produz fragmento de ~450pb; sem a inserção nenhum produto é amplificado. Se não tiver a inserção 72R1+72F1 amplifica produto de ~700pb, Com a presença da inserção os *primers* ficam muito distantes e o produto não é amplificado.

Expressão do gene *OsPMBP1* em plantas mutantes

Para avaliar se a inserção de T-DNA altera a expressão do gene *OsPMBP1*, o RNA total de plântulas NT e Ds72 homozigotas de duas semanas, quatro de cada, foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen). O cDNA sintetizado a partir dos RNAs mensageiros dessas plântulas foram então utilizados em reações de qRT-PCR comparando o número normalizado de transcritos de plantas normais com o de plantas homozigotas para a inserção (procedimentos de qRT-PCR estão descritos na seção V- “Análise do padrão de expressão do gene *OsPMBP1*”).

ii. Previsão do Produto Gênico

A grande maioria dos genes de arroz já passaram por uma anotação automática *ab initio* (a partir da sequência de nucleotídeos) e previsões sobre a estrutura e função deles se encontram acessíveis ao público. Como primeiro passo, reunimos os dados disponíveis sobre o locus interrompido pela inserção de T-DNA na linhagem Ds72, desde a previsão do padrão de expressão até a estrutura da proteína codificada pelo gene. Para tal, utilizamos os serviços dos bancos de dados como NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), e Uniprot (<http://www.uniprot.org/>). Os serviços dos servidores ExPASy - **Expert Protein Analysis System** (<http://ca.expasy.org/>); PredictProtein (Rost *et al.* 2004) e SWISS-MODEL (Arnold *et al.*, 2006) e PrePS-Prenylation Prediction Suite (Maurer-Stroh & Eisenhaber, 2005) foram utilizados para as análises de estrutura de OsPMBP1.

Utilizando o programa DeepView (Swiss Pdb-Viewer) (Guex & Peitsch, 1997), disponibilizado pela plataforma SWISS-MODEL, procuramos modelar por homologia a estrutura terciária da proteína OsPMBP1.

iii. Análises Filogenéticas

Identificação das sequências dos genes que codificam potenciais proteínas preniladas de ligação a metais.

Foram realizadas consultas freqüentes a banco de dados em busca das informações mais atuais disponíveis sobre o gene *OsPMBP1* e de sequências similares em busca de ortólogos presentes em outras espécies e possíveis parálogos.

As seqüências utilizadas foram encontradas em bancos de dados públicos como o do GenBank-NCBI e TIGR (The Institute for Genomic Research), em especial do Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>), além de utilizar da plataforma GRAMENE (<http://www.gramene.org>) especializada na anotação de genes de gramíneas e que reúne as informações destes dois bancos de dados.

Filogenias

As sequências foram analisadas e trabalhadas com os programas BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999) e MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). A construção de filogramas foi realizada utilizando do método de Neighbor Joining, a partir de alinhamento com ClustalW2, através do programa ClustalX 2.0.10 (Larkin *et al.*, 2007). Sendo a confiabilidade de cada nóculo testada por 1000 *Bootstraps*. Por fim, as árvores filogenéticas obtidas foram editadas com o programa MEGA.

iv. Obtenção de mutantes

Como descrito anteriormente, utilizamos a metodologia desenvolvida por Upadhyaya e colaboradores (2006) de mobilização do elemento Ds do interior do T-DNA pela transformação transiente de linhagens de arroz previamente transformadas - Ds72, com o vetor que contém o gene da transposase *iAc* (pMN400d).

A construção pMN400d (Figura 1B), disponível no GenBank sob Acc. No. DQ225752, é bem mais simples em relação ao pMN393b2. Esse vetor possui o gene de seleção *nptII*, que confere resistência a Canamicina e Geneticina em bactéria. Dentro do T-DNA, há o gene repórter *sgfp S65T* que produz uma proteína fluorescente verde (GFP) e, por fim, o gene da transposase *Ac* imobilizado (*iAc*), para evitar a sua própria mobilização do T-DNA. Esses dois genes têm a expressão controlada pelo promotor de ubiquitina de milho. O *iAc* foi gerado pela substituição da região 5' do *Ac* natural por um reforçador (*enhancer*) Ω de TMV fusionado ao promotor *Ubi1*. Não há nenhum gene de seleção no interior do T-DNA.

O plasmídeo foi mantido tanto em *Escherichia coli* cepa XL1 Blue MRF (sup E44, hsd R17, rec AI, end AI, gyr A46, Thi, rel AI, lac⁻, F⁺ [pro AB⁺lacI⁺ lacZ Δ MSTn10 (tetr)]) (Stratagene Cloning Systems, Califórnia, EUA)), para amplificação do vetor, quanto em *Agrobacterium tumefaciens* cepa AGL1, rif⁺ (Lazo *et al.* 1991) para transformação de calos de arroz. Bactérias com o vetor foram mantidas em meio de cultura LB (Miller, 1972) contendo canamicina. Além desse antibiótico, a bactéria *A. tumefaciens* também foi mantida sob seleção do antibiótico rifampicina.

Obtenção de calos de arroz

Os experimentos de transformação foram realizados em calos embriogênicos de arroz obtidos a partir de sementes maduras de plantas da linhagem mutante Ds72. Essa foi obtida pela transformação com o vetor pMN393b2 de calos gerados de sementes de plantas não-transformadas da cultivar Nipponbare, subespécie japonesa de arroz. Os grãos foram descascados manualmente e, em seguida, desinfestados. Primeiro em Etanol 70% por 1 minuto e, após serem lavados com água destilada por três vezes, mergulhados em solução de hipoclorito de sódio 50% por 30 minutos. Sob condições assépticas, essas sementes foram lavadas diversas vezes em água estéril e plaqueadas em meio sólido N6D (Anexo 2). As placas, cada uma contendo em média seis grãos, foram mantidas na luz a 28°C num período de 6 a 8 semanas para a produção de calos.

Os calos foram transferidos para placas contendo meio de proliferação NB (Li *et al.*, 1993) e o herbicida Basta® que serve como agente de seleção das linhagens contendo o vetor pMN393b2. Esses calos foram mantidos a 28°C no escuro em B.O.D. (“*Biologic Oxygen Demand*”, ou Estufa Incubadora) e após gerar massa suficiente utilizados para transformação com pMN400d.

Somente calos heterozigotos para a inserção de T-DNA foram utilizados nas transformações para que existisse somente um (1) elemento *Ds* a ser mobilizado, e esse gerasse somente mais uma inserção no genoma.

Transformação via *Agrobacterium*

O protocolo de transformação a ser utilizado foi adaptado de Hiei *et al.* (1994) e se encontra descrito por Upadhyaya *et al.* (2000).

A transformação foi feita por co-cultivo de calos jovens e saudáveis de Ds72 com *A. tumefaciens* portando o vetor pMN400d em meio contendo 19,62 mg/L de acetoseringona. A acetoseringona é importante para a transformação, pois compostos fenólicos são um sinal químico que desencadeia a infecção pela *Agrobacterium* por normalmente indicar uma lesão no tecido vegetal. Essa sinalização permite que a *Agrobacterium* infecte o arroz, que normalmente não seria infectado por ela.

Após um período de dois dias de co-cultivo com a agrobactéria, os calos foram lavados repetidas vezes com água estéril contendo o antibiótico. Os calos foram secos em papel filtro estéril e transferidos para meio NB contendo os antibióticos Timentina

(150mg/L) e Cefotaxima Sódica (200mg/L) e higromicina (50mg/L) (meio HTC descrito no Anexo 2).

Com exceção das células transformadas, todos os calos devem morrer nesse meio de seleção. Desta forma observam-se pequenos calos jovens que proliferam sobre os mortos, cada um deles formado por células originadas de um evento de transformação diferente. Depois de quatro semanas, esses calos jovens foram transferidos para placas contendo meio de cultura novo, tendo o cuidado de se separar os diferentes calos, pois em cada evento de transformação o elemento *Ds* pode ter se inserido em um ponto diferente do genoma e por isso cada um deve ser considerado uma linhagem diferente. Os calos resistentes foram cultivados em meio de proliferação (NB) e quando atingiram massa suficiente foram transferidos para meio de pré-regeneração (Anexo 2).

Mobilização do elemento *Ds*

Ao ser inserida no núcleo da célula vegetal o T-DNA da construção pMN400d passa a ser transcrita, levando à produção da transposase *Ac* que reconhece e mobiliza o elemento *Ds* de sua inserção original (*launch pad*, LP). Essa mobilização faz com que o promotor 35S ligue-se ao cassete que contém o gene *hph* e o terminador. Desta forma a higromicina fosfotransferase passa a ser expressa, conferindo ao calo resistência à higromicina. Da mesma forma, o fato desses indivíduos manterem a resistência ao Basta® indica que o *Ds* continua a ser transcrito, inserido em outro ponto no genoma que não o LP.

Detecção da fluorescência da GFP

A construção pMN400d, como já descrito, possui como marcador visual o gene da proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein, GFP) que indica a integração do T-DNA no genoma do vegetal. Essa proteína pode ser detectada em microscópio de fluorescência na faixa de excitação a 488 nm e com emissão observada a 530 nm – filtro BP 505-530. Desta forma todas as linhagens de calos contendo transposons mobilizados passarão por essa análise para identificar se essa construção se integrou ao genoma.

Seleção de linhagens estáveis

Calos GFP+, Higromicina resistentes apresentam o T-DNA da construção pMN400d inserido em seu genoma e a transposase *iAc* transcrita de forma contínua, fazendo o elemento *Ds* seja constantemente mobilizado. Estas linhagens de calos seriam altamente instáveis, gerando plantas mutagênicas que apresentariam uma progênie diversificada, porém de difícil estudo por apresentar mutações em cada ponto onde o elemento transponível se inseriu. As plantas que apresentem essas características também podem ser mantidas por nosso grupo, porém como a intenção deste trabalho é a criação de uma coleção de linhagens mutantes estáveis, selecionamos os calos GFP-, higromicina resistentes, Basta® resistente que tiveram o *iAc* transcrito transientemente, sem se integrar ao genoma, mas de forma capaz de mobilizar o elemento *Ds* de sua inserção original.

De calo à planta

Após uma rigorosa seleção, em média cinco calos jovens de cada linhagem foram transferidos do meio HTC, para placas contendo meio de pré-regeneração no qual foram mantidos por um período de 10 a 12 dias no escuro a 28°C em B.O.D. Os calos foram então transferidos para o meio de regeneração. Neste meio os calos, mantidos a partir dessa fase sob regime luminoso de 16 horas/dia, formam embriões que se desenvolvem em plântulas.

As plântulas foram transferidas para vidros estéreis contendo meio de cultura sólido MS (Murashige e Skoog, 1962), a meia força (MS^{1/2}), contendo higromicina para eliminar possíveis escapes.

Após duas semanas, as plântulas que sobreviverem e se desenvolverem foram lavadas e transferidas para copos plásticos contendo o substrato vermiculita e solução nutritiva MS^{1/2}. Os copos foram cobertos com sacos plásticos para impedir a dessecação das plântulas que ainda não possuíam proteção contra a perda de água.

As plantas que se estabeleceram bem na vermiculita e alcançaram uma altura de mais de 15 centímetros foram transferidas para vasos com “Solomax” (Eucatex Química e Mineral Ltda) e mantidas em casa de vegetação.

Análises de PCR

A transgenia das plantas, assim como a transformação das bactérias com os vetores foram comprovadas por reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) com diferente pares de *primers* para detectar diferentes genes que compõem a construção, como o *gus*, o *hph* e o *bar* (anexo 1). As reações de PCR foram feitas geralmente utilizando 0,75µL de MgCl₂ (50mM); 2,5µL de tampão (10X); 0,5µL de dNTP (10mM); 0,5µL de Mix de primer “forward” e “reverse” (10µM); 19µL de água MiliQ autoclavada; 0,25µL de enzima Taq DNA polimerase (5U/µL) e 1µL de DNA (100ng/µL). O programa utilizado para polimerização iniciava com 5 minutos à 94°C, seguido de um ciclo de 30 repetições de 1 minuto à 94°C, 1 minuto à 55°C e 1 minuto à 72°C. Finalizando a polimerização, o programa apresentava 5 minutos à 72°C.

v. Análise do padrão de expressão do gene *OsPMBP1*

Para a análise da expressão do gene *OsPMBP1* foi utilizada a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Para tal, primeiro foi necessário a extração de RNA total das plantas testadas, seguida pela síntese de cDNA a partir dos RNAs mensageiros da amostra.

Condições experimentais

1. Estresse por Alumínio

Sementes de arroz *ssp japonica* (cv Nippombare) NT foram germinadas em papel filtro por 2 a 4 dias no escuro a 28°C. As plântulas germinadas foram colocadas em solução hidropônica (Baier et al., 1995) por 12 dias, em câmara de crescimento a 28°C e 12 h de luz. A solução hidropônica foi trocada a cada quatro dias. No 12º dia de cultivo, as plântulas foram submetidas a tratamento com 60 mg.L⁻¹ de cloreto de alumínio (AlCl₃). Amostras do tecido radicular e folhas foram coletadas nos tempos de 1, 4 e 8 h após o tratamento. Como controles foram utilizadas plantas não tratadas com Al, mas mantidas nas mesmas condições de cultivo e extraídas ao mesmo tempo que as amostras de Al 4 h, evitando dessa forma outras variáveis que poderiam afetar as análises. A solução controle e a solução contendo Al foram mantidas em pH 4,5.

2. Resposta à Luz

As plântulas foram colocadas em vasos de plástico contendo solo comercial “Solomax” (Eucatex Química e Mineral Ltda.) e crescidas em câmara de crescimento à 28°C e 16 h de luz/dia durante quatro semanas. Durante o experimento foram coletadas amostras de folhas de duas plantas após 12 horas expostas a luz (18:00 - seis horas da tarde) para servirem de controle e as demais foram transferidas para estufas B.O.D., quatro numa com fotoperíodo programado para as seis horas da manhã e quatro numa B.O.D. programada para permanecer escura. No dia seguinte, às oito horas da manhã, foram coletadas amostras de folha de duas plantas submetidas à luz por duas horas e de duas mantidas no escuro, repetindo o processo com as demais plantas às 10 horas da manhã.

Extração de RNA

Amostras de parte aérea e/ou raízes foram coletadas das plantas e imediatamente pulverizadas em nitrogênio líquido, ou estocadas no mesmo até o momento da extração. A extração do RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIZOL (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante.

Síntese de cDNA a partir de RNA total

A síntese de cDNA a partir de RNA total foi realizada utilizando-se a enzima M-MLV *Reverse Transcriptase* (Promega) seguindo-se as recomendações do fabricante, com as seguintes adaptações: em um volume final de 20 µL, foi utilizado uma quantidade inicial de 2 µL de RNA total de arroz, 1 µL do oligonucleotídeo poli-T (1 µg/µL), 1µL de desoxirribonucleotídeos (dNTP) a 10 mM, 8 µL de água ultrapura. Visando desnaturar o RNA, a solução foi incubada à 65°C por 5 minutos e imediatamente incubada em gelo por mais 5 minutos. A seguir, 4 µL de tampão 2,5X (*First Strand Buffer 2,5X*), 2 µL de DTT 0,1 M, 1 µL de H₂O e 1 µL de M-MLV *Reverse Transcriptase* (200 U/µL) foram adicionados à solução de forma a completar um volume final de 25 µL. A reação foi mantida a 37°C por 2 horas e em seguida diluída 10x em H₂O.

PCR quantitativo em tempo real

As análises por PCR quantitativo (qRT-PCR) foram realizadas em aparelho “*Applied Biosystems 7500 Real-Time System*”. As qRT-PCRs foram compostas de um passo inicial de desnaturação de 5 min à 94°C seguido de 40 ciclos de 10 s a 94°C, 15 s a 60°C e 15 s a 72°C. As amostras foram mantidas por 2 min a 40°C para reanelamento e, então, aquecidas de 55 para 99°C para adquirir dados procedentes da curva de desnaturação do produto de amplificação.

Os qRT-PCRs foram feitos usando 10 µL da amostra de cDNA diluído 100X em 2,0 µL tampão PCR 10X, 1,2 µL MgCl₂ 50 mM, 0,1 µL dNTPs 5 mM, 0,2 µL de cada *primer* 10 µM, 4,25 µL H₂O, 2,0 µL SYBER GREEN (1:100,000), e 0,05 µL *Platinum Taq DNA Polymerase* (5 U/µL; Invitrogen). Totalizando um volume de 20 µL por reação. Os *primers* utilizados nas reações estão listados no Anexo 1, para *OsPMBPI* foi utilizado o par de primers 72RT3 e como normalizadores internos das amostras de cDNA foram utilizadas duas seqüências gênicas de expressão constitutiva: fator de alongação (eF; código de acesso no GenBank AJ252135) e formaldeído-desidrogenase (FDH; código de acesso no GenBank U77637.1). Todas as reações foram realizadas com quatro repetições experimentais e o cálculo foi feito utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se do teste t de Student, com P < 0,05 de significância. Os cálculos foram realizados no programa Excel[®] do pacote Microsoft Office 2007, nos quais foram criados os gráficos apresentados neste trabalho.

