UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

CAROLINA ROSSI DE OLIVEIRA

Caracterização de uma fosfatidilinositol 4-quinase putativa e seu efeito no desenvolvimento do grão de pólen

Piracicaba

2019

CAROLINA ROSSI DE OLIVEIRA

Caracterização de uma fosfatidilinositol 4-quinase putativa e seu efeito no desenvolvimento do grão de pólen

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof^a. Dr^a Adriana Pinheiro Martinelli

Co-Orientador: Prof. Dr.: Francisco Scaglia Linhares

Piracicaba 2019 AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Oliveira, Carolina Rossi de

Caracterização de uma fosfatidilinositol 4-quinase putativa e seu efeito no desenvolvimento do grão de pólen / Carolina Rossi de Oliveira; orientadora Adriana Pinheiro Martinelli; co-orientador Francisco Scaglia Linhares. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - Piracicaba, 2019. 136 p.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Duplo-híbrido de leveduras 2. Expressão gênica 3. Fosfolipídeos 4. Pólen 5. Produção heteróloga 6. Reprodução vegetal 7. Transporte biológico 8. Transporte de lipídeos I. Título

CDU 631.522 : 577.122.5

Elaborada por: Marilia Ribeiro Garcia Henyei CRB-8/3631 Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

Dedico este trabalho

aos meus pais Eliana & Marcilio,

por serem os meus maiores incentivadores desde sempre e,

aos meus avós Joaquim (in memorian) & Luzia (in memorian) e Florindo (in memorian) & Dulce,

por me ensinarem que sabedoria não se adquire apenas na escola.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo (USP), ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), aos professores e funcionários pelo papel fundamental que desempenharam em minha formação acadêmica.

À Pro-Reitoria de Pós-Graduação (PRPG/USP) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (PPG/CENA-USP) pela oportunidade da realização do curso e do projeto de doutorado, pela infraestrutura e recursos disponíveis.

À Profa. Dra. Adriana P. Martinelli pela orientação, ensinamentos e muitos incentivos durante esses anos.

À Coordenaçao de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES/PROEX) pela concessão da bolsa de doutorado durante o curso e de doutorado sanduíche no exterior (CAPES/PDSE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado durante o curso.¹*

Ao Prof. Dr. Francisco S. Linhares pela co-orientação e auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da Secretaria de Pos-Graduação (CENA), em especial a Cleide Lopes, pela disponibilidade, atenção e eficiência.

À Suzi Manesco, Divisão de Produtividade Agroindustrial e Alimentos (DVPROD-CENA), pela convivência, atenção e suporte.

À Marilia R. G. Henyei, Seção Técnica de Biblioteca (CENA), pelo auxílio na editoração e normatização técnica desta tese.

À Monica L. Rossi, Laboratorio de Biologia de Desenvolvimento e Estrutra Vegetal (LabDEV), pelo processamento de amostras microscópicas e apoio durante o trabalho.

Ao João Geraldo Brancalion, Seção técnica de Informática (CENA) pelo auxílio com a edição das imagens e formatação das figuras deste trabalho.

Ao Marcelo F. Correa, Laboratório de Biotecnologia Vegetal (LBV) pelo suporte nos experimentos de RT-qPCR e em atividades laboratoriais no decorrer deste trabalho.

Ao Dr. Vicente Rubio, Centro Nacional de Biotecnologia de Madrid/Espanha, pela oportunidade de trabalho, confiança e paciência durante o estágio sanduiche.

À Sandra Fonseca, Maria Isabel Puga, e Yolanda Fernandez, Centro Nacional de Biotecnologia de Madrid/Espanha, pela atenção e profissionalismo ao compartilharem seus conhecimentos científicos comigo.

À Marta Garcia Leon e Esther Canibaño, por me receberem com tanto carinho, pelos ensinamentos diários no laboratório e por terem me proporcionado tantas alegrias durante o período sanduiche em Madrid.

¹ Este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – Brasil (CAPES) – Códigos de Financiamento 001 (CAPES/PROEX 0227080 e CAPES/PDSE 88881.189273/2018-01) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq), processo 141644/2019-2.

A todos os membros do Centro Nacional de Biotecnologia de Madrid/Espanha, pela receptividade e conhecimentos compartilhados, em especial à Elena, Rodri, Carlos, Manu, Cristian, Alex, Aitor e Mic pelo bom humor, pela *comida en los viernes*, e por todas as experiências turísticas.

Ao Dr. Rafael Couñago, pela colaboração científica, profissionalismo e por viabilizar os experimentos de expressão heteróloga da proteína, disponibilizando a infraestrutura, recursos e a equipe do laboratório Structural Genomics Consortium (SGC) Unicamp para este trabalho.

Ao Dr. Caio Vinicius dos Reis, pelo excelente treinamento e suporte durante todas as análises de expressão heteróloga da proteína e por ser tão eficiente e gentil, ao desempenhar este trabalho.

A todos os companheiros do laboratório LBV e LabDev que chegaram e partiram durante este período, pela convivência, troca de experiências e momentos de confraternização, e a Cleuza Cabral do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, pelo 'café-sorriso' em muitos momentos.

À Taninha, Parkinha, Pletinha, Syl, Léo, Elcio, Mayra, Renatinha, Raquelzinha, Eve, Bida, Sandra e Tati e por estarem dispostos a ajudar de todas as maneiras possíveis sempre e por tornarem esta jornada mais ... *pertinente*.

À Elaine Dias, Carolyn Dubbern e Luciana Faldoni, por ouvirem sempre as mesmas reclamações e ladainhas com toda atenção do universo e por compreenderem as minhas ausências ao longo deste período e ao amigo Dan Augusto por ter a capacidade de tornar dias tristes em dias hilários.

Ao Neu (*in memorian*), Clérida, Jô, Gê, Nei e Matheus pela amizade e momentos de descontração.

Ao André Luiz Fadel, pelo carinho, por todas as colaborações com este trabalho e pelos incentivos positivistas.

À doce vó Dulce, por todos os cafés da tarde, carinho e doçura em cada frase motivadora em todos estes anos.

À minha família, pela grande torcida, especialmente à aquela organizada aos domingos. Aos meus pais, Eliana e Marcílio, pela paciência e incentivo nesta longa jornada.

A todos que contribuiram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

À Deus pela vida, saúde e conforto em tantos momentos.

Obrigada!

"Sim. Existem muitas hipóteses científicas que estão erradas e isso é perfeitamente aceitável, pois são a primeira etapa para encontrar as que estão corretas".

Carl Edward Sagan

"A persistência é o caminho ao êxito". Charles Chaplin

RESUMO

OLIVEIRA, C. R. Caracterização de uma fosfatidilinositol 4- quinase putativa e seu efeito no desenvolvimento do grão de pólen. 2019. 136 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

O desenvolvimento dos grãos de pólen está intimamente relacionado à viabilidade dos mesmos e esta pode afetar significativamente o sucesso reprodutivo das plantas. No interior das anteras, as células esporogênicas masculinas se diferenciam e sofrem meiose para produzir micrósporos, que dão origem às unidades independentes de dispersão, os grãos de pólen. Estes mecanismos de desenvolvimento e maturação dos grãos de pólen são influenciados pelo tráfego de vesículas e endomembranas celulares. Desta forma, conhecer os mecanismos moleculares que dirigem e coordenam o desenvolvimento dos grãos de pólen são fundamentais, pois geram informações que podem elucidar o funcionamento e vias regulatórias que levam à diferenciação celular, morfogênese e controle gênico ao longo do desenvolvimento dos grãos de pólen. Na literatura encontra-se a identificação do gene AtPI4Ky1(At2g40850), que codifica para uma fosfatidilinositol 4-quinase putativa, predominantemente expressa durante a meiose e a maturação dos grãos de pólen. Estudos ultraestruturais em plantas mutantes para esse gene mostraram grãos de pólen de formato irregular com viabilidade reduzida, indicando possíveis implicações desse produto gênico no desenvolvimento do grão de pólen. O presente trabalho tem como objetivo a caracterização do gene At2g40850 e o estudo de seu envolvimento no desenvolvimento de grãos de pólen. A caracterização comparativa do desenvolvimento de anteras e de pólen por microscopia de luz e eletrônica de transmissão em Arabidopsis thaliana selvagem e mutantes foi realizada, identificando-se em algumas amostras de células de tapete, vacúolos maiores do que nas amostras de material selvagem. Adicionalmente, enquanto anteras do tipo selvagem apresentavam micrósporos circulares vacuolados, anteras mutantes exibiram micrósporos bem desenvolvidos e também micrósporos defeituosos em forma e tamanho, características que podem estar associadas a possíveis defeitos durante a meiose ou a formação de tétrades. Adicionalmente, apesar de não ter sido possível a realização da complementação de mutantes para o gene At2g40850, possivelmente devido à ocorrência de competição gametofítica por grãos de pólen viáveis, os resultados obtidos através de análises de expressão transiente com o auxílio de marcadores de compartimentos celulares (linhas WAVE) em plantas de Nicotiana benthamiana, identificaram a co-localização subcelular da proteína ATPI4Ky1 no

golgi. Além disso, experimentos envolvendo seleção pelo sistema de duplo híbrido realizadas em amostras de botões florais de *A. thaliana*, revelaram uma lista de 27 possíveis interatores da proteína codificada pelo gene At2g40850 que podem ser ponto de partida para a elucidação de mecanismos de interação entre proteínas. Por fim, em análises de expressão heteróloga, foi possível obter a expressão da proteína em sistemas bacterianos e a purificação da mesma com alto grau de pureza, mostrando boas perspectivas de estudos futuros para a elucidação da atividade cinásica putativa da proteína ATPI4K γ 1. As informações geradas neste trabalho podem colaborar para estudos futuros do processo de desenvolvimento de grãos de pólen, aumentando o conhecimento sobre os mecanismos relacionados ao desenvolvimento reprodutivo masculino em plantas.

Palavras-chave: *Arabidopsis thaliana*. Desenvolvimento reprodutivo masculino. Expressão heteróloga. Interatores proteicos. Tráfego vesicular.

ABSTRACT

OLIVEIRA, C. R. Characterization of a putative phosphatidyl inositol 4-kinase and its effect on pollen grain development: 2019. 136 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

The development of pollen grains is closely related to their viability and can significantly affect the reproductive success of plants. Inside the anthers, male sporogenic cells differentiate and undergo meiosis to produce microspores, which give rise to the independent dispersion units, pollen grains. These mechanisms of pollen grain development and maturation are influenced by the traffic of cellular vesicles and endomembranes. Thus, knowing the molecular mechanisms that direct and coordinate the development of pollen grains are fundamental, as they generate information that can elucidate the functioning and regulatory pathways that lead to cell differentiation, morphogenesis and gene control throughout the development of pollen grains. In the literature there is the identification of the AtPI4Ky1 gene (At2g40850), which codes for a putative phosphatidylinositol 4-kinase, predominantly expressed during meiosis and pollen grain maturation. Ultrastructural studies in mutant plants for this gene showed irregularly shaped pollen grains with reduced viability, indicating possible implications of this gene product on pollen grain development. The present work aims to characterize the At2g40850 gene and to study its involvement in pollen grain development. Comparative characterization of anther and pollen development by light microscopy and transmission electron microscopy in wild Arabidopsis thaliana and mutants was performed, identifying in some carpet cell samples larger vacuoles than in wild material samples. In addition, while wild anthers had vacuolated circular microspores, mutant anthers exhibited well-developed microspores as well as defective microspores in shape and size, characteristics that may be associated with possible defects during meiosis or tetrad formation. In addition, although mutant complementation to the At2g40850 gene was not possible, possibly due to the occurrence of gametophytic competition for viable pollen grains, the results obtained through transient expression analysis with the aid of compartiment cell markers (WAVE lines) in Nicotiana benthamiana plants identified the subcellular co-localization of ATPI4Ky1 protein in golgi. In addition, experiments involving double hybrid system selection performed on A. thaliana flower bud samples revealed a list of 27 possible protein interactors encoded by the At2g40850 gene that may be the starting point for elucidating protein interaction mechanisms. Finally, in heterologous expression analysis, it

was possible to obtain protein expression in bacterial systems and to purify it with high purity, showing good prospects for future studies to elucidate the putative kinetic activity of ATPI4K γ 1 protein. The information generated in this work may contribute to future studies of the pollen grain development process, increasing the knowledge about the mechanisms related to male reproductive development in plants.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*. Male reproductive development. Heterologous expression. Protein interactors. Vesicular traffic.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
3 REVISÃO DA LITERATURA	21
3. 1 Desenvolvimento das anteras e formação dos grãos de pólen	21
3.2 Defeitos na maturação de grãos de pólen	25
3.3 Fosfatidilinositóis - biogênese e ação	26
3.4 Fosfoinositídeos estão envolvidos em processos de sinalização celular	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Material Vegetal	35
4.2 Meios de cultura	36
4.3 Preparo de células competentes para eletroporação	37
4.3.1 Escherichia coli	37
4.3.2 Agrobacterium tumefaciens	38
4.4 Transformação de células	38
4.4.1 Transformação de Escherichia coli por eletroporação	38
4.4.2 Transformação de Agrobacterium tumefaciens por eletroporação	39
4.5 Extração de DNA genômico	39
4.6 Genotipagem dos mutantes	39
4.7 Eletroforese em gel de agarose	41
4.8 Extração de RNA	41
4.9 Síntese de <i>c</i> DNA e RT-qPCR	41
4.10 Caracterização anatômica e ultraestrutural do desenvolvimento de grãos de pólen mutantes pa gene <i>AtPI4Kγ1</i>	ura o 42
4.10.1 Microscopia de luz	42
4.10.2 Microscopia eletrônica de transmissão	43
4.11 Elaboração dos vetores de expressão em plantas	44
4.11.1 <i>35S::AtPI4Kγ1-</i> GFP / pGWB5	46
4.11.2 <i>35S::AtPI4Kγ1-</i> GFP / pGWB6	47
4.12 Transformação genética de plantas de A thaliana pelo método "floral dip"	47
4.13 Expressão transiente de ATPI4Kγ1 em folhas de Nicotiana benthamiana	48
4.14 Co-localização de ATPI4Kγ1 em linhagens marcadoras de compartimentos celulares "WAVE reporter	" 49
4.15 Análises em microscópio confocal	50
1	

4.16 Extração da proteína ATPI4Kγ1 de <i>Nicotiana benthamiana</i> para confirmação da expressão transiente	51
4.17 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Western blot	51
4.18 Ensaios de duplo-híbrido em leveduras Saccharomyces cerevisiae	52
4.18.1 Elaboração do vetor de expressão em leveduras isca/DNA-BD	52
4.18.2 Preparo de leveduras competentes Sacharomices cerevisae (Y187)	53
4.18.3 Transformação por choque térmico do clone isca (<i>AtPI4Kγ1</i> +pGBKT7)	54
4.18.4 Confirmação da transformação do clone isca (<i>AtPI4Ky1</i> +pGBKT7) em Y187 por PCR de colônia	54
4.18.5 Screening de duplo híbrido de leveduras	55
4.18.6 Teste de X-α-galactosidase não letal	56
4.18.7 Identificação das proteínas candidatas à interação	56
4.19 Expressão heteróloga e produção da proteína ATPI4Kγ1	57
4.19.1 Clonagem independente de ligação (LIC)	57
4.19.2 Teste de expressão da proteína ATPI4Kγ1 em pequena escala	62
4.19.3 Produção heteróloga e extração da proteína ATPI4Kγ1em larga escala	62
4.19.4 Purificação da proteína ATPI4Kγ1	63
4.19.5 Teste de desfosforilação e autofosforilação da proteína ATPI4Kγ1	64
4.19.6 Cristalografia – Ensaios de cristalização	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1 Crescimento e caracterização das plantas	67
5.2 Análise de expressão do gene <i>AtPI4Kγ1</i> por RT-qPCR	72
5.3 Caracterização anatômica e ultraestrutural do desenvolvimento de grãos de pólen mutantes pa gene <i>AtPI4Kγ1</i>	ara o 73
5.4 Construções gênicas para expressão do gene AtPI4Ky1 nas espécies em estudo	80
5.5 Transformação genética de A. thaliana via floral dip	81
5.6 Análise de expressão transiente em Nicotiana benthamiana	83
5.7 Sistema duplo híbrido em leveduras (Y2H)	89
5.7.1 Screanning de biblioteca de duplo-híbrido em leveduras	90
5.7.2 Teste de α-galactosidase não letal	94
5.8 Expressão heteróloga da proteína ATPI4Kγ1	100
5.8.1 Clonagens de alta eficiência independente de ligação (LIC)	100
5.8.2 Testes de expressão da proteína ATPI4Kγ1	103
5.8.3 Purificação da proteína ATPI4Kγ1	105
5.8.4 Espectrometria de massas	109
5.8.5 Teste de autofosforilação da proteína AtPI4Kγ1	110
5.8.6 Cristalização da proteína ATPI4Kγ1	112

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	. 114
REFERÊNCIAS	. 115
APÊNDICES	. 127
ANEXOS	. 133

1 INTRODUÇÃO

Grãos de pólen inviáveis podem comprometer o sucesso reprodutivo de plantas e a formação destes depende de fatores genéticos que regulam o desenvolvimento das anteras. O processo de desenvolvimento dos grãos de pólen ocorre no interior das anteras e está intimamente ligado ao desenvolvimento da mesma. Este inicia-se através de divisões meióticas na célula mãe do micrósporo que culminam em uma tétrade de micrósporos que se individualizam. Em seguida, inicia-se o processo de maturação, que consiste na deposição de diversas substâncias na parede do grão de pólen, que o protege quando disperso no ambiente, após a deiscência das anteras.

Grande parte das plantas que apresentam alterações durante o desenvolvimento da antera produzem grãos de pólen inviáveis, em alguns casos podendo levar à esterilidade masculina parcial. Estudos realizados por Alves-Ferreira et al. (2007), visando buscar genes implicados em processos tardios do desenvolvimento floral, levaram à identificação do gene *AtPI4Ky1(At2g40850)* que codifica para uma fosfatidilinositol 4-quinase putativa, predominantemente expressa durante a meiose e a maturação dos grãos de pólen. Plantas mutantes para esse gene apresentaram grãos de pólen irregulares e com viabilidade reduzida, indicando potencial atuação em etapas do desenvolvimento dos grãos de pólen.

Fosfoinositídeos são uma classe de lipídios de membrana reguladores encontrados em membranas eucarióticas que, quando fosforilados por quinases específicas em diferentes porções do anel inositol, podem gerar derivados fosforilados com funções distintas (Heilman, 2016). Embora tenham sido relatados há mais de duas décadas, apenas nos últimos anos têm sido demonstrados papéis cruciais no desenvolvimento e função em plantas (Boss; Im, 2012; Heilmann; Heilmann, 2015; Munnik; Nielsen, 2011). A implicação "putativa cinásica" da proteína codificada pelo gene At2g40850 se dá pelo fato de, até o momento, não ter sido comprovada a atividade cinásica desta proteína, apesar de fortes indícios de seu envolvimento em processos de fosforilação de lipídeos de membrana.

Genes como $AtPI4K\gamma I$, que presumidamente codificam fosfatidilinositol 4-quinases, possivelmente estão envolvidos em processos de formação de vesículas endo- e/ou exocitósicas durante processos de diferenciação polarizada, mas até o momento, as implicações em processos meióticos e/ou de maturação de grãos de pólen não são claras. Informações disponíveis até o momento, sugerem o envolvimento desta classe de proteínas na regulação do tráfego intracelular e é possível que o tráfego intracelular e a sinalização celular possam ser mecanismos fundamentais para o desenvolvimento dos grãos de pólen (Bak et al., 2013; Delage et al., 2013, Whitley et al., 2009; Okazaki et al., 2015, Ugaldi et al., 2016). Além disso, estudos sugerem que a proteína AtPI4Kγ1 pode estar envolvida no metabolismo de lipídeos e na diferenciação plastidial nos tecidos especializados (Reis, 2009).

Apesar da importante participação de fosfatidilinositóis em vias de sinalização celular, a quantidade de informações sobre esse sistema em plantas é significativamente reduzida, em comparação com os dados disponíveis em estudos utilizando animais e humanos. Com base nessas informações, a caracterização do gene $AtPI4K\gamma I$ em plantas, utilizando-se a espécie modelo *Arabidopsis thaliana*, pode auxiliar na interpretação de seu papel em processos celulares, mecanismos mediados durante o tráfego de vesículas e sinalização celular. Os resultados obtidos podem esclarecer aspectos até agora desconhecidos do processo de desenvolvimento de grãos de pólen, aumentando o conhecimento sobre a fertilidade masculina em plantas autógamas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar o gene $AtPI4K\gamma I$ em relação a seus aspectos funcionais e bioquímicos e analisar seu envolvimento durante o desenvolvimento de grãos de pólen em plantas de *Arabidopsis thaliana*.

2.2 Objetivos específicos

1. Caracterização anatômica e ultraestrutural de etapas do desenvolvimento do grão de pólen mutante para o gene *AtPI4Ky1* em plantas de *A. thaliana*;

2. Determinação funcional de $AtPI4K\gamma I$ através da complementação de mutantes e análise da regulação do tráfego de vesículas da via do fosfatidilinositol durante a maturação de grãos de pólen, através de superexpressão da fosfatidilinositol 4-quinase;

3. Estudo da relação de formação de vacúolos de tamanhos alterados através da colocalização de ATPI4Kγ1 e marcadores associados a vias endo e exo-citósicas;

4. Analisar interações proteína-proteína através do sistema duplo híbrido;

5. Realizar a expressão heteróloga da proteína ATPI4Kyl em sistemas bacterianos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3. 1 Desenvolvimento das anteras e formação dos grãos de pólen

Uma planta dicotiledônia típica apresenta flores compostas por quatro verticilos concêntricos de órgãos, onde anéis de órgãos externos circundam estruturas reprodutivas localizadas no centro. Em *Arabidopsis thaliana* são observadas dezesseis peças florais, sendo um conjunto de oito peças formando o perianto (quatro sépalas e quatro pétalas) seis estames e dois carpelos fusionados (Kieffer; Davies, 2001). Em uma flor, o androceu é composto pelo conjunto de estames, que são os órgãos reprodutivos masculinos, necessários para o sucesso da reprodução sexuada em angiospermas. Em *A. thaliana*, o desenvolvimento inicia-se a partir de seis primórdios estaminais que surgem no terceiro verticilo dos órgãos florais e termina com a liberação dos grãos de pólen, após a deiscência das anteras (Goldberg; Beals; Sanders, 1993).

Os estames são responsáveis pela formação e dispersão dos grãos de pólen e apresentam processos sofisticados de diferenciação celular (Scott; Spilman; Dickinson, 2004). Na maioria das plantas dicotiledôneas, seis estames são formados, sendo quatro longos e dois curtos. Cada um dos estames é constituído por duas partes morfológica e funcionalmente distintas: o filete e a antera (Feng, 2007; Goldberg; Beals; Sanders, 1993).

O filete apresenta uma estrutura radial simples com feixe vascular único que proporciona suporte estrutural para a antera, ancorando o estame ao receptáculo floral e permitindo o transporte de água e nutrientes pelo feixe vascular (Sanders et al., 1999). As anteras geralmente são formadas por duas tecas, cada uma com dois lóculos que apresentam camadas celulares específicas que circundam o microsporângio. No interior das anteras, através de um programa de desenvolvimento controlado geneticamente, a partir das células-mãe dos micróporos (microsporócitos) ocorre o desenvolvimento e maturação dos grãos de pólen, unidades de reprodução masculina (McCornick, 2004; Ma, 2005; Wilson; Zhang, 2009).

O processo de desenvolvimento da antera de *A. thaliana* é descrito anatomicamente através de 14 estágios, divididos em 2 fases definidas: fase 1, ou de desenvolvimento precoce (estágios 1 a 8) e fase 2, ou de maturação e senescência (estágios 9 a 14) (Sanders et al., 1999). Duas etapas do desenvolvimento da antera (meiose e processos de maturação do grão de pólen) são mais detalhadas neste estudo, devido seu potencial implicado com a caracterização do gene em estudo. Os estágios iniciais da fase 1 (1-4) são marcados por eventos de divisão e diferenciação celular a partir dos primórdios estaminais que estabelecem células esporogênicas primárias (Scott; Spilman; Dickinson, 2004). O estágio 5 do desenvolvimento das anteras é marcado pela presença da célula-mãe do micrósporo, diferenciação de todos os tecidos e estabelecimento nítido dos quatro lóculos da antera (Sanders et al., 1999). Normalmente os tecidos da parede da antera apresentam-se em quatro camadas de células no interior de cada lóculo. Estas camadas podem ser identificadas do exterior para o interior da antera jovem como: epiderme, endotécio, camada média e tapete (Scott; Spilman; Dickinson, 2004).

As células epidérmicas constituem a camada mais externa da antera, tipicamente fina na maturidade e são oriundas da camada celular L1 do primórdio do estame (Scott; Spilman; Dickinson, 2004). O endotécio localiza-se subepidermicamente e apresenta espessamentos parietais especializados, garantindo função importante na deiscência das anteras, participando ativamente da expansão e deposição de espessamento secundário lignocelulósico (Wilson et al., 2001). A camada celular localizada mais internamente ao endotécio é denominada camada média e pode ocorrer em uma única camada de células, ou em uma bicamada celular e, excepcionalmente, pode se apresentar em até cinco estratos (Suzuki et al., 2013). Em geral, esta camada está relacionada a estrutura e suporte, pode ser transitória ou efêmera e em determinadas espécies podem ser persistentes até a deiscência da antera (Sanders et al., 1999).

No início do desenvolvimento das anteras, as células do tapete comunicam-se ativamente via plasmodesmos com o tecido esporogênico (Pacini, 2010; Lallemand et al., 2013) e participam na secreção ativa de moléculas para a maturação dos micrósporos (Hsieh; Huang, 2007). No final do desenvolvimento, as células do tapete sofrem morte celular programada e liberam os materiais de armazenamento, como compostos da parede celular (esporopolenina) (Chen; McCornick, 1996; Pacini, 2010), componentes de revestimento e reserva como "*pollenkitt*" (material lipídico, flavonóides, oleosinas) e ainda substâncias relacionadas à degeneração (Suzuki et al., 2013; Lallemand et al., 2013).

Os estágios finais (6-8) da fase 1 do desenvolvimento das anteras caracteriza-se pelo início da degeneração da camada média, vacuolização das células do tapete e consequente aumento de tamanho da antera. Além disso, nesta etapa ocorre a meiose onde a célula mãe do micrósporo sofre sucessivas divisões e ao final deste processo são geradas tétrades de micrósporos circundados por calose. Por fim, a degeneração da calose que circunda as tétrades ocorre e com isso há a formação de micrósporos haploides individuais dentro de cada lóculo (Sanders et al., 1999).

A meiose é um evento importante do desenvolvimento do grão de pólen e se dá através dos processos meióticos I e II. A meiose é um conjunto de divisões celulares conservados, essencial para a reprodução sexual eucariótica e que produz células haplóides a partir de células diplóides parentais. Existem dois ciclos de divisão nuclear, meiose I que envolve a segregação dos cromossomos homólogos e a meiose II que resulta na segregação de cromátides irmãs (Spielman et al., 1997; Scott; Spilmann; Dickinson, 2004).

Em relação ao desenvolvimento das anteras, a meiose I inicia-se com a prófase meiótica I, a partir de um espesso depósito de calose entre a membrana plasmática e a parede primária das células-mãe do micrósporo. Pontes citoplasmáticas se formam através da calose mantendo a comunicação entre as células, garantindo transporte e distribuição de nutrientes. Estas conexões desaparecem antes da meiose II e assim as células resultantes são isoladas no lóculo (Scott; Spilmann; Dickinson, 2004).

A citocinese é a etapa final da divisão celular e ocorre após a cariocinese. Em plantas, a citocinese inclui a formação da placa celular, uma estrutura membranosa que divide as duas células filhas. A citocinese é caracterizada por secreção extensa de proteínas e material da parede celular e é mediada por um aparato citoesquelético denominado fragmoplasto, composto por dois arranjos de microtúbulos anti-paralelos e filamentos de actina. Ao se expandir centrifugamente, o fragmoplasto utiliza, principalmente vesículas derivadas de Golgi, que se fundem para formar a placa celular em desenvolvimento em um processo de intensa secreção de proteínas e tráfego de membranas em direção ao plano de divisão celular (Livanos; Chugh; Muller, 2017).

Na meiose masculina em plantas, dois tipos diferentes de formação da placa celular ocorrem, a citocinese sucessiva e simultânea. Na citocinese sucessiva, cada divisão celular meiótica é seguida diretamente por um evento citocinético, enquanto que na citocinese simultânea, a formação da placa celular é desacoplada e a citocinese ocorre conjuntamente com as outras fases da meiose I. Geralmente a citocinese sucessiva ocorre em monocotiledôneas, enquanto o tipo simultâneo é característico dicotiledônias, como *A. thaliana*, que devido a essa variação meiótica, gera maior variação morfológica na formação das tétrades (De Storme; Geelen, 2013).

Após a cariocinese, ocorre a geração de dois núcleos haploides em quatro núcleos haploides em um arranjo tetraédrico. Após a meiose II, a célula sofre citocinese para produzir quatro células haplóides (Scott; Spilmann; Dickinson, 2004). No entanto, essas células reprodutoras necessitam de sobrevivência prolongada e exigem fortificação de suas paredes celulares através de polímeros capazes de resistir a possíveis estresses em sua dispersão, quando

liberados ao ambiente (Quilichini; Grienenberger; Douglas, 2015). Para isso, no início da fase 2 (estágios 9 e 10) do desenvolvimento das anteras, além do contínuo crescimento das mesmas e a vacuolização dos micrósporos, inicia-se o processo de maturação e ornamentação da parede do grão de pólen por meio de síntese e acúmulo de substâncias. A parede externa do grão de pólen, denominada exina, é formada por biopolímeros que são secretados pelas células do tapete e compreende as estruturas de maturação do grão de pólen (Ariizumi; Toriyama, 2011; Quilichini; Grienenberger; Douglas, 2015).

Em *A. thaliana*, os componentes lipofílicos da exina também são necessários para a adesão do grão de pólen ao estigma (Suzuki et al., 2008). Dentre as camadas da antera envolvidas neste processo, o tapete desempenha papel fundamental nesta formação realizando a liberação de constituintes a partir do tapete intacto e também através de morte celular programada de células do tapete, que se inicia no estágio 10 (Ariizumi; Toriyama, 2011).

A exina é dividida em duas camadas, nexinas (I e II) e a sexina. A sexina é a mais complexa das camadas. Possui uma estrutura tridimensional compreendida por ornamentações denominadas bácula ou columela e tetum, que garantem proteção aos gametas masculinos contra choques mecânicos, penetração de produtos químicos e infecções bacterianas durante a polinização (Ariizumi; Toriyama, 2011). A camada denominada trifino preenche os interstícios da superfície da parede do pólen entre as ornamentações, na fase final do seu desenvolvimento e é composta principalmente por lipídeos e proteínas armazenados em células do tapete (Ishiguro et al., 2010; Quilichini; Grienenberger; Douglas, 2015).

