

# Análise Estrutural e Funcional de Fatores de Transcrição DOF de *Eucalyptus grandis*

Rafaela de Araújo H. Gaiga & Giancarlo Pasquali

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Laboratório de Biologia Molecular Vegetal do Centro de Biotecnologia e Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia do Instituto de Biociências

## INTRODUÇÃO

A madeira e seus derivados justificam a grande importância econômica do eucalipto e de outras arbóreas, sendo a regulação da sua gênese uma das áreas de mais alta complexidade no estudo de plantas. A família de fatores de transcrição Dof (ligação a DNA com um dedo, do inglês, 'DNA binding with One Finger') compreende proteínas exclusivas de plantas, caracterizadas pela presença de um motivo de ligação ao DNA formado por quatro resíduos de cisteína ligados a um átomo de zinco, semelhante ao domínio 'dedo-de-zinco' (do inglês, 'zinc finger'; Figura 1). Estas proteínas podem agir tanto como ativadores quanto repressores da transcrição gênica e parecem ter evoluído para controlar a expressão de genes de processos característicos de plantas.

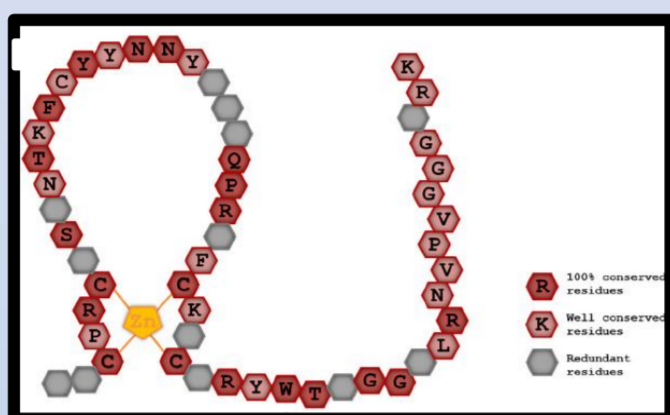


Figura 1: Representação do domínio DOF, mostrando regiões altamente conservadas. (Fonte: Characterization of the role of selected transcription factors in seed filling in *Medicago truncatula*. Atif R, SANCHEZ M, Thompson R, Signor C, Verdier J, Ochatt S. 2011/05/16.

Considerando o número de fatores Dof descritos em plantas bem como a diversidade de metabolismos controlados por estas proteínas, a manipulação gênica dos genes codificadores oferece grande potencial para a obtenção de plantas mais produtivas ou com características mais benéficas às práticas agrossilviculturais.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar gene(s) Dof de *Eucalyptus grandis* potencialmente crítico(s) à gênese da madeira;
- Clonar gene(s) Dof de interesse e adaptar o(s) mesmo(s) a vetores plasmidiais para a expressão em bactérias e superexpressão/inibição em plantas;
- Produzir em *Escherichia coli* e caracterizar bioquímica e funcionalmente proteína(s) Dof recombinante(s);
- Transformar geneticamente plantas de *Arabidopsis thaliana* com vetores binários capazes de promover a superexpressão e a inibição da expressão de gene(s) Dof, caracterizando os efeitos.

## METODOLOGIA E RESULTADOS

Os genes D00607, D01698 e K00405 potencialmente codificadores de proteínas Dof foram escolhidos devido ao perfil de expressão preferencial em tecidos vasculares de caules, raízes e folhas, bem como apresentando mais alta homologia a genes Dof anteriormente caracterizados por outros autores e comprometidos com a gênese dos tecidos vasculares.

Obtenção de amplicons das seqüências codificadoras dos três genes a partir da extração de RNA total de floema de *E. grandis*.

Realização de RT-PCR para a síntese de cDNA e adaptação dos três genes ao vetor pENTR/D-TOPO (Invitrogen) para clonagem em *E. coli* One Shot Mach1 T1 (Invitrogen). Os genes em pENTR/D-TOPO foram sequenciados integralmente, comprovando-se a identidade das seqüências.