Resultados

I. Linhagem Ds72

Comparando o fenótipo da linhagem Ds72 com o de plantas não transformadas

A linhagem Ds72 foi obtida em trabalho prévio (Abreu Neto, 2006) através da transformação de arroz com a construção pMN393b2 (Upadhyaya *et al.*, 2006). Essa planta contém uma inserção do T-DNA contendo o elemento Ds. Após obtenção da progênie T1, descendentes da linhagem Ds72, verificamos que as plantas homozigotas para a inserção apresentavam estatura inferior às plantas não-transformadas da mesma idade. Visando confirmar essa observação foi acompanhado o desenvolvimento de um grupo de plantas homozigotas da linhagem Ds72 e de plantas não transformadas.

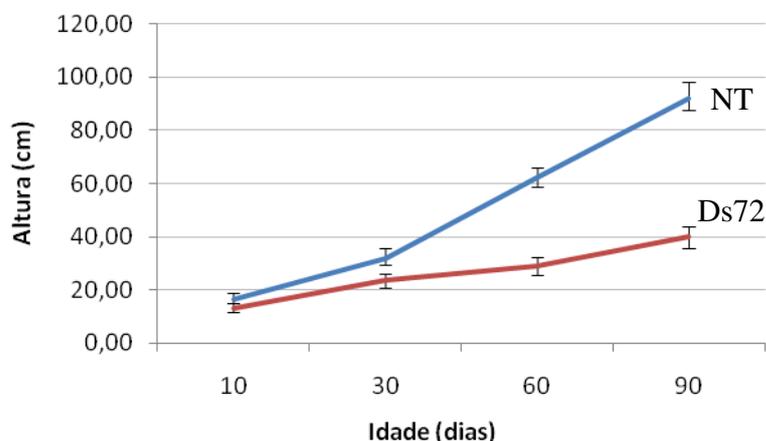


Figura 5. Crescimento médio de 50 plântulas NT e 50 plântulas Ds72 homozigotas para a inserção de T-DNA, acompanhado durante os primeiros 90 dias de crescimento. Medições mensais com desvio amostral demonstrado.

Durante os três meses de acompanhamento, plantas homozigotas para a inserção apresentaram em média estatura menor do que plantas NT e esta diferença aumentou à medida que as plantas se desenvolveram (Fig.5). Porém ao analisar a estatura de cada planta individualmente verificamos uma variação crescente ao longo do

desenvolvimento das plantas, de forma a existirem plantas NT menores que as transgênicas e vice-versa. No entanto, a distribuição das plantas na escala de altura (Figura 6, eixo horizontal) revela que o número de plantas com estatura reduzida é maior no grupo das plantas de linhagem Ds72 quando comparadas com as plantas não transformadas. Esse resultado foi recorrente nos três estágios de desenvolvimento analisados (Fig.6).

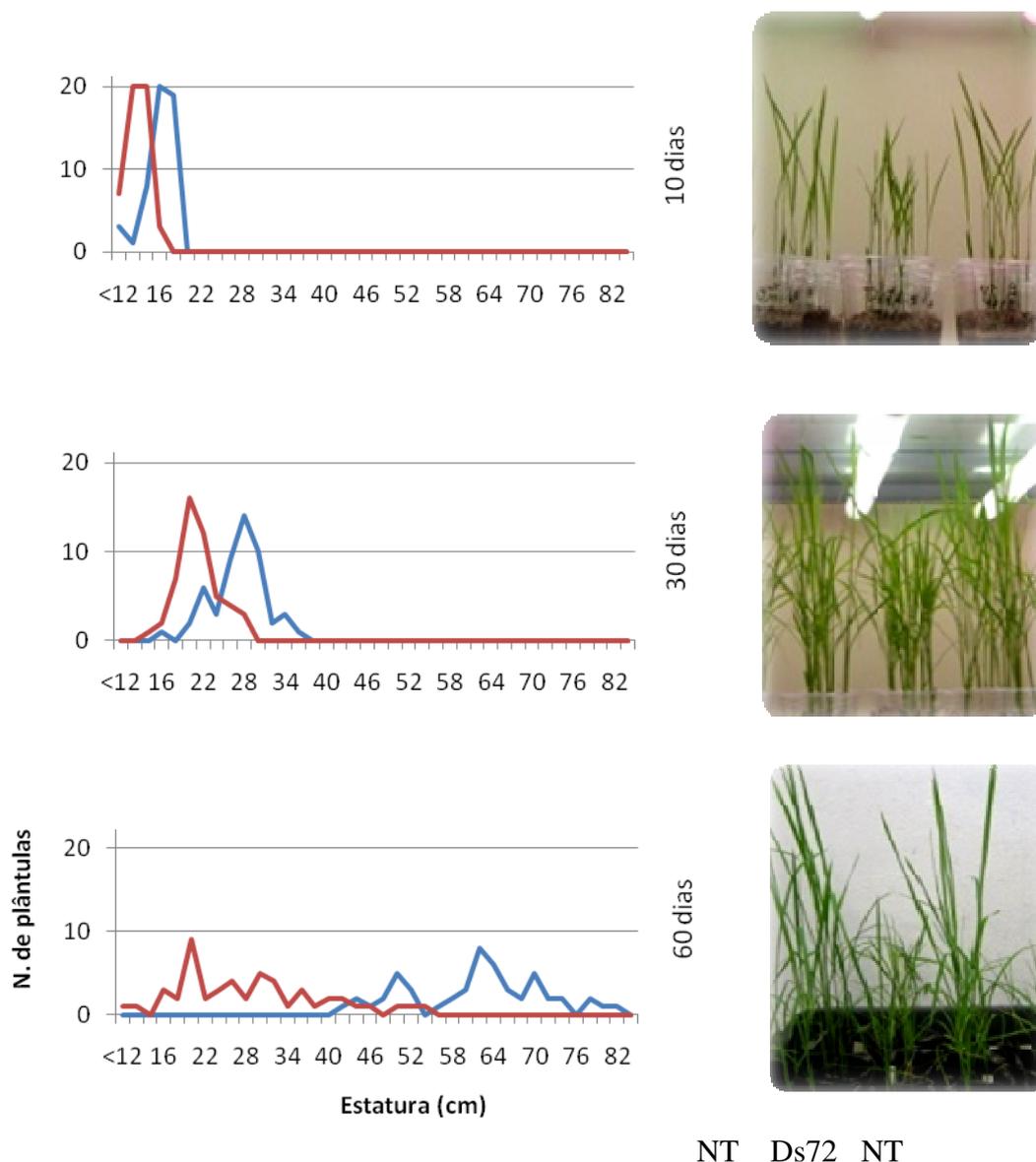


Figura 6 - Distribuição da estatura de plântulas NT (Linha azul) e Ds72 (linha vermelha) nos primeiros dois meses de crescimento. Número de indivíduos (eixo vertical) em relação à estatura em cm (eixo horizontal). Fotos das plantas, uma fileira de Ds72 entre duas de NT nas respectivas datas de medição.

Seleção de plantas sem inserção

A cultura de tecidos, mais especificamente a regeneração de plantas a partir de calos, pode gerar alterações genéticas e fenotípicas nas plantas que passaram por esse processo, denominadas de variações somaclonais. Nas células em cultura, diversos processos geradores de mutações podem ser induzidos: atividade de elementos transponíveis (por exemplo, *Tos17* que é responsável por 5-10% das mutações (Hirochika, 2001)), pequenas inserções, deleções e substituições de bases. Essas mutações “de fundo” são um artefato que dificulta a análise de mutantes por inserção de T-DNA, pois o fenótipo apresentado pela planta pode ser devido a essas mutações não-marcadas (que não podem ser identificadas por FST) e não pela inserção de T-DNA identificada (Guiderdoni *et al.*, 2007).

Para reduzir a influência de variações somaclonais diversos procedimentos são utilizados na produção e análise de mutantes. O processo de cultura de tecidos foi realizado em condições controladas, seguindo protocolos que gerem poucas variações, e com limitação, menos de um ano entre indução dos calos e a regeneração de plantas transformadas. A análise da segregação do fenótipo nas plantas descendentes é de grande importância, para determinar se a característica observada é ligada à inserção e isolar outras mutações. E por fim, é desejável a existência de diferentes mutantes com inserções no gene estudado para determinar se o fenótipo é diretamente ligado ao gene (Guiderdoni *et al.*, 2007; Krishinan *et al.*, 2009).

Para analisar a segregação e em especial a identificação de plantas da linhagem que não possuíssem a inserção, foram germinadas sementes de plantas heterozigotas para a inserção de T-DNA. Dessas somente as de Ds72A-I germinaram e deram origem a plantas que denominamos de Ds72A-I-A a O. Foram extraídas amostras de DNA dessas plântulas juntamente com o de uma planta NT e duas Ds72 homozigotas do experimento de crescimento. Duas plântulas, B e C, não tiveram DNA extraído por estarem fracas e muito pequenas.

Essas 16 amostras de DNA foram utilizadas em reações de PCR com os pares de *primers*: ds72F1+ds72R1, que amplifica na ausência inserção de T-DNA; ds72F1+TTLBnest3(LB), que amplifica na presença da inserção, mas produz uma banda inespecífica um pouco maior que a banda esperada, e Bar5’_68⁺ +Bar3’_489⁻, que comprova a transgenia ao amplificar fragmento do gene de resistência ao Basta[®].

Como resultado encontramos na prole de Ds72A-I onze plantas heterozigotas para a inserção de T-DNA em *OsPMBP1*, uma homozigota (F) e uma planta que não possui a inserção, Ds72A-I-D (Fig. 7).

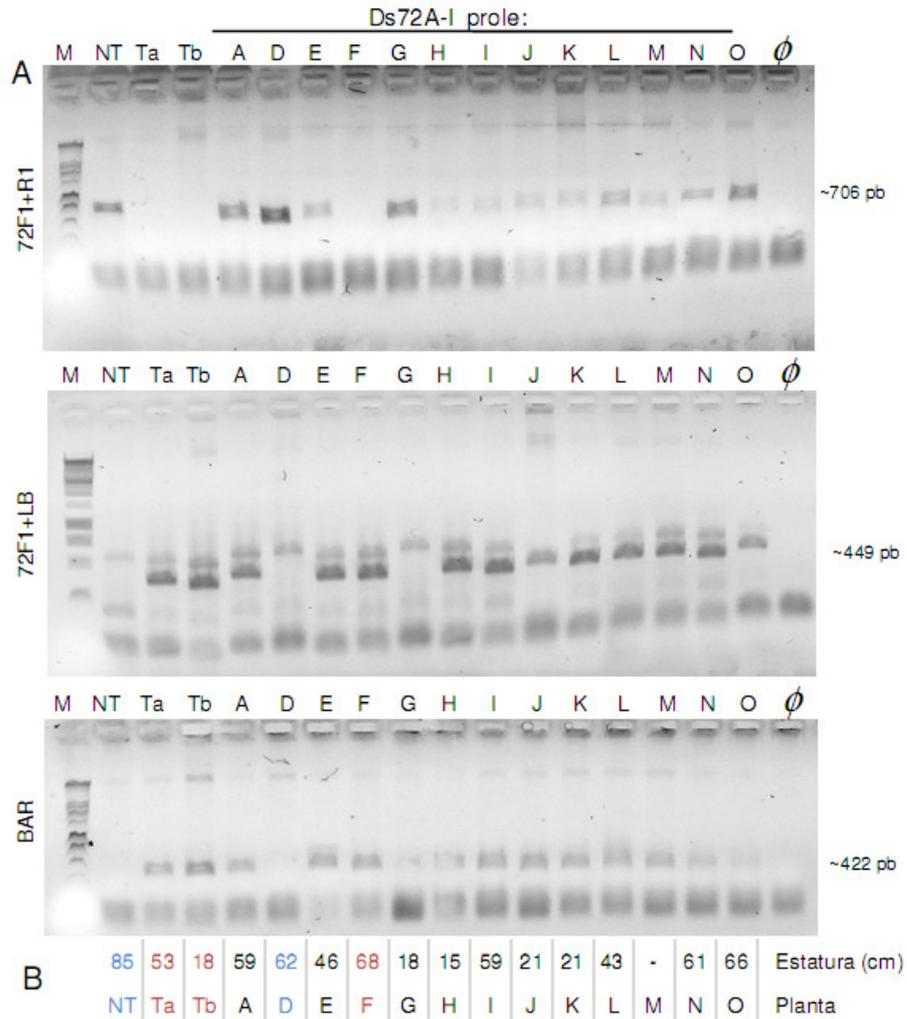


Figura 7 – Segregação de progênie da planta Ds72-A-I. A) Eletroforese em gel de agarose 0,8% de produtos de PCR das plantas da progênie de Ds72A-I (plantas A-O), NT e Ds72 homozigotas (Ta e Tb) como controles. Primers: ds72F1+R1; ds72F1+ TTLBnest3(LB), e barF+R. M: 1Kb ladder Promega. ϕ : Branco, reação sem DNA. Coloração com Gel Red. B) Estatura dessas plantas, em cm, aos três meses de idade. Em azul, plantas sem a inserção e, em vermelho, plantas homozigotas para a inserção de T-DNA.

Essa planta, Ds72A-I-D, apresenta, aos três meses, uma estatura intermediária entre a de plantas NT e homozigotas para a inserção, existindo plantas dos dois grupos com estaturas semelhantes (Fig. 7B). Por se tratar de um único indivíduo, seu fenótipo pode não refletir a realidade de todas as plantas da linhagem ds72 que não possuam a inserção de T-DNA e somente a partir da análise de sua prole poderemos inferir com maior confiança

se a redução de estatura esteja, ou não, ligada com a inserção em *OsPMBP1*.

Porém entre as plantas irmãs identificamos uma homozigota para a inserção, Ds72-A-I-F, que é maior que a planta Ds72-A-I-D. E todas as plantas da linhagem Ds72 apresentam estatura menor que a média de plantas NT, independentes de serem homozigotas, heterozigotas ou homozigota nula para a inserção (Fig. 7B). Tais fatos indicam que o fenótipo observado provavelmente seja devido a variações somaclonais. Porém devido ao pequeno número de plantas avaliadas, especialmente homozigotas nulas, não podemos excluir definitivamente a contribuição da inserção no fenótipo observado.

Expressão do gene *OsPMBP1* em plantas mutantes

A expressão do gene *OsPMBP1* em nível de acúmulo de transcritos foi analisada por qRT-PCR com amostras de cDNA provenientes da parte aérea de plântulas de duas semanas mantidas nas condições descritas em Materiais e Métodos. Essas análises mostraram que ocorreu uma redução de aproximadamente 20% no nível de transcrito de *OsPMBP1* nas plantas homozigotas para a inserção quando comparadas com plantas NT (Fig.8). Porém esta diferença não se mostrou estatisticamente significativa com $P < 0,05$.

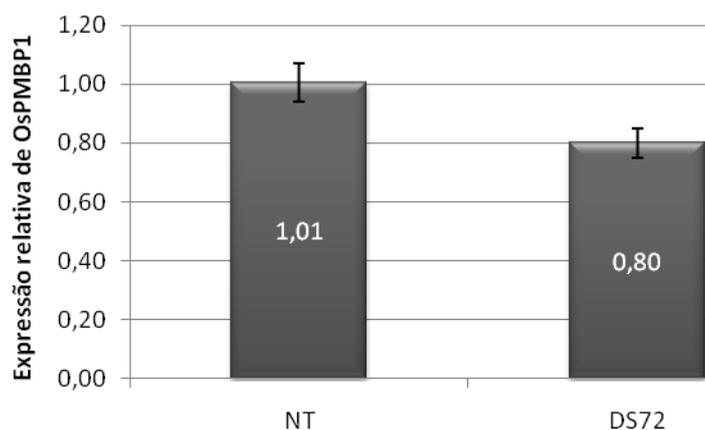


Figura 8 – Análise por qRT-PCR da expressão relativa de *OsPMBP1* em amostras de cDNA de plântulas NT e ds72. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *fdh* e *ef*. A normalização dos resultados foi feita em relação à expressão relativa do gene *OsPMBP1* em plantas NT.