Os estágios finais da fase 2 (11-14) compreendem divisões mitóticas do grão de pólen, expansão e espessamentos secundários da camada endotecial e término da degeneração de células do tapete. Em seguida, o septo que separa os dois lóculos é enzimaticamente lisado, sofrendo colapso semelhante à morte celular programada, dividindo o estômio (Sanders et al., 1999). A lignificação do endotécio desencadea-se através de um pico do hormônio vegetal auxina, gerado na camada média nos estágios 9-10, leva ao gradual espessamento da parede do endotécio (Cecchetti et al, 2017). O aumento da rigidez estrutural conjuntamente com a desidratação das anteras, leva a formação de tensões estruturais que culminam na ruptura dos estômios e de consequência a liberação dos grãos de pólen (Wilson et al., 2001).

3.2 Defeitos na maturação de grãos de pólen

O desenvolvimento das anteras é um evento altamente controlado, que exige uma regulamentação rigorosa de todas as etapas. Esclarecer os mecanismos celulares e moleculares desse programa altamente sincronizado do desenvolvimento das anteras tem sido uma tarefa desafiadora. Nos últimos anos, o emprego de tecnologias genéticas tem permitido análises da expressão de genes relacionados ao desenvolvimento reprodutivo masculino em plantas (Verma, 2019). A obtenção de dados transcriptomicos juntamente com abordagens de genética reversa, resultaram em um impacto significativo na compreensão do desenvolvimento reprodutivo (Twell et al., 2006; Singh; Bhalla, 2007).

Avanços científicos como a acessibilidade facilitada ao genoma bem anotado de *A. thaliana*, disponibilidade de conjuntos de dados transcriptomicos abrangentes de *A. thaliana* (Zimmermann et al., 2004), acesso a análises de dados transcriptomicas do desenvolvimento masculino em plantas (Honys; Twell, 2004) associados à grande disponibilidade de mutantes que provocam a esterilidade masculina em *A. thaliana*, têm fornecido informações sobre os mecanismos moleculares envolvidos em diferentes estágios do desenvolvimento da antera (Verma, 2019).

Perfis distintos de dados transcricionais podem ser encontrados em diferentes fases do desenvolvimento masculino em plantas e têm contribuído para muitos estudos de caracterização de genes implicados nesses processos (Borg et al., 2009). Segundo Twell (2010) o grande número de genes expressos e a mudança entre as fases inicial e tardia do desenvolvimento do gametófito masculino exigem uma regulação coordenada dos genes em nível transcricional.

Com o objetivo de identificar genes relacionados ao desenvolvimento dos estames, Alves-Ferreira et al. (2007) utilizaram microarranjos de DNA na comparação da expressão gênica em plantas tipo selvagem de *A. thaliana*, com o de três mutantes que apresentavam defeitos durante o desenvolvimento dos estames: *apetala3-3 (ap3-3)*, cujo mutante não possui estames nem pétalas (Krizek; Meyerowitz, 1996); *sporocyteless/nozzle (spl/nzz)*, que apresenta defeitos em fases iniciais da esporogênese (Schiefthaler et al., 1999; Yang et al., 1999) e *male sterile-1 (ms1)*, que não produz pólen viável, mas apresenta fenótipo normal (Wilson et al., 2001; Ito; Shinozaki, 2002). Mutantes *ms1*, em contraste com plantas selvagens, não apresentam morte celular programada das células do tapete (Vizcay-Barrena; Wilson, 2006).

Os genes diferencialmente expressos, analisados por Alves-Ferreira et al. (2007), foram classificados em categorias funcionais, sendo que 6% deles codificam fatores transcricionais e

11% codificam componentes envolvidos em vias de sinalização intracelular. Durante os processos de maturação do grão do pólen, foram identificados genes que codificam proteínas com funções putativas na regulação ou transdução de sinais.

Um dos genes identificados como possível sinalizador intracelular, At2g40850, apresentou maior expressão em flores de plantas selvagens, quando comparada à de mutantes com ausência de estames ou tecido esporogênico. Plantas mutantes para o gene At2g40850 mostraram defeitos na formação de micrósporos (Alves-Ferreira et al., 2007; Pereira, 2007). Ainda de acordo com esses autores, plantas mutantes para o gene At2g40850 apresentaram diminuição no número de grãos de pólen, exibindo morfologia irregular e até esterilidade parcial masculina.

Análises de homologia de sequência indicaram que o gene At2g40850 pode codificar uma putativa fosfatidilinositol 4-quinase (Mueller-Roeber; Pical, 2002), predominantemente expressa durante estágios tardios de desenvolvimento da flor. Além disso, análises de expressão do gene $AtPI4K\gamma I$, sugeriram dois picos de expressão: um durante o início de desenvolvimento das anteras, na formação das tétrades e outro em estágios finais do processo de maturação dos grãos de pólen (Alves-Ferreira et al., 2007).

3.3 Fosfatidilinositóis - biogênese e ação

A composição e estrutura das membranas celulares permitem a ancoragem de moléculas hidrofóbicas, tais como: proteínas, esteróis, ceramidas, domínios transmembranares e lipídeos que permeiam a movimentação, troca de componentes e funções celulares (Spector; Yorek, 1985; Zinser et al., 1991). A composição lipídica das membranas celulares varia de acordo com o organismo, natureza celular, tipo de membrana, estado da célula (respondendo a um estímulo ou não) e com as funções específicas desempenhadas pelo compartimento celular (Zinser et al., 1991). É bem estabelecido que certos lipídeos funcionam como pontos de referência para especificar a identidade bioquímica do compartimento celular regulando por exemplo, transporte vesicular de proteínas entre compartimentos de maneira espaço-temporal (Simon et al., 2016).

Os principais lipídeos envolvidos na identificação de compartimentos celulares pertencem à classe dos fosfoinositídeos (PtdIns). Os PtdIns são o conjunto de fosfatidilinositóis fosforilados, pertencentes à classe de lipídios regulatórios de membrana, que podem atuar como ligantes para proteínas associadas à membrana (Eyster, 2007); modificar a atividade bioquímica de várias proteínas, incluindo enzimas, canais iônicos e ATPases (Heilmann; Heilmann, 2015);

ou influenciar as propriedades biofísicas de membranas (Lundbaek et al., 2010; Simon et al., 2016).

Os fosfatidilinositóis (PIs) são uma classe de lipídios de membrana encontrados em membranas eucarióticas e consistem em uma porção lipídica ligada a um grupamento cabeça inositólico, que podem ser diferencialmente fosforilados nas posições D3, D4 e D5 do anel inositol, pela ação de fosfatidilinositol quinases específicas, gerando diferentes isoformas, mono fosforilados (PtdIns 3P, PtdIns 4P e PtdIns 5P), bis-fosforilados (PtdIns 3,4P2, PtdIns (3,5)P2, PtdIns (4,5)P2 ou tris-fosforilados (PtdIns (3,4,5)P3) (Sasaki et al., 2009; Balla, 2013). A porção lipídica comum aos fosfolipídios consiste de duas cadeias de ácidos graxos esterificados em um esqueleto de glicerol ligados, via fosfato, ao grupamento cabeça (Figura 1) (Heilmann, 2016; Dickson; Hille, 2019).

Figura 1. Estrutura comum do fosfatidilinositol com possíveis locais de fosforilação. Preto: anel inositólico; roxo: possíveis sítios de fosforilação; verde: porção de glicerol; azul: cadeia de ácidos graxos



Adaptado de Heilmann, 2016.

Em plantas, apenas cinco das sete espécies de PtdIns conhecidas de outros sistemas eucarióticos, foram detectadas: PtdIns 3P, PtdIns 4P, PtdIns 5P, PtdIns (3,5)P2 e PtdIns (4,5)P2 (Heilmann; Heilmann, 2013). A presença de PtdIns (3,4)P2 e PtdIns (3,4,5)P3 em plantas não foi confirmada de forma confiável, até o momento (Heilmann, 2016). As isoformas monofosfatadas PtdIns 3P e PtdIns 4P são geradas a partir de PI por PI quinases específicas: PI 3-quinase (PI3K) e por, pelo menos, duas subfamílias de PI 4-quinases (PI4Ks), denominadas PI 4K α e PI 4K β , respectivamente (Mueller-Roeber; Pical, 2002).

PtdIns3P e PtdIns4P podem ainda ser adicionalmente fosforiladas por PI P-quinases (PIPKs), resultando na formação de PtdIns (3,5)P2 e PtdIns (4,5)P2. A formação de PtdIns (3,5)P2, a partir de PtdIns 3P, é catalisada por quatro PI 3P 5-quinases (PI3P5Ks), enquanto a conversão de PtdIns4P a PtdIns (4,5)P2 é realizada por PI 4P 5-quinases (PI4P5Ks), que são codificados no genoma de *A. thaliana* na subfamília A (isoformas PIP5K1-PIP5K9) e subfamília B (isoformas PIP5K10 e PIP5K11) (Mueller-Roeber; Pical, 2002). Em uma outra reação, ambas as subfamílias podem também converter PtdIns3P em PtdIns (3,5) P2. Até o momento, não há evidências de que PI-quinases (PIK) possam ser capazes de gerar PtdIns5P a partir de PtdIns, o que torna a biogênese deste lipídeo pouco clara (Heilmann, 2016).

PtdIns produzidos no retículo endoplasmático são transportados para o espaço extracelular através de transporte vesicular tradicional e mecanismos protéicos de transferência lipídica não vesicular, localizados em regiões específicas da membrana (Dickson; Hille, 2019). Em estudos relacionados a tráfego celular, foram identificadas vesículas altamente móveis, originárias do retículo endoplasmático, contendo enzimas envolvidas na síntese de PtdIns (Kim; Guzman-Hernandez; Balla, 2011). Posteriormente, essas vesículas foram relacionadas com a mediação e transporte de PtdIns à membrana plasmática e também com a ressíntese de fosfatidilinositol sintase em membranas celulares (Baskin et al., 2015).

Em relação às enzimas que participam do metabolismo de PtdIns, tem sido difícil atribuir funções catalíticas ou fisiológicas a muitos desses candidatos (Dickson; Hille, 2019, Galvão et al., 2008), dentre estas, PI4-quinases (PI4Ks) que realizam a conversão de PtdIns em PtdIns4P devido à fosforilação do anel de inositol na posição D4 (Boura; Nencka, 2015). O PtdIns4P assim gerado pode ser adicionalmente fosforilado por PI3Ks e PI4P 5-quinases (PI4P5 Ks) para produzir PtdIns 3,4 P2 ou PtdIns4,5 P2, respectivamente. Desta forma, PI4Ks desempenham um papel central no metabolismo de PtdIns, pois ao contrário de PI3Ks e PIP5 Ks, essas enzimas parecem usar apenas o PtdIns como substrato, não realizando fosforilações em espécies lipídicas mono, bis ou trifosforiladas (Frumar; Meyers; Cantley, 1998).

Duas subfamilias principais de enzimas PI4Ks, designadas de tipo II e III, foram identificadas (Mueller-Roeber; Pical, 2002). No genoma de *A. thaliana* há pelo menos 18 locus distintos que codificam proteínas PtdIns com domínios cinásicos. Destes, 12 locus são previstos para codificar AtPI4Ks, sendo quatro isoformas pertencentes ao grupo do tipo III (AtPI4K α 1, AtPI4K α 2, AtPI4K β 1 e AtPI4K β 2) e oito isoformas pertencente ao grupo do tipo II (AtPI4K α 1-AtPI4K γ 8) (Mueller-Roeber; Pical, 2002).

As isoformas do tipo III foram bem caracterizadas em animais (Stevenson; Perera; Boss, 1998; Xue, et al.; 1999; Stevenson-Paulik; Love; Boss, 2003; Boura; Nencka, 2015) e também são as mais conhecidas em plantas. As PI4Ks do tipo III podem ser divididas em duas subfamílias *alfa* e *beta* (PI4Ks III α e PI4Ks III β). PI4Ks III α é a principal isoforma responsável pela geração de PtdIns4P na membrana plasmática, enquanto que PI4Ks III β está principalmente associada com o aparato de Golgi (Gao; Zhang, 2012; Janda et al., 2013; Boura; Nencka, 2015). A família β é representada por proteínas de 68 a 122 kD e a família α por proteínas de 200 a 230 kD, com a exceção de PI4K α que em humanos é uma proteína de 97 kDa (Wong; Cantley, 1994).

Os oito genes de *A. thaliana* que codificam para indivíduos PI4Ks tipo II, foram agrupados na subfamília *gamma* ($AtPI4K\gamma I$ - $AtPI4K\gamma 8$) (Mueller-Roeber; Pical, 2002; Galvão et al., 2008). Nakamura et al. (2014) em experimentos de expressão diferencial de genes em botões florais de *A. thaliana*, identificaram um aumento da expressão de dois genes desta subfamília, $AtPI4K\gamma I$ e $AtPI4K\gamma 8$, o que sugere a participação destes durante o desenvolvimento floral. Em plantas de trigo, o gene $TaPI4KII\gamma$ identificado como putativa PI4K do tipo II, localizado na membrana plasmática, demonstrou atividade de autofosforilação treonina cinásica e, em estudos com mutantes *ubdk7*, ortólogos de *TaPI4KII* γ em *A. thaliana*, foi verificada tolerância salina e à seca nestas plantas (Liu et al., 2013).

Não há relatos de PtdIns4Ks do tipo II em animais, desta forma, até o momento, torna esse grupo uma peculiaridade de plantas. PtdIns4Ks do tipo II são proteínas menores (aproximadamente 55 kD) ligadas à membrana, com domínios cinásicos mostrando pouca homologia de sequência e até o momento não foram caracterizadas como PIKs (Galvão et al., 2008, Liu et al., 2013). A subfamília *Gamma* foi anteriormente categorizada por homologia de sequência do seu domínio PI3 / 4K (Mueller-Roeber; Pical, 2002), mas dados mais recentes mostraram que esta subfamília pode apresentar atividade de serina/threonina quinase (Tang et al., 2016). Como estudos evolutivos sobre sinalização via segundo mensageiro mostraram que as PIKs podem ter evoluído de serina/threonina quinases, ainda há incerteza se ensaios de

atividade da quinase executados em proteínas recombinantes poderiam ser confiáveis em relação à real natureza deste complexo (Brown; Auger, 2011).

Além da categorização por homologia de sequência do domínio PI3 / 4K, análises filogenéticas realizadas por Galvão et al. (2008), mostraram que o *cluster* contendo PI4K tipo II (AtPI4K γ) de *A. thaliana* pode ser dividido em três subgrupos, de acordo com a presença de domínios ubiquitina, e sugerem que *AtPI4K\gamma2, AtPI4K\gamma3 e <i>AtPI4K\gamma4* apresentam dois domínios ubiquitina, *AtPI4K\gamma5, AtPI4K\gamma6 e <i>AtPI4K\gamma7* apresentam apenas um domínio ubiquitina e que *AtPI4K\gamma1 e AtPI4K\gamma8 não possuem domínios ubiquitina.* Neste mesmo estudo, os autores comprovaram a atividade de proteína quinase em dois membros da subfamília *Gamma, AtPI4K\gamma4* e *AtPI4K\gamma7*, através de experimentos de fosforilação.

3.4 Fosfoinositídeos estão envolvidos em processos de sinalização celular

A regulação do transporte vesicular entre compartimentos celulares de maneira espaçotemporal faz com que seja necessária discriminação entre as organelas celulares e que muitas proteínas de sinalização realizem esta marcação de forma específica permanentemente ou transitoriamente (Simon et al., 2016). A discriminação entre compartimentos celulares é realizada com alta especificidade, pois a atribuição de identidades ocorre de maneira singular a cada organela celular e, às vezes, até a cada face de uma organela, como as faces *cis* e *trans* do aparato de Golgi (De Craene et al., 2017).

Para que a identificação dos compartimentos celulares seja efetiva, a modulação dinâmica das propriedades físico-químicas das membranas é necessária. As identidades e marcações são adquiridas pela presença combinada de moléculas de lípideos e de proteínas específicas que atuam como marcadores de membrana (Holthuis; Levine, 2005; Platre; Jaillais, 2016).

Muitos estudos apontam PIs como protagonistas no sistema de sinalização celular. A primeira grande e importante descoberta sobre a sinalização de moléculas realizada por PtdIns foi feita em animais. Berridge e Irvine (1989) identificaram dois mensageiros secundários derivados do metabolismo de uma fosfatidilinositol específica, o inositol 1,4,5-trifosfato e diacilglicerol (DAG) que participam ativamente na liberação de Ca²⁺ das reservas celulares e ativam proteínas quinases C (proteínas ativadoras de vias de transdução de sinais). Desde então, vários estudos têm mostrado que PtdInsP participam ativamente em vários processos celulares em animais, como a regulação dinâmica do citoesqueleto de actina (Lassing; Lundeberg, 1985; Janmey; Stossel, 1987; Brill et al., 2000), potencialização da ativação da proteína quinase C

(Oh et al., 1998) e a ativação de fosfolipase D (Pappan et al., 1997). PtdIns também podem atuar como ligantes lipídicos para proteínas-alvo que possuem domínios específicos de reconhecimento de PtdIns, como a homologia ao domínio Pleckstrin (PH), aos domínios Fab1 / YOTB / Vac1 / EEA1 (FYVE), a oxidase fagocítica (phox- ou PX) já que estes domínios conseguem distinguir entre diferentes tipos de fosfoinositídeos, gerando assim uma ligação específica (Lemmon, 2005).

Em plantas, apesar de haver menos informações do que em animais, ao longo do histórico de estudos relacionados, sabe-se que PtdIns podem participar na regulação de estruturas do citoesqueleto em células vegetais (Yang et al., 1993; Drobak et al., 1994), na polarização do crescimento do tubo polínico (Kost et al., 1999), alta sensibilidade ao inibidor químico wortamina (Endemann; Grazziani; Cantley, 1991) e possível interação das PtdIns na transdução de sinais, tais como a luz, hormônios e respostas ao stress (Munnik et al., 1998; Pokotylo et al., 2014) embora os efeitos relatados tenham sido limitados. Também foi demonstrado que o stress hiperosmótico pode induzir um aumento de PtdIns (4,5) P2 em células de *A. thaliana* (Pical et al., 1999; Pokotylo et al., 2014).

Em estudos recentes em plantas, alterações no metabolismo de PtdIns têm implicado diretamente a ativação de respostas imunes a patógenos (Antignani et al., 2015), participação na regulação da via de sinalização lipídica envolvida na divisão de cloroplastos (Okazaki; Miyagishima; Wada, 2015), mudanças funcionais no tráfego de membrana entre o Golgi e a membrana plasmática (Tejos et al., 2014; Zhao et al., 2010), no estabelecimento da polaridade celular, em defeitos na formação do tubo polínico, no tráfego de proteínas PIN em raízes (Ischebeck et al., 2008; 2011; 2013) entre outros. Alguns estudos têm indicado que PtdIns 4P, PtdIns 4,5P2, PtdIns 3,4,5P3 podem estar envolvidos na alteração das propriedades biofísicas da membrana pelo recrutamento de proteínas portadoras de cargas positivas (Heo et al.; 2006; Hammond et al.; 2012; Simon et al., 2016) ao delimitir regiões espcíficas de membranas.

Vários fenótipos severos foram relatados quando o metabolismo de PtdIns da planta é perturbado (Golani et al., 2013, Löfke et al., 2008; Mei et al., 2012; Novakova et al., 2014; Saavedra et al., 2011; 2015). Entretanto, os mecanismos moleculares relacionados às funções de PtdIns em plantas permanecem pouco claros, o que gera desafios na compreensão destes fenótipos. De forma geral, a rede de estudos relacionadas a PtdIns sugere que estão envolvidos no controle da maquinaria central do tráfego de membranas e sinalização celular, tendo um impacto em vários processos celulares (Heilmann, 2016).

A maioria das proteínas membranares apresenta uma combinação de vários domínios de ligação a lipídios (LBDs). A associação de proteínas com a superfície de membranas intracelulares envolve um conjunto de LBDs e domínios proteicos e variam amplamente os mecanismos de ligação entre as proteínas, permitindo modos distintos de controle (Lemmon, 2008). Exemplos desses mecanismos de ligação provêm de dados de leveduras e animais, nos quais PI3K tipo III foram implicados em várias funções celulares como citocinese, reciclagem de sinalização e em funções relacionadas à autofagia, fagocitose, tráfego endocítico através de domínios de ligação a lipídeos (Balla, 2013).

Rostislavleva et al. (2015), em estudos da estrutura cristalina do complexo PI3K indicam, através da dinâmica de domínios de ligação à membrana, a formação de diferentes complexos que podem desencadear diferentes respostas, ao marcar regiões específicas da membrana. PI3K classe III, conhecida também como Vps34, é necessária para produzir PtdIns3P, que é importante para todas as vias mediadas por vesículas para lisossomos, incluindo processos como fagocitose, autofagia, formação de corpo multivesicular.

Estudos têm comprovado a existência de mecanismos de detecção entre proteínas. Neste sistema denominado Coincidence Detection Mechanism (CDM), proteinas parceiras podem se unir de formas variáveis, o que permite a origem de complexos protéicos que podem atuar de maneiras diferentes ao reconhecer diferentes superfícies de membrana plasmática. Em leveduras, a produção de PtdIns 3P é totalmente dependente de Vps34 (Schu et al., 1993; Kihara et al., 2001), enquanto em fibroblastos de camundongo, um knockout de VPS34 indica que 65% de PtdIns 3P deriva de Vps34, enquanto cerca de 35% deriva de uma PI3K de classe II (Devereaux et al., 2013) o que sugere que Vps34 atue na formação de diferentes complexos com outras proteínas, formando pelo menos dois complexos, que fornecem respostas diferentes, onde o complexo I está envolvido na autofagia, enquanto o complexo II é essencial no direcionamento de proteína vacuolar (Kihara et al., 2001). Em células de mamíferos, o complexo II também está envolvido na autofagia, degradação do receptor e citocinese (Thoresen et al., 2010), bem como sinalização celular (Bago et al., 2014; McLeod et al., 2011). Os papéis cruciais dos complexos I e II nas respostas ao estresse levaram ao desenvolvimento de ativadores e inibidores, como os recém-desenvolvidos inibidores de adenosina trifosfato (ATP) do domínio VPS34 quinase (Bago et al., 2014; Ronan et al., 2014).

Recentemente Simon et al. (2016) utilizando um conjunto de biossensores de cargas de superfície de membrana, verificaram que cargas superficiais de membrana também são elementos chave para a localização de proteínas da membrana plasmática, como PINOID (PID) e o regulador negativo do receptor quinase de brassinosteróide (*BKI*1) e que são

predominantemente mediadas por PtdIns 4P, indicando que a sinalização mediada por PtdInsP também possui função de criar complexos diferenciais de proteínas de membrana. Este trabalho sugere ainda que, além da ligação eletrostática de proteínas às regiões de membrana ricas em PtdIns 4P, existe um sistema de regulação dupla para direcionar seletivamente proteínas para a membrana plasmática e / ou para o sistema de endomembranas, com participação das proteínas do fator ADP-ribosylation (ARFs).

Em outro estudo, o mesmo grupo demonstrou a existência de três diferentes gradientes eletrostáticos, um gradiente mais elevado na membrana plasmática, um gradiente intermediário nos endossomos iniciais e um baixo gradiente eletrostático nos endossomos tardios. Curiosamente, o gradiente eletrostático não é apenas definido pelos fosfoinositídeos, mas é o resultado de um efeito combinatório de vários fosfolipídios aniônicos como PtdIns, ácido fosfatídico (PtdOH ou PA) e fosfatidilserina (PS) (Platre, et al., 2018). A importância do PtdIns e de outros fosfolipídios aniônicos na modificação de cargas superficiais de membrana e, consequentemente, no impacto da deposição de proteínas polarizadas é evidente, e provavelmente ainda pouco se sabe sobre estas questões em plantas.
4 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos relatados neste trabalho foram realizados no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba, SP; no Structural Genomics Consortium (SGC/UNICAMP), Campinas, SP e no Centro Nacional de Biotecnologia do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB/CSIC), Madrid, Espanha.

4.1 Material Vegetal

Foram utilizadas neste trabalho sementes de plantas selvagem de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0) e sementes de plantas mutantes nocaute por inserção de T-DNA *AtPI4Ky1* (SALK_022869). Parte das sementes foram cedidas pelo Prof. Dr. Marcio Alves-Ferreira do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e parte foram oriundas da coleção de mutantes do *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC), Ohio State University, Ohio, EUA. Em relação às sementes oriundas da coleção de mutantes do ABRC, dois lotes de sementes foram utilizados: primeiro lote correspondente a linhagem *AtPI4Ky1* (SALK_022869) e segundo lote de sementes correspondente a linhagem *AtPI4Ky1* (SALK_022869c) homozigota confirmada.

As sementes foram desinfestadas em solução de etanol (70%, 2 min), seguido por Tween 20 (0,05%, 2 min) e novamente etanol (100%, 2 min). Uma vez secas, as sementes foram introduzidas em placas de Petri contendo meio de cultura ¹/₂ MS (Murashige; Skoog, 1962) solidificado com ágar (0.9% p/v). Após três dias a 4°C para vernalizar, as culturas foram mantidas em sala de crescimento, ou em fitotron, a temperaturas entre 21-23 °C, fotoperíodo de 16 h. Após duas semanas, as plântulas tipo selvagem e mutantes foram transferidas para substrato (mistura composta Plantmax® – Eucatex) e vermiculita (2:1) e mantidas sob as mesmas condições ambientais.

Plantas de *Nicotiana benthamiana* também foram utilizadas neste trabalho. Após a germinação das sementes, as plântulas foram transferidas para vasos individuais, contendo uma mistura de 2:1 de terra e substrato. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento com ambiente controlado, a temperaturas entre 21-23 °C, umidade relativa média de 55 %, fotoperíodo 12 h e irrigadas semanalmente com solução de macronutrientes (NPK 30-10-10). Para os experimentos de localização de proteínas e co-localização, foram utilizados indivíduos com 60-80 dias após a germinação.

4.2 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram preparados dissolvendo-se os respectivos componentes em água destilada e ajustando-se o pH quando necessário. Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave, a 120 °C, durante 20 min.

• Meio LB (Luria-Bertani)

Para 1 litro de meio LB foram adicionados 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 10 g de NaCl. Para o meio LB sólido, foi adicionado 1,5% de ágar bacteriológico.

• Meio MS para plantas (Murashige; Skoog, 1962)

Foram adicionados 4,4 g de sais MS, 30 g de sacarose, 0,5 g de MES em 1 litro de água destilada. O pH do meio foi ajustado para 5,8 com KOH 1M. Para meio sólido foram acrescentados 7 g/L de ágar bacteriológico. Ao meio de cultura MS, de acordo com a necessidade, foram adicionados diferentes antibióticos para seleção. Para meio de cultura ¹/₂ MS, foi utilizada a metade da concentração dos sais MS.

Meio YPD para leveduras

Para 1 L de meio YPD foram adicionados 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/l de peptona, 20 g/l de glucose, e para meios de cultura sólidos foram adicionados 20 g/l de ágar bacteriológico.

Meio YSD para leveduras

Para 1 L de meio YSD foram adicionados 6,7 g Yeast Nitrogen Base (YNB), 20 g de dextrose (D+glucose). Para meio YSD sólido, adicionou-se 20 g/l de ágar. Antes de ser utilizado, foram adicionados os aminoácidos necessários de acordo com a seleção desejadas (Tabela 1).

Componente	Quantidade
	(mg/L)
Isoleucine	300
L-Valine	1500
L-Adenine hemisulfate salt	200
L-Arginine HCl	200
L-Histidine HCl monohydrate	200
L-Leucine	1000
L-Lysine HCl	300
L-Methionine	200
L-Phenylalanine	500
L-Threonine	2000
L-Tryptophan	200
L-Tyrosine	300
L-Uracil	200

Tabela 1. Componentes da solução dropout para cultivo de leveduras

Meio TB Salt

Para 1 litro de meio TB *Salt* foram adicionados 24 g de extrato de levedura, 20 g de triptona, 4mL de glicerol, 0,017 M de tampão fosfato (0,17 M KH₂PO₄, 0,72 M K₂HPO₄) e 0,072 M KH₂PO₄. Após a autoclavagem, foram adicionados 100 mL de tampão fosfato esterilizado.

4.3 Preparo de células competentes para eletroporação

4.3.1 Escherichia coli

Inicialmente uma colônia de *E. coli*, cepas BL21 e DH5 α , foram cultivadas separadamente em 10 mL de meio LB líquido sob agitação (250 rpm), a 37°C, por 16 h. Todos os procedimentos posteriores descritos foram realizados separadamente para cada cepa. Em seguida, 10 mL da cultura foram inoculados em 100 ml de meio LB e cultivados a 37°C, sob agitação (250 rpm), até atingir D.O₆₀₀ entre 0,5 e 0,8. A cultura foi então incubada em gelo, por 30 min, e centrifugada a 4000 g durante 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 10 ml de H₂O ultrapura estéril, a 4°C, e centrifugado novamente.

Mais uma vez o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 10 mL de H_2O ultrapura estéril, a 4°C. Depois de nova centrifugação, as células foram ressuspensas em 20 mL de glicerol 10% estéril, a 4°C, e centrifugadas uma última vez. O precipitado foi finalmente ressuspenso em 2 mL de glicerol 10% estéril, a 4°C. As bactérias foram distribuídas em alíquotas de 40 µL e estocadas a -80 °C, até o momento do uso.

4.3.2 Agrobacterium tumefaciens

Inicialmente uma colônia de *A. tumefaciens*, cepa GV3101, foi cultivada em 5 mL de meio LB líquido acrescido dos antibióticos rifampicina (100 μ g/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL). A cultura foi mantida sob agitação (120 rpm), a 28°C, durante 16 h, e então inoculada em 200 mL de meio LB, crescendo nas mesmas condições até atingir D.O₆₀₀ entre 0,5 e 0,6. Em seguida, e cultura foi centrifugada a 6000 g, a 4°C, por 10 min. Depois de descartado o sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso em 10 mL de H₂O ultrapura estéril e a suspensão foi novamente centrifugada. Novamente foi descartado sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso em 10 mL de glicerol 10% estéril gelado. A suspensão foi mais uma vez centrifugada, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em 2 mL de glicerol 10% estéril. As bactérias foram distribuídas em alíquotas de 40 μ L e mantidas a -80 °C, até o momento do uso.

4.4 Transformação de células

4.4.1 Transformação de Escherichia coli por eletroporação

Todas as etapas foram realizadas em gelo. Inicialmente 2 μ L do DNA (~20 ng) foram adicionados a 40 μ L de suspensão de células competentes. Após 1 min, a mistura foi transferida para cuvetas de eletroporação (0,1 cm) (BIO-RAD), sendo em seguida submetida a um pulso elétrico de 3 s no eletroporador (Gene Pulser Apparatus BIORAD), regulado para 25 μ F, 200 ohms e 1,80 kV. Imediatamente após o pulso elétrico, 500 μ L de meio LB líquido foram adicionados à cuveta. A suspensão foi então transferida para um tubo e incubada a 37°C, por 1h, sob agitação (300 rpm). Em seguida, uma alíquota de 100 μ L foi plaqueada em meio LB sólido acrescido dos respectivos antibióticos de seleção e as culturas foram incubadas a 37°C, por 16h.