Os insertos foram transferidos por recombinação para o vetor binário pH7WG2D (VIB) com vistas à superexpressão em plantas.

Foi realizada a transformação genética de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 via choque térmico com os plasmídeos pH7WG2D contendo os três cassetes gênicos.

Realizou-se a transformação genética de plantas de *A. thaliana* Col-0 com as linhagens de *A. tumefaciens*: pH7WG2D-Dof pela metodologia de imersão de inflorescências.

Paralelamente realizaram-se experimentos para a produção das proteínas DOF em *E. coli* e caracterização bioquímica e funcional das mesmas.

Foram realizadas PCRs para a amplificação dos três genes previamente clonados em pENTR/D-TOPO utilizando-se primers específicos às regiões 5' e 3' dos genes, de forma a permitir a ligação dos três genes ao vetor de expressão pGEX-4T-1 (Figura 2). Seqüências dos sítios de clivagem das enzimas BamHI e EcoRI foram adicionados aos primers forward e reverse, respectivamente.

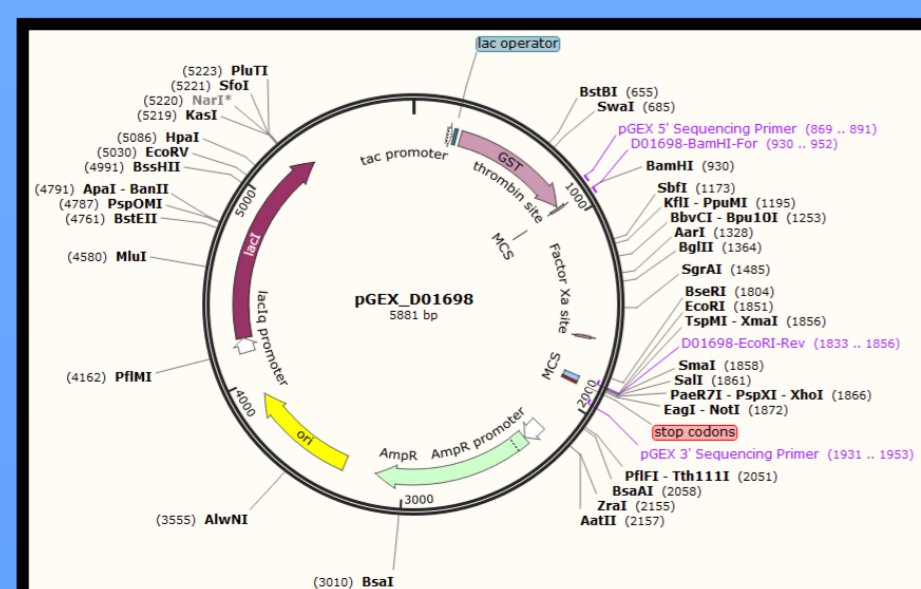


Figura 2: Obtenção do plasmídeo pGEX-4T-1 com o gene D01698 realizada no programa SnapGene. São mostrados os sítios de clivagem do plasmídeo, assim como a marca de seleção (Ampicilina).

Os três produtos de PCR (D00607, D01698, K00405) e a amostra de pGEX-4T-1 foram submetidas a reações de clivagem e purificadas. A ligação do plasmídeo aos fragmentos foi realizada utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (Fermentas).

Foi realizada a transformação de *E. coli* por choque térmico e colônias para os genes D00607 e D01698 foram obtidas.

Os plasmídeos foram purificados em minipreparações plasmidiais e PCRs foram realizadas para confirmação das colônias que apresentam os insertos correspondentes aos genes D00607 e D01698. As amostras foram sequenciadas, comprovando-se a inserção dos genes.

Foram selecionadas as linhagens de *E. coli* BL21 CodonPlus (DE3)-RIL, BL21 CodonPlus (DE3)-RP e BL21 (DE3) Star para a transformação com o vetor pGEX-4T-1-D00607 e pGEX-4T-1-D01698.