II. Obtenção de Novos Mutantes

Produzimos calos embrionários de 35 sementes de plantas da linhagem Ds72, desses oito morreram em meio contendo Basta[®] (provavelmente indivíduos sem a inserção), nove se mostraram, em PCR, homocigotos para a inserção e 20 eram heterocigotos (Fig. 9). Somente os melhores calos obtidos de indivíduos heterocigotos foram utilizados para os experimentos de transformação para que existisse somente um (1) elemento *Ds* a ser mobilizado, gerando somente uma nova mutação por inserção que diferencie as linhagens produzidas da linhagem original, Ds72 (que possui esse elemento no interior do T-DNA inserido no locus de *OsPMBPI*).

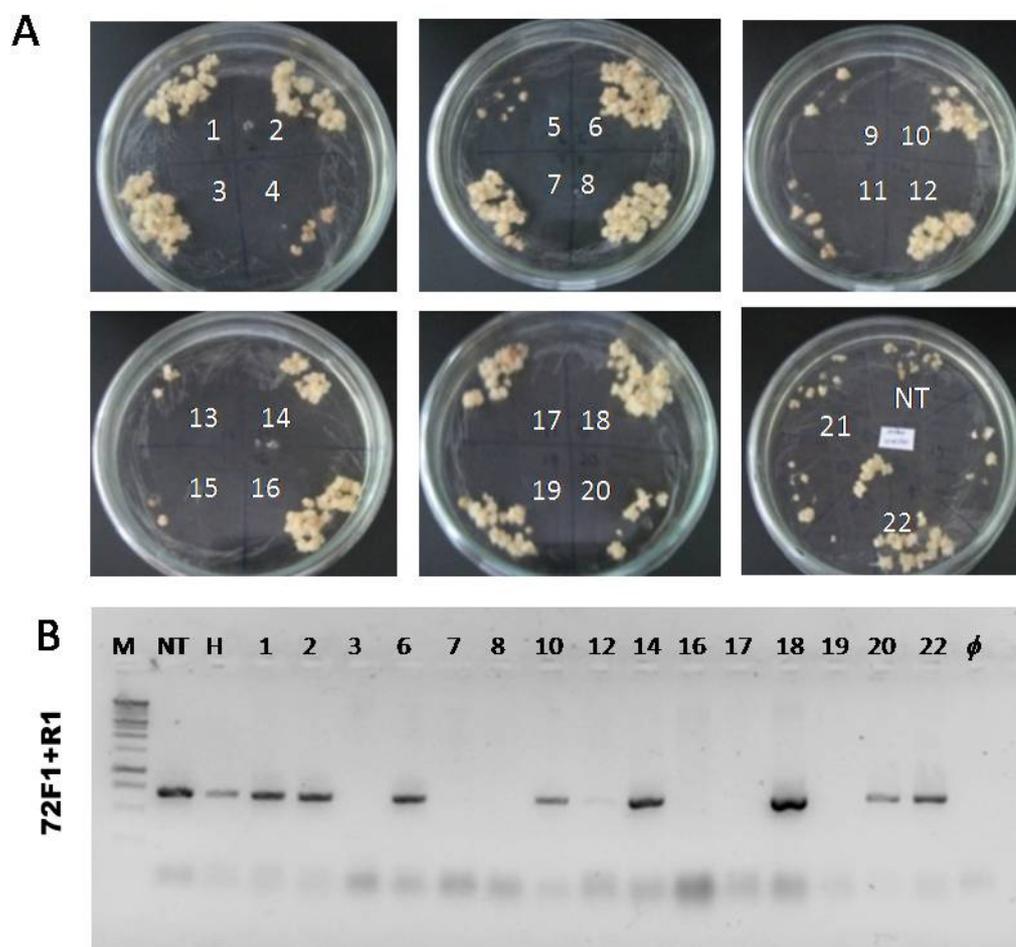


Figura 9. Calos obtidos de sementes da planta Ds72A-H(T1 heterocigota). A) Calos em meio de proliferação contendo Basta[®] (BTC). B) Produto de reação de PCR com DNA de calos resistentes ao Basta[®] com os primers 72F1 e 72R1. A amplificação do produto de 700pb indica que pelo menos um dos cromossomos 1 destes indivíduos não possui a inserção de T-DNA, de forma que na ausência do produto o indivíduo provavelmente seja homocigoto para a inserção (Gel de agarose 1% corado com GelRed, M: 1kb ladder promega, H: DNA da planta mãe. ϕ : branco, reação sem DNA).

Ao longo dos dois anos do desenvolvimento desse trabalho, realizamos 16 experimentos de transformação de calos da linhagem Ds72, utilizando cerca de 120 calos em cada co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor pNU400d. Obtivemos 164 linhagens de calos provenientes da mobilização do elemento Ds da inserção original. Esses calos representam eventos independentes e foram selecionados e proliferados em meio contendo higromicina. Porém, plântulas de somente cinco linhagens passaram pelas etapas seguintes de regeneração, seleção e aclimação. Essas plântulas foram transferidas para solo, mas nenhuma dessas conseguiu se estabelecer e morreram na casa de vegetação antes de serem analisadas.

Análises por microscopia de fluorescência demonstraram que entre as linhagens obtidas nenhuma expressava GFP (marcador da inserção do vetor pMN400d) ou eYFP (expressão de proteína fusionada com gene interrompido pelo transposon). Testes de GUS não foram realizados.

Os experimentos de transformação continuam em andamento, no momento existem cinco linhagens em regeneração e 28 calos resistentes resultantes do último experimento e que se encontram em meio de proliferação.

III. Previsão do Produto Gênico

A seqüência correspondente à FST obtida da planta Ds72A corresponde ao locus Os01g0125600 (NP_001041891.1, GeneID: 4326005) do genoma de arroz. Esse locus contém uma fase aberta de leitura que corresponde à uma proteína de 420 aminoácidos. A inserção de T-DNA estaria localizada à 18 nucleotídeos a partir do códon de parada. A seqüência de aminoácidos deduzida desse locus foi comparada através de BLASTp com seqüências disponíveis nos bancos de dados, genomas de arroz, Arabidopsis, álamo e sorgo.

A proteína deduzida apresenta como características principais a presença de um domínio de associação a metais pesados HMA, do inglês *Heavy Metal Associated-domain* (Fig.10A e B), e um sítio de prenilação que, segundo o programa PrePS, seria alvo tanto da enzima Farnesil transferase (FT) quanto da Geranylgeranyl transferase 1(GGT1) (fig.10C). Por essas características nominamos essa proteína de *Prenylated Metal Binding Protein 1* (OsPMBP1)

A primeira estratégia para a caracterização dessa proteína foi a determinação *in silico* das prenilttransferases para as quais a OsPMBP1 seria um substrato potencial. Para determinar a associação entre a proteína alvo e três as prenilttransferases FT, GGT1 e GGT2, o programa PrePS leva em consideração os onze resíduos a jusante da extremidade carboxil, além do tetrapeptídeo CaaX (onde C: cisteína, a: qualquer aminoácido alifático, X: preferencialmente serina, metionina, cisteína, alanina ou glutamina para FT e leucina para GGT1). As enzimas FT e GGT1, possuem muitos alvos que se sobrepõem, trabalhos anteriores demonstraram que a atividade de uma enzima pode compensar a carência da outra e, em alguns casos, até mesmo utilizando como substrato a cadeia lipídica preferencialmente usada pela outra prenilttransferase, como a FT ligar geranilgeranil a uma proteína alvo (Trueblood *et al.*, 1993). Porém a atividade de GGT1 é três vezes menor que a de FT, de forma que em substratos que sejam alvos das duas enzimas a pontuação (*Score*) dada pelo programa a GGT1 (no caso de OsPMBP1, 2.576) deve ser três vezes maior que o dado para FT (no caso da OsPMBP1, 1.930) para que a proteína seja preferencialmente geranilgeranilada (Maurer-Stroh & Eisenhaber, 2005). Também devemos levar em consideração que as predições por PrePS representam a capacidade da sequência do substrato de ser modificada na presença das enzimas. *In vivo*, atividade, afinidade e disponibilidade de FT, GGT1 e GGT2 no contexto celular determinam por qual enzima e se uma proteína será prenitada. Da mesma forma, a conformação do substrato é essencial, caso a sequência terminal não esteja acessível, ela não será identificada nem modificada por uma prenilttransferase.

O domínio HMA possui um motivo CXXC (C: cisteína e X: qualquer aminoácido) que se liga a íons metálicos como os de cobre, cobalto e zinco. O HMA assume uma conformação semelhante à ferredoxina, em dobramento $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$, e é altamente conservado em proteínas das mais variadas espécies. Identificamos essa estrutura na proteína codificada pelo gene OsPMBP1 pelo programa “PROT predictions” do servidor PredictProtein e pela modelagem da estrutura terciária do domínio pelo Swiss-pdb View (Fig.10A e B, respectivamente)

Pela presença do domínio HMA que se liga a íons metálicos como os de cobre, cádmio, cobalto e zinco, essa proteína foi categorizada temporariamente pelas principais plataformas de dados como associada ao transporte e detoxificação de metais pesados. Porém não há nenhuma evidência experimental apresentada para suportar essa afirmação.

Somente o domínio HMA da proteína pode ser moldado por homologia (Fig. 10 B), visto que essa é a única porção da sequência peptídica que mostrou homologia a uma proteína cuja estrutura já fora cristalografada por difração de raio X. A proteína em questão é a metalochaperona ATX1 de *Saccharomyces cerevisiae* (GI:6324070).

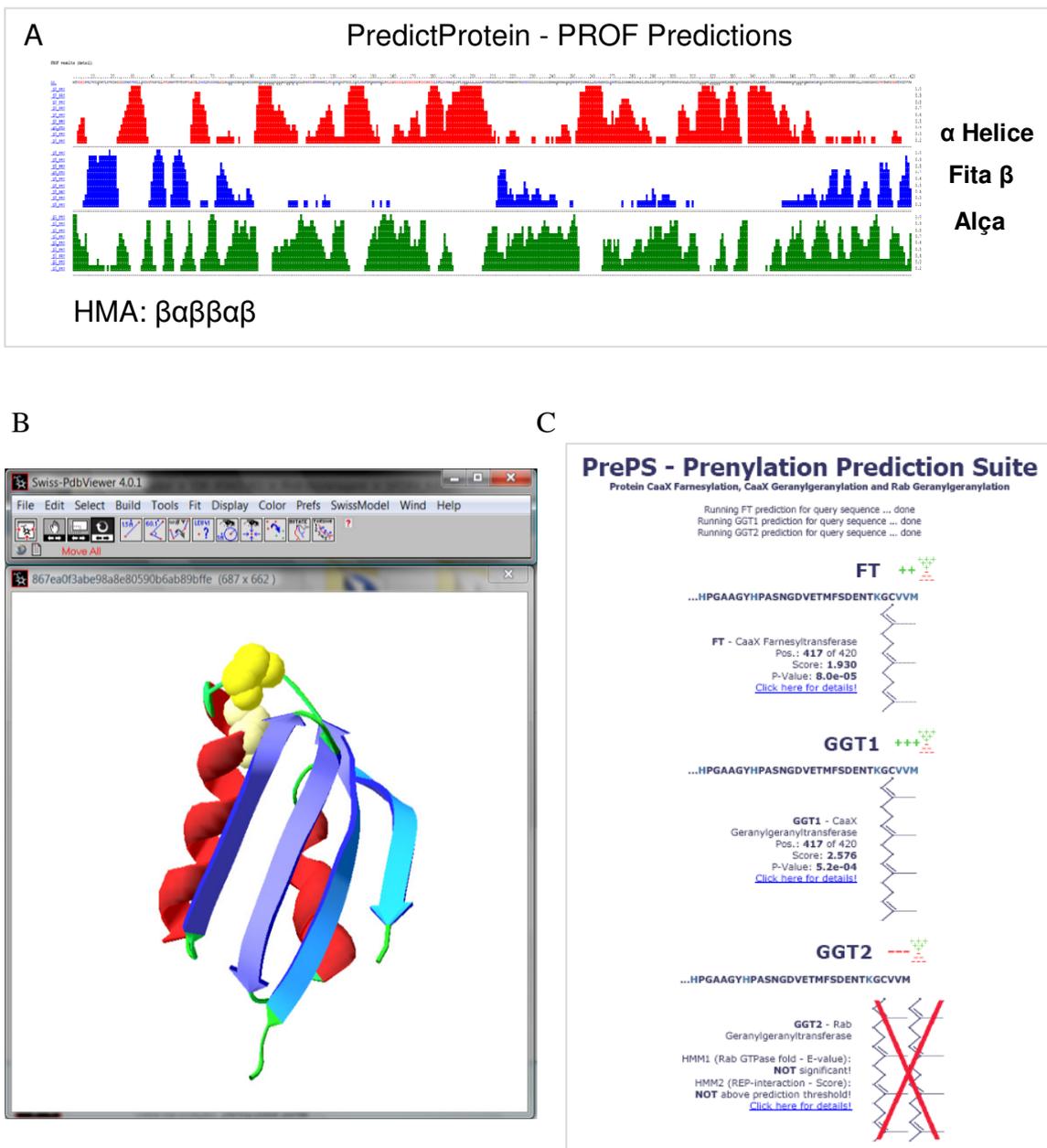


Figura 10. Previsões da estrutura da proteína OsPMBP1 por diferentes programas. A) Estrutura secundária prevista pela probabilidade de cada resíduo de formar uma hélice, uma fita ou uma alça. Programa PROF Prediction do servidor PredictProtein. B) Modelo da estrutura terciária do domínio HMA de OsPMBP1, visualizado e editado no programa Swiss-pdb View, em amarelo as duas cisteínas do sítio de ligação a metal. C) Previsão dada pelo programa PrePS de prenilação da extremidade carboxil pelas enzimas FT, GGT1 e GGT2. Para uma visão mais detalhada das figuras A e C, veja os anexos 3 e 4, respectivamente.

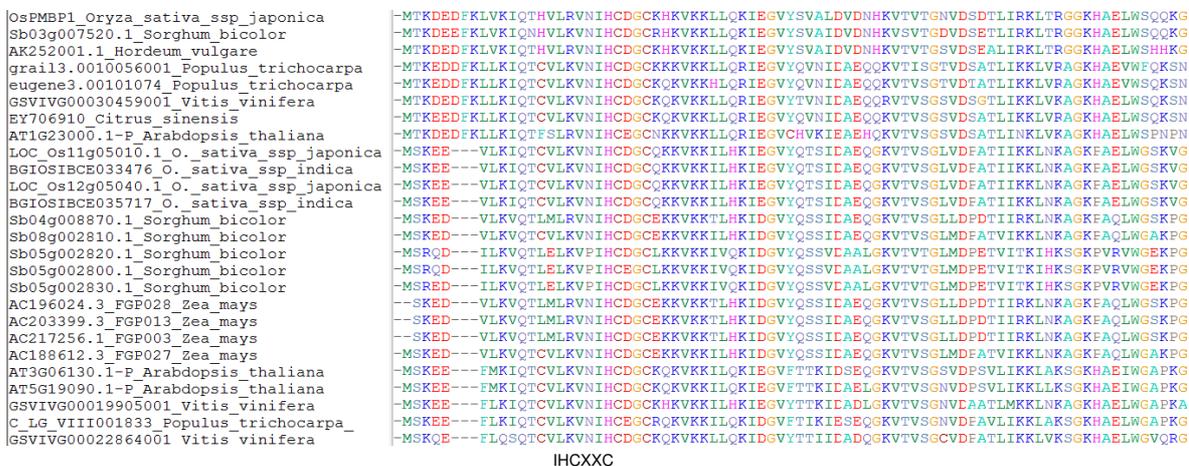
IV. Análises Filogenéticas

De acordo com a plataforma GRAMENE, o gene *OsPMBP1* só possui um parálogo no genoma de *Oryza sativa* ssp. japonica, LOC_Os11g05010, porém, foram encontrados diversos genes no genoma do arroz que codificam proteínas com organização estrutural semelhante. Ao reunir todos os modelos de genes de arroz que, segundo a plataforma GRAMENE, continham o domínio HMA (baseados no seqüenciamento de transcritos), verificamos, através do programa PrePS, que cerca da metade contém um sítio hipotético de prenilação (77 dos 148 modelos analisados). Porém a existência do motivo CaaX, como já demonstrado, pode não refletir uma prenilação *in vivo*, principalmente no caso de 18 sequências que possuem o sitio de ligação a metais no C-terminal, onde o programa PrePS encontrou o motivo de prenilação.