4.4.2 Transformação de Agrobacterium tumefaciens por eletroporação

A transformação de células de *A. tumefaciens* por eletroporação se deu de modo muito similar à preparação realizada em células de *E. coli* (item 4.4.1), sendo a incubação por 4 h, a 28°C, a 150 rpm antes de serem plaqueadas. A solução eletroporada foi plaqueada (200 µl a 500 µl) e incubada a 28°C por 48 horas.

4.5 Extração de DNA genômico

Para extração de DNA genômico total, foram utilizadas plantas adultas de *A. thaliana* tipo selvagem e mutantes. Discos foliares de cada indivíduo foram coletados e colocados em um microtubo de 1,5 mL contendo 400 μ L de tampão de extração (Tris 200mM pH 7.5; NaCl 50mM; EDTA 25mM pH 8.0; SDS 0,5%) e maceradas com o auxílio de um pistilo no próprio tubo. Em seguida a solução foi centrifugada a 13.000 rpm durante 2 min. O sobrenadante (300 μ L) foi transferido para um novo tubo. Depois do acréscimo de 300 μ L de isopropanol (100 %), o conteúdo do tubo foi misturado por inversão, deixado à temperatura ambiente por 2 min e em seguida centrifugado a 300 rpm, por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, contendo o DNA, foi lavado com 300 μ L de etanol (70%). Novamente o tubo foi submetido à temperatura ambiente, por 1 hora, e depois de seco, o DNA foi ressuspenso em 50 μ L de H₂O ultrapura e estocado a -20° C, até o momento do uso.

4.6 Genotipagem dos mutantes

As linhagens mutantes para o gene *AtPI4K* γI foram genotipadas através de PCR usando três iniciadores (Tabela 2). Para amplificar uma região de aproximadamente 900 pb do gene interrompido pelo T-DNA, foram utilizadas a combinação CA_LP F x CA_RP R e para amplificar um fragmento de 410 + 900 pb (300 pb entre a extremidade 3' do gene e o sítio de inserção do T-DNA, mais 110 pb entre a região de anelamento do iniciador LBb1.3 e a extremidade 5' do T-DNA), foram utilizadas duas combinações: CA_LP F x LBb1.3 e CA_RP R x LBb1.3 (Apêndice A). A PCR foi realizada em um volume de 25 µL contendo 50 ng de DNA genômico; deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) 0,2 mM; MgCl2 1,5mM; 0,2 µM de cada iniciador (Tabela 2); 0,5 U taq DNA Polimerase (InvitrogenTM); e tampão de amplificação (InvitrogenTM). A reação foi iniciada a partir de uma etapa de desnaturação a 94°C,

por 5 min, seguida de 40 ciclos (94°C 45 s, 59°C 1 min, 72°C 2 min 30 s) e uma etapa final de extensão a 72°C por 10 min.

Iniciadores	Sequência 5'3'
CA_LP F	5' CTGAATGCCTTCGTCCGTAT 3'
CA_RP R	5' TGGAGAAATCCCGAGTCATC 3'
LBb_1.3	5' ATTTTGCCGATTTCGGAAC 3'

Tabela 2. Sequências amplificadoras utilizadas para genotipagem dos mutantes

A Tabela 3 indica o resultado esperado do padrão de bandas oriundas das análises de genotipagem. A presença de bandas A ou B e A + B indica plantas homozigotas (podendo apresentar uma ou duas inserções de T-DNA), a presença de bandas A + C ou B + C, indica plantas heterozigotas e a presença de bandas C indica, categoricamente que a planta é selvagem. O gene *AtPI4Ky1* está localizado no cromossomo 2 de *A. thaliana* e não possui íntrons. Apresenta tamanho total de 1658 pb e, em plantas mutantes, o T-DNA interrompe a região codificante do gene, inserindo-se entre o códon de início e o domínio PI4Ky1. (Para maiores informações, consulte Apêndice A).

Iniciadores	Bandas	Fragmento esperado até 1º inserção de T-DNA	Fragmento esperado até 2º inserção de T-DNA	Genotipagem
CA_LP x LB 1.3	A	680 pb (380 + 300*)	600 pb	A = Homozigoto A + C = Heterozigoto
CA_RP x LB 1.3	В	1083	1169 pb (869 + 300*)	B = Homozigoto B + C = Heterozigoto
CA_LP x CA_RP	С	1467 pb	-	C = Selvagem

Tabela 3. Genotipagem das plantas provenientes de sementes de mutantes

* Pares de bases correpondentes à borda do T-DNA até o início dos iniciadores

4.7 Eletroforese em gel de agarose

Para checagem dos fragmentos de DNA os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (1%, w/v), preparado com tampão TBE 0,5X [50 mM Tris-base; 50 mM ácido bórico; 2 mM EDTA]; pH 8, agarose 1% e 0,5 µg/ml de brometo de etídeo (Sambrook; Fritsch; Maniatis, 1989). As amostras foram preparadas adicionando 1 µl de tampão de carregamento [0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol e 15% ficol tipo 400-DL] para cada 5 µl de amostra. O tempo e velocidade das corridas variaram de acordo com o tamanho do gel preparado, tamanho da cuba e do fragmento esperado. Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram inferidos com base na migração dos fragmentos do marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Após a eletroforese, o gel foi retirado da cuba e transferido ao sistema Kodak Gel Logic 100 Imaging System (Kodak). As imagens foram capturadas através do software que acompanha o sistema, e as condições de exposição e iluminação foram otimizadas para melhor visualização.

4.8 Extração de RNA

Inicialmente, os botões florais de plantas de *A. thaliana* previamente genotipadas, selvagens e mutantes para o gene $AtPI4K\gamma I$ foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. No mesmo dia, cada amostra (100-200 mg) foi macerada em nitrogênio líquido, utilizando-se microtubotubo de 2 ml e pistilos. O reagente TRIzol® (Ambion, Life Technologies) foi usado para extração de RNA, de acordo com as intruções do fabricante. Ao final da extração, o RNA de cada amostra foi ressuspendido em 30 µl de água DEPC 0,1%. As amostras foram quantificadas em NanoDrop e foram tratadas com a enzima DNAse para a degradação de eventuais moléculas de DNA genômico, que possam ter sido transferidas juntamente com o RNA durante a extração com o TRIzol. Este tratamento foi realizado segundo o protocolo do kit DNA-freeTM (Applied Biosystems).

4.9 Síntese de *c*DNA e RT-qPCR

O RNA tratado com DNase foi submetido a reação enzimática com a transcriptase reversa (SuperScriptTM III - 200 U/ μ l, Invitrogen) e convertido a *c*DNA. As reações foram feitas de acordo com os protocolos do fabricante. Para determinação dos níveis de expressão do gene de estudo, foram feitas reações de qRT-PCR utilizando-se o reagente SYBR® Green,

intercalante de DNA dupla-fita. A RT-qPCR foi realizada no equipamento PCR Rápido em Tempo Real 7500 (Applied Biosystems) e a amplificação foi realizada com iniciadores apresentados na Tabela 4. Em cada poço de uma placa de 96 poços foram misturados 3,6 μ L do *c*DNA (diluído 1:40), 6,4 mL dos iniciadores RT-PCR F e RT-PCR R (0,2 mM cada), e 10 μ L do SYBR Green PCR Master Mix. O controle negativo utilizado foi H₂O ultrapura estéril. As condições de PCR foram as seguintes: 95°C 5 min, 40 vezes (95°C 15 s; 60°C 1 min), e a curva de dissociação a 95°C 15 s, 50°C 1 min, 90°C 15 s. O gene normalizador utilizado nas análises foi o gene actina e como calibrador foi utilizado *c*DNA de uma planta mutante. Para cada amostra, foram feitas reações em triplicatas técnicas, diminuindo possíveis erros de pipetagem. As estimativas de quantificação relativa foram feitas pelo método Delta-Delta-CT (Pfaffl, 2001).

Nome	Sequência 5' 3'
RT-PCR F	5' GATGACTCGGGATTTCTCCA 3'
RT-PCR R	5' TGGTGTATCTCCACCGTCAA 3'
Actina F	5' TATGCCAACAGTGCTGTCTGG 3'
Actina R	5' TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT 3'

Tabela 4. Sequências amplificadoras utilizadas para análises de RT-qPCR

4.10 Caracterização anatômica e ultraestrutural do desenvolvimento de grãos de pólen mutantes para o gene *AtPI4Ky1*

4.10.1 Microscopia de luz

Com o objetivo de analisar o desenvolvimento de anteras e grãos de pólen tipo selvagem e mutantes para o gene $AtPI4K\gamma I$, botões florais de três plantas mutantes e de três plantas selvagens (controle) de *A. thaliana* foram coletados. Em seguida, as amostras foram fixadas em solução de Karrnovsky modificada (Karnovsky, 1965) (glutaraldeído (2%), paraformaldeído (2%), CaCl₂ (0,001 M) em tampão cacodilato de sódio (0,05 M)), pH 7,2, submetidas a vácuo até que os tecidos estivessem completamente submersos, e em seguida, foram mantidas sob refrigeração para posterior processamento das análises de microscopia de luz, ou eletrônica de transmissão.

Para o processamento de amostras para análises histológicas através de microscopia de luz, anteras em diferentes estágios de desenvolvimento (estágios 8, 9, 10 e 11) foram selecionadas de acordo com Sanders et al. (1999). Amostras fixadas foram desidratadas em série crescente de etanol (35-100 %), seguido de propanol (100 %) e butanol (100 %), seguido de infiltração em solução crescente de butanol:meio de infiltração (historesina, Leica), até meio de infiltração puro, seguido de emblocagem em historesina (Leica), à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio (0,1 M) e imediatamente pós- secções semifinas (5 µm) foram obtidas em micrótomo rotativo Leica (RM 2155), montadas em lâminas histológicas, coradas com fucsina ácida (0,05 %), seguida de azul de toluidina (0,01 %) e secas à temperatura ambiente. Posteriormente as secções foram recobertas com Entelan (Merck, Millipore) e lamínula, analisadas e fotografadas em microscópio de luz transmitida, Zeiss Axioscorp2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

4.10.2 Microscopia eletrônica de transmissão

As análises de microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas para estudo da ultraestrutura de anteras e grãos de pólen mutantes para o gene $AtPI4K\gamma Ie$ selvagens. Anteras (estágios 1-8) selecionadas de acordo com Sanders et al. (1999), coletadas, fixadas e mantidas sob refrigeração (item 4.10.1), foram lavadas em tampão cacodilato de sódio (0,1 M) e imediatamente pós-fixadas em tetróxido de ósmio (1%) por 1 h, seguido de lavagens em solução salina (0,9%) e pré coloração em acetato de uranila (2,5%).

Em seguida os botões florais foram desidratados em concentrações crescentes de acetona [50, 70, 90, 3x 100% (v/v); 10 min cada etapa]. As amostras foram gradualmente infiltradas em resina epoxy Spurr (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA, USA), nas proporções acetona 2:1 Spurr (1-2 h), acetona 1:1 Spurr por 12 h e por fim Spurr puro por 6 h. As amostras foram colocadas em moldes contendo Spurr e polimerizadas a 70°C por 48 h. As secções ultrafinas (60 nm) foram realizados com navalha de diamante em ultramicrótomo Reichert. A contrastação dos cortes foi realizada com acetato de uranila (2,5%) e citrato de chumbo, segundo Reynolds (1963). As secções foram observadas sob microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) e imagens digitais foram obtidas.

4.11 Elaboração dos vetores de expressão em plantas

Todas as reações de recombinação utilizadas nas clonagens neste trabalho foram realizadas utilizando o sistema Gateway (Gateway Technology, Life Technologies). As construções gênicas utilizadas, estão descritas na Tabela 5. Informações sobre os vetores utilizados (pGWB5 e pGWB6) foram baseadas em estudos realizados por Nakagawa et al. (2007). A construção gênica *35S::DDa1-*GFP foi cedida pelo Dr. Vicente Rubio, para uso como controle em experimentos de expressão transiente em *N. benthamiana*. A construção gênica *pAtPI4Ky1::AtPI4Ky1-*GFP, dirigida pelo promotor do gene *AtPI4Ky1*, foi cedida pelo Prof. Francisco Scaglia Linhares do Laboratório de Desenvolvimento Vegetal (LabDev) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). O gene *AtPI4Ky1* clonado no vetor de entrada PCR8 serviu como template para a realização das etapas posteriores das clonagens. As sequências amplificadoras utilizadas durante a elaboração e confirmação das clonagens de expressão estão descritas na Tabela 6.

Construção gênica	Vetor	Resistência em	Amplificadores	Espécie
<i>35S::AtPI4Kγ1-</i> GFP C-terminal	pGWB5 (Nakagawa et al., 2007)	canamicina e higromicina	PI4K.BF/PI4K3GLY.BR Amino-terminal	N. benthamiana e A. thaliana
<i>35S:: AtPI4Kγ1-</i> GFP N-terminal	pGWB6 (Nakagawa et al., 2007)	canamicina e higromicina	PI4K3GLY.BF/PI4K.BR STOP Carboxilo-terminal	N. benthamiana
<i>pAtPI4Ky1::AtPI4Ky1-</i> GFP	pHGWFS7	higromicina	(Cedido por F. Linhares)	A. thaliana
35S::DDa1-GFP	pGWB4 (Nakagawa et al., 2007)	-	Controle (Cedido por V. Rubio)	N. benthamiana

Tabela 5. Construções gênicas binárias utilizadas para expressão em plantas

Tabela 6. Sequências amplificadoras utilizadas durante a elaboração e confirmação das clonagens de expressão

Iniciadores	Sequência 5'3'
PI4K.BF	5' GGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTATATGAATTGCTTGGCTACGACC 3'
PI4K3GLYBR	<u>5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA</u> ACCGCCACCAATTTCGCAGGAG CATCCTA 3'
PI4K.3GLYBF	<u>5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGCCTA</u> TATGGGTGGCGGTATGATGAAT TGCTTGGCTA 3'
PI4K.BR STOP	<u>5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA</u> TCAAATTTCGCAGGAGCATCCT AATC 3'
M13 F	5' GTAAAACGACGGCCAG 3'
M13 R	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'
PI4K F	5' ATGAATTGCTTGGCTACGACC 3'
PI4K R	5' CAGCATGTCTGTCAAGGTTCAGG 3'
pDONR207 F	5' TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC 3'
pDONR207 R	5' GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC 3'
PI4K SEQ LR F	5' GAAGAGGAGGCAAGCAAG 3'
PI4K SEQ LR R	5' CGATGGATGTTGTCATCTTC 3'

4.11.1 CaMV35S::AtPI4Ky1-GFP / pGWB5

O gene AtPI4Ky1 presente no vetor PCR8 foi amplificado via PCR, utilizando os iniciadores PI4K.BF e PI4K3GLYBR (Tabela 6). Esta combinação de iniciadores apresenta as caudas att's do sistema Gateway, três glicinas ao final da cauda att no iniciador reverse e não apresenta STOP códon. A reação de PCR foi realizada utilizando o seguinte programa: 94 °C por 3 min, mais 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 52 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 4 min. O fragmento amplificado (1757 pb) correspondente ao gene AtPI4Ky1 foi excisado do gel de agarose (1%), purificado pelo Kit Quiaex II gel Extraction (Qiagen, Hilden, Germany) e sequenciado utilizando iniciadores M13F e M13R (Tabela 6). Após a confirmação do sequenciamento, o DNA purificado foi clonado no vetor de entrada pDONR207, utilizando a enzima Gateway BP Clonase (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, a reação de ligação foi introduzida por eletroporação em células eletrocompetentes de E. coli previamente preparadas. As células foram transferidas para meio de cultura S.O.C. (1 ml, S.O.C. medium - Invitrogen, Carlsbad, USA) e incubadas sob agitação (1 h; 180 rpm; 37 °C). Após este período, a suspensão (200 mL) foi plaqueada em meio de cultura LB suplementado com o antibiótico canamicina (50 mg m^{L-1}) e incubada (16 h; 37 °C) para o crescimento das colônias. As colônias obtidas foram analisadas por PCR, utilizando-se iniciadores PI4K F e PI4K R (Tabela 6) para a detecção do fragmento do gene AtPI4Ky1.

Posteriormente, a extração dos plasmídeos de colônias foi feita com o kit 'Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System' (Promega, Madison, USA) e os fragmentos correspondentes à reação de ligação foram isolados do gel de agarose e purificados pelo Kit Quiaex II gel Extraction (Qiagen, Hilden, Germany). Para confirmar a transformação, realizouse o sequenciamento da reação utilizando iniciadores do vetor pDONR207, pDONR207 F e pDONR207 R (Tabela 6). Por fim, após a confirmação da transformação, a reação de entrada *AtPI4Ky1*+ pDONR207 foi clonada no vetor de destino pGWB5 (Nakagawa et al., 2007), que apresenta o promotor constitutivo *CaMV 35S*, utilizando a enzima Gateway LR Clonase (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Para isto, a reação de ligação e células completentes de *E. coli* foram eletroporadas. A suspensão bacteriana foi então plaqueada em meio de cultura LB, suplementado com o antibiótico canamicina (50 mg/mL⁻¹), e incubada (16 h; 37 °C) para o crescimento das colônias e a confirmação da clonagem foi realizada por meio de PCR de colônias. Novamente realizou-se a extração dos plasmídeos de colônias com o kit 'Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System' (Promega, Madison, USA) e os fragmentos correspondentes à reação de ligação foram isolados do gel de agarose, purificados pelo Kit Quiaex II gel Extraction (Qiagen, Hilden, Germany) e sequenciados utilizando os iniciadores PI4K SEQ LR F e PI4K SEQ LR R (Tabela 6). Após a checagem da transformação por sequenciamento, os cultivos líquidos foram preparados e os estoques em glicerol (50 %), mantidos a -80°C.

4.11.2 CaMV35S::AtPI4Ky1-GFP / pGWB6

O gene $AtPI4K\gamma I$ presente no vetor PCR8 foi amplificado via PCR, utilizando os iniciadores PI4K.3GLYBF e PI4K.BR STOP (Tabela 6). Esta combinação de iniciadores apresenta as caudas *att* 's do sistema Gateway®, três glicinas após as caudas no iniciador foward e apresenta STOP códon. A reação de PCR foi realizada utilizando o seguinte programa: 94 °C por 3 min, mais 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 52 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 4 min. O fragmento amplificado (1769 pb) correspondente ao gene $AtPI4K\gamma I$ foi excisado do gel de agarose (1%), purificado pelo Kit Quiaex II gel Extraction (Qiagen, Hilden, Germany) e sequenciado utilizando iniciadores M13F e M13R (Tabela 6). Após a confirmação por sequenciamento, procedeu-se à clonagem no vetor de entrada pDONR207 e confirmação de todas as etapas subsequenes (item 4.11.1). Por fim, após a confirmação por sequenciamento, a reação de entrada $AtPI4K\gamma I$ +pDONR207 foi clonada no vetor de destino pGWB6 (Nakagawa et al., 2007), que também apresenta o promotor constitutivo *CaMV35S*. Todas as reações subsequentes ocorreram conforme descrito no item 4.11.1 deste documento.

4.12 Transformação genética de plantas de A thaliana pelo método "floral dip"

As construções gênicas para expressão em plantas $35S::AtPI4K\gamma I$ -GFP C-terminal (dirigida pelo promotor constitutivo 35SCaMV) e $pAtPI4K\gamma I::AtPI4K\gamma I$ -GFP (dirigida pelo promotor do gene $AtPI4K\gamma I$), foram introduzidas nas células competentes de *A. tumefaciens*. O cultivo de *A. tumefaciens* foi preparado a partir de uma colônia da bactéria contendo o vetor de interesse, cultivado por 24h em 5 mL de meio LB líquido acrescido dos antibióticos de seleção, no escuro, sob agitação de 120 rpm, a 28°C. Esse pré-inoculo foi colocado em 200 mL de meio LB líquido com os antibióticos de seleção e cultivado por 16h (ou até atingir OD₆₀₀ de 0,8), nas condições citadas anteriormente. A cultura foi centrifugada por 20 minutos a 10.000 g, e o precipitado ressuspenso em 200 mL de solução contendo sacarose (5 %) e surfactante Silwe L-77 (0,01 %). Em paralelo, plantas de *A. thaliana* foram cultivadas em câmara de crescimento até o momento da floração. Para quebrar a dominância apical e aumentar

o número de inflorescências, o primeiro eixo floral das plantas foi excisado. Dez a doze dias após o corte, os indivíduos apresentaram novas hastes florais com inflorescências. As inflorescências foram embebidas na solução de *A. tumefaciens* por cerca de 1 min, sob agitação manual. Depois do embebimento, as plantas inoculadas foram colocadas deitadas sob uma redoma plástica, durante 16 h, para manter elevada umidade. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento até apresentarem sementes maduras, que foram coletadas e estocadas a 4°C em dessecador, até o momento do uso. Para a seleção dos transformantes, sementes produzidas pelas plantas transformadas foram semeadas em placas de Petri contendo meio MS acrescido do antibiótico correspondente a resistência de cada construção gênica utilizadas durante o processo de transformação genética (Tabela 5).

4.13 Expressão transiente de ATPI4Ky1 em folhas de Nicotiana benthamiana

Os experimentos de expressão transiente de AtPI4Kγ1 em folhas de *N. benthamiana* foram realizados no Centro Nacional de Biotecnologia do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB/CSIC), Madrid, Espanha.

As construções gênicas *35S::AtPI4Ky1*-GFP (C-terminal) e *35S::AtPI4Ky1*-GFP (N-terminal) foram utilizadas para os ensaios de expressão transiente em folhas de plantas de *N. benthamiana*. Também foi utilizado o plasmídeo pCB301-p19, que contém a proteína de supressão do silenciamento gênico p19 do vírus do nanismo do tomate (TBSV – Tomato Bushy Stunt Virus) (Voinnet et al., 2003). Nestes experimentos, como controle positivo foi utilizada uma construção *35S::DDa1*-GFP devido sua expressão conhecidamente nuclear (Irigoyen et al., 2014) e, como controle negativo dos experimentos, foram utilizadas folhas de *N. benthamiana* não agroinfiltradas.

Uma colônia de *A. tumefaciens* contendo cada uma das construções gênicas e pCB301-p19 foi inoculada em 5 ml de meio de cultura LB líquido suplementado pelos antibióticos canamicina (50 mg/mL⁻¹) e rifampicina (25 mg/mL⁻¹) e mantidos por 24 horas a 28° C e 200 rpm. Em seguida, as culturas foram centrifugadas em tubo de 1,5 ml a 2500 x g por 5 minutos. O precipitado celular resultante de cada cultura foi ressuspendido em 1 ml de meio de cultura de ativação (10mM 2N-morpholino ethanesulfonic acid - MES; 10 mM MgCl2; 200µM de acetoseringona) e incubado em escuro por 4 horas. Após o período de incubação, a leitura de absorbância a 600 nm de cada cultura de ativação foi determinada e ajustada para o valor de 0,3 (OD₆₀₀ 0,3) com auxílio de meio de cultura de ativação. Em um tubo de 15 ml,

foram preparadas as seguintes misturas para agroinfiltração: $35S::AtPI4K\gamma I$ -GFP (C-terminal)+pCB301-p19; $35S::AtPI4K\gamma I$ -GFP (N-terminal)+pCB301-p19 e 35S::DDa1+p19. Ao final, adicionou-se a cada mistura 50 ul de acetoseringona (100 μ M).

O processo de agroinfiltração das misturas foi realizado em folhas jovens de plantas de *N. benthamiana* com aproximadamente um mês de idade, cultivadas em casa-de-vegetação. Com o auxílio de uma seringa de 1ml, a mistura de ativação foi delicadamente aplicada na face abaxial das folhas, até o surgimento de resistência por parte do tecido foliar, caracterizada pelo princípio de exudação da mistura injetada. Foram agroinfiltradas cerca de três a quatro folhas jovens de quatro plantas para cada amostra e em seguida as plantas foram mantidas em casade-vegetação por três dias, até o momento da análise em microscopia confocal.

4.14 Co-localização de ATPI4Kγ1 em linhagens marcadoras de compartimentos celulares "WAVE" reporter

A construção gênica 35S::AtPI4Ky1-GFP (C-terminal) foi utilizada para os ensaios de co-localização com marcadores de compartimentos celulares específicos "WAVE" repórter através da expressão transiente em N. benthamiana. Os marcadores "WAVE" são uma série de plasmídeos que foram geradas de maneira estável expressando fusões de proteínas marcadoras de compartimentos ccelulares através de tags fluorescentes espectralmente distintas. São seleções com padrões distintos de localização subcelular e expressão estável, não tóxica, multicoloridos, utilizados em análises combinatórias dos compartimentos das membranas das células das plantas, tanto em microscopia de imagem ao vivo como por microscopia imunoeletrônica (Geldner et al., 2009). Os plasmídeos contendo marcadores "WAVE" utilizados neste estudo foram previamente selecionados com base na literatura (Cardona-López et al., 2015) e estão descritos na Tabela 7. Para realizar os ensaios de co-localização da proteína desse estudo, após o crescimento de colônias de A. tumefaciens contendo a construção gênica 35S::AtPI4Ky1-GFP (C-terminal) e de A. tumefaciens contendo os plasmídeos das linhagens marcadoras "WAVE" selecionados, uma colônia de cada construção gênica foi inoculada em 5 ml de meio de cultura LB líquido suplementado pelos antibióticos canamicina (50 mg/mL⁻¹) e rifampicina (25 mg/mL⁻¹) e mantido por 24 horas à 28° C e 200 rpm. Além disso, também foi inoculada uma colônia de A. tumefaciens contendo o plasmídeo pCB301-p19 (Voinnet et al., 2003). O protocolo para ativação, incubação e inoculação de A. tumafeciens em folhas de *N. benthamiana* se deu conforme descrito anteriormente (4.13).

Número	Nome	U-clone	Localização
2	RabF2b	U09899	Late endosome/ pre-vacuolar compartment
18	Got1p homólogo	U63080	Golgi
24	Rab A5d	U22946	Endosomal/ Recycling endosome
33	Rab D2b	U10162	Golgi/ Endosomal

Tabela 7 - Marcadores "WAVE"* utilizados nos ensaios de co-localização

*Para uma visão geral das linhagens "WAVE" consulte Geldner, 2009

4.15 Análises em microscópio confocal

Com o auxílio de uma lâmina de bisturi, folhas de *N. benthamianas* previamente agroinfiltradas foram seccionadas em cortes de aproximadamente 2 cm². Os cortes foram posicionados em lâminas com uma gota de água ultrapura cobertas por lamínulas. As análises das amostras foram realizadas através do microscópio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems) do Centro Nacional de Biotecnologia / Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (CNB/CSIC) em Madrid/Espanha. O laser utilizado nas análises foi de argônio, e o comprimento de onda para excitação de cada fluoróforo foi: 488 nm para o GFP e 520 nm para o mRFP/mcherry. A captação no detector foi feita nos comprimentos de onda 500-590 nm para GFP e 545-600 nm para mRFP/mcherry. A aquisição das imagens foi realizada de modo sequencial, assim cada laser foi acionado separadamente, evitando crosstalking (interferências causadas pela excitação similar de fluoróforos). As capturas e montagens das imagens foram feitas através do software Leica LAS AF v.2x.

4.16 Extração da proteína ATPI4Kγ1 de *Nicotiana benthamiana* para confirmação da expressão transiente

Com o objetivo de confirmação da presença da proteína AtPI4K γ 1 em plantas de *N. benthamiana* utilizadas nos ensaios de expressão transiente, foi realizada a extração de proteínas das folhas agroinfiltradas. Para isso foram selecionadas somente as regiões foliares agroinfiltradas e coletado um disco foliar por folha agroinfiltrada de cada planta (totalizando 3 discos foliares) por amostra. A extração de proteínas foi iniciada a partir da maceração do tecido em nitrogênio líquido. Em seguida, foi adicionado 100 μ L de tampão extração (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM de phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma Aldrich), 0,5 M de SDS 20%, 8 M de uréia, 1 M dithiothreitol (DTT) (Sigma Aldrich)) e as amostras foram incubadas a 99° C, por 5 min. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm, por 10 min, e o sobrenadante foi separado e transferido para um novo tubo. Após o preparo das frações sobrenadantes dos extratos protéicos, estas foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE (do inglês, *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ou gel de poliacrilamida e análises de *Western blot*.

4.17 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Western blot

As amostras foram elaboradas a partir de 20 μ L de extrato proteico extraído adicionado a 10 μ L de tampão de carga (63 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 20% glicerol, 125 mM azul de bromofenol, 3 mM DTT e 10% de β -mercaptoetanol) e desnaturalizadas durante 5 min. Em seguida, foi realizada a preparação das duas fases do gel de poliacrilamida. Primeiramente foi feita a aplicação de 30 μ L da mistura com auxílio de microseringa em gel concentrador (4% de acrilamida:bisacrilamida (29:1) Biorad) e em seguida a aplicação de 15 μ L gel separador de 12%, preparados de acordo com Sambrook; Fritsch; Maniatis (1989). A solução tampão usada na corrida de eletroforese foi preparada a partir das soluções 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS (Tris-glicina 1x). A corrida dos géis se deu primeiramente a 35 mA, por 30 min, e em seguida, a 55mA, por 1 h. Após a corrida das amostras em gel de poliacrilamida, o gel foi colocado cuidadosamente sobre uma membrana de polyvinylidene difluoride (PVDF), Millipore de 0.45 μ m, previamente ativada, por 1 min, em solução metanol (20 %).

O sistema para transferência das amostras do gel para a membrana se deu através de 3 papéis filtro umedecidos em tampão de transferência (50 mM Tris, 40 mM glicina, 0,040 % SDS), membrana ativada, gel de policrilamida e 3 papéis filtro umedecidos em tampão de transferência novamente. O material preparado foi colocado em cuba de transferência e submetido a uma voltagem de 110 mA durante 90 min. Em seguida, a membrana foi incubada durante 1 h em solução bloqueadora de leite em pó desnatado (5 % leite em pó diluído em tampão TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween 0,05 %)). Depois de bloqueada, a membrana foi submetida a tríplice lavagem em tampão TBS por 10 min cada uma e incubada com 15 ml de anticorpo primário anti-GFP-HRP (produzido por Milteny Biotecnology, diluição 1:2000) à temperatura de 4 °C, overnight. No dia seguinte, novamente foi realizada a tríplice lavagem da membrana com tampão TBS, por 10 min cada, e submetida à quarta e última lavagem, por 10 min, em tampão PBS (Tampão TBS sem Tween). Posteriormente, para revelação do Western blot, foi utilizado o sistema de detecção ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham). Primeiramente as soluções 1 (1 ml Tris/HCl 1 M pH 8.5, 100µl Luminol 250 mM, 44 µl p-coumaric acid 90 mM, 8.85 ml dH₂O) e a solução 2 (6 µl H₂O₂ 30 %, 1 mM Tris/HCl 1 M pH 8.5, 9 ml dH₂O) foram misturadas e adicionadas em contato direto com a membrana, por 2 min. Em seguida, a membrana foi colocada dentro de um plástico e este foi acomodado em um cassete de autorradiografia GE Healthcare Amersham Hypercassette, com uma folha de filme sobre o plástico contendo a membrana. De acordo com a intensidade da luminescência, foi estipulado o tempo de incubação, podendo variar de 10 s a 40 min. Por fim, o filme foi revelado utilizando soluções comerciais (8610248 e 1562826, KODAK) de acordo com instruções do fabricante.