Foi realizada a transformação por choque térmico das três linhagens de *E. coli* com os genes D00607 e D01698, além do plasmídeo vazio como controle. Como resultado, obteve-se todas as colônias positivas.

Até o momento, as linhagens Star e RIL foram submetidas a duas condições de tratamento (Figura 3).

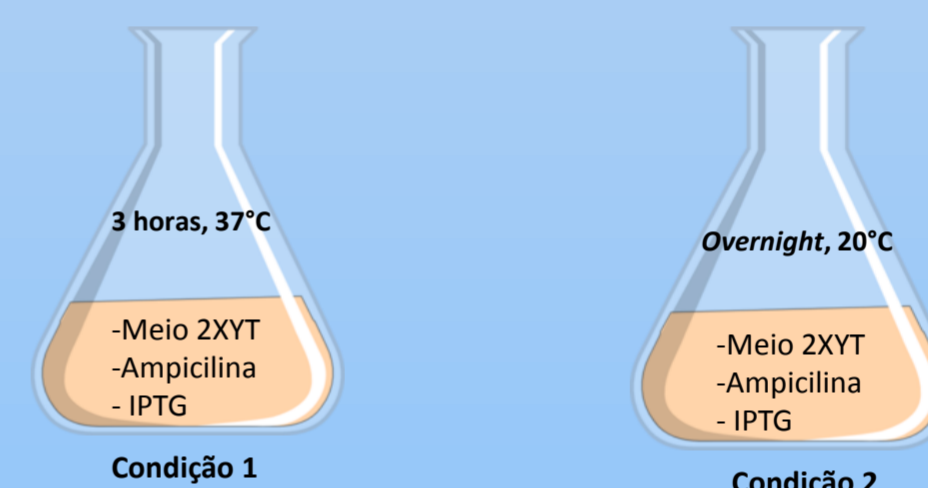


Figura 3: Representação esquemática das condições em que foram submetidas as colônias positivas das linhagens Star e RIL.

Foi realizada a lise celular dos sedimentos após centrifugação das culturas e com a fração solúvel foram migrados géis de SDS-PAGE para a linhagem transformada Star. Foi possível verificar a presença de bandas entre 50 e 75 kDa (Figura 4), as quais podem ser correspondentes à proteína fusionada a GST (Dof D00607 31 kDa + GST 26 kDa; Dof D01698 32 kDa + GST 26 kDa).