O alinhamento das sequências desses genes que apresentam os domínios HMA e de prenilação com sequências de uma família de proteínas já descritas como contendo esses dois elementos em *A. thaliana*, soja (*Glicine max*) e cevada (*Hordeum vulgare*), revelou que existe a possibilidade de uma ligação filogenética entre OsGMBP1 e essa família de Proteínas Ferniladas. OsPMBP1 e proteínas semelhantes se agrupam dentro de um dos ramos dessa família, junto com ATFP6, ATFP7 e outras proteínas farnesiladas de soja, cevada e arroz (Filograma no ANEXO 5).

A busca por sequências semelhantes à OsPMBP1 em outras espécies revelou sequências peptídicas altamente conservadas no domínio HMA e na extremidade carboxil (fig.11). Com o programa ClustalX 2.0, essas sequências foram alinhadas e uma árvore filogenética foi construída (Fig.12). Com essa análise foi verificado que os genes de espécies monocotiledôneas (arroz, sorgo (*Sorghum bicolor*), milho (*Zea mays*) e cevada), estão claramente separados dos genes de dicotiledôneas, como *Arabidopsis*, videira (*Vitis vinifera*), álamo (*Populus trichocarpa*) e laranjeira (*Citrus sinensis*). O fato dos genes se separarem entre OsPMBP1 e seu “parálogo” que, provisoriamente, denominamos de OsPMBP2, indica que a divergência dos dois deve ter ocorrido antes da formação das Liliopsidas (monocotiledôneas).

Extremidade Amino-terminal- Domínio HMA :



Extremidade C-terminal - sítio de prenilação CaaX:

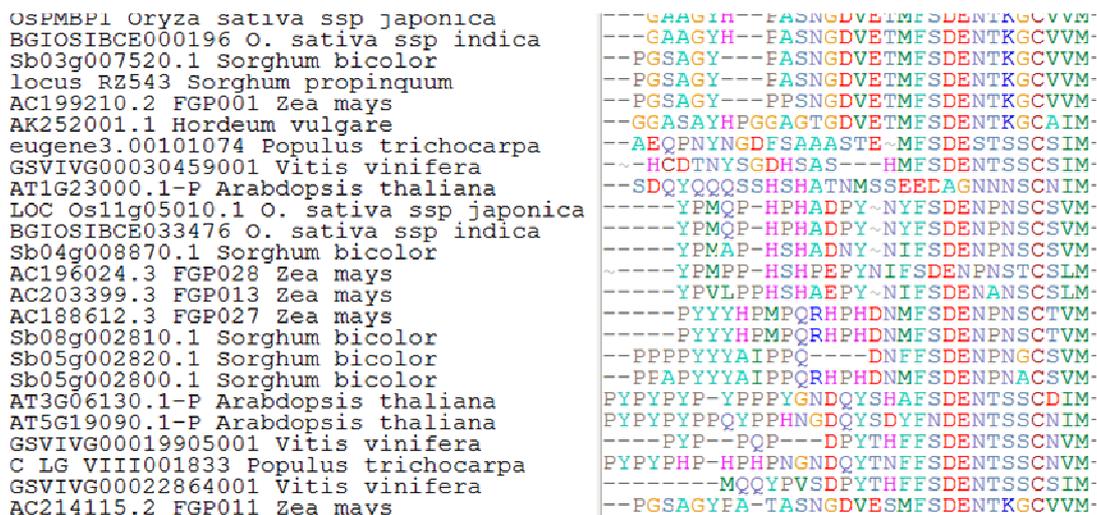


Figura 11 – Alinhamento de seqüências peptídicas realizado no programa ClustalX2. Regiões altamente conservadas no início (N-terminal) e no fim (C-terminal) das sequencias: domínio HMA e sítio de prenilação, respectivamente. Somente as seqüências menos divergentes estão representadas.

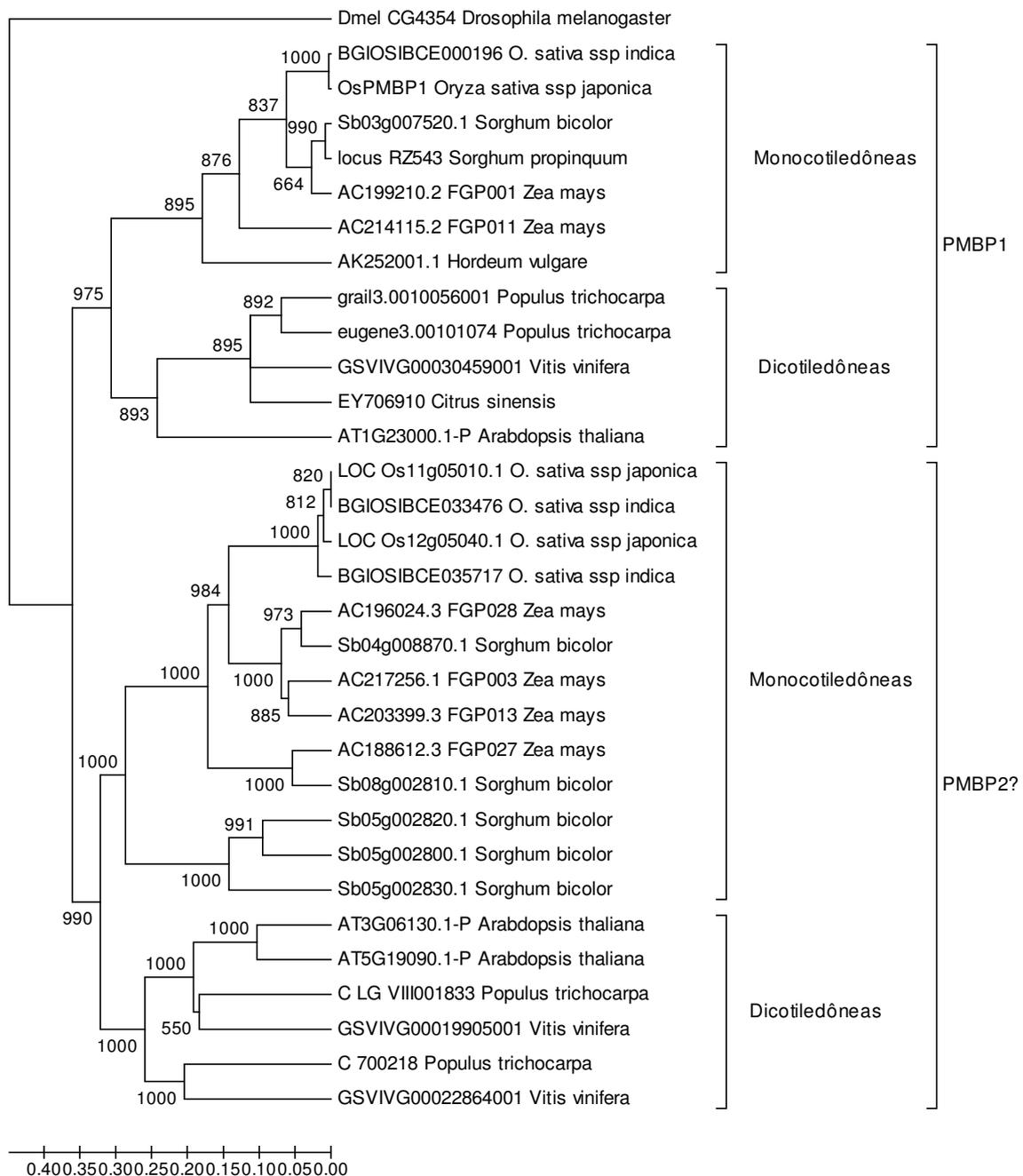


Figura 12- Árvore filogenética representando as relações evolutivas entre OsPMBP1 e outras sequencias contendo um domínio HMA e sitio de prenylação. Construída a partir do método de Neighbor Joining e testada com 1000 Bootstraps no programa ClustalX 2.0.10.

V. Análise do Padrão de Expressão do gene *OsPMBP1*

Expressão em raízes

Utilizando das amostras de cDNA de raízes e parte aérea das plântulas controle de 12 dias comparamos a expressão entre esses órgãos. As análises de qRT-PCR demonstraram que *OsPMBP1* é igualmente expresso em raízes e parte aérea nas condições testadas (Fig.13A). Esse resultado contradiz a previsão dos bancos de dados públicos que sugerem que esse gene não seria transcrito em raízes, pois nenhuma EST dele foi sequenciada em bibliotecas de cDNA de raiz de arroz, somente em amostras de calo, panícula, caule, folha e flor (Fig.13B).

O qRT-PCR é uma técnica mais sensível e precisa para a detecção e quantificação do que o sequenciamento de EST. O sequenciamento de EST disponível nos bancos de dados públicos não tem o objetivo de indicar níveis de expressão, mas somente identificar os genes expressos nos tecidos analisados e existem poucas ESTs correspondentes a *OsPMBP1*, mesmo nas bibliotecas onde ele é supostamente mais expresso. Esse dado indica que o gene é pouco expresso em condições normais e que para analisá-lo é necessário o uso de técnicas mais sensíveis, como o qRT-PCR.

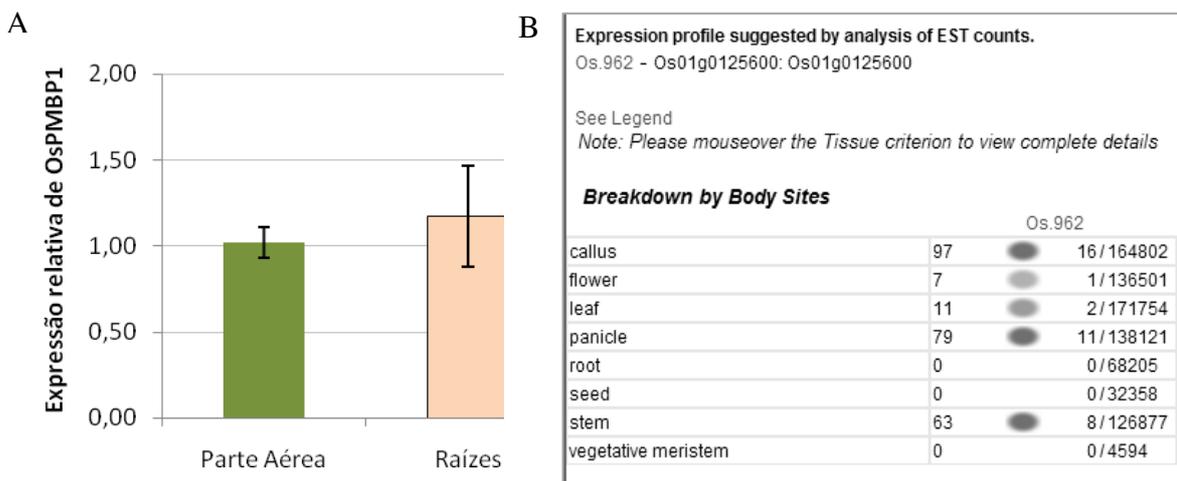


Figura 13 – Expressão de *OsPMBP1* em diferentes tecidos. A) Análise por qRT-PCR mostrando a expressão relativa de *OsPMBP1* em amostras de cDNA de raiz e parte aérea de plântulas. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *fdh* e *ef*. A normalização dos resultados foi feita em relação à expressão relativa do gene *OsPMBP1* em raiz. B) Perfil de expressão sugerido pela análise de contagem de ESTs pelo NCBI.

Expressão de *OsPMBP1* em resposta ao excesso de alumínio

As análises de qRT-PCR com cDNA de plântulas submetidas a 60 ppm de alumínio mostrou que o gene *OsPMBP1* responde ao estresse por esse metal de maneira diferente em amostras de parte aérea e de raiz. Na porção aérea da plantas ocorreu um aumento no nível de transcritos de *OsPMBP1* (Fig.14A), enquanto em raízes o acúmulo de transcritos foi reduzido em resposta ao tratamento com alumínio (Fig. 14B).

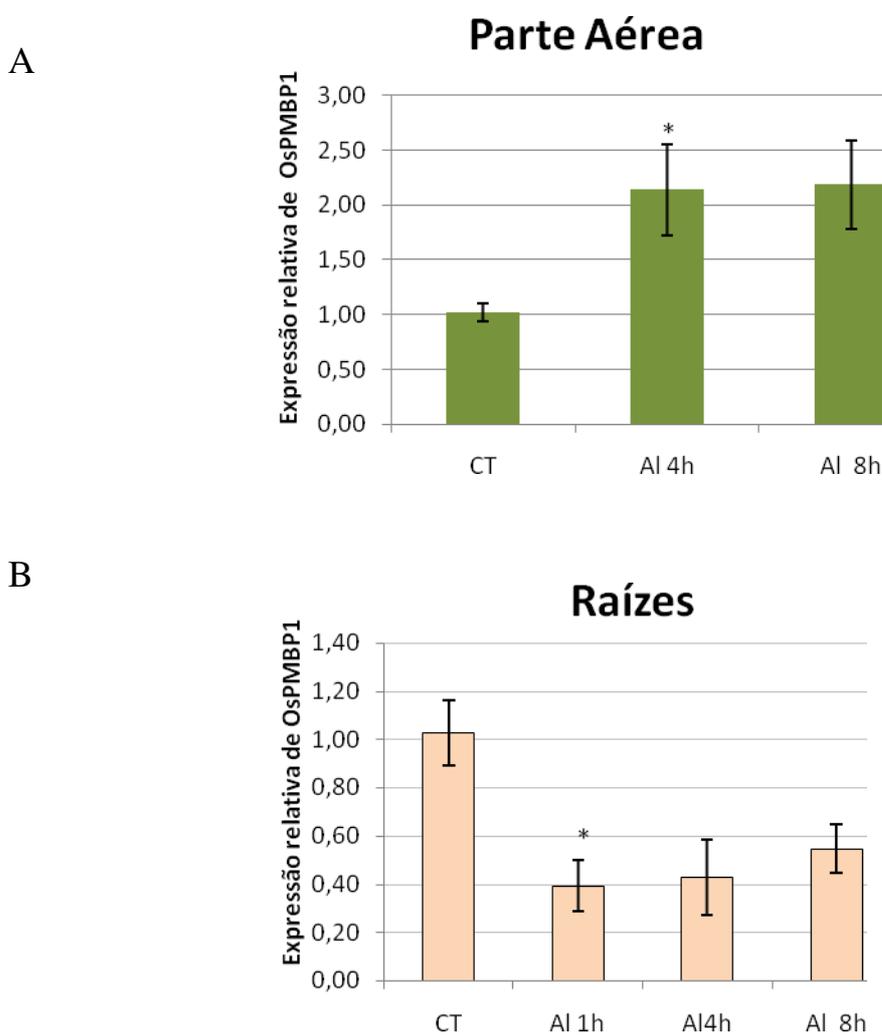


Figura 14 - Análise por qRT-PCR da expressão relativa de *OsPMBP1* em amostras de cDNA de plântulas submetidas a 1, 4 e 8h de tratamento com 60 ppm de alumínio. CT: controle, planta mantida em solução com concentração normal de alumínio. A) Análise das amostras de parte aérea. B) Análise das amostras de raízes. O nível de expressão de parte aérea foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *fdh* e *ef*, enquanto o de raízes foi normalizado em relação a *fdh*, *ef* e *18S*. A normalização dos resultados foi feita em relação à expressão relativa do gene *OsPMBP1* nas respectivas condições controle (CT). *: difere significativamente do controle ($P < 0,05$).

Expressão de *OsPMBP1* em resposta à Luz

Uma análise da região 5' não transcrita do gene utilizando o programa de identificação de promotores PlantCARE (Lescot et al., 2002), revelou na região reguladora de *OsPMBP1* a existência de diversos cis-elementos relacionados com a resposta à luz. Por esse motivo, analisamos a expressão do gene em um experimento no qual foi avaliada a expressão do gene após 12 horas de exposição à luz (coleta das 18h), e após duas e quatro horas de exposição pela manhã (coleta às 8h e 10h, respectivamente), usando como controles plantas mantidas no escuro.

As análises de qRT-PCR demonstraram que houve uma redução significativa, de cerca de 50%, no nível de transcritos de *OsPMBP1* nas amostras coletadas de manhã em relação às amostras coletadas ao final da tarde e às 10 horas é ainda menor. Entretanto não há diferença significativa entre as plantas expostas à luz e as mantidas no escuro (Fig. 15).