4.18 Ensaios de duplo-híbrido em leveduras Saccharomyces cerevisiae

4.18.1 Elaboração do vetor de expressão em leveduras isca/DNA-BD

Todos os experimentos de duplo híbrido de leveduras deste estudo foram realizados por meio do protocolo Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual, Takara Bio USA, Inc e foram desenvolvidos no Centro Nacional de Biotecnologia do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB/CSIC), Madrid, Espanha.

Para a elaboração do vetor de expressão isca/DNA-BD utilizado nos experimentos de screening de duplo híbrido em leveduras (Y2H) foi utilizado o vetor pGBKT7 (Clontech). O gene *AtPI4Kγ1* presente no vetor PCR8 foi amplificado via PCR, utilizando os iniciadores

PI4K.3GLYBF e PI4K.BR STOP (Tabela 6). Esta combinação de iniciadores apresenta as caudas *att s* do sistema Gateway, três glicinas após as caudas no iniciador foward e apresenta STOP códon. A reação de PCR foi realizada utilizando o seguinte programa: 94 °C por 3 min, mais 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 52 °C por 30 s, 72 °C por 1 min e uma extensão final de 72 °C por 4 min. O fragmento amplificado (1769 pb) correspondente ao gene *AtPI4Ky1* foi excisado do gel de agarose (1%), purificado pelo Kit Quiaex II gel Extraction (Qiagen, Hilden, Germany) e sequenciado utilizando iniciadores M13F e M13R (Tabela 6). Após a confirmação do sequenciamento, procedeu-se à clonagem no vetor de entrada pDONR207. Em seguida, a reação de entrada *AtPI4Ky1*+pDONR207 foi clonada no vetor de destino pGBKT7 (Clontech) com auxílio da enzima LR clonase. O vetor pGBKT7 inclui o promotor T7 entre o GAL4 DNA-BD e o promotor ADH1 e geram uma fusão GAL4 DNA-BD (Anexo B) clonando o gene de interesse *AtPI4Ky1 in frame* com o domínio de ligação ao DNA GAL4 do plasmídeo pGBKT7 (Tabela 8).

Tabela 8. Vetores utilizados nos experimentos de duplo-híbrido em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

Vetor	Promotor	BD*	AD**	Seleção em levedura	Seleção em bactérias	Observações
pGBKT7	t-ADH1	N-term	-	Trp (W)	canamicina	Descrito no item 4.18.1
pGADT7	fl-ADH1	-	N-term	Leu (L)	ampicilina	Cedido por V. Rubio

Baseado em Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual, Takara Bio, USA, Inc. *BD: Binding Domain; **AD: Activation Domain. Para maiores detalhes, consulte Anexo B.

4.18.2 Preparo de leveduras competentes Sacharomices cerevisae (Y187)

Para a transformação do clone isca ($AtPI4K\gamma I$ +pGBKT7) em levedura, o cultivo de *S. cerevisae* cepa Y187 foi realizado em meio de cultura YPD ou YPDA (mesma composição do meio YPD acrescido de 40 mg/L de adenina), a partir de uma colônia. A seguir, após checagem da DO₆₀₀ 0.6, as células foram submetidas a centrifugação, por 7 min, a 2.200 rpm; descarte do sobrenadante e lavagem do pellet com 50 ml de H₂0 ultrapura autoclavada; nova centrifugação das células, por 7 min, a 2.200 rpm, descarte do sobrenadante e lavagem do pellet com 25 ml de H₂0 ultrapura autoclavada; nova centrifugação das células, por 7 min, a 2.200 rpm; descarte do sobrenadante e lavagem do pellet com 2 ml de H₂0 ultrapura autoclavada e descarte do sobrenadante. Em seguida, o precipitado celular foi ressuspendido em 400 μ l de preparado fresco de 1X LiAc /1X TE estéril e as células foram submetidas ao processo de transformação.

4.18.3 Transformação por choque térmico do clone isca (*AtPI4Ky1*+pGBKT7)

A transformação do clone isca (*AtPl4Kγ1*+pGBKT7) em células competentes de *S. cerevisae* (Y187) foi realizada imediatamente após o preparo das mesmas. Todos os procedimentos foram realizados em gelo. Em um microtubo estéril foi adicionada uma alíquota da levedura competente contendo (100 µl); 1 µl (150 ug) do clone isca; 5 µl de esperma de salmão fervido (50 µg) e 600 µl de 40 % PEG-3350/1X LiAc/1X TE estéril. A mistura foi cuidadosamente homogeneizada e incubada, a 30°C, por 30 minutos, a 250 rpm. Em seguida, foram adicionados 70 µl de Dimetilsulfóxido (DMSO) estéril (Sigma Aldrich) e a mistura foi levemente homogeneizada. Posteriormente, a reação foi submetida à temperatura de 42 °C, por 15 min, e imediatamente transferida para gelo, por 2 min, induzindo o choque térmico. Cada suspensão de células foi plaqueada em uma placa de Petri de 15 cm contendo meio YSD-W (meio de cultura YSD, suplementado com todos os aminiácidos exceto triptofano) e as placas foram incubadas a 30 °C, por 48 horas.

4.18.4 Confirmação da transformação do clone isca (*AtPI4Kγ1*+pGBKT7) em Y187 por PCR de colônia

Para a confirmação da transformação do clone isca em Y187, foi realizada uma PCR de colônia de leveduras. Com um palito autoclavado, as colônias foram tocadas individualmente e o DNA foi dissolvido em 5 ul de água ultrapura autoclavada. A PCR foi realizada em um volume de 25 μL contendo 5 ul de DNA; 0,2 mM dNTP; 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 μM de cada iniciador; 0,5 U Platinum® Pfx DNA Polimerase (Invitrogen). Os iniciadores utilizados na reação foram: PI4K SEQ LR F e PI4K SEQ LR R (Tabela 6). A reação de amplificação se deu a partir da desnaturação, a 94 °C, por 5 min, seguida de 40 ciclos (94 °C 45 seg, 56 °C 1 min, 68 °C 2 min e 30 s) e uma etapa final de extensão a 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR obtidos foram visualizados em gel de agarose 1 % e purificados conforme instruções do fabricante QIAquick Gel extraction kit (Quiagen).

Antes do início dos experimentos de screening de duplo híbrido de leveduras, foi realizado um teste de autoativação da isca (BD) recém transformada. Para isso, foram preparadas 10 placas contendo o meio de cultura YSD suplementados com diferentes auxotrofias: –Ade; -His; -Leu; -Trp (-WLHA); -His; -Leu; -Trp (-WLH); -Leu; -Trp (-WL). Em placas com meio de cultura YSD sem histidina (YSD -WLHA e YSD -WLH) se adicionaram, como complemento para a seleção, diferentes concentrações de 3-amino-1,2,4-triazol (3AT) (1 mM; 5 mM e 15 mM), que é o inibidor do produto do gene *His*3, implicado na biossíntese de *S. cerivisae*.

Em seguida, foram gotejados 10 ul do inóculo (previamente crescido contendo a isca BD transformada em Y187), confirmada por meio de PCR de colônia e, distribuídos em 12 gotas, numeradas de 1 a 12 nas 10 placas de Petri, contendo o meio de cultura YSD suplementados com diferentes auxotrofias: 1 placa -W (controle positivo); 3 placas –WLHA contendo diferentes concentrações de 3AT (sendo 1 placa –WLHA + 1 mM de 3AT; 1 placa – WLHA + 5 mM de 3AT e 1 placa –WLHA + 15 mM de 3AT); 3 placas de –WLH (sendo 1 placa –WLH + 1 mM de 3AT; 1 placa de –WLH + 5 mM de 3AT e 1 placa de –WLH + 15 mM de 3AT); 3 placas –WL (sendo 1 placa –WL + 1 mM de 3AT; 1 placa de –WL + 5 mM de 3AT e 1 placa de –WL + 15 mM de 3AT) e foram incubadas, overnight, à 30°C.

Após a confirmação do teste de autoativação, foi inciado o screening de duplo híbrido de leveduras. Para isso, foi preparado um inóculo em meio de cultura YSD-W, a partir de uma colônia de levedura contendo a isca BD, e incubado por 24 h à 30 °C, sob agitação. A seguir, após checagem da DO₆₀₀ 0.7, foi preparado o estoque de glicerol 60 % e o mesmo foi armazenado em -80°C. A cultura restante foi distribuída em tubos de 50 ml e centrifugadas por 10 min, a 1000 rpm. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em meio de cultura YPDA, por duas vezes. Após as lavagens, o precipitado foi novamente ressuspenso e vertido em um erlenmayer de 2 L. Em seguida, foi adicionado 500 μ l da biblioteca de *c*DNA de botão floral de *A. thaliana*, clonada ao vetor presa pGADT7 (Clontech), cedida pelo Dr. Vicente Rubio. Por fim, a mistura foi incubada a 30°C, 100 rpm, por 24 horas.

Após o período de incubação, a mistura foi centrifugada a 2600 rpm por 10 min, à 4 °C e o pellet foi ressuspenso em 50 ml de NaCl (0,05 %) + YPDA 0,5X (1:1,5). Posteriormente, uma placa de 96 poços (Corning) foi preparada com a mistura e utilizada como molde para

replicar a cultura em placas de Petri de 15 cm, contendo os meios de cultura seletivos YSD suplementado com as auxotrofias: -Ade / -His / -Leu / -Trp (-WLHA, 28 placas); -His / -Leu / -Trp (-WLH, 8 placas); -Ade / -Leu / -Trp (-WLA, 9 placas); -Leu / -Trp (-WL, 3 placas (controle). Novamente, em meios de cultura sem histidina (YSD- WLH e YSD-WLHA) se adicionaram, como complemento para a seleção diferentes concentrações de 3-amino-1,2,4-triazol (3AT) (1 mM; 5 mM e 15 mM). A partir da placa de 96 poços, com o auxílio de uma pipeta multicanal, as células foram depositadas em formato de spots e, em seguida, as placas foram incubadas a 30°C, por 5 dias, para o crescimento das colônias. Após esse período, foram analisadas as colônias que cresceram nos diferentes meios seletivos. As colônias obtidas em meio de cultura YSD-Trp-Leu (YSD-2) foram selecionadas para ensaios enzimáticos X- α -galactosidase não letal.

4.18.6 Teste de X-α-galactosidase não letal

Colônias de *S. cerevisiae*, crescidas em meio de cultura YSD -WL, obtidas nos experimentos de screanning, foram submetidas ao teste de X-α-galactosidase não letal. Para isso, primeiramente, foi preparada a solução de detecção (20 mg/ml X-Gal em Dimetilformamida (Thermo Fisher Scientific), 1M de tampão fosfato pH 7.0 (1M KPi: 61,5 ml, 1M K₂HPO₄, 38,5 ml 1M KH₂PO₄ pH 7.0), 1g agarose de baixo ponto de fusão (preparada em 85 ml de tampão TAE) e, para 10 ml de agarose (placa 12 x 12 cm) foi adicionado 0,5 ml de 20 mg/ml X-α-galactosidase e 1ml de 1M tampão fosfato pH 7.0. Em seguida, a placa de Petri com meio de cultura YSD –WL, contendo as colônias, foi coberta com 20 ml de clorofórmio e incubada à temperatura ambiente por 7 min, em capela de exaustão. Cuidadosamente, após a incubação, o clorofórmio foi retirado por meio de escoamento e a placa de Petri foi invertida para secar, por aproximadamente 10 min. Após a secagem, foi adicionada a solução de detecção da agarose, a placa foi incubada à temperatura ambiente, overnight.

4.18.7 Identificação das proteínas candidatas à interação

Após a obtenção das colônias, foi realizada a extração de DNA plasmidial de leveduras. Com o auxílio de um palito autoclavado, cada colônia obtida foi tocada e inoculada em meio YSD líquido, incubada à 30°C, 250 rpm, overnight. Após este período, 2 ml da cultura foi centrifugada à 16000 x g por 1 min, à temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante, os precipitados celulares foram submetidos a extração com o kit ZymoprepTM Yeast Plasmid Miniprep I (Zymo Research), de acordo com as instruções do fabricante. Para identificação dos possíveis parceiros de interação de ATPI4K γ 1, 1 µl do DNA plasmidial extraído de levedura de cada colônia foi transformado em células de *E. coli*. Em seguida, as células transformadas foram plaqueadas em meio LB, suplementado com antibiótico ampicilina, para seleção das células que incorporaram apenas o plasmídeo da biblioteca de *c*DNA, o pDEST22. Após crescimento das colônias, uma única colônia foi selecionada e inoculada por 16h em meio LB líquido suplementado com ampicilina. Posteriormente, foi extraído DNA plasmidial do cultivo e submetidos à verificação da qualidade em eletroforese em gel de agarose (1%). O DNA obtido das colônias foi purificado através do QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen) e sequenciado utilizando os iniciadores descritos na Tabela 9. Após a obtenção das sequências, estas foram analisadas nos bancos de dados GenBank, através da ferramenta blastX, e TAIR, pela ferramenta tblastx, comparando-se com as sequências já existentes nestes bancos de dados.

Tabela 9. Sequências amplificadoras utilizadas no sequenciamento de colônias de leveduras obtidas no screanning de duplo híbrido

Iniciadores

Sequência 5'--- 3'

pGADT7 F 5' CTATTCGATGATGAAGATACCCC 3'

pGADT7 R 5' AGATGGTGCACGATGCACAG 3'

4.19 Expressão heteróloga e produção da proteína ATPI4Ky1

4.19.1 Clonagem independente de ligação (LIC)

Todos os experimentos de expressão heteróoga da proteína ATPI4K γ 1 foram realizados no Structural Genomics Consortium (SGC/UNICAMP), Campinas, SP. As informações sobre vetor, sequência proteica ATPI4K γ 1 e demais particularidades do sistema utilizado, estão em Anexo C e Apêndice B, respectivamente.

Todas as construções gênicas utilizadas para a expressão heteróloga em *E. coli* da proteína ATPI4Kγ1 foram realizadas com o sistema de clonagem independente de ligação (LIC) (Aslanidis; De Jong, 1990). Este método, simples e rápido, utiliza a atividade da enzima T4 DNA polimerase para criar sítios de anelamento individuais de 10-15 bases específicas no vetor de expressão, através de iniciadores específicos contendo uma sequência adesiva (cauda LIC). Desta forma, o tratamento com a enzima T4 permite a retirada das extremidades 3' dos fragmentos amplificados originando terminações livres e coesivas para a hibridização das terminações livres, coesivas e complementares do vetor.

Para o planejamento das diferentes construções de ATPI4Kγ1, primeiramente foi gerado um modelo tridimensional por homologia, baseado nas estruturas de alta resolução, com maior identidade sequencial à proteína de interesse. Esse modelo foi gerado por meio do software de bioinformática Swiss-Model (Waterhouse et al., 2018), baseado em alinhamento global e predição de estrutura secundária da proteína. Os resíduos limites para o desenho das construções propostas foram reconhecidos por inspeção visual com ajuda do programa Pymol, DeLano Scientific, através da sobreposição do modelo gerado por homologia (Swiss-Model) e em duas estruturas resolvidas das proteínas homológas depositadas no banco de dados de proteínas – PDB (do inglês, Protein Data Bank) (PDB IDs 4hne e 4pla) que correspondem a duas construções da human type II alpha Phosphatidylinositol 4-kinase (PI4KIIalpha) (Figura 2). Durante a inspeção visual, buscou-se preservar a delimitação das construções, mantendo íntegras estruturas secundárias (motivos) ou terciárias (domínios), buscando manter maior estabilidade das construções gênicas.

Após a definição dos resíduos limites foram gerados os iniciadores para a transcrição dos genes para cada versão de construção gênica, com exceção da construção "full-length" e que contou com o iniciador forward para o resíduo 1 e com o iniciador reverse para o resíduo 561. Ao redor dos domínios já cristalizados (verificados através do programa Pymol), foram desenhados três pontos de corte para o N-terminal e três para o C-terminal, preservando os seguintes resíduos de aminoácidos: N-terminal: 71, 97, 103 e C-terminal: 382, 389, 364 (Tabela 10).

Figura 2. Duas estruturas proteicas depositadas no banco de dados de proteínas – PDB que apresentam sequência de aminoácidos mais similares à ATPI4K γ 1. As duas estruturas (PDB IDs 4hne (A) e 4pla (B)) correspondem respectivamente a duas construções da human type II alpha Phosphatidylinositol 4-kinase (PI4KIIalpha). Os números indicados representam os resíduos indicados na Tabela 10 referente à proteína ATPI4K γ 1



Tabela 10. Sequências amplificadoras utilizadas nas clonagens de alta eficiência (LIC)

Inibidores	Sequência 5' 3'
1.Metionina F	5' TACTTCCAATCCATGAATTGCTTGGCTACGACCATAATC 3'
71.Valina F	5' TACTTCCAATCCATGGTTTCCTCTCCTTGCTTTTCC 3'
97. Ácido Glutâmico F	5' TACTTCCAATCCATGGAGATTCTTGGTGGACAGAGAG 3'
103. Arginina F	5' TACTTCCAATCCATGAGAGTGCCCACCGTTCG 3'
364. Valina R	5' TATCCACCTTTACTGTCAAACTGTGCAGACGACGAG 3'
382. Lisina R	5' TATCCACCTTTACTGTCACTTGGAGAAATCCCGAGTC 3'
561. Isoleucina R	5' TATCCACCTTTACTGTCAAATTTCGCAGGAGCATCC 3'

^{*}Foi adicionada a sequência dos adaptadores LIC para todos os primers utilizados. Para primers forward, foram adicionados TACTTCCAATCCATG à extremidade 5' (o ATG deve estar em fase com a sequência codante). Esse primer adiciona um resíduo de serina e um de metionina à extremidade N-terminal da proteína. Para primers reverse, foram adicionados TATCCACCTTTACTG à extremidade 5'. Esse primer adiciona um resíduo de glutamina e um códon terminador à extremidade C-terminal da proteína.

O processo de clonagem ocorreu por meio da amplificação dos fragmentos por PCR, usando 10 nmol dos iniciadores F e R, 30 ng de DNA genômico, 0,2 mM de dNTP Mix, uma unidade de Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Estados Unidos, MA) e 5 µl buffer Phusion, totalizando 50 µl de reação. A amplificação dos fragmentos foi realizada em termocilador Biorad, utilizando-se a rotina PCR touchdown: desnaturação inicial a 94°C, por 5 min, seguida de 35 ciclos (94 °C por 45 s, 54 °C por 1 min, 70 °C por 2 min 30 s) e uma etapa final de extensão a 72 °C, por 10 min. Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1 %).

Os produtos amplificados gerados na etapa anterior foram tratados com T4 DNA polimerase, para geração das caudas de terminais de fita simples, complementares às caudas terminais que serão geradas no vetor. O vetor de clonagem pNIC28-Bsa4 ^{Kan R} (que apresenta sequência para cauda de His-Tag N-terminal) foi utilizado em todas as construções gênicas desenvolvidas para a expressão heteróloga e foi cedido pelo Structural Genomics Consortium (SGC/UNICAMP). A preparação do vetor de clonagem se deu através da clivagem com a enzima de restrição *BsaI* e tratamento com a T4 polimerase (Fermentas, Life Science), que possui atividade exonucleásica 3'->5 (Sambrook; Russell, 2001). Em seguida, 2 µl de vetor tratado com T4 e 3 µl de insertos (previamente amplificados) tratados com T4 foram adicionados em um microtubo e incubados à temperatura ambiente, por 30 min, para reação de hibridização.

Logo após a combinação do vetor e fragmentos (Tabela 11), estes foram transformados em E. coli MACH1 pelo método de choque térmico e as células foram plaqueadas em meio de cultura LB contendo 50 mg/mL de canamicina e mantidas a 37 °C até o dia seguinte. A partir do crescimento das colônias bacterianas, foi realizada PCR de colônia, para avaliação de colônias que continham o plasmídeo recombinante. Colônias positivas confirmadas foram cultivadas em 1 mL de meio de cultura LB contendo canamicina (50 mg/mL), por 16 horas, a 37 °C, sob agitação. Uma parte dessa cultura (120 µl) foi utilizada para preparo de estoque glicerinado (15% de glicerol final) de bactéria e congelado em ultrafreezer (-80 °C) e do restante (880 µl) foi extraído o conteúdo plasmidial utilizando-se o kit comercial de Miniprep (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos). Em seguida, o material foi sequenciado no Laboratório Lactad da Unicamp, utilizando-se os pNIC28 F: iniciadores 5' 3' AGTAAAGGTGGATACGGATCCGA e pNIC28 R: 5' ATGGATTGGAAGTACAGGTTCTCGGTAC 3'.

Construção	Resíduos aminoácidos	Plasmídeo	Fragmento esperado*
1	1x561	pNIC28-Bsa4	aprox1990pb
2	1x389	pNIC28-Bsa4	aprox1470pb
3	1x382	pNIC28-Bsa4	aprox11450pb
4	1x364	pNIC28-Bsa4	aprox1400pb
5	71x561	pNIC28-Bsa4	aprox1780pb
6	71x389	pNIC28-Bsa4	aprox1260pb
7	71x382	pNIC28-Bsa4	aprox1240pb
8	71x364	pNIC28-Bsa4	aprox1110pb
9	97x561	pNIC28-Bsa4	aprox1700pb
10	97x389	pNIC28-Bsa4	aprox1180pb
11	97x382	pNIC28-Bsa4	aprox1160pb
12	97x364	pNIC28-Bsa4	aprox1110pb
13	103x561	pNIC28-Bsa4	aprox1680pb
14	103x389	pNIC28-Bsa4	aprox1170pb
15	103x382	pNIC28-Bsa4	aprox1140pb
16	103x364	pNIC28-Bsa4	aprox1190pb

Tabela 11. Construções gênicas binárias utilizadas para expressão heteróloga da proteína ATPI4K γ 1

*Fragmento esperado correspondente + 300pb caudas LIC

4.19.2 Teste de expressão da proteína ATPI4Ky1 em pequena escala

Após a confirmação por sequenciamento dos fragmentos amplificados na etapa anterior, os plasmídeos recombinantes (pNIC28-Bsa4) foram utilizados para nova transformação em cepas de expressão. Foram utilizadas duas cepas de *E. coli*, *E. coli* λ -Fosfatase (λ PPase), que contém a sequência que produz λ -Fosfatase (proteína responsável por impedir a fosforilação/autofosforilação no interior da bactéria) e *E. coli* BL21(DE3)-R3-pRARE2, que contém códons raros (derivada da cepa Rosetta2, Merck). Desta forma, foram testadas 32 construções gênicas, sendo 16 em cada cepa.

Para isso, colônias positivas confirmadas, contendo plasmídeos recombinantes, foram inoculadas em 1 mL de meio LB (contendo 50 mg/ml de canamicina e 35 mg/ml de cloranfenicol) em um bloco de 96 poços, sendo 1 poço para cada construção gênica. Esse bloco foi mantido sob agitação a 130 rpm, 37 °C, *overnight*. No dia seguinte, uma parte dessa cultura (120 ul) foi utilizada para preparo de estoque glicerinado (15% de glicerol final) e congelado a -80 °C (estoque de cepa de expressão). Em seguida, foi preparado um segundo bloco de 96 poços contendo 1 mL de meio TB Salt e 35 ul de canamicina e 50 ul da crescida na etapa anterior, por poço, respectivamente, para cada construção gênica. O bloco foi incubado a 37 °C, sob agitação, até atingir DO₆₀₀ entre 2 e 3. Logo em seguida, a temperatura foi reduzida para 18 °C e foram adicionados 0,5 mM de slsopropiltio-β-D-galactopironosídio (IPTG) aos poços, para indução da expressão. O bloco foi mantido a 18 °C, por 16 horas. Em seguida, procedeu-se ao teste de expressão, de acordo com o protocolo de Vincentelli et al. (2011). As amostras resultantes foram analisadas por SDS-PAGE, segundo protocolos descritos por Sambrook et al. (1989).

4.19.3 Produção heteróloga e extração da proteína ATPI4Ky1em larga escala

A partir do teste de expressão em pequena escala, a construção gênica que possibilitou a expressão da proteína em forma solúvel foi selecionada para produção em larga escala. Na noite anterior ao início da expressão foram preparados dois pré-inóculos (50 mL cada), em meio de cultura LB suplementado com canamicina (50 mg/mL) e cloranfenicol (34 mg/mL), a partir do estoque glicerinado do plasmídeo que expressou a proteína no teste em pequena escala. O crescimento do inóculo foi realizado *overnight*, a 37 °C, sob agitação, a 130 rpm.

Em seguida, aos dois pré-inóculos foram adicionados 1,5 1 de meio de cultura TB Salt suplementado com canamicina (35 mg/mL) e mantidos a 37 °C, sob agitação de 130 rpm, até se atingir uma D.O₆₀₀ entre 2 e 3. Imediatamente após atingir a D.O_{.600}, a temperatura foi reduzida até 18 °C e adicionou-se 0,5 mM de IPTG para indução da expressão, mantendo-se sob a mesma agitação, *overnight*. No dia seguinte, o inóculo foi centrifugado a 5500 rpm, por 30 min, descartando-se o sobrenadante. As células foram ressuspendidas em tampão de lise (50 mM Hepes pH 8,0, 500 mM NaCl, 5% (v/v) glicerol, 5 mM imidazol, 0,5 mM TCEP e 1 mM de PMSF) e sonicadas sob refrigeração no sonicador 550 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific), em ciclos alternados em modo "ON" e modo "OFF" por 5 s e 10 s, respectivamente, totalizando 8 min em modo "ON". Em seguida, foi adicionado 0,15 % de polyethylenimine (PEI) (Sigma Aldrich) à mistura, para precipitação dos ácidos nucleicos. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 15000 rpm, por 35 min, e o sobrenadante foi coletado. Como controles negativos, foram utilizadas colônias isoladas de *E. coli*, BL21(DE3)-R3-pRARE não transformadas, que foram induzidas nas mesmas condições.

4.19.4 Purificação da proteína ATPI4Kγ1

A etapa de purificação se inicia por meio da cromatografia de afinidade em resina de níquel, mais conhecida como IMAC (do inglês, Immobilized metal affinity chromatography). Inicialmente a solução sobrenadante, obtida na etapa anterior, foi aplicada no sistema de cromatografia por afinidade em resina de níquel acoplado ao sistema automático AKTApurifier 10 FPLC System. O sistema automático AKTApurifier foi abastecido previamente com as soluções necessárias (tampão de afinidade: 50 mM Hepes-NaOH, pH 7.5, 0,5 M NaCl, 10 mM imidazole, 0,5 mM TCEP e 5% de glicerol; tampão de lavagem: tampão de afinidade acrescido de 30 mM imidazole; tampão de eluição: tampão de afinidade acrescido de 300 mM imidazole, e tampão gel infiltração: 50 mM Hepes, pH 7.5, 0,5 M NaCl, 5% glycerol, 1 mM TCEP).

A solução sobrenadante (amostra) foi injetada na coluna equilibrada previamente com tampão de afinidade e em seguida, adicionou-se o tampão de lavagem para a retirada de proteínas fracamente ligadas à resina. Por fim, foi realizada a etapa de eluição da proteína de interesse, através da aplicação do tampão de eluição através da resina. A solução eluída foi coletada em frações de 1,8 mL automaticamente, em bloco de 96 poços. Em seguida, após a análise do cromatograma da amostra, frações de 1,8 mL de eluído, que supostamente contêm a proteína de interesse, são juntadas em um frasco e amostras de todas as fases, desde o sobrenadante (fase de expressão) até as lavagens e eluição (em solução de lise contendo 300 mL de imidazol), são preparadas para análise por meio de SDS-PAGE. Em seguida, a fração de eluição obtida foi quantificada em nanodrop e a partir da concentração obtida, foi adicionada a protease vírus do tabaco (TEV, do inglês "tobacco etch virus", Sigma Aldrich), na proporção de 1 mg de TEV para 10 mg de proteína. Essa mistura foi introduzida em uma membrana e submetida à dialise, *overnight*, contra tampão de gel infiltração, para clivagem da cauda de histidinas.

Após a diálise, a solução foi novamente aplicada a uma IMAC equilibrada com tampão de afinidade, desta vez o procedimento foi realizado na bancada, por gravidade. A fração que não interagiu com a resina de níquel, que corresponde à proteína de interesse clivada (sem a cauda de histidinas), foi recuperada como fração FT (*flow through*) da etapa de *rebinding*. Foram realizadas de três a quatro lavagens subsequentes, com tampão gel filtração adicionado de 30 mM e 60 mM de imidazol, respectivamente. A etapa final foi concluída com a eluição (passagem do tampão de eluição através da resina) fazendo com que a TEV (que contém cauda de histidinas) seja eluída. Em todas as etapas, foram coletadas alíquotas que foram analisadas por meio de SDS-PAGE.

Após a análise do SDS-PAGE e confirmação de quais frações, a proteína de interesse foi recuperada, foi realizada a concentração das frações proteicas em 5 mL. Esta solução concentrada foi aplicada na coluna de cromatografia por exclusão molecular, acoplada ao sistema de cromatografia líquida automática AKTA*purifier*, e submetida à cromatografia por exclusão molecular, utilizando uma coluna Superdex 200 10/300 GL calibrada (GE Healthcare). Durante a corrida do experimento, o volume de saída foi separado em frações de 1,8 µl em bloco de 96 poços. Alíquotas de cada fração ao longo dos picos do cromatograma foram coletados e analisados por SDS-PAGE. Em seguida, após a análise do SDS-PAGE, as frações consideravelmente puras foram unidas em um frasco único. Por fim, uma alíquota desta reação, contendo a proteína purificada, foi coletada e enviada para análise de massa intacta por espectrometria de massas.

4.19.5 Teste de desfosforilação e autofosforilação da proteína ATPI4Ky1

O ensaio para desfosforilação iniciou-se com a incubação da proteína purificada por 4 h, sob temperatura ambiente, em solução tampão (50 mM Hepes, 250 mM NaCl, 0,5 mM TCEP, 1 mM MnCl₂ com adição do inibidor de protease Lambda fosfatase a uma concentração final de 2 mM). Após o período de incubação, uma alíquota da amostra foi enviada para análise de massa intacta por espectrometria de massas, para análise do processo de desfosforilação. O restante da amostra foi submetido ao processo de *rebinding* em resina de afinidade por GST, para retirada da λ -Fosfatase. A resina foi empacotada em uma coluna de cromatografia por afinidade e, em seguida, a amostra foi aplicada. Após a passagem da amostra por gravidade através da resina, foi realizada a coleta da fração contendo a proteína ATPI4K γ 1 FT, já que esta não interage com a resina. Logo em seguida, foi adicionado ao FT, 1 mM de orto-vanadato de sódio, para inibição de moléculas de lambda fosfatase remanescentes.