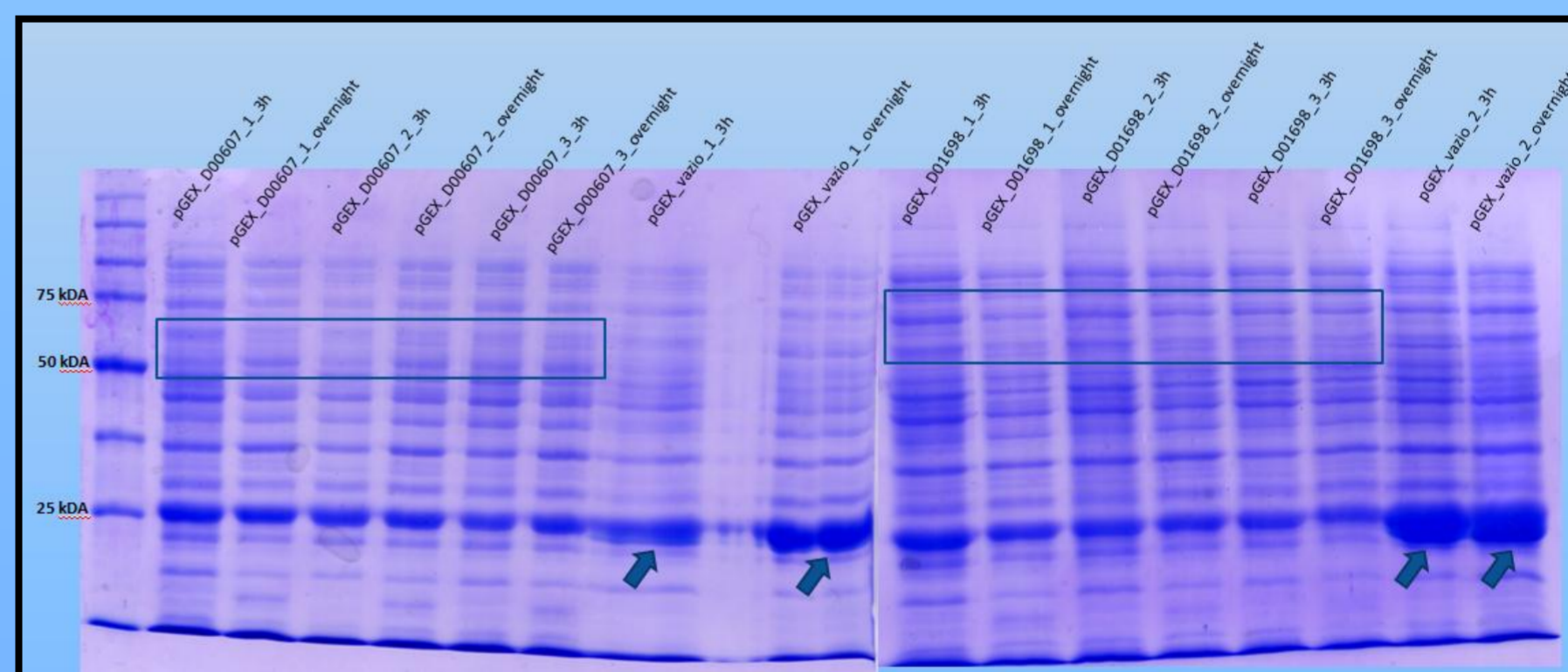


Figura 4: SDS-PAGE de colônias transformadas da linhagem Star. São observadas 3 colônias para cada gene e duas para o vetor vazio, sendo cada uma delas submetida aos dois tratamentos (3 h, 37°C e overnight, 20°C). São indicadas pelas setas, bandas mais intensas de GST (26 kDa) para os vetores vazios. Dentro dos retângulos é possível se observar bandas entre 50 e 75 kDa para todas as colônias e condições testadas para os dois genes.

## PERSPECTIVAS

Será realizada a técnica de Western Blot para a confirmação da presença de proteínas Dof das linhagens testadas. Além disso, a linhagem BL21 CodonPlus (DE3)-RP também será testada. Futuramente, as proteínas serão analisadas quanto a seu peso molecular; ponto isoeletrico; estabilidade estrutural sob diferentes pHs, temperaturas e agentes redutores; estudos de termodinâmica de desnaturação; calorimetria de titulação isotérmica; e estudos de interação intermolecular.

Em relação às plantas de *A. thaliana*, transformadas com o vetor pH7WG2D, estão sendo realizadas a coleta e antissepsia de sementes da linhagem T1, com o objetivo de obtenção de plantas da linhagem T3 e consequente análise anatomomorfológica.