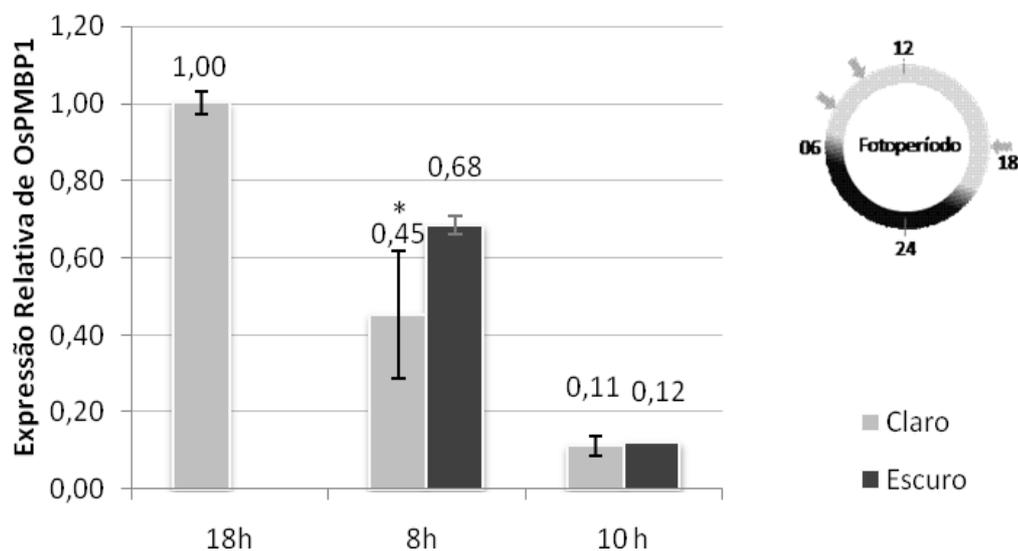


Figura 15. Análise por qRT-PCR da expressão relativa de *OsPMBP1* em resposta à luz. As amostras foram coletadas às 18:00, 8:00 e 10:00 de plantas mantidas (histogramas cinza) no claro e de plantas mantidas no escuro (histogramas pretos). O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *fdh* e *ef*. A normalização dos resultados foi feita em relação à expressão relativa do gene *OsPMBP1* às 18:00. *: difere significativamente do controle (18h), $P < 0,05$.

Discussão

Proteínas preniladas ligantes de metais

Em trabalho prévio (Abreu-Neto, 2006) foi obtida a linhagem de arroz denominada Ds72, a qual possui uma inserção de T-DNA na seqüência correspondente ao locus Os01g0125600 (GenBank NP_001041891.1, GeneID: 4326005) do genoma de arroz. A proteína deduzida a partir da seqüência de nucleotídeos desse locus possui como características principais a presença de um domínio de associação a metais pesados HMA e um sítio de prenilação. Esse gene foi então denominado *Prenylated Metal Binding Protein 1 (OsPMBP1)*.

Conhecida há três décadas, inicialmente observada em fungos e depois em animais e plantas, a prenilação de proteínas é um mecanismo altamente conservado nos três reinos (Rodríguez-Concepción *et al*, 1999). A prenilação é realizada pelas enzimas Farnesil transferase (FT), Geranilgeranil transferase I (GGT1) e Rab-geranilgeranil transferase (Rab-GGT ou GGT2) que, respectivamente, ligam covalentemente farnesil pirofosfato ou geranilgeranil pirofosfato à proteína alvo. FT e GGT1 são enzimas heterodímeras que possuem uma subunidade α em comum, e se diferenciam por suas subunidades β , que apresentam 25% de identidade de seqüências e uma estrutura terciária muito semelhante, composta principalmente por α -hélices. As subunidades β possuem os sítios de ligação a lipídeos, de ligação a um íon de Zn^{2+} , essencial para sua atividade catalítica, e são responsáveis pela especificidade da enzima através do reconhecimento do motivo C-terminal CaaX, onde “C” é cisteína, “a”, aminoácidos alifáticos, e “X” geralmente corresponde a metionina, cisteína, serina, alanina ou glutamina para FT e leucina ou fenilalanina para GGT1 (Lane & Beese, 2006).

Em levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e na mosca-da-fruta (*Drosophila melanogaster*) a perda de função da proteína FT resulta em severos defeitos de crescimento e a perda de GGT1 é letal. As proteínas preniladas conhecidas estão envolvidas no controle do ciclo celular, transdução de sinais, organização do citoesqueleto, transporte de vesículas e outros processos importantes para o crescimento e desenvolvimento de fungos e animais

(Crowell, 2000).

Surpreendentemente, o mesmo não é observado em plantas. Mutantes para a subunidade- β de FT (mutante *eral1*), a subunidade- β de GGT1 (*ggb*) e a subunidade α (*plp*) já foram identificados em *Arabidopsis thaliana* e apresentam fenótipos semelhantes ao de plantas selvagens, sendo viáveis e férteis (Johnson *et al.*, 2005). Estudos realizados nessas plantas demonstraram que apesar de não serem imprescindíveis, as prenilttransferases são de grande importância para processos de crescimento, desenvolvimento e sinalização, estando envolvidas inclusive na resposta a estresses bióticos e abióticos (Goritschnig *et al.*, 2008). Em especial, esses mutantes demonstraram ligação entre a prenilação e as rotas de sinalização hormonal do ácido abscísico (ABA), auxinas e citocininas (Johnson *et al.*, 2005; Galichet *et al.*, 2008). Além disso, em mutantes de *Catharanthus roseus* com GGT1 silenciada por RNAi, a relação entre essa enzima e a rota de sinalização do jasmonato foi demonstrada (Courdavault *et al.*, 2008).

Entre os alvos comprovados de prenilação em plantas estão: fatores de transcrição como APETALA1 e CAULIFLOWER de *Arabidopsis*; proteínas reguladoras do tráfico de vesícula e organização do citoesqueleto como LeRab1A de tomate e Rac13 de algodão; responsáveis por sinalização por Ca^{2+} como as calmodulinas CaM53 de petúnia e CaM61 de arroz; e proteínas de sinalização hormonal como Aux2-11, induzida por auxina, e AtIPT3, envolvida na biossíntese de citocinina (Crowell, 2000; Galichet *et al.*, 2008).

Dez anos atrás, Dykema e colaboradores (1999) caracterizaram a primeira família de proteínas vegetais capazes de serem preniladas e de se ligarem a íons metálicos. Denominadas de FP (*farnesylated protein*), essas proteínas foram identificadas em uma biblioteca de cDNAs que codificavam proteínas preniladas e possuíam motivos de ligação a metais I/L/MXCXXC semelhantes àqueles encontrados em proteínas responsáveis pela homeostase e transporte de íons metálicos como a chaperona de cobre ATX1 de levedura, nas quais um íon de Cu^{2+} se liga aos dois resíduos de cisteína.

Alguns membros dessa família que foram estudados em mais detalhe têm capacidade de se ligar, *in vitro*, a diferentes cátions divalentes: ATFP3 (*Arabidopsis thaliana farnesylated protein 3*) se liga preferencialmente a Cu^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} (Dykema *et al.*, 1999); a proteína induzível por cádmio 19, CdI19, se liga eficientemente a Cd^{2+} , Hg^{2+} e Cu^{2+} , e sua expressão é induzida no excesso desses metais e de Fe^{2+} (Suzuki *et al.*, 2002); e ATFP6 se liga a Pb^{2+} , Cd^{2+} e Cu^{2+} , e sua expressão é induzida por cádmio, mas não por

cobre (Gao *et al.*, 2009). Essas três proteínas encontram-se ancoradas à membrana plasmática e estão supostamente envolvidas na manutenção da homeostase de íons metálicos.

Plantas e outros eucariotos necessitam de sistemas altamente regulados para lidar com os íons metálicos, pois muitos deles são micronutrientes essenciais para o crescimento, como cobre, zinco, manganês, níquel e ferro, porém em excesso são tóxicos, enquanto outros como cádmio, alumínio e chumbo não são essenciais, mas se encontram no solo e são altamente tóxicos. Esses íons agem como co-fatores catalíticos essenciais das mais diversas rotas metabólicas, desde a percepção de etileno até a síntese de DNA (Puig *et al.*, 2007).

O cobre e outros íons metálicos possuem uma solubilidade limitada e alta reatividade, podendo gerar danos irreparáveis à célula se não forem controlados. Chaperonas de cobre ou metalochaperonas são proteínas solúveis que têm a função de mediar o transporte intracelular de Cu^{2+} para apoproteínas específicas que irão formar Cu-proteínas ativas. Como exemplo podemos citar a proteína ATX1 de *Arabidopsis* que como sua homóloga a proteína antioxidante 1, Atx1, de levedura, leva cobre Cu^{2+} até uma ATPase do tipo P (proteína transmembrana que, consumindo ATP, transporta íons contra o gradiente de concentração) localizada no sistema trans-Golgi para ser translocado e incorporado a uma Cu-proteína na rota secretora. Outros exemplos podem ser citados como a Cu chaperona para Cu/ZnSOD (Ccs1), necessária para a inserção do cobre no sítio ativo da Cu/ZnSOD (Cobre/Zinco Superóxido Dismutase) citosólica, e Cox17, envolvida no transporte de Cu^{2+} para a citocromo C oxidase (COX) mitocondrial (Puig *et al.*, 2007).

As proteínas farnesiladas podem agir de uma forma semelhante, CdI19 foi descrita como uma metalochaperona, preferencialmente expressa em tecidos vasculares. Sua função seria de proteger a célula contra a ação de íons metálicos, sequestrando-os no meio intracelular e provavelmente os encaminhando para uma rota de detoxificação por extrusão ou isolamento em vacúolos. Apesar de não se saber exatamente como esse mecanismo de detoxificação ocorre, a participação de CdI19 nele é clara, por gerar uma maior tolerância à cádmio em levedura e em plantas de *Arabidopsis* nas quais o gene foi superexpresso (Suzuki *et al.*, 2002).

Gao e colaboradores (2009) demonstraram a interação de AFTP6 com a proteína ACBP2 (Acyl-CoA-binding protein 2) num mecanismo de resposta ao estresse por metal

pesado. Ambas tem transcrição induzida por metais, são capazes de ligar Cd^{2+} , Cu^{2+} e Pb^{2+} , se localizam na membrana plasmática e a interação entre elas foi comprovada pelo sistema de duplo híbrido em levedura. O cádmio, metal que induz a transcrição de ATFP6, induz a depleção de glutatona e inibe a ação de enzimas antioxidantes, desta forma gerando a peroxidação de lipídios e o acúmulo de peróxido de hidrogênio. No modelo sugerido, ATFP6 está envolvida com ACBP2 no reparo desses fosfolípidos peroxidados, modelo embasado na capacidade de ACBP2 carrear acil-CoAs, substrato para o reparo da membrana, e na tolerância aumentada a peróxido de hidrogênio e cádmio em plantas superexpressando esse gene.

Proteínas farnesiladas com domínio de ligação a metais pesados podem ter outras funções além do transporte e detoxificação de metais pesados. Barth e colaboradores (2004) identificaram em cevada (*Hordeum vulgare*) o gene HvFP1, que possui um motivo de farnesilação, um domínio HMA e um sinal de localização nuclear. Com a transformação de células epidérmicas de cebola com vetores de expressão com fusões de HvFP1 e GFP, a localização subcelular dessa proteína foi demonstrada como sendo no núcleo, devido ao sinal de localização nuclear, e mais especificamente no nucléolo, devido a farnesilação. Como as laminas, que também são proteínas nucleares farnesiladas, HvFP1 pode estar envolvida na organização estrutural e de expressão do núcleo. A sua expressão é muito fracamente induzida por metais, mas responde de forma rápida e transiente a outros estresses abióticos como frio, excesso luminoso e seca. O nível de transcritos é elevado em folhas senescentes e aumentado em presença de ABA. Se HvFP1 associa-se a um metal como cobre, agindo de co-fator, e se essa ligação está envolvida na sua possível função regulatória no núcleo, são perguntas que os autores deixaram em aberto, necessitando de futuros experimentos para respondê-las.

Da mesma forma ainda não podemos esclarecer a função de *OsPMBP1*. A proteína codificada por este gene apresenta características semelhantes as proteínas farnesiladas da família de ATFP3, como os motivos de ligação a metais pesados e de prenilação. Alinhamento de sequências peptídicas e subsequente construção de árvores filogenéticas indicam que *OsPMBP1* ou pertence a uma subfamília dentro da família FP, ou pertence a uma família muito próxima (Fig. 12 e ANEXO 5). Nossas análises sugerem que membros dessa família se dividem em pelo menos dois grupos parálogos, *PMBP1* e *PMBP2*, estando presentes em espécies tanto de monocotiledôneas quanto dicotiledôneas (milho, cevada,

sorgo, videira, álamo e *Arabidopsis*), sendo que nenhum desses genes foi estudado ou classificado como proteína farnesilada até o momento (Fig. 11 e 12).

***OsPMBP1* responde diferencialmente a estresse por alumínio**

O alumínio é o metal mais abundante da crosta terrestre, porém uma grande porção desse elemento se encontra incorporado na forma de alumino-silicatos e óxidos, sendo que uma quantidade muito pequena se encontra em formas solúveis capazes de afetar sistemas biológicos. Porém quando o pH do solo baixa para menos de 5,0, o hexahidrato octaédrico $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, normalmente referido a Al^{3+} , se solubiliza na solução do solo. Essa é a forma tóxica mais comum de alumínio, sendo capaz de afetar o crescimento da planta (Kochian *et al.*, 2005; Zheng & Yang, 2005).

O primeiro sintoma de toxicidade por alumínio é a rápida redução no crescimento da raiz e na formação de raízes laterais. Este fenótipo é causado pela interrupção quase que imediata do crescimento e alongamento das células do ápice radicular afetadas de diversas maneiras por esse metal. O Al^{3+} inicialmente liga-se a sítios negativamente carregados na matriz de pectina da parede celular (apoplasto), ocupando o lugar de outros íons como Ca^{2+} , e assim alterando propriedades mecânicas e estruturais da parede celular, tornando-a mais rígida e dessa forma impedindo que a célula se alongue. Porém esse é o primeiro efeito do alumínio na célula vegetal, devido a sua carga ele se liga a membrana plasmática negativamente carregada, gerando uma despolarização catastrófica, em especial interrompendo o gradiente de H^+ e fluxos de outros íons pela membrana, o que afeta toda a rede de transdução de sinais por Ca^{2+} da célula. O alumínio também gera espécies reativas de oxigênio (EROs) levando a peroxidação de lipídeos, e em exposições prolongadas afeta o núcleo alterando a estrutura da cromatina (Kochian *et al.*, 2005).

A partir da análise de duplo haplóides gerados do cruzamento de plantas de arroz pertencentes a um ecotipo tolerante a alumínio (CT9993, da subespécie japônica) com as de um ecotipo suscetível (IR62266, da subespécie indiana), Nguyen e colaboradores (2002) identificaram vinte QTLs (*Quantitative trait loci*) envolvidos no crescimento de raízes sob estresse por alumínio. Um desses, qALRR-1-2, teve sua posição mapeada ao locus de *OsPMBP1*.

A esse QTL, os autores creditaram cerca de 18% da variação do fenótipo de comprimento relativo de raiz atribuído ao ecotipo tolerante em relação ao suscetível, sendo o quarto QTL mais expressivo identificado para essa característica, com um efeito aditivo de 10,63. Porém, esse QTL não foi identificado em nenhum outro trabalho, de forma que os autores concluíram que esse seria exclusivo do ecotipo testado (Nguyen et al, 2002).

Recentemente outra proteína da família FP foi descrita como relacionada à resposta a alumínio. Em pontas de raízes leguminosa *Medicago trunculata*, Chandran e colaboradores (2008) identificaram uma proteína isoprenilada ligante de metal (*Metal-binding isoprenylated protein*) com transcrição aumentada cerca de nove vezes em resposta a excesso de alumínio. Ao alinhar a sequência dessa proteína (TC102873) com a de outras proteínas preniladas ligantes de metal conseguimos agrupá-la com ATFP7 demonstrando que ela deve pertencer a um dos ramos da família das proteínas farnesiladas (ANEXO 5).

Os mecanismos mais estudados de defesa da planta contra o Al^{3+} envolvem a liberação de ácidos orgânicos (malato, citrato e oxalato) para formar complexos não tóxicos com o alumínio. Existem plantas que os secretam na rizosfera para quelar o Al antes do metal entrar na raiz, enquanto outras utilizam mecanismos mediados por ácido orgânicos para detoxificar o Al^{3+} internamente.

Na bibliografia analisada, não encontramos trabalhos que demonstrem a ligação do domínio HMA com Al^{3+} , somente com íons divalentes de metais pesados (Cu, Cd, Zn, Co, Pb e Hg) de forma que a associação entre o alumínio e proteínas isopreniladas pode não se dar por uma interação direta.