Em seguida, para o ensaio de fosforilação, foi adicionado à fração FT, 10 mM de ATP e 15 mM de MgCl₂. Esta reação foi mantida sob temperatura ambiente, em bancada, *overnight*. No dia seguinte, uma alíquota da amostra foi enviada para análise por de massa intacta por espectrometria de massas.

4.19.6 Cristalografia – Ensaios de cristalização

Com o objetivo de organizar as macromoléculas da solução proteica em arranjos periódicos e organizados, após a purificação da proteína, os ensaios de cristalização foram realizados. Um dos objetivos principais do ensaio de cristalização é criar um ambiente propício para o crescimento de cristais da proteína de interesse. A partir de um cristal de proteína, é possível, por difração de raios-X, resolver sua estrutura em alta resolução, podendo-se elucidar/estabelecer uma relação fidedigna de estrutura-função.

Para isso, foi utilizado o método de difusão de vapor em gota sentada, que consiste na criação de um microssistema isolado contendo uma gota da solução da proteína (e também agentes precipitantes e sais) mantida em um suporte. Ainda dentro do sistema isolado, existe um reservatório, no qual estão presentes agentes precipitantes e sais em uma concentração maior, comparada à concentração desses componentes na gota. Como o sistema é isolado do meio externo, ocorre a transferência de vapor de solvente da gota para o reservatório, de modo a atingir o equilíbrio do sistema. Como consequência, o volume da gota diminui e a concentração da proteína aumenta lentamente. Esse processo lento de aumento da concentração permite que as proteínas encontrem uma orientação termodinamicamente favorável de interação uma a uma, culminando no crescimento da rede cristalina, os cristais.

Neste experimento foi utilizando o robô de cristalização Mosquito (TTP Labtech), o qual realizou automaticamente a distribuição de volumes em placas de cristalização (96 poços 3 Lens Crystallization low profile plate, Swissci), de acordo com a técnica de difusão a vapor com gota sentada, distribuindo a solução protéica (concentração de aproximadamente 15 mg/mL) e também as soluções comerciais. As diferentes soluções testadas para o reservatório foram obtidas através dos kits comerciais: HIN3, SALTRX, BCS5, LFS6, JCSG7 (Molecular Dynamics) e MORPHEUS (Hampton Research). Após a pipetagem automática, as placas de cristalização foram mantidas em câmara com temperatura controlada, a 20 °C. A inspeção de crescimento de cada gota foi realizada com 3, 7 e 15 dias após o experimento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Crescimento e caracterização das plantas

Primeiramente, com o objetivo de realizar experimentos de complementação de mutantes e a caracterização anatômica, sementes de *A. thaliana* selvagens ecotipo Columbia-0 (Col-0) e sementes de plantas mutantes nocaute por inserção de T-DNA *AtPI4Ky1* (SALK_022869) e *AtPI4Ky1* (SALK_022869c) foram vernalizadas e introduzidas *in vitro* para germinação (item 4.1). Durante os experimentos, as plantas foram cultivadas em dois locais distintos, em uma sala com a manutenção de temperatura a $22 \pm 2^{\circ}$ C e fotoperíodo de 16h, adaptada para o cultivo de *A. thaliana*, nas dependências do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, CENA/USP, ou em uma câmara de crescimento fitotron, com temperatura, fotoperíodo e umidade controladas, espaço cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira, do Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP.

No primeiro experimento, foi utilizado o material genético cedido pelo Prof. Dr. Marcio Alves-Ferreira (UFRJ) (item 4.1). Neste experimento, após a germinação das sementes, as plantas foram transferidas para substrato e cultivadas na sala de crescimento adaptada para o cultivo. Trinta plantas foram obtidas, sendo 10 selvagens e 20 mutantes para o gene $AtPI4K\gamma I$ (Figura 3A-B).

Aproximadamente 20-22 dias após o plantio das sementes, algumas plantas cultivadas na sala de crescimento, apresentaram fenótipo anormal, onde plantas mutantes apresentavam brotação lateral formando uma segunda roseta (Figura 3C-D). Neste experimento, não foi possível observar diferenças entre flores oriundas de plantas consideradas mutantes e plantas selvagens.

Figura 3: Plantas de *Arabidopsis thaliana* selvagens e mutantes para o gene *AtPI4Ky1*. A: Plantas mutantes para o gene *AtPI4Ky1*. B: Detalhe de planta mutante para o gene *AtPI4Ky1*. C: Planta mutante para o gene *AtPI4Ky1* com fenótipo anormal, mostrando brotações laterais que geraram novas rosetas e planta selvagem, respectivamente, obtidas em nosso laboratório. D: Detalhe de planta mutante para o gene *AtPI4Ky1*, com fenótipo anormal obtidas em nosso laboratório



A fim de comprovar o fenótipo observado e associá-lo à mutação, foi realizada a genotipagem das plantas, por meio de análise de PCR (item 4.6). Para todas as plantas analisadas, houve a amplificação do fragmento C, o que indica que, ou todas as plantas são selvagens (Figura 4, colunas 1C, 2C, 3C, 4C, 5C, 6C, 9C e 10C) ou são heterozigotas (Figura 4, colunas 7A, 7B, 7C e 8A, 8B, 8C) e, desta forma, nenhum mutante homozigoto para o gene *AtPI4Ky1* foi confirmado. Neste momento, percebeu-se que a mutação poderia ter se perdido no processo de produção de sementes e foi realizada a aquisição de um novo lote de sementes mutantes para o gene *AtPI4Ky1*, certificadas pelo ABRC.

Figura 4: Genotipagem por PCR, em gel de agarose (1%), de dez plantas provenientes de sementes de *A. thaliana* mutantes para o gene $AtPI4K\gamma I$ (sementes mutantes cedidas pelo Prof. Marcio Alves-Ferreira, UFRJ). L1Kb: Ladder 1Kb (Sinapse); 1a, 1b, 1c: planta 1 com a combinação de primers "a", "b" e "c" e assim sucessivamente para plantas de 2 a 10



L1Kb1a1b1c2a2b2c3a3b3c4a4b4c5a5b5c

Sementes oriundas da coleção de mutantes do ABRC, foram germinadas *in vivo* e 50 plantas foram obtidas, sendo 15 selvagens e 35 mutantes para o gene *AtPI4Ky1*. Estas plântulas foram plantas em substrato e transferidas para fitotron, onde foram mantidas em condições controladas (item 4.1).

Durante o desenvolvimento, muitas plantas apresentaram desenvolvimento lento e florescimento prematuro, tornando difícil a identificação do fenótipo de número reduzido de flores, característico da mutação e, em alguns casos, o desenvolvimento foi comprometido, levando à morte de plantas. Em busca da associação do fenótipo e genótipo destas plantas, uma nova análise de genotipagem foi realizada. Do total de 50 plantas analisadas, todas apresentaram a amplificação dos três fragmentos possíveis, A, B e C, o que indica que todas as plantas são heterozigotas para a mutação (Figura 5) e novamente, nenhum mutante homozigoto para o gene AtPI4Ky1 foi confirmado.

Figura 5: Genotipagem por PCR, em gel de agarose (1%), de oito plantas provenientes de sementes de *A. thaliana* mutantes para o gene $AtPI4K\gamma I$ (sementes mutantes oriundas do ABRC, Ohio, EUA). L1Kb: Ladder 1Kb (Sinapse); 21a, 21b, 21c: planta 21 com a combinação de primers a; b; c e assim sucessivamente para plantas 22, 23, 24, 25, 26, 27, e 28



L1Kb 21a 21b 21c 22a 22b 22c 23a 23b 23c 24a 24b 24c

A partir dos resultados da genotipagem das plantas, a busca por alternativas para a continuação dos estudos de complementação de mutantes nos levou ao conhecimento de sementes mutantes para o gene *AtPI4Ky1* provenientes de linhagens homozigotas confirmadas (SALK_022869c, ABRC), desta forma um lote destas foi adquirido. Sementes mutantes homozigotas confirmadas foram germinadas *in vivo* e, 50 plantas foram obtidas, sendo 15 plantas selvagens e 35 plantas mutantes para o gene *AtPI4Ky1*. Estas plântulas foram transferidas para substrato e mantidas no fitotron.

Durante o estabelecimento dessas plantas, observou-se falta de homogeneidade no crescimento e morte de 42 das 50 plantas, o que gerou a necessidade de instalação de quatro experimentos adicionais, com as mesmas condições anteriores, totalizando 250 plantas estabelecidas e 133 plantas mortas. Desta forma, 117 plantas foram submetidas à análise por
meio de genotipagem. Observações feitas ao longo do tempo de estabelecimento das plantas não nos permitiram observar diferenças entre o fenótipo de plantas selvagens e mutantes.

Do total de plantas analisadas por meio de genotipagem (117), apenas 16 plantas foram realmente identificadas como homozigotas para a mutação. A Figura 6 indica um dos géis provenientes da genotipagem, onde foi possível identificar homozigose para a mutação do gene *AtPI4Ky1* apenas na planta 10, de acordo com a amplificação da banda A.

Figura 6: Análise de PCR em gel de agarose (1%) de plantas provenientes de sementes de *A. thaliana* mutantes para o gene *AtPI4Ky1* (sementes mutantes homozigotas confirmadas adquiridas do ABRC, Ohio State University). L1Kb: Ladder 1Kb (Sinapse); 2a, 2b, 2c: planta 2 com a combinação de primers a; b; c e assim sucessivamente para plantas 5, 7, 10, 12, 15, 17, 18 e 19, totalizando 9 plantas



L1kb 2a 2b 2c 5a 5b 5c 7a 7b 7c 10a 10b 10c 12a 12b

A ausência de plantas homozigotas para a mutação em estudo, em sucessivos experimentos, gerou dificuldades em entender o comportamento desse mutante. Whitley et al. (2009) em estudos fenotípicos de mutantes *fab1a* e *fab1b*, apontam resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho. De acordo com esses pesquisadores (Whitley et al., 2009),

cerca de 50 progênies resultantes das polinizações foram analisadas quanto à presença de alelos mutantes (fab1a-1 ou fab1b-1) e nenhuma planta foi encontrada como sendo gerada por pólens fab1a-1 / fab1b-1. Concluíram que a viabilidade de grãos de pólen dessas plantas mutantes é significativamente reduzida e, devido à baixa viabilidade dos grãos de pólen, flores que não possuem grãos de pólen viáveis para autofecundação, podem ser polinizadas por grãos de pólen de outras plantas que estejam no ambiente, devido à polinização cruzada, ocasionando competição gametofítica e levando à perda da homozigose da mutação e a reinserção de genótipos selvagens, mesmo trabalhando somente com a progênie de plantas homozigotas mutantes. As causas da ausência de fenótipo nas plantas mutantes do presente estudo podem ser semelhantes aos resultados observados por Whitley et al. (2009), pois grande parte dos grãos de pólen produzidos pelas plantas mutantes para o gene $AtPI4K\gamma I$ são inviáveis (Pereira, 2007). É importante ressaltar que em estudos realizados por Pereira (2007) plantas heterozigotas para a inserção de T-DNA no gene $AtPI4K\gamma I$ apresentavam fenótipo indistinguível de plantas tipo selvagem, caracterizando a mutação insercional como recessiva.

Em relação ao estabelecimento das plantas, muitas dificuldades impediram a continuação dos experimentos de complementação de mutantes e caracterização anatômica do mutante. Durante o desenvolvimento de plantas mutantes confirmadas originárias de sementes SALK 022869c, notou-se a presença da praga de solo *Fungus gnatus* (Diptera: *Sciaridae*) em vasos. As larvas deste inseto, normalmente se alimentam de fungos presentes no substrato de cultivo e de raízes, levando as plantas à morte. Esta dificuldade foi de difícil controle e visando transpor esta barreira, foi realizado uso de armadilhas para controle do mosquito adulto e do composto comercial "Denguetech". Outra dificuldade para o desenvolvimento das plantas foi a característica multiusuária do fitotron, que proporcionou condições de temperatura ideais de crescimento para *A. thaliana* de forma sazonal durante os experimentos estabelecidos. Após a realização dos testes de genotipagem, foi estabelecida a necessidade de genotipar todas as plantas para as próximas etapas do trabalho e de conhecer os níveis de expressão do gene *AtPI4Ky1*em relação as plantas selvagens.

5.2 Análise de expressão do gene *AtPI4Ky1* por RT-qPCR

Botões florais de três plantas de *A. thaliana*, oriundas do experimento estabelecido anteriormente, genotipadas e confirmadas mutantes homozigotas para o gene *AtPI4Ky1*, e de uma planta selvagem, foram coletados para análise da expressão gênica por RT-qPCR. O gene actina foi utilizado como gene de referência nestas análises. Para todas as plantas analisadas,

foi detectada a expressão do gene $AtPI4K\gamma I$ (Figura 7). Foram verificados, níveis duas vezes mais baixos de expressão do gene $AtPI4K\gamma I$ em plantas mutantes, quando comparados aos níveis de expressão deste na planta selvagem (Figura 7, colunas 1 e 11). Em estudos de padrão de expressão do gene $AtPI4K\gamma I$ realizados por Pereira (2007) também foram observados níveis de expressão gênica reduzidos em flores de *A. thaliana* mutantes quando comparados aos níveis de expressão deste gene em plantas selvagens, com a expressão do gene $AtPI4K\gamma I$ 40 vezes menor do que em plantas selvagens. Neste caso, vale ressaltar que a especificidade de tecido analisado foi distinta entre os dois estudos, já que Pereira (2007) analisou a expressão do gene em flores enquanto na presente análise, optou-se pela análise da expressão gênica em botões florais. Também foi possível observar que os resultados de expressão são bastante consistentes entre as três amostras de plantas mutantes analisadas neste trabalho.

Figura 7: Análise da expressão genica de $AtPI4K\gamma I$ por RT-qPCR. wt – planta selvagem; 6, 11 e 20 – plantas mutantes homozigotas confirmadas para o gene $AtPI4K\gamma I$. A planta 11 foi utilizada como calibrador nestas análises. O gene ACT foi utilizado como referência



5.3 Caracterização anatômica e ultraestrutural do desenvolvimento de grãos de pólen mutantes para o gene *AtPI4Ky1*

Com o objetivo de caracterizar alterações no desenvolvimento de grãos de pólen mutantes para o gene *AtPI4Ky1*, plantas de *A. thaliana* selvagens e mutantes homozigotas confirmadas por genotipagem e com os níveis de expressão avaliados por RT-qPCR, em antese, foram coletadas para as análises anatômicas e ultraestruturais. Foram analisadas amostras de anteras de três plantas mutantes para o gene $AtPI4K\gamma I$, denominadas #4; #9 e #10, e de uma planta selvagem. As células mãe-do-micrósporo apresentaram-se semelhantes entre amostras da planta selvagem (Figura 8) e mutantes (Figuras 9-11), entretanto, ao final da meiose alguns grãos de pólen de plantas mutantes apresentam tétrades malformadas e de tamanhos diferentes em comparação com grãos de pólen selvagens (Figura 8D; Figura 9E-F; Figura 10E-F e Figura 11E-F).

De acordo com a possível função atribuída ao gene *AtPI4K*γ*1*, estas observações podem sugerir um distúrbio na progressão meiótica, ocasionando um defeito durante a meiose I em plantas mutantes, possivelmente na formação do fragmoplasto durante a citocinese. Esse possível defeito pode ser relacionado ao fato da ocorrência de citocinese simultânea, típica de dicotiledôneas, em plantas de *A. thaliana*, na qual não há formação de uma banda pré-meiótica (Brown, 1991; Bhatt, Canales, Dickinson, 2001). Com isso, as tétrades resultantes são mais variáveis em morfologia, exibindo arranjos tetragonais, romboidais e tetraédricos (De Storme; Geelen, 2013).

Outros fatores relacionados à citocinese simultânea, como a distribuição desigual de feixes de microtúbulos também podem ocasionar anormalidades citocinéticas, incluindo perda do estabelecimento da parede celular (Shamina et al., 2007; De Storme; Geelen, 2013). Ainda que, grãos de pólen malformados tenham sido observados em maior número em plantas mutantes, também foram observados em plantas selvagens (Figura 8E) e, em nossas observações estas alterações não foram analisadas em relação à frequência de ocorrência, o que dificulta a atribuição deste fenótipo à mutação. Além disso, as etapas do desenvolvimento dos grãos de pólen não estão exatamente sincronizadas entre plantas selvagens e mutantes, isto pode também ser decorrente de dificuldades encontradas com as condições de cultivo.

Figura 8 - Desenvolvimento de antera e micrósporo em plantas selvagens de *A. thaliana* A-F: Micrósporos individuais nos estádios de desenvolvimento 1-7. ac: célula arcosporial; ca: calose; cn: conectivo; dy: díade; ed: endotécio; ep: epiderme; mc: micrósporo; ml: camada média; mmc: célula mãe do micrósporo; sc: célula esporogênica; ta: tapete; te: tétrade. As setas indicam a primexina (camada de células ao redor de cada micrósporo relacionada com a estrutura da exina). Barras: A-F = 60 μ m



Figura 9 - Desenvolvimento de antera e micrósporos no mutante $AtPI4K\gamma I$ (planta #4) de *A. thaliana*. A-F: Micrósporos individuais nos estádios de desenvolvimento 1-7. ac: célula arcosporial; ca: calose; cn: conectivo; dy: díade; ed: endotécio; ep: epiderme; mc: micrósporo; ml: camada média; mmc: célula mãe do micrósporo; sc: célula esporogênica; ta: tapete; te: tétrade. As setas indicam a primexina. Barras: A-F = 60 µm



Figura 10 - Desenvolvimento de antera e micrósporos no mutante $AtPI4K\gamma I$ (planta #9) de *A. thaliana*. A-F: Micrósporos individuais nos estádios de desenvolvimento 1-7. ac: célula arcosporial; ca: calose; cn: conectivo; dy: díade; ed: endotécio; ep: epiderme; mc: micrósporo; ml: camada média; mmc: célula mãe do micrósporo; sc: célula esporogênica; ta: tapete; te: tétrade. As setas indicam a primexina. Barras: A-F = 60 µm



Figura 11 - Desenvolvimento da antera e micrósporos em plantas mutantes $AtPI4K\gamma I$ (planta # 10) de *A. thaliana* nos estádios 1 a 7 (Sanders et al. 1999). A-C anteras com desenvolvimento de células arqueosporiais (A), esporogênicas (B) e célula mãe do micróporo (C); D-F: anteras apresentando micrósporos individuais, díades e tétrades. ac: célula arcosporial; ca: calose; cn: conectivo; dy: díade; ed: endotécio; ep: epiderme; mc: micrósporo; ml: camada média; mmc: célula mãe do micrósporo; sc: célula esporogênica; ta: tapete; te: tétrade. Barras: A-F = 60 µm



A observação de micrósporos malformados analisados por microscopia de luz, sugeriu a realização de análises ultraestruturais. Em amostras de plantas mutantes (Figura 12D-F) observam-se células de tapete com vacúolos maiores (Figura 12A), maior número de elaioplastos (Figuras 12D-E) e possíveis defeitos durante a formação da exina (Figura 12F), se comparados a amostras de plantas selvagens (Figuras 12A, B e A, respectivamente). Observase, também, que os elaioplastos presentes em células do tapete, estão presentes em maior número e com menor tamanho em plantas mutantes, quando comparado às amostras de plantas selvagens (Figura 12E, setas vermelhas). Em estudos realizados por Alves-Ferreira et al. (2007) também foram verificados possíveis defeitos associados a células do tapete, embora não precisamente em vacúolos e elaioplastos. Análises ultraestruturais de anteras mutantes para o gene $AtPI4K\gamma I$, mostraram diferença significativa na quantidade e morfologia de estruturas de armazenamento denominadas tapetossomos, os quais em plantas mutantes, eram escassos e subdesenvolvidos e, em plantas selvagens, numerosos e desenvolvidos (Pereira, 2007).

Sobre aspectos do desenvolvimento tardio do grão de pólen (Figura 12A e F), sugerimos que possa ocorrer um defeito na deposição da exina, na parede do grão de pólen, principalmente na formação do tetum, ocasionando má formação destas estruturas. Este mecanismo é relacionado ao processo de vesiculação de substâncias de maturação na superfície do grão de pólen e, em um estudo realizado com mutantes nocaute dos genes FAB1 de A. thaliana (fab1A e fab1b), que codificam PI3P5Ks, foram identificados defeitos durante a biogênese vacuolar no desenvolvimento dos grãos de pólen, resultando em falha formação do grão de pólen maduro fértil (Whitley et al., 2009). Porém, em nosso trabalho essas observações foram observadas esporadicamente, não ocorrendo em todas as amostras de mutantes analisadas (Figura 12C e F) e, como mencionado anteriormente, as etapas de desenvolvimento dos grãos de pólen não se apresentaram sincronizadas entre plantas selvagens e mutantes. Futuramente, uma análise suplementar para caracterização mais detalhada do desenvolvimento dos grãos de pólen nesse mutante poderá envolver a análise morfológica dos grãos de pólen através de microscopia eletrônica de varredura. Estudos sobre a viabilidade e a capacidade de germinação dos grãos de pólen podem também caracterizar alterações no processo de desenvolvimento dos grãos de pólen nesse mutante.

Figura 12 - Anteras de plantas selvagens (A-C) e mutantes para o gene $AtPI4K\gamma I$, de *A. thaliana* (D-F), detalhando a ultraestrutura de células do tapete e de grãos de pólen. ex: exina; mc: micrósporo; ta: tapete; v: vacúolo. Setas indicam elaioplastos



5.4 Construções gênicas para expressão do gene AtPI4Ky1 nas espécies em estudo

As construções gênicas denominadas *CaMV35S::AtPI4Ky1*GFP C-terminal (Figura 13A) e *CaMV35S::AtPI4Ky1*GFP N-terminal (Figura 13B), dirigidas pelo promotor constitutivo 35S, foram utilizadas para superexpressão do gene *AtPI4Ky1* em experimentos de expressão transiente em *N. benthamiana* e em experimentos de transformação genética de plantas de *A. thaliana* via "floral dip".

Figura 13: Construções gênicas para expressão nas espécies em estudo. A. Construção gênica *CaMV35S::AtPI4Ky1-*GFP C-terminal. B. Construção gênica *CaMV35S::AtPI4Ky1-*GFP N-terminal. A e B= Adaptado de Nakagawa et al. (2007)



5.5 Transformação genética de A. thaliana via floral dip

Os experimentos de transformação genética foram realizados via *A. tumefaciens* (EHA 105), primeiramente com a construção gênica p*AtPI4Ky1::AtPI4Ky1-*GFP (cedida pelo Prof. Francisco S. Linhares) e em seguida com a construção gênica *CaMV35S::AtPI4Ky1-*GFP C-terminal através do método "floral dip", realizado de acordo com Clough e Bent (1998).

As sementes de *A. thaliana* que passaram pelo processo de transformação genética pelo método "floral dip" com a construção gênica p*AtPI4Ky1::AtPI4Ky1-*GFP foram introduzidas *in vivo* em meio de cultura MS (Murashig; Skoog, 1962) suplementado com higromicina e foram submetidas ao teste de seleção de transformantes de acordo com Harrison et al. (2006). De acordo com os autores, plantas resistentes à concentração de 15 μ l/ml do antibiótico higromicina devem apresentar hipocótilo bem alongado (0,8 a 1,0 cm), enquanto que plantas não-resistentes (não transformadas) devem apresentar um discreto alongamento do hipocótilo (0,2 a 0,4 cm), sem continuidade no desenvolvimento após 3 a 5 dias. Para cada teste de seleção com esta construção, foram preparadas oito placas de Petri com 40 sementes cada, sendo três placas para sementes WT e cinco placas com sementes que passaram pelo processo de transformação genética. Após oito experimentos de germinação realizados não foram observadas diferenças no alongamento do hipocótilo das plântulas germinadas na presença de higromicina e, após 10 dias, todas as plântulas estavam mortas.

Sabe-se que a seleção de plantas por este antibiótico não é evidente, desta forma foram iniciados testes de variação na concentração do antibiótico buscando adequar o protocolo e assim obter uma curva de concentração de seleção eficiente. Para isso, foram determinadas três concentrações diferentes do antibiótico: 15 µg/ml, 20 µg/ml e 30 µg/ml e foram realizadas oito

placas de Petri, com cinco repetições, contendo 40 sementes cada. Após 15 dias, novamente nenhuma planta apresentou desenvolvimento ou resistência ao antibiótico (Figura 14).

Figura 14: Sementes de *A. thaliana* em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de higromicina (15 μ g/ml, 20 μ g/ml e 30 μ g/ml) para seleção de plantas transformadas com a construção gênica p*AtPI4K* γ *1::AtPI4K* γ *1-*GFP



Sementes de *A. thaliana* que passaram pelo processo de transformação genética com a construção gênica *35S::AtPI4Ky1*-GFP C-terminal, também introduzidas *in vivo* em meio de cultura MS suplementado com 15 µg/ml de canamicina, foram submetidas ao teste de seleção de transformantes idem ao experimento anterior e para cada teste de seleção com esta construção, também foram preparadas oito placas de Petri com 40 sementes cada uma, sendo três placas para sementes WT e cinco placas com sementes que passaram pelo processo de transformação genética. Diferentemente dos resultados obtidos anteriormente, com esta construção gênica, após 15 dias, foram observadas diferenças no alongamento do hipocótilo das plântulas T0 germinadas na presença de canamicina (Figura 15). Ao final dos testes de seleção, 28 plântulas foram selecionadas e aclimatizadas em substrato.

A estrutura dos vetores pGWBs, é construída com base em pBI modificado contendo *HPT* e o gene da neomicina fosfotransferase II (*NPTII*); assim, todos os pGWBs apresentam resistência à canamicina e à higromicina (Nakagawa et al., 2007), o que permitiu a seleção dos transformantes com o antibiótico canamicina de forma eficiente. Após o crescimento e secagem das plantas, sementes T1 foram coletadas e as plantas provenientes destas, serão analisadas posteriormente.

Figura 15: Sementes de *A. thaliana* em meio de cultura MS suplementado com antibiótico higromicina para seleção de plantas transformadas. Setas indicam das plântulas selecionadas



5.6 Análise de expressão transiente em Nicotiana benthamiana

Para compreensão da função celular de determinada proteína, conhecer sua localização subcelular é fator pertinente. Estudos de localização e dinâmica subcelular de proteínas são úteis para entender as funções celulares das proteínas em um organismo e a fusão com uma proteína fluorescente, como a GFP (do inglês, Green Fluorescent Protein), ampliou significativamente o conhecimento neste campo. A expressão transiente de proteínas marcadas com GFP é amplamente utilizada para estudar a localização da proteína *in vivo* em diferentes sistemas, fornecendo uma maneira rápida e conveniente de caracterizar as propriedades das proteínas em células vivas (Cui et al., 2016).

A fim de se observar a possibilidade de expressão transiente da proteína em estudo, foram realizadas agroinfiltrações em folhas de *N. benthamiana* contendo as construções gênicas *CaMV35S::AtPI4Ky1-*GFP C-terminal e *CaMV35S::AtPI4Ky1-*GFP N-terminal, associados ao ativador de expressão p19 (Voinnet et al., 2003) e, como controle positivo, o gene marcador de núcleo *DDa1 (CaMV35S::DDa1-*GFP) (Irigoyen et al., 2014).

A expressão transiente de ATPI4Kγ1 em células de *N. benthamiana* com a construção *CaMV35S::AtPI4Kγ1*GFP C-terminal foi detectada (Figura 16B-C, E-F). Observou-se também a expressão do controle positivo *CaMV35S::DDa1*GFP (Figura 16A e D) e a autofluorescência de cloroplastos, em vermelho (Figura 16D-F). No entanto, não foi possível visualizar a expressão transiente da proteína em estudo nos experimentos realizados com a construção gênica *CaMV35S::AtPI4Kγ-1*GFP N-terminal, evidenciando que o plasmídeo que contém a GFP à N-terminal não se mostrou eficiente nesses experimentos.

Figura 16. Expressão transiente de *CaMV35S::AtPI4Ky1*-GFP C-terminal em células de *Nicotiana benthamiana*, observada por microscopia confocal. A e D: controle positivo: *CaMV35S::DDa1*-GFP marcador de núcleo, apresentando a fluorescência emitida por GFP. B-C e E-F: fluorescência emitida por GFP fusionada ao produto do gene *AtPI4Ky1* (*CaMV35S::AtPI4Ky1-GFP* C-terminal). As imagens D-F mostram em vermelho a autofluorescência de cloroplastos. Barras = 5 μ m



5.6.1 Análises de co-localização de ATPI4Kγ1 em marcadores de compartimentos celulares *"WAVE report lines"*

Com a finalidade de conhecer a co-localização de ATPI4K γ 1, a construção gênica *CaMV35S::AtPI4K\gamma1-GFP C-terminal que se mostrou eficiente nos experimentos anteriores* (item 5.6), juntamente com quatro linhagens marcadoras de compartimentos celulares *WAVE report lines*, RabF2b, Got1p homólogo, Rab A5d e Rab D2b, contendo mCherry/mRFP (Geldner et al., 2009), foram agroinfiltradas no mesófilo de folhas de *N. benthamiana*. As linhagens *WAVE*, foram selecionadas com base na literatura (Cardona-Lopéz et al., 2015) e, apresentam marcação fluorescente para endossomos tardios/compartimentos pré-vacuolares, Golgi, endossomos/síntese de endossomos e Golgi/endossomos, respectivamente (Geldner et al., 2009, Tabela 7). Para isso, as agroinfiltrações em folhas de *N. benthamiana* foram preparadas individualmente para as quatro linhagens marcadoras selecionadas, juntamente com o ativador de expressão p19 e o plasmídeo $CaMV35S::AtPI4K\gamma I$ -GFP C-terminal. Como controle positivo, foi usado o gene marcador de núcleo, CaMV35S::DDa1-GFP.

Análises por microscopia confocal mostraram a co-localização da expressão transiente da proteína ATPI4Kγ1 com a linhagem marcadora do compartimento celular golgi (Got1p homólogo), através da sobreposição de sinais fluorescentes emitidos por GFP e mRFP/mCherry (Figura 17D-F). As demais linhagens marcadoras dos compartimentos celulares utilizadas (RabF2b, Rab A5d e Rab D2b) não apresentaram co-localização com a proteína ATPI4Kγ1, em nenhuma das observações realizadas (Figura 17G-O).

Figura 17. Expressão transiente de *CaMV35S::AtPI4Ky1*-GFP C-terminal e linhagens marcadoras "*WAVE*": RabF2b, Got1p homólogo, Rab A5d e Rab D2b em *Nicotiana tabacum*, observada por microscopia confocal. A-C: Controle positivo: *CaMV35S::DDa1*-GFP: marcador de núcleo apresenta a fluorescência emitida por GFP. D-F: Linhagem marcadora RabF2b G-I: Linhagem marcadora Got1p homólogo co-localizada com a proteína ATPI4Ky1 fusionada a GFP (I). J-L: Linhagem marcadora Rab A5d. M-O: Linhagem marcadora Rab D2b. Barras = 5 µm



Para comprovação da expressão de *CaMV35S::AtPI4Ky1*-GFP C-terminal visualizada nos experimentos de co-localização celular, realizou-se a análise de *Western blot* a partir das mesmas folhas de *N. benthamianas* que apresentaram a co-localização da proteína ATPI4Ky1 (agroinfiltradas com *CaMV35S::AtPI4Ky1*-GFP C-terminal e "*Wave report*" Got1 homólogo) e folhas que não foram agroinfiltradas, como controle.