## REFERÊNCIAS

- Aatsinki, J.T. & Rajaniemi, H.J. (2005) An alternative use of basic pGEX vectors for producing both N- and C-terminal fusion proteins for production and affinity purification of antibodies. *Protein Expression and Purification* 40: 287-291.
- Clough, S.J. & Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16: 735-743.
- d'Almeida, G.S. (2004) Caracterização da Família de Fatores de Transcrição Dof de *Eucalyptus grandis*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 67p.
- Gardiner, J., Sherr, I., & Scarpa, E. (2000) Expression of DOF genes identifies early stages of vascular development in *Arabidopsis* leaves. *International Journal of Developmental Biology*, 54(8-9), 1389-1396.
- Gupta, S. et al. (2005) Insights into structural and functional diversity of Dof (DNA binding with one finger) transcription factor. *Planta* 241: 549-562.
- Karim, M., Depicker, A. & Hilson, P. (2007) Recombinational cloning with plant gateway vectors. *Plant Physiology* 145: 104-114.
- Karim, M., Inzé, D. & Depicker, A. (2002) GATEWAY VECTORS for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7: 193-195.
- Konishi, M. et al. (2005) MONOPTEROS directly activates the auxin-inducible promoter of the Dof8 transcription factor gene in *Arabidopsis thaliana* leaf provascular cells. *Journal of Experimental Botany* 56: 283-291.
- Konishi, M. & Yanagisawa, S. (2007) Sequential activation of two Dof transcription factor gene promoters during vascular development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 623-629.
- Konishi, M. & Yanagisawa, S. (2005) Transcriptional repression caused by Dof8.8 is involved in proper vein network formation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Plant Research* 128: 643-652.
- Lopes, F.C. et al. (2005) Phable natural biocide: Jaburetox is an intrinsically disordered insecticidal and fungicidal polypeptide derived from jack bean urease. *FEBS Journal* 282: 1043-1064.
- Nuggero, M. et al. (2003) The role of the DNA-binding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants. *Plant Science* 209: 32-45. Oh, S.-J. et al. (2009) Overexpression of the transcription factor AP37 in rice improves grain yield under drought conditions. *Plant Physiology* 150: 198-199.
- Papi, M. et al. (2000) Identification and disruption of an *Arabidopsis* zinc finger gene controlling seed germination. *Genes and Development* 14: 38-33.
- Papi, M. et al. (2002) Inactivation of the phylum-specific Dof zinc finger gene DAG1 affects response to light and integrity of the testa of *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiology* 128: 411-417.
- Real-Guerra, R. et al. (2004) Biochemical and structural studies on native and recombinant Glycine max UreC: a detailed characterization of a plant urease accessory protein. *Plant Molecular Biology* 58: 466-475.
- Rengel, D. et al. (2002) A new genomic resource dedicated to wood formation in *Eucalyptus*. *BMC Plant Biology* 9: 36.
- Santopolo, S. et al. (2005) DOF AFFECTING GERMINATION 2 is a positive regulator of light-mediated seed germination and is repressed by DOF AFFECTING GERMINATION 1. *BMC Plant Biology* 15: 72.
- Sun, Z., Guo, T., Liu, Y., Liu, Q., & Fang, Y. (2005) The Roles of Arabidopsis DOFs in Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Primary MicroRNAs. *PLoS Genetics* 1(10).
- Umemura, Y. et al. (2004) The Dof domain, a zinc finger DNA-binding domain conserved only in higher plants, truly functions as a Cys2/Cys2 Zn finger domain. *The Plant Journal* 37: 741-749.
- Wei, P.-C., Tan, F., Guo, X.-Q., Zhang, X.-Q., Wang, G.-Q., Xu, H., Wang, X.-C. (2008) Overexpression of AtDOF4.7, an Arabidopsis DOF family transcription factor, induces floral organ abscission deficiency in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 145: 386-399.
- Yanagisawa, S. & Schmidt, R.J. (1999) Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *The Plant Journal* 17: 209-214.
- Yanagisawa, S. & Sheen, J. (1998) Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. *Plant Cell* 10: 75-89.
- Yanagisawa, S. & Sheen, J. (1998) Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. *The Plant Cell* 10: 75-89.
- Ye, Z.H. & Zhong, R. (2005) Molecular control of wood formation in trees. *Journal of Experimental Botany*, 66: 419-431.
- Zhang, J. et al. (2004) The formation of wood and its control. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 56-63.
- Zou, H.-F., Zhang, Y.-Q., Wei, W., Chen, H.-W., Song, Q.-X., Liu, Y.-F., Chen, S.-Y. (2013). The transcription factor AtDOF4.2 regulates shoot branching and seed coat formation in *Arabidopsis*. *Biochemical Journal*, 449(2), 373-388.