A resposta na expressão de genes como *OsPMBPI* e a nova FP de *M. trunculata* em situações de excesso de alumínio provavelmente se deve, não ao Al^{3+} em si, mas a uma reação aos danos provocados pelo íon, que são muito semelhantes aos resultantes de estresse por metais dicatiônicos como o Cd^{2+} que, assim como o alumínio, induz a formação de ROS e peroxidação de lipídeos.

Diferente dos outros genes que tiveram sua expressão induzida em raízes pelo excesso de metal, *OsPMBPI* teve sua expressão reprimida. Este fato pode indicar que essa proteína não esteja ligada diretamente a uma rota de detoxificação, mas que pertença a um mecanismo de transporte de metais, onde a redução no acúmulo de seus transcritos ocorra para regular os níveis intracelulares do metal quando a planta está submetida a uma

condição de excesso do metal. Pelo resultado do qRT-PCR, foi observada uma resposta rápida e significativa ao alumínio, sendo com uma hora de estresse a expressão é mais reprimida do que às quatro e oito horas de tratamento, tempos nos quais ocorreu uma leve tendência para normalizar a expressão (Fig. 14B).

Já na porção aérea das plântulas, a resposta observada foi contrária ao observado nas raízes, em vez de reduzir pela metade o conteúdo relativo de transcritos duplicou, mantendo-se nesse nível de expressão tanto em quatro quanto em oito horas de tratamento (Fig. 14A). Essa divergência indica que a proteína é regulada de maneira diferente nesses órgãos, podendo desempenhar uma função na raiz que seja diferente da desempenhada em caule e folhas.

Nossa hipótese seria que OsPMBP1 atue no transporte de íons metálicos. Nas células das raízes que se encontram em grave estresse por excesso de metal, a expressão desse gene, assim como de outros fatores que tragam mais metais para dentro da planta, é reprimida.

Considerando essa hipótese para a repressão na raiz, propomos dois modelos de possíveis funções que podem explicar a indução da expressão nos tecidos aéreos:

1. OsPMBP1 pode participar em um mecanismo de detoxificação, ligando-se a íons metálicos, evitando que estes causem dano no meio intercelular e em interação com outras proteínas de rota de detoxificação levar os íons, por exemplo, para vacúolos nos quais fiquem armazenados, longe de compartimentos celulares onde possam gerar dano.

2. A proteína pode ter uma função de metalochaperona, mediando o transporte de íons metálicos para a formação (ou maturação) de proteínas que usem o íon como co-fator e tenham papel importante na resposta ao estresse. Um exemplo já citado é o da Cu-chaperona Ccs que leva Cu^{2+} à Cu/Zn-Superóxido dismutase, enzima que utilizando o potencial redox do seu co-fator metálico converte superóxido em H_2O_2 , uma das proteínas antioxidantes mais importantes existentes em eucariotos (Puig *et al.*, 2007).

A expressão de *OsPMBP1* indica regulação pelo ritmo circadiano

O experimento de resposta a luz mostrou que a expressão do gene *OsPMBP1* não é alterada pela presença/ausência de luz. Porém nesse experimento foi verificada uma redução no acúmulo de transcritos do final da tarde ao início da manhã do dia seguinte, tendência mantida pela coleta das 10 horas da manhã (Fig. 15). Tal variação é indicativa de que a expressão desse gene possa ser regulada pelo relógio circadiano.

O relógio circadiano é um regulador intrincado e delicado da fisiologia dos mais diversos organismos e que existe devido a um processo fundamental do planeta, a rotação da terra que produz ciclos de 24 horas, divididos em dias e noites. Normalmente, grandes alterações ambientais estão relacionadas ao ciclo diário claro/escuro, além da luminosidade, existem variações na temperatura e umidade. Fatores essenciais para a fisiologia das plantas, em especial, devido à necessidade da luz ao processo fotossíntese e ao mesmo tempo de processos que evitem a dessecação durante o dia (por exemplo, o fechamento dos estômatos). Este relógio interno permite que o organismo se antecipe a estas mudanças previsíveis (Harmer, 2009).

Couvington e colaboradores (2008) demonstraram que cerca de um terço dos transcritos de *A. thaliana* possuem regulação pelo ciclo circadiano. Entre os genes identificados estão genes de regulação e resposta a hormônios, além de genes de diversas rotas de resposta a estresses abióticos. Os autores observaram regulação circadiana em genes induzidos por calor (30 de 57 genes avaliados), frio (41/111), seca (36/70) e sal (62/124). Tal regulação protege a planta das variações ambientais diárias. Genes com expressão induzida pelo calor apresentam um pico de transcrição um pouco antes do amanhecer, já genes de resposta ao frio são mais expressos no início da noite. E a expressão de genes envolvidos na resposta a espécies reativas de oxigênio (ROS) apresentou seu pico ao meio-dia, horário de maior incidência solar e atividade fotossintética na planta.

Apesar da necessidade de avaliar a expressão de *OsPMBP1* em outros horários ao longo do dia para afirmar com maior confiabilidade, o padrão de expressão observado nos três horários de coleta indica que o gene pertence ao grupo de genes de expressão tardia, com pico de expressão ao final da tarde e anoitecer e queda da expressão ao meio-dia. A partir dessa informação, elaboramos um modelo de como seria a expressão de

OsPMBP1 ao longo do dia, nos baseando no padrão de expressão de genes regulados pelo promotor *evening element* (EE), apresentado por Couvington e colaboradores (2008) como um dos principais cis-elementos responsáveis pela expressão de genes ao entardecer e início da noite (Fig. 16).

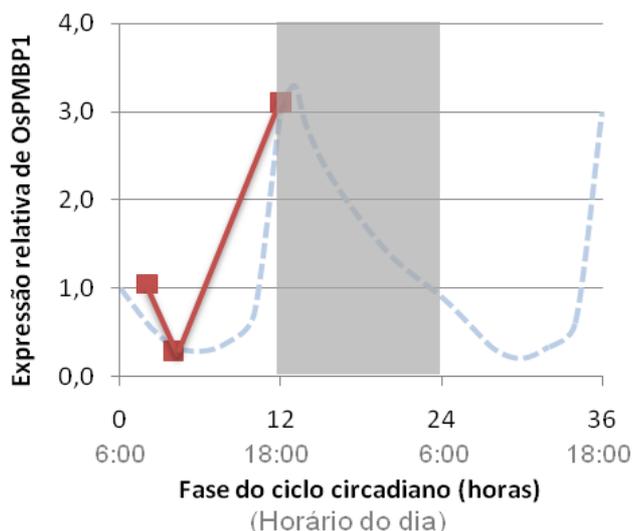


Figura 16. Ciclo circadiano hipotético baseado na expressão de *OsPMBP1* às 2, 4 e 12 horas de exposição a luz (início do ciclo) (linha contínua em vermelho). Tracejado em azul, o modelo elaborado com base na expressão de genes regulados pelo cis-elemento EE (Couvington et al., 2008). Expressão relativa de *OsPMBP1* (eixo vertical) ao longo do tempo (eixo horizontal), determinado tanto em horas do ciclo (em preto) quanto no horário oficial (abaixo, em letras cinzas). Fundo claro representa dia, enquanto o escuro representa o período da noite.

Os genes induzidos nessa faixa de horário possuem, em sua maioria, promotores com o motivo GATA (*anti-senso*, TATC) como elemento principal, como o *Evening Element* (EE, que possui a sequência principal AATATCT), *GATA-Box* (CTTATCC ou GGATAA) e CBS (*Circadian-Clock-associated-1 binding site*, AAAATCT) (Michael et al, 2008; Couvington et al., 2008). Apesar de não identificarmos uma sequência canônica de cis-elemento já descrito, localizamos, na região de 1 Kb antes do início do gene, três sequências que correspondem ao motivo (T/A)GATA(G/A), alvo dos membros da família de fatores de transcrição GATA (Manfield et al., 2007). Esses motivos encontram-se nas posições -199, -688 e -710 a partir do início da tradução (ATG), o padrão de expressão observado indica que provavelmente esta região promotora seja responsável pela transcrição ritmada do gene *OsPMBP1* (Fig.17).

```

AAGAGAGAATAAGTTTGCATTAAAAAGAAGAGCTAAGTGGCTTATTAAGCAGATCTGACCAATTAGATTTCTAAAAA
CCCAGCAAGCAAGTAAATAAATGCCACTCCAAGAATCATAGTTGTAACCATCTTCTTATGAACCTACATGCTCCT
TTAAACACATGAATTTTATAAAAAATAATAATATATAAATTAATTAATAATTTCCATAAAAAATTACACGAAACTT
CTGCTTTCCAAGTAGGTTTAAAAATCCAGCTAGTCAGCACCTTCTAAGTTATACTCCAAGAACTGATAAGTAATGA
CAGGGAAACTGATAAAATCCTCTCTCATAGATACTACTTCTCCATTCTAGAATATAACAATTTAGTACTGGATGAG
ACATATTATAGTACTACGAATTTAGACATGCATATGTCCAAATACATAATATATTATACGTCTAATCCGATTATAG
ATTGTTATATTCTCGGAGGGAGGGAGTAGTAATATTTTTTAGTACTGCCAAGTCCAAACTTCAAAGCTCCCAACAGG
CCTTCCCAGTCTCTTTAGACAATGTTCTGGAGAGACTACAAAAGTGATGTTTTACCCACACTATTCTAACCGAGAG
AGAGAAGAGAGAGGGTCTCTGTATGTAACCATGCAAAAAAAAAAATACTACACCGATGGAGGTGGTGGGGTCA
GGAAGAGAAGACCCCTACCCATGTGGGAGGGTCAGTGAGATTATAGAAGAGAGGAGGTAGAATTGTAGTAGTAGAAA
AGAGGAGGAGCTAGTAGTAGTAGAAGAAGAAGAGAGAGAGATAGAAAGAACCCTTTCTTAAATGCAGGGAAGTAGTGG
CTTCACTTGCAACGGTACAAGAACCACCATCACTTCCCTACCACTCCACTACTAGCCACTGGCCATTGCTCCTCTCC
TCCCCTCTTCTCCATCTCCTCTCCTCTTCTCTCATTCTCTTCCCTGCAACTGCAACAGTCTCTGCAGA
ATGACCAAAGATGAGGATTTCAAGCTGGTCAAGATCCA-OsPMBP1

```

Figura 17. Região promotora do gene *OsPMBP1* (1Kb antes do início de transcrição), com os motivos GATA destacados em negrito e a região transcrita do gene em amarelo.

A Linhagem Ds72

A redução no número de transcritos de *OsPMBP1* na linhagem mutante não foi estatisticamente significativa nas condições testadas ($P < 0,05$). Porém para atestar que a inserção de T-DNA não alterou a expressão do gene serão necessários novos experimentos, utilizando amostras de tecidos diferentes (como raiz, folha adulta, caule e panícula) e submetidas a condições diferentes, principalmente de estresses por metal.

Outro fator a ser considerado é que a presença de mRNA não necessariamente comprova a expressão do gene. O par de *primers* utilizado nas reações de qRT-PCR se anelam na porção inicial do gene, podendo estar amplificando transcritos que na realidade se encontrem truncados ou alterados pela presença de elementos do T-DNA. Além disso, ainda que os transcritos estejam presentes, a funcionalidade dos mesmos poderia estar comprometida pela inserção, o que resultaria na não tradução do mesmo. Portanto, análises posteriores para verificar a presença da proteína expressa serão necessárias para confirmar a expressão de *OsPMBP1* na linhagem transgênica.

A ligação do fenótipo de estatura reduzida nas plantas dessa linhagem com a inserção de T-DNA não foi comprovada. Apesar das plantas Ds72 terem em média uma estatura menor que as plantas NT (Fig.5), verificamos uma grande variação entre as plantas dos dois grupos, existindo plantas Ds72 com estatura semelhante à de plantas NT (Fig. 6).

Além disso, plantas da linhagem que são heterozigotas para a inserção e, inclusive, uma que não possui a inserção também apresentam estatura menor que as plantas NT (Fig.8). A redução no crescimento dessas plantas provavelmente está associada a outro fator, como, por exemplo, uma mutação ocasionada pela cultura de tecidos em um locus diferente, que segregou da inserção de T-DNA na prole. Mutações desse tipo são umavariável essa a qual todo projeto de criação de mutantes, por essa técnica, está sujeito.

Plantas são organismos “robustos” em que mesmo a falta de um gene importante pode não resultar em um fenótipo aparente em condições normais. Em muitos casos, como o das preniltransferases, efeitos da falta do gene só se tornaram perceptíveis as plantas foram submetidas a estresses. Dessa forma avaliações do crescimento de plantas dessa linhagem em condições adversas, como, por exemplo, carência e/ou excesso de cobre, são necessárias para a completa caracterização dessas plantas

Para isolar características derivadas da carência de *OsPMBPI* nessa linhagem pretendemos utilizar de outras plantas que possuam a expressão desse gene alterada. Como informado na introdução, nas coleções de mutantes com FST conhecida, não há nenhuma outra linhagem de arroz identificada que possua inserção de T-DNA ou transposon nesse locus.

Para realizar essa comparação, pretendemos utilizar linhagens geradas pela mobilização do elemento Ds, buscando linhagens com inserções do transposon que afetem mais a expressão desse gene. Para isso pretendemos realizar novos experimentos de transformação além de manter e analisar linhagens obtidas a partir deste trabalho. Outra abordagem proposta para trabalhos futuros é o silenciamento de *OsPMBPI* por RNAi.

Em paralelo, utilizaremos como controle os descendentes da planta Ds72A-I-D, que não possui a inserção de T-DNA, mas apresentou estatura relativamente reduzida em relação a plantas NT. Comparando essas plantas com as que possuem a inserção de T-DNA, será possível isolar características que mais provavelmente se encontrem ligadas a inserção no locus de *OsPMBPI*.

Conclusão e Perspectivas

Identificamos, em arroz, a proteína prenilada ligante de metal, *OsPMBP1*, que pertence a um grupo de proteínas vegetais recentemente descoberto. Caracterizada há 10 anos a família das proteínas farnesiladas (FP) possui como características principais a presença de um domínio de associação a metais pesados e um sítio de prenilação em sua extremidade carboxil. Muito pouco se sabe sobre essas proteínas, sendo a elas atribuídas funções relacionadas com o metabolismo, transporte e detoxicação de metais pesados.

Nesta década em que passaram a ser conhecidas, poucas FPs foram alvo de trabalhos publicados: *CdI19* foi descrita como uma metalochaperona que ancorada na membrana plasmática, principalmente de tecidos vasculares, impede que íons tóxicos como Cd^{2+} causem dano no meio intracelular (Suzuki *et al.*, 2002); e *ATPF6* interage com a proteína ligante de acil-CoA *ACP2* em um provável mecanismo de reparo de lipídios peroxidados pela ação de íons metálicos, em que parece ter papel na detoxicação de metais como o cádmio, ancorada a membrana (Gao *et al.*, 2009). Outro membro dessa família, *HVFP1*, apresenta uma ação completamente diferente, a proteína se localiza no núcleo da célula e responde fracamente a metais pesados, sua expressão é induzida por outros estresses abióticos, como frio e seca, e ele ainda se mostra altamente expresso em folhas senescentes (Barth *et al.*, 2004).

OsPMBP1 assim como outros membros desse grupo teve sua transcrição afetada em resposta a íons metálicos, em excesso de Al^{3+} , que provoca danos semelhantes a outros cátions divalentes como Cd^{2+} . Curiosamente, a expressão do gene foi reprimida em raízes e induzida em folhas e caule. Essa reação se mostra oposta a de *CdI19*, *ATPF6* e *HVFP1*, que foram induzidas em toda a planta, com uma resposta maior nas raízes. Tal variação pode ser resultado de mecanismo de regulação expressos diferencialmente em raízes e parte aérea, e que afetam a expressão de *OsPMBP1*. Esse resultado indica que esse gene pode desempenhar uma função diferente das demais FPs descritas.

Também observamos indícios de que esse gene é regulado pelo ciclo circadiano, com expressão tardia, alcançando o pico de transcrição ao final da tarde. A regulação pelo relógio circadiano foi verificada em muitos genes de resposta a estresse, como *OsPMBP1*, tendo a função de preparar o organismo para estresses futuros.

Este trabalho iniciou-se por uma linhagem mutante (Ds72) que apresenta uma inserção de T-DNA nesse gene e um fenótipo de estatura reduzida. Porém análises iniciais não comprovaram de maneira inequívoca uma alteração na expressão do gene na linhagem mutante nem uma ligação entre a inserção de T-DNA e o fenótipo.