Os resultados obtidos nessas análises, após 30 min de exposição às soluções de revelação, mostraram a presença de bandas com tamanhos aproximados de 83 KDa (Figura 18). O tamanho previsto da proteína ATPI4Ky1 é de 56 KDa, devendo-se adicionar 27 KDa da proteína GFP, totalizando um fragmento com tamanho aproximado de 83 KDa, comprovando a presença da proteína ATPI4Ky1 nos ensaios de co-localização com a linhagem marcadora para Golgi.

Figura 18. *Western blot* de folhas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas com *CaMV35S::AtPI4Ky1*GFP C-terminal e com a linhagem marcadora "*WAVE*" report Got1p homólogo. Test: folha não agroinfiltrada. Got1p homol: Linhagem marcadora que apresentou co-localização com a proteína ATPI4Ky1. Fragmento com tamanho aproximado de 83KDa (56 KDa da proteína ATPI4Ky1+27 KDa de GFP)



A compreensão da funcionalidade proteica intracelular é um dos maiores desafios da era pós-genômica. Muitas vezes, a funcionalidade de uma proteína está relacionada com sua localização. Neste sentido, é importante conhecer a localização dinâmica de proteínas em compartimentos subcelulares distintos, o que em plantas, é desafiador já que um conjunto

abrangente de proteínas marcadoras desses compartimentos ainda não está disponível (Martin et al., 2009), apesar da substancial contribuição que coleções fornecem atualmente.

Avanços significativos têm sido alcançados na definição do tráfego de vesiculação de membranas vegetais usando sistemas de expressão transiente de co-localização. Uma série de vetores e de plantas transformadas foram geradas de maneira estável expressando fusões de proteína de membrana em marcadores fluorescentes espectralmente distintas, com padrões distintos de localização subcelular, expressão estável e não tóxica, denominadas linhagens marcadoras de compartimentos celulares "*WAVE*" report (Geldner et al., 2009). As linhagens marcadoras multicoloridas "*WAVE*" permitem uma análise combinatória dos sistemas compartimentalizados de membranas celulares das plantas, tanto em microscopia confocal como por microscopia imunoeletrônica (Cardona-Lópex et al., 2015).

De acordo com estudos realizados por De Matteis et al. (2013) e Balla (2013) PtdIns apresentam distribuição subcelular e de membrana únicas e estão concentrados na superfície de membranas, podendo atuar em compartimentos ou sub-compartimentos celulares específicos. Em organismos modelo em geral, muitas informações têm sido descritas em relação à distribuição dessas moléculas (De Matteis et al., 2013).

A localização da maioria de PtdIns já é conhecida em compartimentos celulares (Heilman; Heilman, 2013). Dentre os PtdIns fosforilados, foi visto que PtdIns3P está presente nos endossomos, sendo conhecido por desencadear o recrutamento de proteínas importantes para a identidade e função endossômica precoce (Marat; Haucke, 2016; Schink et al., 2016). PtdIns (3,5) P2, acumula-se nos corpos multivesiculares (MVBs) e endossomos tardios, à medida em que os endossomos precoces amadurecem (Marat; Haucke, 2016) e PtdIns5P está presente no núcleo, membrana plasmática e endomembranas (Vicinanza et al., 2015; Várnai et al., 2017).

Em relação à localização de PI 4-quinases, informações de co-localização são restritas. Em células de mamíferos, sabe-se PI 4-quinases do tipo II e PI 4-quinases tipo III são associadas ao Golgi e localizam-se em subcompartimentos desta organela de forma distinta (Weixel et al., 2005). Em estudos de localização de PI 4-quinases tipo II, em células de mamíferos, observouse que estas não se localizam apenas nas estruturas de Golgi, mas também em estruturas endossomais (Balla et al., 2002; Wang et al., 2003; Weixel et al., 2005), enquanto que PI 4-cinases tipo III, são localizadas principalmente no cis/médio Golgi (Weixel et al., 2005).

As informações reunidas neste trabalho, como a co-localização da proteína ATPI4Kγ1 em células do Golgi, aliadas aos estudos desenvolvidos por Pereira et al. (2007) e Alves-Ferreira et al. (2007) e às recentes descobertas em relação ao reconhecimento de regiões específicas celulares, elucidadas por Simon et al. (2016) e Rostislavleva et al. (2019), indicam que a função desempenhada pelo produto do gene $AtPI4K\gamma l$ pode estar intimamente ligada ao tráfego intracelular de vesículas e de endomembranas. Esta possibilidade se dá, principalmente pela característica sinalizadora dos fosfoinositídeos, que através dos diferentes produtos fosforilados, podem realizar marcações de regiões específicas da membrana, o que pode levar à montagem de complexos proteicos, resultando na transdução de determinado sinal subcelular e indicar atividade de transporte, secreção, brotamento, ou ainda de fusão vesicular. Mais especificamente, no caso da esterilidade masculina em plantas, poderia ter implicação em processos de deposição de vesículas que podem atuar na formação de fragmoplasto em processos de divisão celular, ou ainda em atividades secretoras de células do tapete para a formação do revestimento de grãos de pólen, entretanto, maiores estudos são necessários buscando a comprovação dessas hipóteses.

5.7 Sistema duplo híbrido em leveduras (Y2H)

Interações físicas específicas entre proteínas formam a base da maioria dos processos biológicos. O sistema duplo híbrido de leveduras (Y2H) é um método genético amplamente utilizado para detectar interações proteína-proteína em células de levedura (Rajagopala; Uetz, 2011). Neste estudo, o screening de biblioteca de duplo-híbrido em levedura foi realizado para determinar possíveis parceiros de interação da proteína ATPI4Kγ1. Esta ferramenta molecular permite revelar parceiros de interação de uma proteína específica quando os mesmos ainda são desconhecidos.

Todos os experimentos realizados durante os experimentos de screanning de duplo híbrido foram realizados com os vetores de expressão em leveduras pGBKT7 (BD) e pGADT7 (AD) (Anexo B) de acordo com o protocolo Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual, Takara Bio USA. Incialmente, a proteína ATPI4K γ 1 foi produzida com fusão amino-terminal ao domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição GAL4 (DNA Binding Domain – BD). Todas as etapas de recombinação foram confirmadas por sequenciamento.

Imediatamente após o preparo das células competentes de levedura Y187, a reação de recombinação isca BD (ATPI4K γ 1pGBKT7) foi submetida às etapas de transformação por choque térmico. Após o crescimento das colônias de levedura transformadas, foram selecionadas 7 colônias para análise de PCR (Figura 19). Todas as colônias selecionadas se mostraram positivas, amplificando o fragmento esperado.

Figura 19: Análise de PCR de levedura para confirmação da transformação da reação de recombinação isca BD (ATPI4K γ 1pGBKT7) em levedura cepa Y187. M: λ EcoRI+HindIII (Fermentas). Col 1-7: Colônias de levedura cepa Y187 transformadas; CP: DNA da reação LR clonase pGBKT7+*AtPI4K\gamma1*; CN: Controle negativo da reação – água



M Col1 Col2 Col3 Col4 Col5 Col6 Col7 CP CN

5.7.1 Screanning de biblioteca de duplo-híbrido em leveduras

Para a realização do screanning, foi utilizada a biblioteca de *c*DNAs de botão floral de *A. thaliana*, clonados através do sistema Gateway de recombinação, em vetores de expressão em leveduras com domínio de ativação da transcrição (DNA-AD) cedido pelo CNB, Madrid, Espanha. Antes de iniciar o screening de duplo híbrido, como etapa controle, foi realizado um teste de autoativação da isca BD transformada em Y187 com os meios de cultura utilizados no screening de duplo híbrido. Após o período de incubação, o controle positivo (YSD-W) e os controles negativos (YSD –WLHA (1, 5, 15mM 3AT); YSD –WLH (1, 5, 15mM 3AT) e YSD –WL (1, 5, 15mM 3AT) foram confirmados (Figura 20). Houve crescimento somente de colônias de leveduras em meio de cultura YSD –W, como esperado. Figura 20: Teste de controles. Meio de cultura YSD com diferentes auxotrofias e concentrações de 3AT contendo levedura transformada com a isca BD. A: Colônias de levedura transformadas em meio de cultura YSD-W. B: Meio de cultura YSD -WLHA + 1mM de 3AT; C: Meio de cultura YSD -WLH + 1mM de 3AT. D: YSD -WL + 1mM de 3ATM



Após o teste de autoativação, iniciou-se o ensaio de screening de biblioteca de duplohíbrido em leveduras. Os resultados do screening da biblioteca de *c*DNA de botão floral de *A. thaliana* contra a isca BD resultou em 47 clones de levedura (Figura 21). A placa controle contendo as auxotrofias (-WL) (Figura 21A) mostra o crescimento de colônias de leveduras dos 47 clones obtidos. Além disso, na presença das auxotrofias (-WLH) (Figura 21C) e, nas auxotrofias (-WLHA) (Figura 21D) e com adição de diferentes concentrações de 3-amino-1,2,4-triazol (3AT), inibidor do produto do gene *His*3, implicado na biossíntese de *S. cerivisae*. (1 mM, 5 mM e 15 mM respectivamente) (Figura 21E-M) também foi possível o crescimento das mesmas 47 colônias obtidas no controle positivo, o que indica que as interações entre as proteínas podem ser classificadas como interações fortes. Figura 21: Screening da biblioteca de *c*DNA de botão floral de *Arabidopsis thaliana* contra a isca BD, resultou em 47 clones. A: Meio de cultura YSD –WL (controle positivo); B: Meio de cultura YSD –WLA e clones de interatores; C: Meio de cultura YSD –WLHA e clones de interatores; D: Meio de cultura YSD –WLHA e clones de interatores; E-G: Meio de cultura YSD –WLA suplementado com diferentes concentrações de 3AT (E: 1 mM; F: 5 mM; G: 15 mM); H-J: Meio de cultura YSD –WLH suplementado com diferentes concentrações de 3AT (H: 1 mM; I: 5 mM; J: 15 mM); K-M: Meio de cultura YSD –WLHA suplementado com diferentes concentrações de 3AT (K: 1 mM; L: 5 mM; M: 15 mM)



Neste estudo, o fator de transcrição de levedura Gal4 foi dividido em um domínio de ligação BD fusionado ao gene $AtPI4K\gamma I$ e um domínio de ativação AD fusionado a uma biblioteca de *c*DNA de botão floral de *A. thaliana*. As fusões BD e AD foram referidas como isca e presa, respectivamente. Desta forma, somente se houver a co-expressão simultânea da isca e de uma presa em interação, a reconstituição do fator de transcrição completo de levedura permite a transcrição do gene repórter e a colônia de levedura, contendo o clone de uma presa em interação, poderá crescer em meio de cultura de seleção.

Um elemento chave no processo de detecção das interações é o uso de linhagens de leveduras que apresentam genes repórteres como *His3*, *Ade2*, entre outros, regulados sob controle de um promotor GAL4-indutível para a detecção das interações. Cada domínio somente é expresso a partir de uma das proteínas candidatas à interação e, somente se as proteínas apresentarem interação entre si, os domínios poderão de unir e a expressão dos genes repórteres promoverão auxotrofia a aminoácidos (Uetz, 2002). A expressão do (s) gene (s) repórter (es) permite que a colônia cresça apenas sob certas condições, como por exemplo, *His3* codifica a imidazoleglicerolfosfato desidratase (IGP desidratase), uma enzima chave na biossíntese de histidina (Koegl; Uetz, 2007). Quando as proteínas da isca e da presa interagem, a expressão *His3* responsiva à Gal4 permite que a colônia biossintetize histidina e cresça em seu meio mínimo.

A confirmação dos resultados geralmente deve ser feita por meio de validações. Neste experimento, além da seleção em meio de cultura auxotrófico, um indicativo da força da interação em seleções iniciais foi ainda confirmado por meio de ensaios de sobrevivência em auxotrofias suplementadas com concentrações de 3AT, uma vez que o aumento de força dessa interação, pode ser mensurado através do aumento da concentração de 3AT em meios de cultura (Uetz, 2002). Como este é um inibidor competitivo do produto do gene *His3* usado como gene repórter durante o screnning, a célula capaz de crescer em presença de 3AT indica que somente se o nível do produto do gene *His3* for suficiente para sustentar o efeito inibitório do 3AT para produzir histidina suficiente, pode permitir a sobrevivência celular. Portanto, a presença de 3AT seleciona clones com alto nível de *His3*, já que doses maiores de 3AT, tornam o meio de cultura mais específico, sugerindo, consequentemente, uma tendência de força de interações entre as proteínas (Rajagopala; Uetz, 2011), no entanto, nenhuma inferência conclusiva pode ser feita em relação à força de interação dos clones obtidos, devido à não padronização da quantidade de células plaqueadas em cada spot.

5.7.2 Teste de α-galactosidase não letal

Colônias que crescem sob seleção (-WL) foram submetidas ao teste não letal de α-galactosidase. O teste realizado neste trabalho foi baseado no teste descrito por Duttweiler (1996). Foi possível observar a coloração azul em apenas alguns spots de células (Figura 22, spots 3, 4, 5, 9, 11, 25 e 42). As colônias postivas nos testes de –WL (que cresceram em diferentes auxotrofias e concentrações de 3AT) e na presença do substrato X-alpha-Gal + (cor azul) foram caracterizadas como fortemente positivas. Entretanto, embora tenham sido priorizadas colônias -WL e X-alpha-Gal+ (Figura 22, spots 3, 4, 5, 9, 11, 25 e 42) para a caracterização inicial dos clones, as colônias -WL e X-alpha-Gal+ não foram descartadas, pois o gene repórter *Mel1* é menos sensível e nem sempre a coloração azul fica evidente nestes casos.

Figura 22: Teste não letal de α -galactosidase com os 47 clones interatores em meio de cultura YSD –WL com substrato cromogênico X-alpha-Gal. Os spots foram numerados sequencialmente de 1-47



O gene *Mel-1* codifica a-galactosidase, uma enzima que ocorre naturalmente em cepas de leveduras e, como resultado de interações, a a-galactosidase (*Mel-1*) é expressa e secretada pelas células de levedura. Colônias de leveduras que expressam *Mel-1* ficam azuis na presença do substrato cromogênico X-alpha-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactosideo) substrato histoquímico da α -galactosidase através de reação enzimática. Desta forma, a atividade de α -galactosidase pode ser utilizada como um indicador de interações proteína-proteína *in vivo* utilizando sistemas de duplo híbrido (Duttweiler, 1996).

Para minimizar efeitos de entrada de mais de um plasmídeo em células de levedura, e com isso favorecer a tradução de mais de uma proteína candidata à interação com $AtPI4K\gamma I$, é necessário conhecer qual proteína presente em cada levedura interagiu com a proteína alvo e promoveu o crescimento da colônia no meio seletivo. Para isso, o DNA plasmidial das leveduras foi extraído e transformado em células competentes de *E. coli*, pois nestas células o controle de entrada de um único plasmídeo por transformação é mais confiável (Uetz, 2002).

Para analisar os clones obtidos, primeiramente foram priorizadas colônias His+ e LacZ+ (Figura 22, spots 3, 4, 5, 9, 11, 25 e 42) e extrações de DNAs plasmidiais de *E. coli* foram purificadas e encaminhadas para o sequenciamento, com inicadores descritos na Tabela 6. Em seguida, todos os outros spots de colônias obtidos (Figura 21) também foram submetidos à mesma preparação. Após análises do sequenciamento, 27 genes foram identificados (Tabela 12). Para a identificação dessas sequências, foi utilizado o software BLASTN no banco de dados NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Após a identificação e análise dos genes, observou-se o potencial de alguns como possíveis interatores, pelas características funcionais já descritas em plantas. Dentre eles, destaca-se a proteína codificada pelo gene *PATL*1, relacionada às proteínas envolvidas no tráfego de membranas (Anantharaman; Aravind, 2002). *PATL1* é recrutada do citoplasma para a placa celular e em estudos de ligação a vesículas, *PATL1* ligou-se a fosfoinositídeos específicos, importantes reguladores do tráfego de membranas, com preferência por PtdIns 5P, PtdIns (4,5) P2 e PtdIns 3P. Estes resultados sugerem um papel para a *PATL1* em eventos de tráfego de membrana associados à expansão ou maturação da placa celular e apontam para o envolvimento de fosfoinositídeos na biogênese da placa celular (Peterman et al., 2004).

Um fator de destaque dentre os dados obtidos, foi o grande número de proteínas relacionadas ao cloroplasto identificadas. Das 27 proteínas, 10 foram relacionadas ao cloroplasto (Tabela 12). Esses dados podem ser associados à diversas evidências já descritas. Rios (2009) relatou a localização sub-celular da proteína AtPI4Kγ1 em proplastídios, através de análises de microscopia confocal de raízes. Protoplastídeos são pequenas organelas presentes em células meristemáticas que irão se diferenciar em tipos plastídiais, através de diferenciação plastidial, como plastídios que passam a produzir e estocar lipídeos, denominados elaioplastídeos (ou elaioplastos) (Dickinson, 1981). Além do mais, análises morfoanatômicas do desenvolvimento tardio de mutantes deste trabalho, identificaram que elaioplastos presentes em células do tapete em plantas mutantes, são presentes em maior número e com menor tamanho quando comparado às amostras de plantas selvagens. Em conjunto, estes dados podem

sugerir uma relação entre o grande número de proteínas relacionadas a cloroplastos identificadas e a proteína AtPI4K γ 1.

Dentre as proteínas relacionadas ao cloroplasto, identificou-se a proteína BIP 1 (HSP70), também envolvida em processos catabólicos proteicos associados ao retículo endoplasmático. Estudos de microarranjo, relacionados ao padrão de expressão gênica de plantas AtPI4Kγ1KO, evidenciaram menor expressão em AtPI4Kγ1KO de genes que se apresentam mais expressos em uma linhagem de silenciamento do gene que codifica a proteína HSP90 (Rios, 2009). A proteína HSP90 é uma chaperona implicada na maturação de substratos protéicos metaestáveis, atuantes como reguladores centrais de circuitos biológicos. Uma diminuição da função exercida por HSP90 pode diminuir a capacidade de responder a estímulos externos (Young; Moarefi; Hartl, 2001; Queitsch; Sangster; Lindquist, 2002).

Outros genes identificados também apresentaram potencial em possíveis interações, mas para a continuação dos estudos de interatores da proteína ATPI4K γ 1, a comprovação das possíveis interações relacionadas abaixo, devem inicialmente ser realizadas em experimentos futuros. Tabela 12. Identificação de putativos candidatos a interação com $AtPI4K\gamma I$ através de ensaio de Y2H após análises de sequências dos clones identificados através do software BLASTN no banco de dados NCBI

Colônia	X-α-gal	ID gene/Interator	Localização	Função				
1	+	824768 / Ribossomal protein L41 family / E TAMBÉM Arabidopsis RNA nocoding nc RNA	Ribosome, cytosolic large ribosomal subunit	Structural constituent of ribosome; INVOLVED IN: translation				
2	+	842910 / TPX1 thioredoxin-dependent peroxidase 1	Chloroplast, plasma membrane, membrane	Oxidoreductase activity, antioxidant activity; INVOLVED IN: response to cadmium ion				
3	+++	835585 / Translation initiation factor SUI1 family protein	Cellular_component unknown	Translation initiation factor activity; INVOLVED IN: translational initiation, translation				
4*	+++	843546 / PATL1 PATELLIN 1	Apoplast, plasma membrane, chloroplast, vacuole, membrane	Transporter activity; INVOLVED IN: transport, pollen tube growth				
5	+++	837808 / CCS copper chaperone for SOD1	Chloroplast	Superoxide dismutase copper chaperone activity, superoxide dismutase activity; INVOLVED IN: cellular copper ion homeostasis				
6	++	838599 / DNA ligase-like protein		Molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown				
7	++	842197 / Phosphoglicerate mutase family protein	Chloroplast					
9	+++	830784 / KIWI ssDNA-binding transcriptional regulator	cellular_component unknown	Protein binding, transcription coactivator activity, DNA binding; INVOLVED IN: regulation of transcription, DNA-dependent				
12	++	816381 / PNP-A plant natriuretic peptide A	Extracellular region, cell wall					
14	х	838921 / Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein		Molecular_function unknown; INVOLVED IN: response to biotic stimulus, defense response				
15	+	840860 / PMI1 plastid movement impaired1	Plasma membrane	Molecular_function unknown; INVOLVED IN: chloroplast relocation				

Levedura	X-α-gal	ID gene/Interator	Localização	Função				
17	++	820775 / TRX-M4 thioredoxin M-type 4	Thylakoid, chloroplast thylakoid membrane, cell wall, chloroplast, chloroplast envelope	Enzyme activator activity; INVOLVED IN: response to oxidative stress, positive regulation of catalytic activity				
18	++	832950 / BIP1 heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	Cell wall, plasma membrane, chloroplast, vacuole, endoplasmic reticulum lumen	INVOLVED IN: Protein folding, ER-associated protein catabolic process, response to heat, polar nucleus fusion				
20	++	829965 / Ribosomal protein S5 domain protein	Cellular_component unknown	Molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown				
21	+	837974 / PnsL2 PsbQ-like 2		Electron transporter, transferring electrons within the cyclic electron transport pathway of photosynthesis activity; INVOLVED IN: photosynthetic electron transport chain				
22	x	822444 / CSLC04 Cellulose-synthase- like C4	Plasma membrane	Cellulose synthase activity, transferase activity, transferring glycosyl groups; INVOLVED IN: biological_process unknown				
23	++	818915 / ARA4 P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase superfamily protein	Trans-Golgi network, Golgi stack, plasma membrane, Golgi-associated vesicle	Response to heat, inter-Golgi cisterna vesicle-mediated transport				
29	х	834895 / ATGLR1.2 Glutamate receptor family protein	Endomembrane system, membrane	Protein binding, intracellular ligand-gated ion channel activity; INVOLVED IN: cellular calcium ion homeostasis, response to light stimulus				
30	х	836556 / FKBP12 FK506-binding protein 12	Chloroplast thylakoid lumen	FK506 binding, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity; INVOLVED IN: protein folding				
31	x	829715 / PSAT phosphoserine aminotransferas	Chloroplast stroma, chloroplast	O-phospho-L-serine:2-oxoglutarate aminotransferase activity; INVOLVED IN: L-serine biosynthetic process				
33	x	829965 / Ribosomal protein S5 domain protein	cellular_component unknown	Molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown				
34	+	829965 / Ribosomal protein S5 domain protein	Cellular_component unknown	Molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown				

Levedura	X-α-gal	ID gene/Interator	Localização	Função				
36	+	820775 / TRX-M4 thioredoxin M-type 4	Thylakoid, chloroplast thylakoid membrane, cell wall, chloroplast, chloroplast envelope	Enzyme activator activity; INVOLVED IN: response to oxidative stress, positive regulation of catalytic activity				
39	x	830018 / MYB4 myb domain protein 4		DNA-binding, transcriptional regulator, Myb-type, DNA-binding				
41	++++	838672 / AT1G20810 FKBP-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	Thylakoid lumen, chloroplast thylakoid lumen, chloroplast	FK506 binding, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity; INVOLVED IN: protein folding				
44	x	825317 / CYSC1 cysteine synthase C1	Mitochondrion, chloroplast	Cysteine synthase activity, copper ion binding, L-3-cyanoalanine synthase activity; INVOLVED IN: cysteine biosynthetic process, detoxification of nitrogen compound, cyanide metabolic process				
46	+	825366 / AT3G61930 hypothetical protein		N-terminal protein myristoylation; EXPRESSED IN: 11 plant structures; EXPRESSED DURING: 4 anthesis, C globular stage, petal differentiation and expansion stage; Has 11 Blast hits to 11 proteins in 5 species				

5.8 Expressão heteróloga da proteína ATPI4Ky1

Dentre as subfamílias de PI4Ks do tipo III, $\alpha \in \beta$ e de tipo II, γ , a subfamília γ foi previamente categorizada por homologia ao seu domínio 3, 4 quinase (Mueller-Roeber; Pical, 2002). Posteriormente, PI4Ks subfamília γ também foram caractrizadas pela presença de domínios ubiquitina, sendo que dois indivíduos dessa subfamília (*AtPI4K* γ 1 e *AtPI4K* γ 8) não apresentam nenhum domínio ubiquitina (Galvão et al., 2008).

Dados mais recentes mostraram que um integrante da subfamília γ (*AtPI4K* γ 5) apresenta atividade serina/treonina quinase (Tang et al., 2016). Como estudos evolutivos, sobre a sinalização via segundo mensageiro mostraram que as PIKs podem ter evoluído de serina/treo quinases (Brown; Auger, 2011) ainda há incertezas sobre a atividade cinásica destas proteínas, uma vez que, membros da subfamília γ , como *AtPI4K* γ 1, ainda não foram caracterizados em relação à sua real atividade quinase.

Desta forma, para compreender melhor a estrutura e função proteica de ATPI4K γ 1, experimentos de expressão heteróloga foram conduzidos, primeiramente com o objetivo de obtenção da proteína em forma solúvel e pura e, em seguida, para comprovação da atividade cinásica da proteína ATPI4K γ 1.

5.8.1 Clonagens de alta eficiência independente de ligação (LIC)

A fim de aumentar a probabilidade de obtenção de um produto solúvel e estável da proteína ATPI4K γ 1, foram elaboradas 16 construções gênicas, baseadas em diferentes pontos de truncagem a partir da proteína inteira. As construções foram planejadas e desenvolvidas, evitando-se a perda de sequências gênicas de regiões que podem codificar motivos ou domínios estruturais e de acordo com análises das estruturas de proteínas homólogas (Tabela 13).

Tabela 13: Construções gênicas desenvolvidas para as clonagens de alta eficiência independente de ligação (LIC) utilizadas nos de testes de expressão da proteína ATPI4Kγ1

PRODUTO PCR	NOME DA CONSTRUÇÃO	TAMANHO PRODUTO PCR (PB)	MASSA ESPERADA DA PROTEÍNA (DA)	MASSA ESPERADA DA PROTEÍNA SEM HIS-TAG (DA)	RESÍDUO N- TERMINAL	RESÍDUO C- TERMINAL	INICIADOR FORWARD	INICIADOR REVERSE
1	ATPI4KY1-1	1713	63917,8	61452,2	Met1	Ile561	1	561
2	ATPI4KY1-2	1197	45086,1	42620,5	Met1	Lys389	1	389
3	ATPI4KY1-3	1176	44220,1	41754,5	Met1	Lys382	1	382
4	ATPI4KY1-4	1122	42405,0	39939,3	Met1	Val364	1	364
5	ATPI4KY1-5	1506	55991,0	53525,3	Val71	Ile561	71	561
6	ATPI4KY1-6	990	37159,2	34693,6	Val71	Lys389	71	389
7	ATPI4KY1-7	969	36293,2	33827,6	Val71	Lys382	71	382
8	ATPI4KY1-8	915	34478,1	32012,5	Val71	Val364	71	364
9	ATPI4KY1-9	1428	53298,9	50833,3	Glu97	Ile561	97	561
10	ATPI4KY1-10	912	34467,2	32001,6	Glu97	Lys389	97	389
11	ATPI4KY1-11	891	33601,2	31135,6	Glu97	Lys382	97	382
12	ATPI4KY1-12	837	31786,1	29320,4	Glu97	Val364	97	364
13	ATPI4KY1-13	1410	52701,3	50235,7	Arg103	Ile561	103	561
14	ATPI4KY1-14	894	33869,5	31403,9	Arg103	Lys389	103	389
15	ATPI4KY1-15	873	33003,5	30537,9	Arg103	Lys382	103	382
16	ATPI4KY1-16	819	31188,4	28722,8	Arg103	Val364	103	364

*Para detalhamento dos iniciadores utilizados, consulte Tabela 10.

A partir da extração de DNA genômico de *A. thaliana* (template), 16 fragmentos de DNA esperados foram amplificados por PCR (Figura 23). Após a análise do tamanho dos fragmentos resultantes em gel de agarose 1% (Tabela 10), os fragmentos foram purificados e tratados com T4 DNA polimerase e preparado para clonagem independente de ligação (LIC).

Figura 23: Amplificação dos fragmentos de DNA por PCR, a partir de DNA genômico de *Arabidopsis thaliana*, de acordo com pontos de truncagem previamente estabelecidos. 1-16: Fragmentos correspondentes aos pontos de truncagem preservados. MK: Marcador

а мк 1	6 15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
-															
=															

O método de clonagem utilizado para a expressão em pequena escala neste trabalho é denominado clonagem independente de ligação (LIC). Os produtos de PCR são ligados ao vetor linearizado através de caudas complementares de fita simples de DNA de 12 a 15 nucleotídeos (caudas LIC). Para as clonagens, uma média de 100 ng de DNA foi obtido em cada amplificação e estes foram purificados e tratados com T4 DNA polimerase (Fermentas Life Sciences). Este tratamento permitiu que ocorresse a retirada das extremidades 3' das duas fitas dos fragmentos amplificados e gerou extremidades livres e coesivas complementares as caudas LIC do vetor pNIC28-Bsa4, visto que o mesmo também havia sido previamente tratado.

Após a reação de hibridização entre insertos e vetor, foi realizado o sequenciamento utilizando os iniciadores LIC (item 4.19.1). A confirmação dos plasmídeos recombinantes permitiu as transformações em bactérias competentes *E. coli* MACH1 e, após o crescimento das colônias, três colônias de cada construção gênica foram analisadas por meio de PCR de colônia (Figura 24). O tamanho de todos os fragmentos amplificados nesta análise, corresponderam aos fragmentos esperados para cada uma das construções gênicas (Tabela 13).

Figura 24: Fragmentos de DNA obtidos em análise de PCR de colônia correspondentes aos fragmentos esperados, utilizados em de testes de expressão da proteína ATPI4Kγ1. MK: Marcador. 1-16 Colônias obtidas por meio da transformação em bactérias competentes *E. coli* MACH1



5.8.2 Testes de expressão da proteína ATPI4Ky1

Após a extração dos plasmídeos, estes foram submetidos à nova transformação em cepa de expressão *E. coli* BL21(DE3)-R3-pRARE2 (para as 16 construções) e *E. coli* λPPase (para as 16 construções), e submetidos aos testes de expressão. Ao total, 32 testes de expressão foram realizados e, apenas a construção gênica denominada 5, produzida em cepa *E. coli* BL21(DE3)-R3-pRARE2, foi recuperada na fração solúvel (Figura 25). Nesta análise, foi observada uma banda de aproximadamente 55 kDa, o que corresponde à massa molecular esperada para a construção número 5 (Tabela 13).

A construção gênica 5, produzida em fração solúvel corresponde ao fragmento proteico com início no aminoácido 71 (valina) e término no aminoácido 561 (isoleucina) (Apêndice B). Não foi verificada expressão da proteína ATPI4K γ 1 solúvel em nenhuma outra condição, o que pode sugerir que o fragmento proteico (71 x 561) pode ser determinante para a expressão proteica e que e a cepa de *E.coli* BL21(DE3)-R3-pRARE2 possa ter favorecido esta expressão.

