

**CLONAGEM, CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO
GÊNICA E DO TRANSPORTE INTRA-ORGANELAR DA
PROTEASE FtsH-p1 DE TOMATE (*Lycopersicon
esculentum* Mill. cv. MicroTom)**

REINALDO MONTRAZI BARATA

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia, Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo – Brasil

Julho – 2003

**CLONAGEM, CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO
GÊNICA E DO TRANSPORTE INTRA-ORGANELAR DA
PROTEASE FtsH-p1 DE TOMATE (*Lycopersicon
esculentum* Mill. cv. MicroTom)**

REINALDO MONTRAZI BARATA
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **MARCIO DE CASTRO SILVA FILHO**

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia, Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Julho – 2003

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Barata, Reinaldo Montrazi

Clonagem, caracterização da expressão gênica e do transporte intra-organelar da protease FtsH-p1 de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Micro Tom) / Reinaldo Montrazi Barata. - - Piracicaba, 2003.

123 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.
Bibliografia.

1. Citogenética vegetal 2. Clonagem 3. Enzimas 4. Expressão gênica 5. Melhoramento genético vegetal 6. Proteínas 7. Recombinação genética 8. Tomate I. Título

CDD 635.642

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Aos meus pais Renato e Suely,

OFEREÇO

A Sabrina e Nathália,
responsáveis pelo estímulo e
inspiração no dia-dia,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

Ao Prof. Dr. Marcio de Castro Silva Filho pela orientação, amizade e paciência em todos os momentos;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro;

A todos os professores, alunos e funcionários do Departamento de Genética da ESALQ-USP, em especial aos técnicos Rafael Colombi e Carlos Alberto pelo auxílio e amizade;

Ao Prof. Dr. Lázaro Peres do Depto de Ciências Biológicas da ESALQ-USP pelo fornecimento das sementes de tomate utilizadas nesse trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, ESALQ-USP, pela amizade, convivência e incentivo em todos os momentos;

Aos amigos Phellippe Marbach, Juliana Dantas e Juliana Aparecida Fernando, pela participação e obtenção dos resultados;

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular, ESALQ - USP, pela amizade, e à Prof^a. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira por colocar seu laboratório à disposição.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética, ESALQ - USP, e à Prof^a Dra Margarida L. R. de Aguiar Perecin por colocar seu laboratório à disposição.

Aos colegas do Laboratório de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ - USP, em especial a Daniela Truffi e ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Aranha Camargo pelas facilidades de seqüenciamento.

Aos funcionários do Setor de Biblioteca Central e do Departamento de Genética da ESALQ – USP, pelos auxílios prestados.

De maneira muito especial, a
Sabrina Moutinho Chabregas pela sua admirável paciência, amor e incentivo nas circunstâncias mais difíceis.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Proteases.....	3
2.1.1 Proteases AAA.....	4
2.1.2 FtsH - uma metaloprotease bacteriana.....	5
2.1.3 FtsHs em leveduras.....	7
2.1.4 Proteínas AAA em plantas superiores.....	8
2.2 Importação de proteínas nos plastídios.....	16
2.2.1 Via de inserção dependente de SRP (<i>Signal Recognition Particle</i>).....	23
2.2.2 Direcionamento via Sec e dependente de Tat (Twin Arginine Translocation).....	25
2.2.2.1 Via de translocação Sec.....	26
2.2.2.2 Via Tat dependente.....	28
2.2.3 Inserção espontânea de proteínas nas membranas dos tilacóides.....	29
2.3 Regulação da expressão gênica.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Clonagem do cDNA da FtsH-p1 de tomate e localização subcelular.....	35
3.1.1 Construções gênicas.....	35
3.1.2 Espécie Vegetal.....	35
3.1.3 Análise das seqüências homólogas à FtsH-p1 em plantas superiores depositadas em Banco de Dados.....	35
3.1.4 Amplificação do fragmento correspondente à região central do gene	

homólogo à FtsH-p1 de tomate.....	36
3.1.4.1 Preparação do material e soluções para o isolamento de RNA total.	36
3.1.4.2 Extração de RNA de frutos e folhas de tomate.....	36
3.1.4.2.1 Homogenização.....	36
3.1.4.2.2 Fase de preparação.....	37
3.1.4.2.3 Precipitação do RNA.....	37
3.1.4.2.4 Lavagem do RNA.....	37
3.1.4.2.5 Ressuspensão do RNA.....	38
3.1.5 Eletroforese de RNA em gel desnaturante.....	38
3.1.6 Síntese da primeira fita de cDNA usando o Kit Seperscript II Pre-amplification system® para RT-PCR (Gibco-BRL).....	39
3.1.7 Reação de PCR para amplificação da sequência específica correspondente à região central do gene FtsH-p1.....	39
3.1.8 Extração do fragmento desejado (região central) do gel de agarose.....	40
3.1.9 Clonagem do fragmento proveniente da reação de PCR (1272 pb) utilizando o Kit Sure Clone™ Ligation da Amersham Pharmacia Biotech.....	40
3.1.9.1 Reação Blunting/Kinasing.....	41
3.1.9.2 Ligação.....	41
3.1.10 Preparação de células competentes de <i>E. coli</i> (JM 109) para transformação.....	41
3.1.11 Meios de culturas.....	42
3.1.12 Transformação de <i>E. coli</i> (JM 109).....	42
3.1.13 Avaliação da transformação ("screening" por PCR diretamente nas bactérias).....	43
3.1.14 "Mini-prep" para extração de plasmídios pUC18-FtsH-p1(1272 pb)	