Muito ainda nos falta para que possamos entender a função e o funcionamento dessa proteína na planta, experimentos adicionais para avaliar a expressão em condições de excesso e carência de metais serão realizados para comprovar se o gene realmente está ligado à resposta a estresses abióticos, agindo no transporte e/ou detoxificação de metais pesados.

A expressão do gene será avaliada em diferentes tecidos da plantas NT e Ds72, em especial nas panículas, que segundo o perfil de expressão apresentado pelo NCBI é o tecido onde o gene é mais transcrito em condições naturais (Fig.13B). Da mesma forma, as plantas mutantes serão submetidas a estresse por excesso/carência de metal pesado sendo analisadas em busca de variações fenotípicas resultantes da deficiência dessa proteína.

Referências Bibliográficas:

ABREU NETO, J.B. de (2006). **Criação de Mutantes por Inserção de Transposon em Arroz como Ferramenta de Genômica Funcional em Cereais**. 32 f. Monografia apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul

ARNOLD K., BORDOLI L., KOPP J., & SCHWEDE T.(2006) The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, 22:195-201. (<http://swissmodel.expasy.org/>)

BAIER, A. C.; SOMERS, D.J. & GUSIAFSON, J.P.(1995) Aluminium tolerance in wheat: correlating hydroponic evaluations with field and soil performances. **Plant Breeding**, 114 (4):291–296.

BARTH, O.; ZSCHIESCHE, S.S.; & HUMBECK, K. (2004) Isolation of a novel barley cDNA encoding a nuclear protein involved in stress response and leaf senescence. **Physiol. Plant**. 121:282-293

CAMPBELL, M. A.; ZHU, W.; JIANG, N.; LIN3, H.; OUYANG, S.; CHILDS, K.L.;HAAS, B. J.; HAMILTON,J. P. & BUELL, C.R.(2007) Identification and Characterization of Lineage-Specific Genes within the Poaceae. **Plant Physiol**. 145:1311–1322

CHANDRAN, D.; SHAROPOVA, N.; IVASHUTA, S.; GANTT, J.S.; VANDENBOSCH, K.A. & SAMAE, D. (2008) Transcriptome profiling identified novel genes associated with aluminium toxicity, resistance and tolerance in *Medicago trunculata*. **Planta** 288;151-166

CHIN, H.G.; CHOE1, M. S.; LEE1, S-H, PARK, S.H.; PARK, S.Y.; KOO; J.C. KIM, N.Y; LEE, J.J.; OH, B. G.; YI,G.H, *et al.* (1999) Molecular analysis of rice plants harboring an *Ac/Ds* transposable element-mediated gene trapping system. **Plant J**. 19:.615-623,

COURDAVAULT, V.; BURLAT, V.; ST-PIERRE, B.; GIGLIOLI-GUIVARC'H, N. (2009) Proteins prenylated by type I protein geranylgeranyltransferase act positively on the jasmonate signalling pathway triggering the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. **Plant Cell Rep** 28:83–93

COVINGTON, M.F; MALOOF, J.N.; STRAUME, M.; KAY, S.A. & HARMER,S.L. (2008) Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant

growth and development **Genome Biol**, 9(8)R130.

CROWELL, D.N (2000) Functional implications of protein isoprenylation in plants. **Prog Lipid Res.** 39:393-408

DYKEMA, P.E., SIPES, P.R., BRENDA, A.M., BIERMANN, J., CROWELL, D.N. & RANDALL, S.K. (1999) A new class of proteins capable of binding transition metals. **Plant Mol Biol.** 41, 139–150.

EAMENS, A.L.; BLANCHARD, C.L.; DENNIS, E.S. & UPADHYAYA, N.M.(2004) A bidirectional gene trap construct for T-DNA and Ds mediated insertional mutagenesis in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Biotechnol J**, 2:367–380

EDGERTON, M. (2009) Increasing crop productivity to meet global needs for feed, food, and fuel. **Plant Physiol.**, 149:7-13

GALICHET, A. & GRUISSEM, W. (2003) Protein farnesylation in plants – conserved mechanisms but different targets. **Curr Opin Plant Biol**, 6:530-535

GALICHET, A.; HOYEROVÁ, K.; KAMÍNEK, M. & GRUISSEM, W. (2008) Farnesylation Directs AtIPT3 Subcellular Localization and Modulates Cytokinin Biosynthesis in Arabidopsis. **Plant Physiol.** 146:1155–1164,

GAO, W.; XIAO, S.; LI, H-I., TSAO, S-W. & CHYE, M-L. (2009) Arabidopsis thaliana acyl-CoA-binding protein ACBP2 interacts with heavy-metal-binding farnesylated protein AtFP6. **New Phytol.**, 181:89–102

GORITSCHNIG, S. WEIHMANN, T.; ZHANG, Y.; FOBERT,P.; MCCOURT, P. & LI, X. (2008) A Novel Role for Protein Farnesylation in Plant Innate Immunity. **Plant Physiol.**, 148:348-357.

GUEX, N. & PEITSCH, M.C.(1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis** 18,2714-2723

GUIDERDONI, E; AN,G. YU,S-M; HSING, Y & WU, C (2007) T-DNA Insertion Mutants as a Resource for Rice Functional. In NM Upadhyaya. ed, **Rice Functional Genomics -Challenges, Progress and Prospects**. Springer, New York, pp 223–271

HALL, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95.98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series** N.41. p. 95-98.

HARMER, S.L. (2009) The Circadian System in Higher Plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 60:357-77

HIEI, Y.; OHTA, S.; KONARI, T. & KUMASHIRO, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **Plant J** 6:271-282

HIROCHIKA, H. (2001) Contribution of the Tos17 retrotransposon to rice functional genomics. **Curr Opin Plant Biol**, 4:118–122

HIROCHIKA, H.; GUIDERDONI, E.; AN, G.; HSING, Y.-I.; EUN, M. Y.; HAN, C. D.; UPADHYAYA, N.; RAMACHANDRAN, S.; ZHANG, Q.; PEREIRA, A. *et al.* (2004) Rice mutant resources for gene discovery. **Plant Mol Biol** 54:325–334

IRGSP- THE INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT (2005) The map-based sequence of the rice genome. **Nature** 436:793–800

ITOH, T.; TANAKA, T.; BARRERO, R.A.; YAMASAKI, C.; FUJII, Y.; HILTON, P.B.; ANTONIO, B.A.; AONO, H.; APWEILER, R.; BRUSKIEWICH, R.; BUREAU, T. *et al.* (2007), Curated genome annotation of *Oryza sativa* ssp. *japonica* and comparative genome analysis with *Arabidopsis thaliana*. **Genome Res**, 17:175-83

IZAWA, T.; MIYAZAKI, C.; YAMAMOTO, M.; TERADA, R.; IIDA, S. & SHIMAMOTO, K. (1991) Introduction and transposition of the maize transposable element Ac in rice (*Oryza sativa* L.). **Mol Gen Genet.** 227:391–396

IZAWA, T.; OHNISHI, T.; NAKANO, T.; ISHIDA, N.; ENOKI, H.; HASHIMOTO, H.; ITOH, K.; TERADA, R.; WU, C.; MIYAZAKI, C. *et al.* (1997) Transposon tagging in rice. **Plant Mol Biol.** 35:219-229,

JEFFERSON, R.A.; KAVANAGH, T.A. & BEVAN, M.W. (1997) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO J.** 6:3901–3907

JOHNSON, C.D.; CHARY, N.; CHERNOFF, E. A.; ZENG, Q.; RUNNING, M.P. & CROWELL, D. N. (2005) Protein Geranylgeranyltransferase I is Involved in Specific Aspects of Abscisic Acid and Auxin Signaling in *Arabidopsis Arabidopsis* . **Plant Physiol.** 139:722-733

JUNG, K.-H.; AN, G. & RONALD, P.C. (2008). Towards a better bowl of rice: assigning function to tens of thousands of rice genes. **Nat. Rev. Genetics** 9:91-101

KIM, C.M.; PIAO, H. L.; PARK, S. J.; CHON, N.S.; JE, B.I.; SUN, B.; PARK, S.H.; PARK, J.Y., LEE, E.J.; KIM, M.J., *et al.* (2004) Rapid, large-scale generation of Ds transposant lines and analysis of the Ds insertion sites in rice. **Plant J** 39:252-263

KOCHIAN, L.V.; PIÑEROS, M.A. & HOEKENGA, O.A. (2005) – The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminium resistance and toxicity. **Plant and Soil** 274:175-195

KOLESNIK, T. SZEVERENYI, I.; BACHMANN, D.; KUMAR, C.S.; JIANG, S.; RAMAMOORTHY, R.; CAI, M.; MA, Z.G.; SUNDARESAN, V. & RAMACHANDRAN, S. (2004) Establishing an efficient Ac/Ds tagging system in rice: large-scale analysis of Ds flanking sequences. **Plant J** 37:301–314

KRISHNAN, A.; GUIDERDONI, E.; AN, G.; HSING, Y.C.; HAN, C.D.; LEE, M.C.; YU, S.M.; UPADHYAYA, N.; RAMACHANDRAN, S.; ZHANG, Q., *et al.* (2009) Mutant resources in rice for functional genomics of the grasses. **Plant Physiol.** 149: 165-170.

LANE, K. & BEESE, L. (2006) Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I. **J Lipid Res**, 47:681-699

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., *et al.* (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, 23:2947-2948

LAZO, G.R.; STEIN, P.A. & LUDWIG, R.A.(1991) A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. **Biotechnology (N Y)** 9: 963-967.

LESCOT, M.; DÉHAIS, P.; THIJS, G.; MARCHAL, K.; MOREAU, Y.; VAN DE PEER, Y.; ROUZÉ, P.; ROMBAUTS, S. (2002) PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences **Nucleic Acids Res.** 30(1):325-327.

LEWIS, J.C.; FELTUS, A.; ENSOR, C.M.; RAMANATHAN, S. & DAUNERT, S. (1998) Application of Reporter Genes. **Anal Chem.** 70:579-585.

LI, L.; QU, R.; KOCHKO, A. de; FAUQUET, C.M.; BEACHY, R.N.(1993) An improved rice transformation system using the biolistic method. **Plant Cell Rep** 12:250–255

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D.(2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, 25: 402-408.

MANFIELD, I.W.; DEVLIN, P.F.; JEN, C-H.; WESTHEAD, D.R. & GILMARTIN, P.M. (2007). Conservation, Convergence, and Divergence of Light-Responsive, Circadian-

Regulated, and Tissue-Specific Expression Patterns during Evolution of the Arabidopsis GATA Gene Family. **Plant Physiol.**, 143:941–958

MAURER-STROH, S. & EISENHABER, F. (2005) Refinement and prediction of protein prenylation motifs. **Genome Biol.** 6:R55 doi:10.1186/gb-2005-6-6-r55, (<http://mendel.imp.ac.at/sat/PrePS/index.html>)

MICHAEL, T.P.;MOCKLER, T.C.; BRETON, G.; MCENTEE,C.; BYER, A.; TROUT, J.D.; HAZEN, S.P.; SHEN, R.; PRIEST, H.D.; SULLIVAN, C.M. *et al.* (2008) Network Discovery Pipeline Elucidates Conserved Time-Of-Day–Specific cis-Regulatory Modules. **PLoS Genetics** 4(2): e14.

MILLER, J.H. (1972) **Experiments in Molecular Genetics.** Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York , EUA

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol Plant** 15:473-497

NGUYEN, V.T.; NGUYEN,B.D.; SARKARUNG, S.; MARTINEZ, C.; PATERSON, A.H., & NGUYEN, H.T. (2002) Mapping of genes controlling aluminum tolerance in rice: Comparison of different genetic backgrounds., **MGG**, 267:772-780

PATERSON, A.H.; FREELING, M. & SASAKI, T. (2005) Grains of knowledge: Genomics of model cereals. **Genome Res.** v. 15, p. 1643–1650

PATERSON, A.H., BOWERS, J.E., FELTUS, F.A., TANG, H. LIN, L. & WANG X. (2009) Comparative Genomics of Grasses Promises a Bountiful Harvest. **Plant Physiol.** 149:125-131.

PUIG, S.; ANDRÉS-COLÁS, N.; GARCÍA-MOLINA, A. & PEÑARRUBIA. L. (2007) Copper and iron homeostasis in Arabidopsis: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. **Plant Cell Environ.** 30:271–290

RICE ANNOTATION PROJECT (2008). The Rice Annotation Project Database (RAP-DB): 2008 update, **Nucleic Acids Res** 36(Database issue):D1028-33.

RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; YALOVSKY, S. & GRUISSEM, W. (1999) Protein prenylation in plants: old friends and new targets. **Plant Mol. Biol.**, 39:865-870

ROST, B., YACHDAV, G. & LIU, J. (2004) The PredictProtein Server. **Nucleic Acids Res** 32(Web Server issue):W321-W326. (<http://www.predictprotein.org/>)

- SUZUKI, N.; YAMAGUCHI, Y.; KOIZUME, N., & SANO, H. (2002) Functional characterization of the heavy metal binding protein CdII9 from *Arabidopsis*. **Plant J**, 32:165-173.
- TAKEDA, S. & MATSUOKA, M. (2008) Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. **Nat. Rev. Genetics** 9:444-456
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. & KUMAR, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Mol Biol Evol.** 24(8):1596-9
- TRUEBLOOD, C.E.; OHYA, Y., & RINE, J. (1993) Genetic Evidence for In Vivo Cross-Specificity of the CaaX-Box Protein Prenyltransferases Farnesyltransferase and Geranylgeranyltransferase-I in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol.** 13(17):4260-4275.
- UPADHYAYA, N.M.; SURIN, B.; RAMM, K.; GAUDRON, J.; SCHÜNEMANN, P.H.D.; TAYLOR, W.; WATERHOUSE, P.M.; WANG, M-B. (2000) Agrobacterium-mediated transformation of Australian rice cultivars Jarrah and Amaroo using modified promoters and selectable markers. **Aust J Plant Physiol** 27:201–210
- UPADHYAYA, N.M.; ZHOU, X-R; RAMM, K.; ZHU, Q.H; WU, L.; EAMENS, A.L.; SIVAKUMAR, R.; KATO, T.; YUN, D.-W.; KUMAR, S.; NARAYANAN, K.K.; PEACOCK, W.J.; DENNIS, E.S. (2002) An iAc/Ds gene and enhancer trapping system for insertional mutagenesis in rice. **Funct Plant Biol** 29:547–559
- UPADHYAYA, N.M.; ZHU, Q-H; ZHOU, X-R; EAMENS, A.E.; HOQUE, M.S.; RAMM, K.; SHIVAKKUMAR, R.; SMITH, K.F.; PAN, S-T.; LI, S. *et al.* (2006) *Dissociation (Ds)* constructs, mapped *Ds* launch pads and a transiently-expressed transposase system suitable for finalized insertional mutagenesis in rice. **Theor Appl Genet** 112:1326-1341
- YANG, Y.; PENG, H.; HUANG, H.; WU, J.; JIA, S; HUANG, D.; LU, T. (2004) Large-scale production of enhancer trapping lines for rice functional genomics. **Plant Science** 167: 281-288
- ZHENG, S.J. & YANG, J.L (2005) Target sites of aluminum phytotoxicity. **Biol Plant**, 49 (3):321-331