Figura 25: SDS-PAGE do teste de expressão de 16 construções gênicas em duas cepas de *E.coli*. A: *E.coli* λPPase (construções 1 a 12); B: *E. coli* BL21(DE3)-R3-pRARE2 (construções 1 a 12); C: *E.coli* λPPase (construções 13 a 16) e *E. coli* BL21(DE3)-R3-pRARE2 (construções 13 a 16). Retângulos em vermelho destacam a produção da proteína em forma solúvel (SF) com a construção gênica denominada 5 expressa em *E.coli* BL21(DE3)-R3-pRARE2. TL: indica colunas contendo frações totais



A expressão de proteínas funcionais em hospedeiros heterólogos é um dos pilares da biotecnologia moderna. Apesar disso, a obtenção da expressão da proteína fora de seu contexto original exige a otimização de muitos fatores (Kaur; Kumar; Kaur, 2018). Uma das estratégias para maximizar o rendimento de proteínas recombinantes nativas é o aumento da disponibilidade de códons que raramente estão disponíveis no microorganismo de expressão. Neste sentido, uma solução eficiente pode ser expandir o pool intracelular de RNAs transportadores (tRNA) do hospedeiro através da expressão de genes que codificam os tRNAs raros (Gustafsson; Govindarajan; Minshull, 2004). O plasmídeo BL21(DE3)-R3-pRARE2 contém genes de tRNA para seis codóns raros em *E. coli*: argU (AGG / AGA), ileX (AUA), leuW (CUA), proL (CCC) e glyT (GGA) (Novy et al.; 2001; Kaur; Kumar; Kaur, 2018).

A expressão de proteínas cujos genes contêm códons raros pode ser exponencialmente melhorada quando o tRNA codificado é aumentado ou inserido dentro de cepas utilizadas para a expressão de proteínas (Kane, 1995). Burgess-Brown et al. (2008) relataram níveis de expressão de proteína de interesse aumentados, através do uso de plasmídeos que apresentavam genes para códons raros, em estudos comparativos de expressão proteica nativa e otimizadas relacionados à desidrogenase e redutase em humanos.

5.8.3 Purificação da proteína ATPI4Ky1

Após expressão em forma solúvel da proteína ATPI4Kγ1 em larga escala, foram iniciados os ensaios de purificação. A partir da cultura oriunda do crescimento do inóculo de *E. coli* BL21(DE3)-R3-pRARE2 contendo a construção gênica 5, foi realizada a separação da fase sobrenadante e pellet, por centrifugação. Em seguida, o sobrenadante foi submetido à análise de cromatografia por afinidade em resina de níquel (IMAC), com o auxílio do sistema automático AKTApurifier (item 4.19.4).

As frações protéicas coletadas que não interagiram com a resina de níquel e a fração eluída, contendo a proteína pré-purificada, foram agrupadas e analisadas em SDS-PAGE (Figura 26, coluna 1-4). Em seguida, a fração eluída pré-purificada (Figura 26, coluna 4) foi adicionada TEV protease, e esta solução foi submetida à diálise, overnight, contra o tampão de gel infiltração para clivagem da cauda de histidina. Logo após a diálise, foi realizada a etapa de *rebinding* e novamente as frações protéicas foram coletadas, agrupadas e analisadas em SDS-PAGE (Figura 26, coluna 5-9).

A proteína ATPI4Kγ1 purificada foi obtida em todas as frações do *rebinding* (Figura 26, colunas 5-9). Entretanto, é possível que as frações do *rebinding*: lavagem 60 mM imidazol do *rebinding*, eluição do *rebinding* e lavagem 3M imidazol (Figura 26, colunas 7-9) possam estar contaminadas com TEV protease, pela presença de bandas na parte inferior do gel, o que levou ao descarte destas frações e agrupamento somente das frações *flow-trow* e lavagem com 30 mM de imidazol do *rebinding*, utilizadas posteriormente para aplicação em cromatografia por exclusão molecular. Foi possível ainda, observar que as bandas das frações correspondentes a estas colunas (Figura 26, colunas 5 e 6) estão menores do que em comparação à bandas correspondente à fração eluição do IMAC (Figura 26, coluna 4), o que indica possivelmente a clivagem da cauda de histidina.

Figura 26: SDS-PAGE das frações protéicas coletadas durante o processo de purificação da proteína ATPI4Kγ1 pelo IMAC. MK: marcador KDa. 1: sobrenadante pós sonicação; 2: *flow-trow* IMAC; 3: lavagem 30 mM IMAC; 4: eluição do IMAC; 5: *flow-trow* do *rebinding*; 6: lavagem 30 mM de imidazole do *rebinding*; 7: lavagem 60 mM de imidazole do *rebinding*; 8: eluição do *rebinding*; 9: lavagem 3 M de imidazole do *rebinding*


A cromatografia por exclusão molecular, ou gel infiltração, é outra etapa de purificação que realiza a separação de proteínas por peso molecular (tamanho). A cromatografia por exclusão molecular é um método não desnaturante que separa proteínas por tamanho em sua forma nativa, ao contrário do gel de poliacrilamida, que é desnaturante e que quebra possíveis estruturas quaternárias (tetrâmeros, dímeros, trímeros, etc).

A partir da análise dos resultados da cromatografia por exclusão molecular (Figura 27A), foi possível a verificação de três picos da eluição da proteína ATPI4Kγ1, embora apenas uma proteína vinha sendo observada em maior quantidade em SDS-PAGE. Em um primeiro momento, este resultado gerou dúvida acerca do processo de purificação, já que seria esperado apenas um único pico correspondente à proteína pura ATPI4Kγ1. Desta forma, para esclarecer a origem dos três picos, as frações correspondentes a toda extensão dos picos do cromatograma (poços A5 até C2) foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE.

Após a análise dos resultados em SDS-PAGE (Figura 27B), ficou evidente que todas as frações apresentaram apenas uma banda muito concentrada, o que indica que os três picos estão relacionados a proteína ATPI4Kγ1e que esta foi purificada com sucesso. Também foi observada uma banda na parte superior do gel, presente em todas as amostras (Figura 27B). De acordo com massa desta proteína (aproximadamente 75 KDa) foi possível inferir que provavelmente corresponde a uma chaperona, proteína bacteriana que auxilia o enovelamento de outras proteínas, sendo comum a ocorrência deste tipo de proteína após o processo de purificação devido sua forte ligação. Apesar da presença de contaminantes na parte inferior do SDS-PAGE (bandas fracamente ligadas ao gel), as bandas referentes a proteína ATPI4Kγ1 são mais fortes e consistentes.

A análise dos dados permitiu ainda inferir que os diferentes picos gerados pelo cromatograma (Figura 27A) podem corresponder a diferentes estados oligoméricos da proteína ATPI4Kγ1, como monômeros, dímeros e tetrâmetros. Apesar de substancial, esta suposição deve ser melhor investigada em estudos futuros, utilizando por exemplo padrões de peso molecular.

Figura 27: Purificação da construção 5 da proteína ATPI4Kγ1. A: Cromatograma da etapa de gel filtração com a formação de três picos distintos. B: SDS-PAGE das frações ao redor dos três picos eluídos, confirmando a purificação da proteína de interesse. MK: marcador de massa molecular (KDa)



Após o processo de purificação da proteína ATPI4K γ 1, uma fração da amostra purificada (1 mg/mL) foi utilizada para análise de massa intacta, por meio de espectrometria de massas. A técnica analítica de espectrometria de massas converte moléculas de uma amostra em íons, em fase gasosa, que se separam no espectrômetro de massas de acordo com razão massa (m) sobre carga (Z) (She et al., 2010).

Os resultados obtidos através do gráfico de massas, indicaram vários picos, múltiplos de 80 Daltons em relação à massa inicial (Figura 28). É esperado que o gráfico de massas indique um único pico com a massa exata da proteína clivada, (um pico com aproximadamente 54 KDa), mas nestas análises, não foi possível obter a massa correspondente à proteína deste estudo. Segundo She et al. (2010) em espectrometria de massas, quando a diferença de massa entre picos é de 80 KDa, isso corresponde a fosforilações, e à medida que as diferenças são múltiplos de 80 KDa, pode-se inferir diferentes graus de fosforilação. Sete picos foram confirmados (Figura 28), indicando sete forforilações sofridas pela proteína ATPI4Kγ1. A presença de fosforilações (adição de grupos fosfato em determinados resíduos) geralmente caracterizam quinases, que se autofosforilam.

Ainda sobre os resultados obtidos nas análises de espectrometria de massas, outra possível, porém improvável, explicação para a ocorrência das fosforilações da proteína purificada, poderia ser a origem destas fosforilações causadas por uma quinase bacteriana presente em *E. coli*, já que a construção gênica 5 utilizada foi expressa em cepa de *E. coli* BL21(DE3)-R3-pRARE2, que não produz a proteína λ -Fosfatase, responsável por evitar que proteínas expressas sejam fosforiladas ou autofosforiladas. Buscando elucidar a origem das fosforilações, testes de desfosforilação e refosforilação foram propostos e realizados (item 4.19.5).

Figura 28: Análise de massa intacta por meio de espectrometria de massas. 1P - 7P: pontos de detecção de fosforilações. Picos se diferenciam por ~80 KDa entre si



5.8.5 Teste de autofosforilação da proteína AtPI4Ky1

Para confirmar as origens das fosforilações sofridas pela proteína ATPI4K γ 1, foram realizados testes de autofosforilação. Para isso, primeiramente foi realizado o tratamento para desfosforilação, por meio da incubação da proteína pura ATPI4K γ 1 com a proteína com λ -Fosfatase (enzima que retira grupamentos fosfato) e em seguida, a amostra novamente foi encaminhada para análise de massa intacta por meio de espectrometria de massas, para comprovar a retirada das fosforilações.

O processo de retirada dos grupos fosfato foi bem-sucedido, observando-se um pico único de aproximadamente 54 KDa da proteína pura ATPI4Kγ1 (Figura 29A). Após a análise dos dados, o tratamento de refosforilação foi realizado com auxílio da aplicação de ATP exógeno em duas condições de temperatura, com o intuito de maximizar as chances de fosforilação da proteína, considerando-se não haver conhecimento sobre sua estabilidade térmica. Os resultados observados em experimentos realizados em temperatura ambiente (Figura 29B) e em gelo (Figura 29C) não indicaram diferenças entre si e mostraram picos únicos de aproximadamente 54 KDa, o que demonstra que a autofosforilação não ocorreu.

Estes resultados sugerem que, caso a proteína ATPI4Kγ1 realmente não possua atividade cinásica, as fosforilações visualizadas na Figura 28 podem estar associadas a proteínas presentes em *E. coli* BL21(DE3)-R3-pRARE2 que podem fosforilar outras proteínas, inclusive

a proteína ATPI4K γ 1, durante os ensaios de expressão heteróloga. Contudo, estes resultados não são conclusivos e indicam a necessidade de novos testes para aperfeiçoamento de variáveis experimentais.

Figura 29: Análise de massa intacta por meio de espectrometria de massas. A: Desfosforilação da proteína ATPI4Kγ1 e pico ~54 KDa. B: Refosforilação da proteína ATPI4Kγ1 com ATP exógeno em temperature ambiente e pico ~54 KDa. C: Refosforilação da proteína ATPI4Kγ1 com ATP exógeno em gelo e pico ~54 KDa



5.8.6 Cristalização da proteína ATPI4Ky1

Com o objetivo de reunir maior número de informações sobre a proteína ATPI4Kγ1, optou-se pela tentativa de cristalização da mesma. Os testes de cristalização foram realizados após a obtenção da proteína purificada, utilizando-se kits comerciais contendo 96 diferentes substratos cada um. Após o período de incubação, não foi possível observer a formação dos cristais em nenhuma das condições utilizadas neste experimento (Figura 30). Em todas as condições estabelecidas, as soluções para cristalização proteica não se solidificaram, indicando a ausência de formação de cristais (Figura 30C).

A cristalização de proteínas é um processo pelo qual as macromoléculas da solução proteica podem ser supersaturadas, levando a formação de cristais, sendo bastante útil na resolução da estrutura de uma proteína de interesse. O estado de supersaturação pode ser gerado por diferentes processos e neste estudo, o procedimento abordado foi de difusão de vapor em gota (sitting drop) (Gavira et al., 2015).

Figura 30: Experimento de cristalização da proteína ATPI4Kγ1. A: Placa de cristalização utilizada, com 96 microambientes (numerados de A1 a H12). B: Detalhe de cada microambiente com locais para as gotas (circulares) para reservatório de solução (quadrados). C: Detalhe da gota não cristalizada. Barra: 1mm



Ao realizar ensaios de cristalografia, a primeira dificuldade é a complexidade intrínseca da macromolécula biológica. Existem vários aspectos importantes que precisam ser considerados para estudos de difração de cristais protéicos. A primeira delas é a própria conformação das cadeias polipeptídicas compactadas e dobradas com diferentes resíduos, pois após processos de purificação, apenas uma parte da proteína, ou ainda apenas uma parte do complexo proteico pode ser obtida na forma pura. Em outras situações, pode haver necessidade de um parceiro protéico, ou de um cofator, um ligante entre outros agentes de interação (Gavira, 2015).

Além de ser considerada um processo laborioso, a cristalização apresenta taxa de sucesso baixa, pois vários fatores podem influenciar características dos cristais. Dentre os fatores envolvidos, podemos incluir a diferença entre as concentrações salinas das duas soluções (proteína pura e substrato), a natureza da própria proteína, a duração do processo e a adição aleatória de compostos que podem proporcionar a cristalização (McPherson; Cudney, 2014). Com base nos resultados deste estudo, a ausência de cristais pode ser explicada por diversos fatores, como: solução proteica pouco monodispersa (contendo monômeros, dímeros e tetrâmeros), presença de vários graus de fosforilações, alta concentração proteica e, por fim, ausência da solução ideal utilizada como substrato da reação.

No estudo, a proteína de interesse foi obtida de forma pura (banda única dominante em SDS-PAGE) (Figura 27B), mas apresentou mistura de estados oligoméricos, como observado pelos múltiplos picos no cromatograma da cromatografia por exclusão molecular (Figura 27A). Quando a proteína alvo é visualizada em uma única banda em SDS-PAGE e apresenta valor de massa intacta correspodendente ao esperado, é considerada um alvo promissor para a cristalização (Reis, 2017), mesmo apesar da tendência de proteínas a formar multímeros e a existência de formas ligadas e não-ligadas, como grupos prostéticos e co-fatores (fontes de heterogeneidade - auto-impurezas) possam não ser visualizadas em SDS-PAGE e impedir a nucleação ou o crescimento de cristais de proteína (Kaur; Kumar; Kaur, 2018).

A proteína utilizada nos experimentos de cristalização estava fosforilada (Figura 28). Esse tipo de modificação na estrutura pode interferir tanto na estabilidade da proteína em solução, quanto em suas interações intermoleculares, fator primordial no crescimento de cristais (McPherson; Cudney, 2014). Uma abordagem inicial para a otimização do processo de cristalização da proteína ATPI4Kγ1 é a definição de novos parâmetros para a condução de novos experimentos para a comprovação da fosforilação, a utilização de novos kits de substratos para indução da formação de cristais ou ainda a exploração de pequenas variações das condições experimentais de cristalografia.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- De acordo com os resultados deste estudo, é possível sugerir que a mutação causada pelo gene *AtPI4Ky1* favorece a competição gametofítica entre grãos de pólen durante a germinação e que esta condição pode levar à perda da homozigose da mutação;
- Foi possível determinar a co-localização da proteína ATPI4Kγ1 no Golgi, através da utilização da linhagem "WAVE" Got-homolog1, através da expressão transiente em plantas *N. bentamiana;*
- Por meio da transformação genética de plantas via "floral dip", foi possível a obtenção de plantas transgênicas que superexpressam o gene *AtPI4Ky1;*
- Através do sistema screanning de duplo híbrido de leveduras, foi possível a identificação de 27 proteínas possívelmente interatoras da proteína ATPI4Kγ1;
- Foi posssível a realização da expressão heteróloga da proteína ATPI4Kγ1 em sistemas bacterianos.

REFERÊNCIAS

Alves-Ferreira, M.; Wellmer, F.; Pereira, A.B.; Kumar, V.; Riechmann, J. L.; Meyerowitz, E. M. Global expression profiling applied to the analysis of *A. thaliana* stamen development. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 145, n. 3, p. 747–762, 2007.

Anantharaman, V.; Aravind, L. The GOLD domain, a novel protein module involved in Golgi function and secretion. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 5, res. 023, 2002. DOI: 10.1186/gb-2002-3-5-research0023.

Antignani, V.; Klocko, A. L.; Bak, G.; Chandrasekaran, S. D.; Dunivin, T.; Nielsen, E. Recruitment of PLANT U-BOX13 and the PI4Kbeta1/beta2 phosphatidylinositol-4 kinases by the small GTPase RabA4B plays important roles during salicylic acid-mediated plant defense signaling in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 27, p. 243-261, 2015.

Ariizumi, T.; Toriyama, K. Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 62, p. 437–460, 2011.

Aslanidis, C.; De Jong, P. J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). Nucleic Acids Research, London, v. 18, n. 20, p. 6069-6074, 1990.

Bago, R.; Malik, N.; Munson, M. J.; Prescott, A. R.; Davies, P.; Sommer, E.; Shpiro, N.; Ward, R.; Cross, D.; Ganley, I. G.; Alessi, D. R. Characterization of VPS34-IN1, a selective inhibitor of Vps34, reveals that the phosphatidylinositol 3- phosphate-binding SGK3 protein kinase is a downstream target of class III phosphoinositide 3-kinase. **Biochemical Journal**, London, v. 463, p. 413-427, 2014. doi: 10.1042/BJ20140889.

Bak, G.; Lee, E.J.; Lee, Y.; Kato, M.; Segami, S.; Sze, H.; Maeshima, M.; Hwang, J.U.; Lee, Y. Rapid structural changes and acidification of guard cell vacuoles during stomatal closure require phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate. **Plant Cell**, Rockville, v. 25, n. 6, p.2202-2216, 2013

Balla, A.; Tuymetova, G.; Barshishat, M.; Geiszt, M.; Balla, T. Characterization of Type II Phosphatidylinositol 4-Kinase Isoforms Reveals Association of the Enzymes with Endosomal Vesicular Compartments. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, p. 20041–20050, 2002.

Balla, T. Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. **Physiological Reviews**, Washington, DC, v. 93, p. 1019–1137, 2013.

Baskin, J. M.; Wu, X.; Christiano, R.; Oh, M. S.; Schauder, C. M.; Gazzerro, E. et al. The leukodystrophy protein FAM126A (hyccin) regulates PtdIns(4)P synthesis at the plasma membrane. **Nature Cell Biology**, London, v. 18, p. 132–138, 2015. DOI: 10.1038/ncb3271.

Berridge, M. J.; Irvine, R. F. Inositol phosphates and cell signalling. Nature, London, v. 21, n. 341(6239), p.197-205, 1989

Bhatt, A. M.; Canales, C.; Dickinson, H. G. Plant meiosis: the means to 1N. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, p. 114-121, 2001.

Borg, M.; Brownfield, L.; Twell, D. Male gametophyte development: a molecular perspective. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 5, p. 1465–1478, 2009. doi:10.1093/jxb/ern355.

Boss, W. F.; Im, Y. J. Phosphoinositide signaling. **Annual Rev Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, p. 409-29. doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103840, 2012

Boura, E.; Nencka, R. Phosphatidylinositol 4-quinases: Function, structure, and inhibition. **Experimental Cell Research**, New York, v. 337, n. 2, p. 136–145, 2015.

Burgess-Brown, N, A.; Sharma, S.; Sobott, F.; Loenarz, C.; Oppermann, U.; Gileadi, O. Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: a multi-gene study, **Protein Expression Purification**, v. 59, n. 1, p. 94-102, 2008

Brill, J. A.; Hime, G. R.; Scharer-Schuksz, M.; Fuller, M. T. A phospholipid kinase regulates actin organization and intercellular bridge formation during germline cytokinesis. **Development**, Cambridge, v. 127, p. 3855–3864, 2000.

Brown, J. R.; Auger, K. R. Phylogenomics of phosphoinositide lipid kinases: perspectives on the evolution of second messenger signaling and drug discovery. **BMC Evolutionary Biology**, New York, v. 11, art. 4, 2011. doi: 10.1186/1471-2148-11-4.

Brown, R. C. The cytokinetic apparatus in meiosis: control of division plane in the absence of a preprophase band of microtubules. In: Lloyd, C. W. (Ed.). **The cytoskeletal basis of plant growth and form**. New York: Academic Press, 1991. p. 269–273.

Cardona-López, X.; Cuyas, L;. Marín,E.; Rajulu, R.; Irigoyen, M. L.; Gil, E.; Puga, M.I.; Bligny, R.; Nussaume, L.; Geldner, N.; Paz-Ares, J.; Rubio, V. ESCRT-III-Associated Protein ALIX Mediates High-Affinity Phosphate Transporter Trafficking to Maintain Phosphate Homeostasis in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 27, p.2560–2581, 2015

Cecchetti, V.; Celebrin, D.; Napoli, N.; Ghelli, R.; Brunetti, P.; Costantino, P.; Cardarelli, M. An auxin maximum in the *ARF8.4* Regulates Stamen Development 635 middle layer controls stamen development and pollen maturation in Arabidopsis. **New Phytologist**, London, v. 213, p. 1194–1207, 2017.

Champion, A.; Jouannic, S.; Guillon, S.; Mockaitis, K.; Krapp, A.; Picaud, A.; Simanis, V.; Kreis, M.; Henry, Y. AtSGP1, AtSGP2 and MAP4K alpha are nucleolar plant proteins that can complement fission yeast mutants lacking a functional SIN pathway. **Journal of Cell Science**, London, v. 117, p. 4265-4275, 2004.

Chen, Y. C.; McCormick, S. sidecar pollen, an *Arabidopsis thaliana* male gametophytic mutant with aberrant cell divisions during pollen development. **Development**, Cambridge, v. 122, n. 10, p. 3243-3253, 1996.

Clough, S.J.; Bent, A F.Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, Hoboken, v. 16, n. 6, p. 735-43, 1998.

Cui, Y.; Gao, C.; Zhao, Q.; Jiang, L. Using Fluorescent Protein Fusions to Study Protein Subcellular Localization and Dynamics in Plant Cells. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 1474, p. 113-123, 2016. DOI: 10.1007/978-1-4939-6352-2_7.

De Craene, J. O.; Dimitri, L.; Bertazzi, S. B.; Friant, S. Review Phosphoinositides, Major Actors in Membrane Trafficking and Lipid Signaling Pathways. **Internaltional Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 18, p. 634, 2017.

Delage, E.; Puyaubert, J.; Zachowski, A.; Ruelland, E. Signal transduction pathways involving phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: convergences and divergences among eukaryotic kingdoms. **Prog Lipid Resources**. Amsterdam, v. 52, n. 1, p.1-14, 2013

De Matteis, M. A.; Vicinanza, M.; Venditti, R.; Wilson, C. Cellular assays for drug discovery in genetic disorders of intracellular trafficking. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 14, p. 159-190, 2013. doi: 10.1146/annurev-genom-091212-153415.

De Storme, N.; Geelen, D. Cytokinesis in plant male meiosis. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 8, n. 3, e. 23394, 2013.

Devereaux, K.; Dall'Armi, C.; Alcazar-Roman, A.; Ogasawara, Y.; Zhou, X.; Wang, F.; Yamamoto, A.; De Camilli, P.; Di Paolo, G. Regulation of mammalian autophagy by class II and III PI 3-kinases through PI3P synthesis. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, e. 76405, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0076405.

Dickinson, H. The structure and chemistry of plastid differentiation during male meiosis in Lilium henryi. **Journal Cell Science**, Cambridge, v.52, n.1, p.223-241. 1981.

Dickson, E. J.; Hille, B. Understanding phosphoinositides: rare, dynamic, and essential membrane phospholipids. **Biochemical Journal**, London, v. 476, p. 1-23, 2019.

Drobak, B. K.; Watkins, P. A. C. Inositol (1,4,5) trisphosphate production in plant cells: stimulation by the venom peptides, melittin and mastoparan. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 205, p. 739–745, 1994.

Duttweiler, H. M. A highly sensitive and non-lethal beta-galactosidase plate assay for yeast. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 12, n. 9, p. 340-341, 1996.

Endemann, G. C.; Graziani, C.; Cantley, L. C. A Monoclonal Antibody Distinguishes Two types of phosphatidylinositol 4-kinase. **Biochemical Journal**, London, v. 273, p. 63–66, 1991.

Eyster, K. M. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. Advances in Physiology Educcation, Bethesda, v. 31, p. 5-16, 2007.

Feng, X. Q.; Dickinson, H. G. Packaging the male germline in plants. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 23, n. 10, p. 503-510. 2007.

Fruman, D. A.; Meyers, R. E.; Cantley, L. C. Phosphoinositide kinases. Annual Review of Biochemistry, Palo Alto, v. 67, p. 481-507, 1998.

Galvão, R. M.; Kota, U.; Soderblom, E. J.; Goshe, M. B.; Boss, W. F. Characterization of a new family of protein quinases from *A. thaliana* containing phosphoinositide 3/4-quinase and ubiquitin-like domains. **Biochemical Journal**, London, v. 409, p. 117–127, 2008. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006252.

Gao, X. Q.; Zhang, X. S. Metabolism and roles of phosphatidylinositol 3-phosphate in pollen development and pollen tube growth in A. thaliana. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 7, n. 2, p. 165–169, 2012.

Geldner, N.; Dénervaud-Tendon, V.; Hyman, D. L.; Mayer, U.; Stierhof, Y.-D.; Chory, J. Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set. **The Plant Journal**, Oxford, v. 59, n. 1, p. 169–178, 2009.

Golani, Y.; Kaye, Y.; Gilhar, O.; Ercetin, M.; Gillaspy, G.; Levine, A. Inositol polyphosphate phosphatidylinositol 5-phosphatase9 (At5ptase9) controls plant salt tolerance by regulating endocytosis. **Molecular Plant**, Oxford, v. 6, p. 1781-1794, 2013.

Goldberg, R. B.; Beals, T. P.; Sanders, P. M. Anther development - Basic principles and practical applications. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 10, p. 1217-1229, 1993.

Gustafsson, C.; Govindarajan, S.; Minshull, J. Codon bias and heterologous protein expression. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 22, n. 7, p. 346-353, 2004.

Hammond, G. R.; Fischer, M. J.; Anderson, K. E.; Holdich, J.; Koteci, A.; Balla, T.; Irvine, R. F. PI4P and PI(4,5)P2 are essential but independent lipid determinants of membrane identity. **Science**, New York, v. 337, p. 727-730, 2012. DOI:10.1126/science.1222483.

Harrison, S.; Mott, E. K.; Parsley, K.; Aspinall, S.; Gray, J. C.; Cottage, A. A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. **Plant Methods**, London, v. 2, n. 19, 2006. DOI:10.1186/1746-4811-2-19.

Heilmann, I. Plant phosphoinositide signaling - dynamics on demand. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1861, p. 1345-1351, 2016. DOI: 10.1016/j.bbalip.2016.02.013.

Heilmann, M.; Heilmann, I. Arranged marriage in lipid signalling? The limited choices of PtdIns(4,5)P 2 in finding the right partner. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 15, n. 5, p. 789-797, 2013. DOI: 10.1111/plb.12025.

Heilmann, M.; Heilmann, I. Plant phosphoinositides-complex networks controlling growth and adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1851, p. 759-769, 2015.

Heo, W. D.; Inoue, T.; Park, W. S.; Kim, M. L.; Park, B. O.; Wandless, T. J.; Meyer, T. PI(3,4,5)P3 and PI(4,5)P2 lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. **Science**, New York, v. 314, p. 1458-1461, 2006. DOI:10.1126/science.1134389.

Holthuis, J. C.; Levine, T. P. Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 6, p. 209–220, 2005. DOI: 10.1038/nrm1591.

Honys, D.; Twell, D. Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in Arabidopsis. **Genome Biology**, London, v. 5, p. R85, 2004.

Hsieh, K.; Huang, A. H. Tapetosomes in Brassica tapetum accumulate endoplasmic reticulum-derived flavonoids and alkanes for delivery to the pollen surface. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 582–596, 2007.

Hunter, T. The role of tyrosine phosphorylation in cell growth and disease. Harvey Lectures, New York, v. 94, p. 81-119, 1998-1999.

Irigoyen, M.L.; Iniesto, E.; Rodriguez, L.; Puga, M.I.; Yanagawa, Y.; Pick, E.; Strickland, E.; Paz-Ares, J.; Geert De Jaeger, N.; Rodriguez, P.L.; Deng, X.W.; Rubio, V. Targeted Degradation of Abscisic Acid Receptors Is Mediated by the Ubiquitin Ligase Substrate Adaptor DDA1 in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 26, n. 2, p.712-728, 2014.

Ischebeck, T.; Stenzel, I.; Heilmann, I. Type B phosphatidylinositol-4- phosphate 5-kinases mediate *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum* pollen tube growth by regulating apical pectin secretion. **Plant Cell**, Rockville, v. 20, p. 3312-3330, 2008.

Ischebeck, T.; Stenzel, I.; Hempel, F.; Jin, X.; Mosblech, A.; Heilmann, I. Phosphatidylinositol-4,5bisphosphate influences Nt-Rac5-mediated cell expansion in pollen tubes of *Nicotiana tabacum*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 65, p. 453-468, 2011. Ischebeck, T.; Werner, S.; Krishnamoorthy, P.; Lerche, J.; Meijon, M.; Stenzel, I.; Lö Fke, C.; Wiessner, T.; Im, Y. J.; Perera, I. Y. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate influences PIN polarization by controlling clathrin-mediated membrane trafficking in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 25, p. 4894-4911, 2013.

Ishiguro, S.; Nishimori, Y.; Yamada, M.; Saito, H.; Suzuki, T.; Nakagawa, T.; Miyake, H.; Okada, K.; Nakamura K. The Arabidopsis *FLAKY POLLEN1* gene encodes a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase required for development of tapetum-specific organelles and fertility of pollen grains. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v. 51, 896-911, 2010

Ito, T.; Shinozaki, K. The *MALE STERILITY1* gene of Arabidopsis, encoding a nuclear protein with a PHD-finger motif, is expressed in tapetal cells and is required for pollen maturation. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v. 43, p. 1285–1292, 2002.

Janda, M.; Planchais, S.; Djafi, N.; Martinec, J.; Burketova, L.; Valentova, O.; Zachowski, A.; Ruelland, E. Phosphoglycerolipids are master players in plant hormone signal transduction. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 32, p. 839-851, 2013.

Janmey, P. A.; Stossel, T. P. Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. **Nature**, London, v. 325, p. 362, 1987.

Jensen, O. N. Modification-specific proteomics: characterization of post translational modifications by mass spectrometry. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 8, p. 33-34, 2004.

Jia, B.; Jeon, C. O. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: currentstatus and future perspectives. **Open Biology**, London, v. 6, p. 160196, 2016. DOI: 10.1098/rsob.160196.