das colônias selecionadas.....	44
3.1.15 Sequenciamento do DNA dos clones obtidos.....	44
3.1.16 Subclonagem do fragmento de 1272 pb correspondente à região central do gene FtsH-p1.....	45
3.1.17 Obtenção da extremidade 5' do gene FtsH-p1 à partir do fragmento amplificado (1272 pb) utilizando o Kit 5' RACE (RAPID AMPLIFICATION of cDNA ENDS) da Gibco-BRL.....	46
3.1.17.1 Isolamento do RNA total.....	46
3.1.17.2 Síntese da primeira fita do cDNA.....	46
3.1.17.3 Purificação do cDNA.....	47
3.1.17.4 Adição de uma cauda homolimérica (oligo-dC) na extremidade 3' do cDNA purificado utilizando a enzima Deoxinucleotidil Transferase Terminal (TdT).....	48
3.1.17.5 Reação de PCR com o cDNA dC-tailed.....	48
3.1.18 Extração do fragmento 5' FtsH-p1 do gel de agarose.....	49
3.1.19 Obtenção da extremidade 3' do gene FtsH-p1 à partir do fragmento amplificado no item 3.1.9.....	49
3.1.19.1 Isolamento do RNA total.....	49
3.1.19.2 Síntese da primeira fita do cDNA.....	49
3.1.19.3 Reação de PCR para obtenção da região 3' FtsH-p1 de tomate.....	50
3.1.20 Extração do fragmento 3' FtsH-p1 do gel de agarose.....	51
3.1.21 Obtenção do cDNA completo da FtsH-p1 de tomate utilizando DNA polimerase de alta fidelidade.....	51
3.1.21.1 Reação de PCR com a DNA polimerase <i>Pfu</i>	51
3.1.22 Construções gênicas envolvendo a região amino-terminal da FtsH- p1 e clonagem no vetor binário para transformação de plantas.....	52
3.1.22.1 Amplificação dos fragmentos.....	53
3.1.22.2 Restrição dos fragmentos e do vetor de expressão em plantas.....	53
3.1.23 Ensaio de expressão transiente da GFP em células epidérmicas de	

cebola.....	54
3.1.24 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	55
3.1.25 Transformação de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> com as construções pCAMBIA 35S-TP-GFP-NOS, pCAMBIA 35S-TP-H1-GFP-NOS, pCAMBIA 35S-TP-H1-loop-GFP-NOS e pCAMBIA 35-TP-H1-loop-H2-NOS.....	55
3.1.26 Extração de DNA e verificação da presença do T-DNA nas plantas..	56
3.1.27 Expressão dos transgenes.....	57
3.1.27.1 Extração de proteínas totais.....	57
3.1.27.2 Análise da concentração de proteínas.....	57
3.1.27.3 Eletroforese.....	58
3.1.27.4 Imunodeteção.....	58
3.1.28 Isolamento de cloroplastos e tilacóides.....	59
3.2 Clonagem da região promotora do gene <i>FtsH-p1</i> , utilizando a técnica PCR-TAIL.....	60
3.2.1 PCR-TAIL.....	62
3.2.2 Clonagem e sequenciamento dos fragmentos obtidos nas reações PCR-TAIL e busca por motivos regulatórios.....	63
3.2.3 Deleções e clonagem dos fragmentos no vetor pCAMBIA 1281Z.....	64
3.2.3.1 Construções gênicas envolvendo a região promotora da <i>FtsH-p1</i> e clonagem no plasmídio binário para transformação de plantas (pCAMBIA 1281Z).....	64
3.2.4 Expressão transiente e estável do gene <i>uid A</i> (GUS).....	66
3.2.5 Ensaio histoquímico da enzima β -glucuronidase (GUS).....	66
3.2.6 Ensaio fluorimétrico da enzima β -glucuronidase (GUS).....	66
3.2.6.1 Preparação do extrato celular.....	66
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
4.1 Análise das seqüências homólogas à <i>FtsH</i> em plantas superiores no	

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