ANEXO 1. *Primers* utilizados

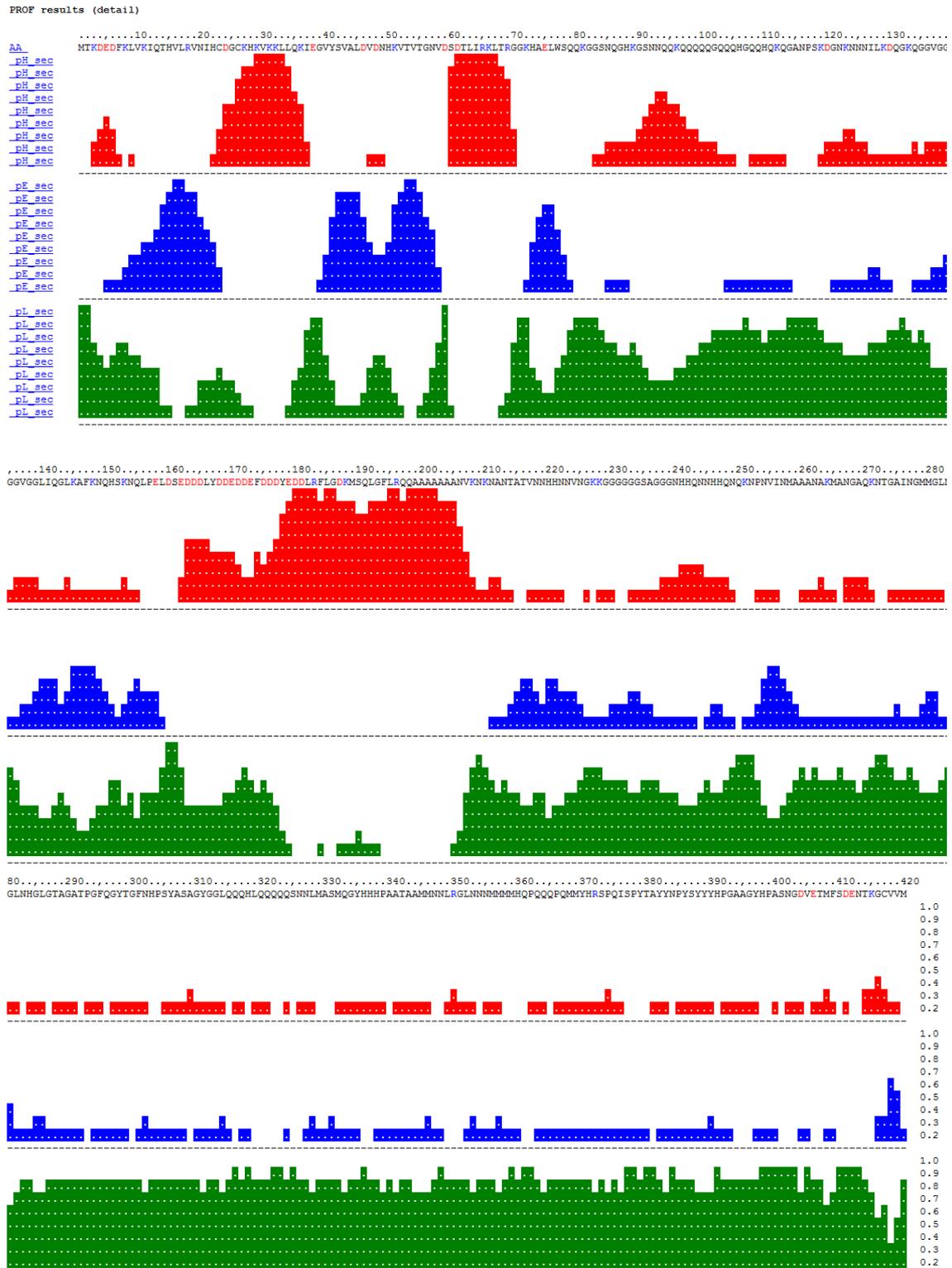
Nome do <i>Primer</i>		Sequência
Ac_1931 ⁺	<i>iAc</i> forward	5'-CAGCTCCAAAGACAAAGACAAC-3'
Ac_2382 ⁻	<i>iAc</i> reverse	5'-TGCAGCAGCAATAACAGAGTC-3'
Bar5 ⁺ _68	<i>bar</i> forward	5'-CCATCGTCAACCACTACATC-3'
Bar3 ⁻ _489	<i>bar</i> reverse	5'-AGAAACCCACGTCATGC-3'
hph5 ⁺ _5	<i>hph</i> forward	5'-AAAAGCCTGAACTCACCGC-3'
Hph3 ⁻ _515	<i>hph</i> reverse	5'-TCGTCCATCACAGTTTGCC-3'
GUS_1346F	<i>uidA</i> forward	5'- TCACCGAAGTTCATGCCAGTCC-3'
GUS_1781R	<i>uidA</i> reverse	5'- ACGCTCACACCGATACCATCAG-3'
Ds3_6587+	Ds3 forward	5'-CCGTCCCGCAAGTTAAATATG-3'
TTLBnest3	LB flank	5'-ACGTCCGCAATGTGTTATTAAG-3'
Ds72f1	72 forward	5'- CTGGTTTTTCAGGGCTACACC-3'
Ds72r1	72 reverse	5'- TGTTTAGTCCGATGCCATGA -3'
72RT3	72rt forward 3	5'- TGATGGCTGTAAGCACAAGG- 3'
	72 rt reverse 3	5'- CTGTGACCACAGCTCTGCAT-3'
OseF	eF forward	5'- TTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT-3'
	eF reverse	5'- GACTTCCTTCACGATTCATCGTAA-3'
OsFDH	FDH forward	5'- CAAAATCAGCTGGTGCTTCTC-3'
	FDH reverse	5'- TTCCAATGCATTCAAAGCTG-3'
Os18S	18S forward	5'-CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA-3'
	18S reverse	5'-ACACTTCACCGGACCATTCAA-3'

ANEXO 2. Meios de cultura utilizados na cultura de tecidos.

Nome	Composição para 1 litro de meio de cultura:
N6D Meio de indução de calos	<u>N6 Macro-elementos</u> : (NH ₄) ₂ SO ₄ 4,6 mg; KNO ₃ 28,3 mg; KH ₂ PO ₄ 4mg; MgSO ₄ .7H ₂ O 1,9 mg; CaCl ₂ .2H ₂ O 1,7 mg; <u>N6 Micro-elementos</u> : MnSO ₄ .4H ₂ O 4,4 mg; ZnSO ₄ .7H ₂ O 1,5 mg; H ₃ BO ₃ 6 mg; KL 0,8 mg; <u>N6 Vitaminas</u> : Glicina 0,2 mg; Tiamina-HCl 0,1 mg; Piridoxina-HCl 0,5mg; Ácido Nicotínico 0,5 mg; FeEDTA ^{*1} 36,75 mg; Mioinositol 100 mg, Ácido Casamínico 300mg; Prolina 2,9 g; 2,4-D ^{*2} 2mg; Sacarose 30g; Fitagel 3g; pH 5,8
NB Meio base de proliferação de calos	N6 Macro (metade da concentração usada no meio N6D); B5 Micro-elementos ^{*3} (100X) 10 mL; B5 Vitaminas(100X) 10mL; FeEDTA 36,75 mg; Sacarose 30g; Prolina 0,5g; Glutamina 0,5g; Caseína Enzimática Hidrolisada 0,3g; 2,4-D Fitagel 3g; pH 5,8
NB líquido	Preparo igual ao NB sólido, mas sem Fitagel
HTC Meio de seleção com Basta®	Preparar meio NB e, depois de autoclavado, acrescentar: Timentina 150 mg/L Cefatoxima Sódica 200mg/L Basta® 10 mg/L
HTC Meio de seleção com higromicina	Preparar meio NB, e depois de autoclavado, acrescentar: Timentina 150 mg/L Cefatoxima Sódica 200mg/L Higromicina 50mg/L
PR Meio de pré-regeneração	Preparar meio NB sem 2,4-D e acrescentar: ANA 1 mg/L BAP 2 mg/L Depois de autoclavado acrescentar: ABA 5 mg/L
Reg Meio de regeneração	Preparar meio NB sem 2,4-D e acrescentar: ANA 0,5 mg/L BAP 3 mg/L
MS ^{1/2}	Sais e vitaminas do meio Murashige & Skoog, na metade da concentração/L Sacarose 30g; Fitagel 2,5 g;

*1. Ferric-Sodium salt (Sigma cell culture); *2. Ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético; *3. Gamborg's vitamin solution (Sigma cell culture).

ANEXO 3. Predição da estrutura secundária de OsPMBP1 segundo o programa PROF Prediction do servidor PredictProtein indicando ao longo da seqüência peptídica pela probabilidade de cada resíduo de formar uma hélice (colunas vermelhas), uma fita (azuis) ou uma alça (verdes).



ANEXO 4. PrePS – Resultado do programa de predição de prenilação para a proteína OsPMBP1.

PrePS - Prediction of Protein Prenylation

Page 1 of 1

PrePS - Prenylation Prediction Suite

Protein CaaX Farnesylation, CaaX Geranylgeranylation and Rab Geranylgeranylation

Running FT prediction for query sequence ... done
Running GGT1 prediction for query sequence ... done
Running GGT2 prediction for query sequence ... done

FT ++ 

...HPGAAGYHPASNGDVETMFSDENTKGCVVM

FT - CaaX Farnesyltransferase
Pos.: **417** of 420
Score: **1.930**
P-Value: **8.0e-05**
[Click here for details!](#)



GGT1 +++ 

...HPGAAGYHPASNGDVETMFSDENTKGCVVM

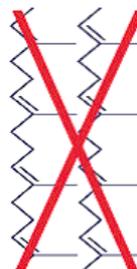
GGT1 - CaaX
Geranylgeranyltransferase
Pos.: **417** of 420
Score: **2.576**
P-Value: **5.2e-04**
[Click here for details!](#)



GGT2 --- 

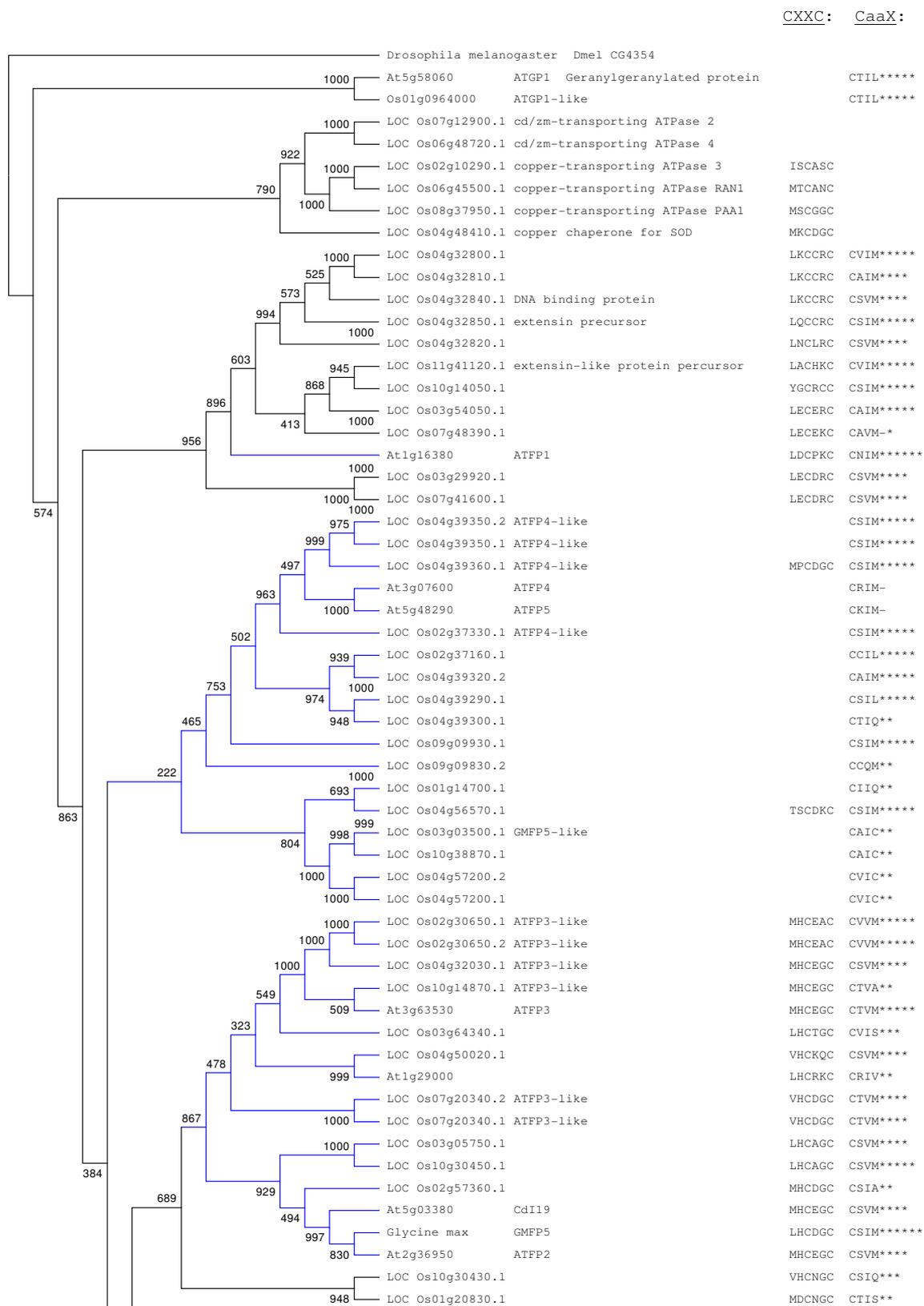
...HPGAAGYHPASNGDVETMFSDENTKGCVVM

GGT2 - Rab
Geranylgeranyltransferase
HMM1 (Rab GTPase fold - E-value):
NOT significant!
HMM2 (REP-interaction - Score):
NOT above prediction threshold!
[Click here for details!](#)

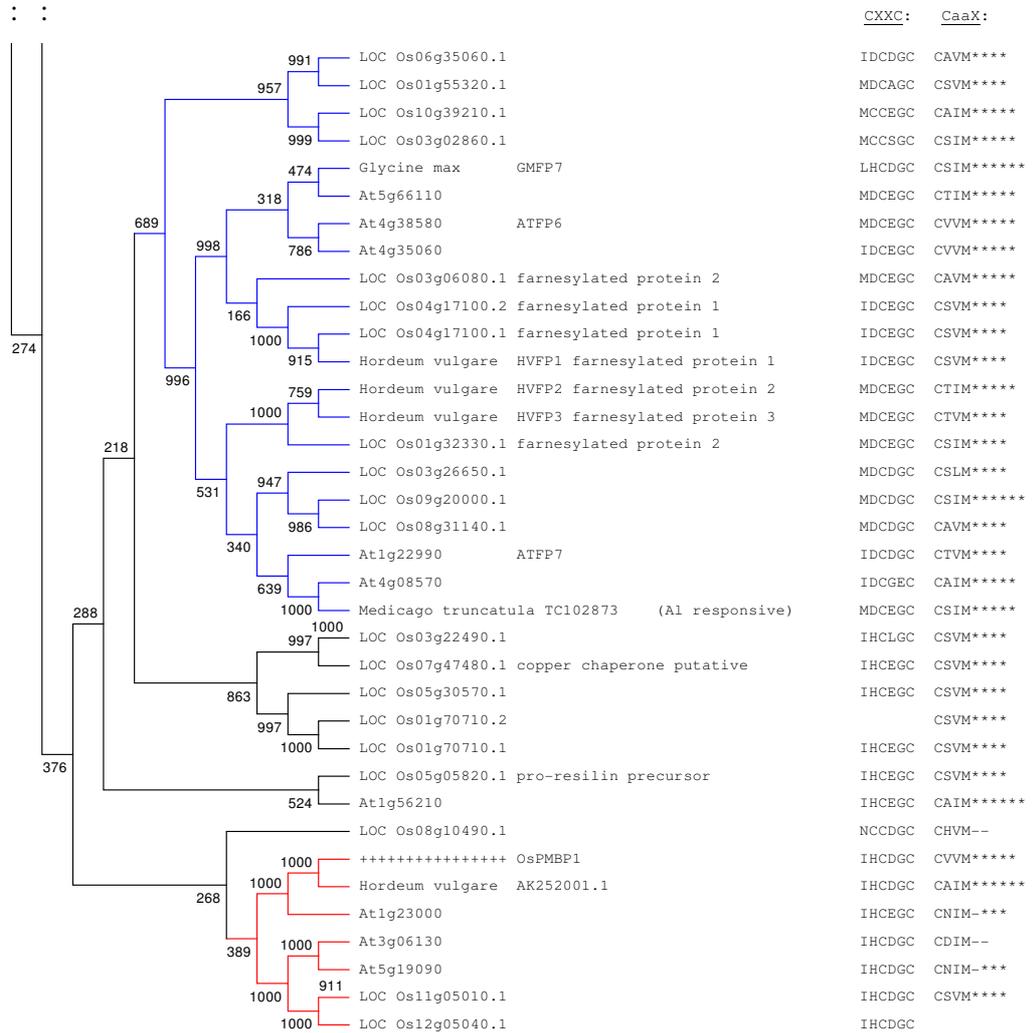


[The Mendel Site](#) [Details & Help](#) [Contact](#)

ANEXO 5. Árvore filogenética demonstrando relações entre proteínas preniladas ligantes de íons metálicos



ANEXO 5. Relações filogenéticas entre proteínas preniladas ligantes de íons metálicos (continuação)



ANEXO 5. Árvore filogenética representando relações entre proteínas da família FP (em azul) e outras proteínas com sítios de ligação a íons metálicos (CXXC) e de prenilação (CaaX) em *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare* e *Oryza sativa*. *: índice de prenilação dado pelo programa PrePS. Destacado em vermelho, a família de OsPMBP1. Árvore gerada por ClustaX2 por NJ, testada com 1000 bootstraps e editada em MEGA4.0.