Kane, J.F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. Current Opin Biotechnology, London, v.6, n. 5, p. 494-500, 1995.

Karnovskya, M.J. Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, n.2, p. 1-149, 1965

Kieffer, M.; Davies, B. Developmental programmes in floral organ formation. Cell & Developmental Biology, Los Angeles, v. 12, p. 373-380, 2001.

Kihara, A.; Noda, T.; Ishihara, N.; Ohsumi, Y. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Cell Biology, New York, v. 152, p. 519–530, 2001. doi: 10.1083/jcb.152.3.519.

Kim, Y. J.; Guzman-Hernandez, M. L.; Balla, T. A highly dynamic ER-derived phosphatidylinositolsynthesizing organelle supplies phosphoinositides to cellular membranes. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 21, p. 813–824, 2011. 10.1016/j.devcel.2011.09.005

Koegl, M, Uetz P. Improving yeast two-hybrid screening systems. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, London, v. 6, n. 4, p. 302-312, 2007. doi: 10.1093/bfgp/elm035.

Kost, B.; Lemichez, E.; Spielhofer, P.; Hong, Y.; Tolias, K.; Carpenter, C.; Chua, N. H. Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 145, p. 317–330, 1999.

Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli* : Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v.106, p. 803–822, 2018.

Krizek, B. A.; Meyerowitz, E. M. The Arabidopsis homeotic genes *APETALA3* and *PTDINSTILLATA* are sufficient to provide the B class organ identity function. **Development**, Cambridge, v. 122, n. 1, p. 11-22, 1996.

Lallemand, B.; Erhardt, M.; Heitz, T.; Legrand, M. Sporopollenin biosynthetic enzymes interact and constitute a metabolon localized to the endoplasmic reticulum of tapetum cells. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 162, p. 616–625, 2013.

Lassing, I.; Lundberg, U. Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. **Nature**, London, v. 314, p. 472–474, 1985.

Lemmon, M. A. Pleckstrin homology domains: two halves make a hole? **Cell**, Cambridge, v. 120, n. 5, p. 574-576, 2005.

Lemmon, M. A. Membrane recognition by phospholipids binding proteins. **Nature Reviews of Molecular Cell Biology**, London, v. 9, p. 99-111, 2008.

Liu, P.; Xu, Z.S.; Lu, P.P.; Hu, D.; Chen, M.; Li, L.C.; Ma, Y.Z. A wheat PI4K gene whose product possesses threonine autophophorylation activity confers tolerance to drought and salt in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 10, p. 2915–2927, 2013.

Livanos, P., Chugh, M., Müller, S. Analysis of Phragmoplast Kinetics During Plant Cytokinesis. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 1662, p. 137–150. doi:10.1007/978-1-4939-7262-3_12, 2017

Lofke, C.; Ischebeck, T.; Konig, S.; Freitag, S.; Heilmann, I. Alternative metabolic fates of phosphatidylinositol produced by PI-synthase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. **Biochemical Journal**, London, v. 413, p. 115-124, 2008.

Louret, O.; Doignon, F.; Crouzet, M. Stable DNA-binding yeast vector allowing high-bait expression for use in the two-hybrid system. **BioTechniques**, Natick, v. 23, p. 816–819, 1997.

Lundbaek, J. A.; Collingwood, S. A.; Ingolfsson, H. I.; Kapoor, R.; Andersen, O. S. Lipid bilayer regulation of membrane protein function: gramicidin channels as molecular force probes. **Journal of the Royal Society Interface**, London, v. 7, p. 373-395, 2010.

Ma, H. Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. Annual Review of Plant Biology, Palo Alto, v. 56, p. 393-434, 2005.

Marat, A. L.; Haucke, V. Phosphatidylinositol 3-phosphates-at the interface between cell signalling and membrane traffic. **EMBO Journal**, Oxford, v. 35, n. 6, p. 561-579, 2016. DOI: 10.15252/embj.201593564.

Martin, K.; Kopperud, K.; Chakrabarty, R.; Banerjee, R.; Brooks, R.; Goodin, M. M. Transient expression *inNicotiana benthamiana*fluorescent marker lines provides enhanced definition of protein localization, movement and interactionsin planta. **The Plant Journal**, Oxford, v. 59, n. 1, p. 150–162, 2009.

McCormick, S. Control of male gametophyte development. Plant Cell, Rockville, v. 16, p. 142-153, 2004.

McLeod, I. X.; Zhou, X.; Li, Q.-J.; Wang, F.; He, Y.-W. The class III kinase Vps34 promotes T lymphocyte survival through regulating IL-7Ra surface expression. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 187, p. 5051–5061, 2011. doi: 10.4049/jimmunol.1100710.

Mei, Y.; Jia, W.-J.; Chu, Y.-J.; Xue, H.-W. Arabidopsis phosphatidylinositol monophosphate 5-kinase 2 is involved in root gravitroPtdInsm through regulation of polar auxin transport by affecting the cycling of PIN proteins. **Cell Research**, Beijing, v. 22, p. 581-597, 2012.

Mueller-Roeber, B.; Pical, C. Inositol phospholipid metabolism in A. thaliana. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid quinase and phosphoinositide-specific phospholipase C. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 130, n. 1, p. 22–46, 2002.

Munnik, T.; Nielsen, E. Green light for polyphosphoinositide signals in plants. Current Opin Plant Biology, London, v. 14, n.5, p. 489-97, 2011.

Munnik, T.; van Himbergen, J. A. J.; Riet, B.; Braun, F. J.; Irvine, R. F.; van den Ende, H.; Musgrave, A. Detailed analysis of the turnover of polyphosphoinositides and phosphatidic acid upon activation of phospholipases C and D in Chlamydomonas cells treated with nonpermeabilizing concentrations of mastoparan. **Planta**, Berlin, v. 207, p. 133–145, 1998

Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 15, p. 473–497, 1962.

Nakagawa, T.; Kurose, T.; Hino, T.; Tanaka, K.; Kawamukai, M.; Niwa, Y.; Toyooka, K; Matsuoka, K.; Jinbo, T.; Kimura, T. Development of Series of Gateway Binary Vectors, pGWBs, for Realizing Efficient Construction of Fusion Genes for Plant Transformation. Journal of Bioscience and Bioengineering, Tokio, v. 104, n. 1, p. 34–41, 2007.

Nakamura, Y.; Teo, N. Z.; Shui, G.; Chua, C. H.; Cheong, W.-F.; Parameswaran, S.; Koizumi, R.; Ohta, H.; Wenk, M. R.; Ito, T. Transcriptomic and lipidomic profiles of glycerolipids during Arabidopsis flower development. **New Phytologist**, London, v. 203, p. 310–322, 2014.

Novakova, P.; Hirsch, S.; Feraru, E.; Tejos, R.; van Wijk, R.; Viaene, T.; Heilmann, M.; Lerche, J.; De Rycke, R.; Feraru, M. I. et al. SAC phosphoinositide phosphatases at the tonoplast mediate vacuolar function in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 111, p. 2818-2823, 2014.

Oh, E. S.; Woods, A.; Lim, S. T.; Theibert, A. W.; Couchman, J. R. Syndecan-4 proteoglycan cytoplasmic domain and phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate coordinately regulate protein kinase C activity. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, p. 10624–10629, 1998.

Okazaki, K.; Miyagishima, S.-Y.; Wada, H. Phosphatidylinositol 4-phosphate negatively regulates chloroplast division in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 27, p. 663-674, 2015.

Pacini, E. Relationships between tapetum, loculus, and pollen during development. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 171, p. 1–11, 2010.

Pappan, K.; Zheng, S.; Wang, X. Identification and characterization of a novel phospholipase D that requires polyphosphoinositide and submicromolar calcium for activity in Arabidopsis. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, p. 7048–7054, 1997.

Pereira, A. B. **Desenvolvimento de anteras em Arabidopsis**: identificação e caracterização de uma fosfatidilinositol quinase e um fator transcricional do tipo *MYB* envolvidos na microsporogênese. 2007. 199 p. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2007.

Peterman, T. K.; Ohol, Y. M.; McReynolds, L. J.; Luna, E. J. Patellin1, a novel Sec14-like protein, localizes to the cell plate and binds phosphoinositides. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 136, n. 2, p. 3080-3094, 2004.

Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. Nucleic Acids Research, London, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

Pical, C.; Westergren, T.; Dove, S. K.; Larsson, C.; Sommarin, M. Salinity and hyperosmotic stress induce rapid increases in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, diacylglycerol pyrophosphate, and phosphatidylcholine in *Arabidopsis thaliana* cells. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, p. 38232-38240, 1999.

Platre, M. P.; Jaillais, Y. Guidelines for the Use of Protein Domains in Acidic Phospholipid Imaging. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 1376, p. 175–194, 2016. DOI: 10.1007/978-1-4939-3170-5_15.

Platre, M. P.; Noack, L. C.; Doumane, M.; Bayle, V.; Simon, M. L. A.; Maneta-Peyret, L.; Fouillen, L.; Stanislas, T.; Armengot, L.; Pejchar, P., et al. A Combinatorial Lipid Code Shapes the Electrostatic Landscape of Plant Endomembranes. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 45, e. 411, p. 465-480, 2018. DOI: 10.1016/j.devcel.2018.04.011.

Pokotylo, I.; Kolesnikov, Y.; Kravets, V.; Zachowski, A. Ruielland, E. Plant phosphoinositidedependent phospholipases C: Variations around a canonical theme. **Biochimie**, Paris, v. 96, p. 144-157, 2014.

Queitsch, C.; Sangster, T.; Lindquist, S. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. **Nature**, London, v.417, n.6889, p.618-624. 2002.

Quilichini, T. D.; Grienenberger, E.; Douglas, C. The biosynthesis, composition and assembly of the outer pollen wall: A tough case to crack. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 113, p. 170-182, 2015. DOI: 10.1016/j.phytochem.2014.05.002.

Rajagopala, S. V.; Uetz, P. Analysis of protein-protein interactions using high-throughput yeast twohybrid screens. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 781, p. 1-29, 2011. DOI: 10.1007/978-1-61779-276-2_1.

Regan, S.; Moffatt, B. A. Analysis of Pollen Development inild-Type Arabidopsis and a Male-Sterile Mutant. **The Plant Cell**, Rockville, v. 2, p. 877-889, 1990.

Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal Cell Biology**, Cambridge, v.17, p.208-212, 1963.

Rios, F. D. Caracterização funcional do gene AtPI4Kγ1de Arabidopsis codificante de uma possível fosfatidilinositol cinase. **Dissertação** (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, p. 119. 2009.

Ronan, B.; Flamand, O.; Vescovi, L.; Dureuil, C.; Durand, L.; Fassy, F.; Bachelot, M. F. et al. A highly potent and selective Vps34 inhibitor alters vesicle trafficking and autophagy. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 10, p. 1013–1019, 2014. doi: 10.1038/nchembio.1681.

Rostislavleva, K.; Soler, N.; Ohashi, Y.; Zhang, L.; Pardon, E.; Burke, J. E.; Masson, G. R.; Johnson, C.; Steyaert, J.; Ktistakis, N. T.; Williams, R. L. Structure and flexibility of the endosomal Vps34 complex reveals the basis of its function on membranes. **Science**, New York, v. 350, n. 6257, 2015.DOI: 10.1126/science.aac7365.

Saavedra, L.; Balbi, V.; Lerche, J.; Mikami, K.; Heilmann, I.; Sommarin, M. PIPKs are essential for rhizoid elongation and caulonemal cell development in the moss Physcomitrella patens. **The Plant Journal**, Oxford, v. 67, p. 635-647, 2011.

Saavedra, L.; Catarino, R.; Heinz, T.; Heilmann, I.; Bezanilla, M.; Malhó, R. Phosphatase and tensin homolog is a growth repressor of both rhizoid and gametophore development in the moss Physcomitrella patens. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 169, p. 2572-2586, 2015.

Shamina, N. V.; Gordeeva, E.; Kovaleva, N. M.; Seriukova, E. G.; Dorogova, N. V. Formation and function of phragmoplast during successive cytokinesis stages in higher plant meiosis. **Cell Biology International**, London, v. 31, n. 6, p. 626-235, 2007.

Sambrook, J. E.; Fritsch, F.; Maniatis, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Sambrook, J.; Russell, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Sanders, P. M.; Bui, A. Q.; Weterings, K.; McIntire, K. N.; Hsu, Y. C.; Lee, P. Y.; Truong, M. T.; Beals, T. P.; Goldberg, R. B. Anther developmental defects in *A. thaliana* male-sterile mutants. **Sexual Plant Reproduction**, Heidelberg, v. 11, n. 6, p. 297-322, 1999.

Sasaki, T.; Takasuga, S.; Sasaki, J.; Kofuji, S.; Eguchi, S.; Yamazaki, M.; Suzuki, A. Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 48, n. 6, p. 307-343, 2009. doi: 10.1016/j.plipres.2009.06.001.

Schiefthaler, U.; Balasubramanian, S.; Sieber, P.; Chevalier, D.; Wisman, E.; Schneitz, K. Molecular analysis of *NOZZLE*, a gene involved in pattern formation and early sporogenesis during sex organ development in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 96, p. 11664–11669, 1999.

Schink, K. O.; Tan, K. W.; Stenmark, H. Phosphoinositides in Control of Membrane Dynamics. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 32, p. 143-171, 2016.

Schommer, C.; Beven, A.; Lawrenson, T.; Shaw, P.; Sablowski, R. AHP2 is required for bivalent formation and for segregation of homologous chromosomes in Arabidopsis meiosis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 36, p. 1–11, 2003.

Schu, P. V.; Takegawa, K.; Fry, M. J.; Stack, J. H.; Waterfield, M. D.; Emr, S. D. Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast *VPS34* gene essential for protein sorting. **Science**, New York, v. 260, n. 5104, p. 88-91, 1993.

Scott, R. J.; Spielman, M.; Dickinson, H. G. Stamen structure and function. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. S46-S60, 2004.

Seo, J.; Lee, K. J. Post-translational Modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Soul, v. 37, p. 44-55, 2004.

She, Y.M.; Xu, X.; Yakunin, A. F.; Dhe-Paganon, S.; Donald, L. J.; Standing, K. G.; Lee, D. C.; Jia, Z.; Cyr, T. D. Mass Spectrometry Following Mild Enzymatic Digestion Reveals Phosphorylation of Recombinant Proteins in *Escherichia coli* Through Mechanisms Involving Direct Nucleotide Binding. **Journal of Proteome Research**, Washington, DC, v. 9, p. 3311–3318, 2010.

Simon, M. L.; Platre, M.; Marquès-Bueno, M. M.; Armengot, L.; Stanislas, T.; Bayle, V.; Caillaud, M. C.; Jaillais, Y. A PtdIns(4)P-driven electrostatic field controls cell membrane identity and signalling in plants. **Nature Plants**, London, v. 2, art. 16089, 2016. doi:10.1038/nplants.2016.89.

Singh, M. B.; Bhalla, P. L. Control of male germ-cell development in flowering plants. **BioEssays**, Cambridge, v. 29, p. 1124–1132, 2007.

Spector, A. A.; Yorek, M. A. Membrane lipid composition and cellular function. Journal of Lipid Research, Menphis, v. 26, p. 1015–1035, 1985.

Spielman, M.; Preuss, D.; Li, F.-L.; Browne, W. E.; Scott, R. J.; Dickinson, H. G. *TETRASPORE* is required for male meiotic cytokinesis in *Arabidopsis thaliana* development. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 96, p. 1664–1669, 1997

Stevenson, J. M.; Perera, I. Y.; Boss, W. F. A phosphatidylinositol 4-quinase pleckstrin homology domain that binds phosphatidylinositol 4-monophosphate. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, p. 22761–22767, 1998.

Stevenson-Paulik, J.; Love, J.; Boss, W. F. Differential regulation of two *A. thaliana* type III phosphatidylinositol 4-quinase isoforms. A regulatory role for the pleckstrin homology domain. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 132, p. 1053–1064, 2003.

Suzuki, T.; Tsunekawa, S.; Koizuka, C.; Yamamoto, K.; Imamura, J.; Nakamura, K.; Ishiguro, S. Development and disintegration of tapetum-specific lipid-accumulating organelles, elaioplasts and tapetosomes, in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. **Plant Science**, Oxford, v. 207, p. 25-36, 2013. DOI: 10.1016/j.plantsci.2013.02.008.

Suzuki, T.; Masaoka, K.; Nishi, M.; Nakamura, K.; Ishiguro, S. Identification of kaonashi mutants showing abnormal pollen exine structure in *A. thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 49, n. 10, p. 1465–1477, 2008.

Tang, Y.; Zhao, C. Y.; Tan, S. T.; Xue, H. W. Arabidopsis Type II Phosphatidylinositol 4-Kinase PI4K γ 5 Regulates Auxin Biosynthesis and Leaf Margin Development through Interacting with Membrane-Bound Transcription Factor ANAC078. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 12, e. 1006252, 2016. doi: 10.1371/journal.pgen.1006252.

Tejos, R.; Sauer, M.; Vanneste, S.; Palacios-Gomez, M.; Li, H.; Heilmann, M.; Van Wijk, R.; Vermeer, J. E. M.; Heilmann, I.; Munnik, T. Bipolar plasma membrane distribution of phosphoinositides and their requirement for auxinmediated cell polarity and patterning in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 26, p. 2114-2128, 2014.

Thoresen, S. B.; Pedersen, N. M.; Liestøl, K.; Stenmark, H. A phosphatidylinositol 3-kinase class III sub-complex containing VPS15, VPS34, Beclin 1, UVRAG and BIF-1 regulates cytokinesis and degradative endocytic traffic. **Experimental Cell Research**, New York, v. 316, p. 3368–3378, 2010. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.07.008.

Twell, D.; Oh, S.; Honys, D. Pollen development, a genetic and transcriptomic view. In: Malhó, R. (Ed.). **The pollen tube**. Berlin: Springer, 2006. (Plant Cell Monographs, 3).

Twell, D. Male gametogenesis and germline specification in flowering plants. **Sexual Plant Reproduction**, Heidelberg, v. 24, n. 2, p. 149–160, 2010. doi:10.1007/s00497-010-0157-5

Uetz, P. Two-hybrid arrays. Current Opinion in Chemical Biology, London, v. 6, n. 1, p. 57-62, 2002.

Ugalde, J. M.; Rodriguez-Furlán, C.; Rycke, R.; Norambuena, L.; Friml, J.; León G, Tejos, R. Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases 1 and 2 are involved in the regulation of vacuole morphology during *Arabidopsis thaliana* pollen development. **Plant Science**, Oxford, v. 250, p. 10–19, 2016.

Várnai, P.; Gulyás, G.; Tóth, D. J.; Sohn, M.; Sengupta, N.; Balla, T. Quantifying lipid changes in various membrane compartments using lipid binding protein domains. **Cell Calcium**, Amsterdam, v. 64, p. 72-82, 2017. doi: 10.1016/j.ceca.2016.12.008.

Verma, N. Transcriptional regulation of anther development in Arabidopsis. **Gene**, Amsterdam, v. 689, p. 202-209, 2019. DOI: 10.1016/j.gene.2018.12.022.

Vicinanza, M.; Korolchuk, V. I.; Ashkenazi, A.; Puri, C.; Menzies, F. M.; Clarke, J. H.; Rubinsztein, D. C. PI(5)P regulates autophagosome biogenesis. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 57, n. 2, p. 219-234, 2015. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.12.007.

Vincentelli, R.; Cimino, A.; Geerlof, A.; Kubo, A.; Satou, Y.; Cambillau, C. High-throughput protein expression screening and purification in *Escherichia coli*. **Methods**, San Diego, v. 55, n. 1, p. 65-72, 2011.

Vizcay-Barrena, G.; Wilson, Z. A. Altered tapetal PCD and pollen wall development in the Arabidopsis ms1 mutant. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 2709–2717, 2006.

Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. **Plant Journal**, Oxford, v.33, p.949–956, 2003.

Wang, Y. J.; Wang, J.; Sun, H. Q.; Martinez, M.; Sun, Y. X.; Macia, E.; Kirchhausen, T.; Albanesi, J. P.; Roth, M. G.; Yin, H. L. Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. **Cell**, Cambridge, v. 114, p. 299-310, 2003.

Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F. T.; de Beer, T. A. P.; Rempfer, C.; Bordoli, L.; Lepore, R.; Schwede, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 46, p. 296-303, 2018.

Weixel, K. M.; Blumental-Perry, A.; Watkins, S. C.; Aridor, M.; Weisz, O. A. Distinct Golgi Populations of Phosphatidylinositol 4-Phosphate Regulated by Phosphatidylinositol 4-Kinases. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280, n. 11, p. 10501–10508, 2005.

Wilson, Z. A.; Zhang, D. B. From Arabidopsis to rice: Pathways in pollen development. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p. 1479-1492, 2009.

Wilson, Z. A.; Morroll, S. M.; Dawson, J.; Swarup, R.; Tighe, P. J. The Arabidopsis *MALE STERILITY1* (*MS1*) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD finger family of transcription factors. **The Plant Journal**, Oxford, v. 28, p. 27–39, 2001.

Wong, K.; Cantley, L. C. Cloning and characterization of a human phosphatidylinositol 4-kinase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, p. 28878–28884, 1994.

Whitley, P., Hinz, S., & Doughty, J. Arabidopsis FAB1/PIKfyve proteins are essential for development of viable pollen. **Plant Physiology**, Lancaster, v.151, p. 1812–1822. doi: 10.1104/pp.109.146159, 2009

Xue, H. W.; Pical, C.; Brearley, C.; Elge, S.; Muller-Rober, B. A plant 126-kDa phosphatidylinositol 4-quinase with a novel repeat structure. Cloning and functional expression in baculovirus-infected insect cells. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, p. 5738–5745, 1999.

Yang, W.; Burkhart, W.; Cavallius, J.; Merrick, W. C.; Boss, W. F. Purification and characterization of a phosphatidylinositol 4-kinase activator in carrot cells. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, p. 392–398, 1993

Yang, W. C.; Ye, D.; Xu, J.; Sundaresan, V. The *SPOROCYTELESS* gene of Arabidopsis is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor, v. 13, p. 2108–2117, 1999.

Young, J.; Moarefi, I.; Hartl, F. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. **Journal Cell Biology**, Cambridge, v. 154, n. 2, p. 267-274, 2001.

Zhang, Y. N.; Wei, D. M.; Song, Y. Y.; Chen, L.; Zhu, X. Y.; Tian, H. Q. Microtubule organization during successive microsporogenesis in *Allium cepa* and simultaneous cytokinesis in *Nicotiana tabacum*. **Biologia Plantarum**, Heidelberg, v. 55, p. 752-756, 2011. doi: 10.1007/s10535-011-0181-9.

Zhao, Y.; Yan, A.; Feijó, J. A.; Furutani, M.; Takenawa, T.; Hwang, I.; Fu, Y.; Yang, Z. Phosphoinositides regulate clathrin-dependent endocytosis at the tip of pollen tubes in Arabidopsis and tobacco. **Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 4031-4044, 2010.

Zimmermann, P.; Hirsch-Hoffmann, M.; Hennig, L.; Gruissem, W. Genevestigator. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 136, p. 2621–2632, 2004.

Zinser, E.; Sperka-Gottlieb, C. D.; Fasch, E. V.; Kohlwein, S. D.; Paltauf, F.; Daum, G. Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology, Washington, DC, v. 173, p. 2026–2034, 1991.

APÊNDICES

Apêndice A. Caracterização do locus gênico $AtPI4K\gamma I$ e inciadores utilizados para genotipagem de mutantes para o gene $AtPI4K\gamma I$



Apêndice B. Dados complementares utilizados durante a expressão heteróloga da proteína ATPI4Kγ1

16 construções:	<mark>1</mark> x <mark>561</mark>	<mark>71</mark> x <mark>561</mark>	<mark>97</mark> x <mark>561</mark>	<mark>103</mark> x <mark>561</mark>
	<mark>1</mark> x <mark>389</mark>	<mark>71</mark> x <mark>389</mark>	<mark>97</mark> x <mark>389</mark>	<mark>103</mark> x <mark>389</mark>
	<mark>1</mark> x <mark>382</mark>	<mark>71</mark> x <mark>382</mark>	<mark>97</mark> x <mark>382</mark>	<mark>103</mark> x <mark>382</mark>
	<mark>1</mark> x <mark>364</mark>	<mark>71</mark> x <mark>364</mark>	<mark>97</mark> x <mark>364</mark>	<mark>103</mark> x <mark>364</mark>

Sequência dos adaptadores LIC para os primers:

Primer forward - adicionar TACTTCCAATCCATG à extremidade 5' do primer forward (o ATG deve estar em fase com a sequência codante). Esse primer adiciona um resíduo de serina e um de Metionina à extremidade N-terminal da proteína. Primer reverse - adicionar TATCCACCTTTACTG à extremidade 5' do primer

reverse. Esse primer adiciona um resíduo de glutamina e um codon terminador à extremidade C-terminal da proteína.

Primer 1:							
	Metionina						
LEFT PRIMER:	TACTTCCAATCCATGATGAATT(GCTTGGCTACGACC					
Ratio: 85%	36 nucl.	GC: 44%	TM: 78.1				
<mark>Primer 71</mark> :							
	Valina						
LEFT PRIMER:	TACTTCCAATCCATGGTTTCCT	CTCCTTGCTTTTCC					
Ratio: 78%	36 nucl.	GC: 44%	TM: 77.7				
<mark>Primer 97</mark> :	<u>,</u>						
Ácido Glutâmico							
LEFT PRIMER:	TACTTCCAATCCATGGAGATTC	FTGGTGGACAG <mark>AGA</mark> G					
Ratio: 70%	37 nucl.	GC: 45%	TM: 77.3				
<mark>Primer 103</mark> :							
	Arginina						

LEFT PRIMER: TACTTO Ratio: 90%	CCAATCCATG <mark>AGA</mark> GTGCC 32 nucl.	CCACCGTTCG GC: 53%	TM: 78.8
Primer 364: REVERS	COMPLEMENTAR		
Valina			
RIGHT PRIMER: AACTO	GTGCAGACGACGAGGACC	TATCCACCTTTACT	3
Ratio: 86%	36 nucl.	GC: 51%	TM: 78.6
Primer 382: REVERSO	O COMPLEMENTAR		
Lisina	L		
RIGHT PRIMER: CTTC	ICGCCTATCTCCGCG <mark>TA</mark>	CCACCTTTACTG	
Ratio: 77%	34 nucl.	GC: 52%	TM: 77.0
Primer 389 <mark>: REVERS</mark>	COMPLEMENTAR		
Lisina	L		
RIGHT PRIMER: CTTG	GAGAAATCCCGAGTCATC	CTTC <mark>TATCCACCTTT</mark> A	ACTG
Ratio: 87%	40 nucl.	GC: 45%	TM: 77.9
Primer 561: REVERSO	COMPLEMENTAR		
Isoleuci	na		
RIGHT PRIMER: AATT	ICGCAGGAGCATCCTAAI	CTT <mark>TATCCACCTTT</mark>	ACTG
Ratio: 87%	40 nucl.	GC: 40%	TM: 77.3
SEQUENCIA PROTEINA	A - AT2G40850.1		

MNCLATTIIIITCKPTLISDMAVAIDPFSDKFPYFNRSSQRCRLQSLTNLDFNFLAQSFNHTFEDDNIHRS<mark>V</mark> SSPCFSIAASANMEEDLKATTAPRIEILGGQRVPTVRALVAEVTMAMVSGAQPLLLPSGMGGAYLLQTGKG HNIAVAKPVDEEPLAFNNPKKSGNLMLGQPGMKHSIPVGETGIRELAAYLLDYQGFSGVPPTALVSISHVP FHVSDAFSFSSMPYKVASLQRFVGHDFDAGELGPGSFTATSVHRIGILDVRLLNLDRHAGNMLVKRCDKKE AYNRLGTAELVPIDHGLCLPECLDDPYFEWLNWPQALVPFSDTELDYISNLDPFKDAELLRTELHSLPESA IRVLVVCTVFLKQAAAAGLCLAEIGEKMTRDFSKGEESFSLLETLCTKAKASVFGKTSEDSDYSHEGNEVN TELQCGMFKFDGGDTPCEAEISEVFHVSKPPLVPRGPRANTIPNDVTASMSSSQNQRITHQEKSAKEKKRG GKQERCTVRSKSPPTDINSPNHDESKGVSFVDMTTVEWDTFLQSFQTLLQDALSKGSTPRLGCSCEI*

SEQUENCIA GENE TAIR - AT2G40850.1 e pontos de truncagens

ATGAATTGCTTGGCTACGACCATAATCATCACCTGCAAGCCCACATTGATCTCGGATATGGCCGTGGCTATTGAT CCTTTCAGTGACAAGTTCCCTTACTTTAACCGATCCTCTCAAAGATGCAGACTTCAATCCCTTACCAACCTTGAC TTTTCCATAGCTGCGTCTGCTAATATGGAGGAAGATCTCAAAGCAACCACGGCTCCACGGATT<mark>GAG</mark>ATTCTTGGT GGACAG<mark>AGA</mark>GTGCCCACCGTTCGTGCTCTTGTGGCTGAGGTGACCATGGCTATGGTTTCTGGAGCTCAGCCTTTG CTTTTACCAAGTGGCATGGGAGGTGCTTATCTCTTGCAAACCGGAAAGGGACATAACATTGCTGTGGCTAAACCG GTTGATGAAGAGCCTCTAGCTTTCAATAATCCTAAAAAGTCTGGAAATTTGATGCTCGGGCAACCGGGAATGAAA CATTCAATTCCTGTTGGCGAGACGGGTATCAGAGAACTAGCTGCCTACCTTTTGGATTACCAAGGCTTTTCTGGT GTTCCACCAACAGCATTGGTTAGTATCTCACATGTCCCATTCCATGTCAGTGATGCCTTCTCTTTTCTCCTCCATG CCCTATAAGGTTGCTTCCTTGCAGCGATTTGTGGGTCATGATTTTGATGCAGGAGAATTGGGTCCAGGAAGCTTC CTAGTGAAGAGATGTGACAAAAAGGAAGCTTATAATCGACTTGGGACCGCTGAGCTTGTGCCTATTGATCATGGT CTCTGCCTCCCTGAATGCCTAGATGATCCTTACTTTGAATGGCTAAACTGGCCTCAAGCTTTGGTTCCATTCTCT GACACTGAACTGGATTATATATCCAATCTTGACCCTTTCAAAGACGCAGAACTTCTGAGAACTGAACTACACTCT CTGCCGGAATCTGCCATAAGGGTCCTCGTCGTCGTCGCACA<mark>GTT</mark>TTCTTAAAACAAGCAGCAGCTGCAGGGCTCTGT CTCGCGGAGATAGGCGAG<mark>AAG</mark>ATGACTCGGGATTTCTCC<mark>AAG</mark>GGTGAAGAGAGTTTCAGTCTGTTAGAGACCCTC

ANEXOS



Anexo A. Mapas do vetor de entrada pDONR Gateway utilizado para expressão em plantas

Anexo B. Mapas dos plamídeos Gateway utilizados para expressão em leveduras, de acordo com Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System user manual, Takara Bio, USA





Anexo C. Mapa do plasmídeo pNIC28-Bsa4 utilizado para construções gênicas LIC