

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DO GENE AT1G52200 (*AtPLAC8-11.1*) DE *Arabidopsis thaliana*

Fernanda VALANDRO¹, Paloma Koprovski MENGUER¹, Alexandro CAGLIARI², Márcia MARGIS¹.

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); ² Universidade Estadual do Rio Grande do Sul
fernandavvalandro@gmail.com; paloma.menguer@gmail.com; alexandro-cagliari@uergs.edu.br;
marcia.margis@ufrgs.br

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM) da UFRGS

Resumo

A morte celular programada (PCD) é um processo geneticamente controlado que provoca o suicídio celular, ocorrendo em plantas durante seu desenvolvimento e quando exposta a diferentes condições de estresses ambientais. A rede denominada "AtLSD1 - deathosome" foi proposta em 2011 para descrever vários genes relacionados ao controle da PCD em *Arabidopsis thaliana*. O gene At1g52200, que codifica uma proteína do motivo PLAC8 (*placent specific 8*), foi descrito como componente dessa rede, mas sua função não havia sido estudada até o momento. O gene At1g52200 foi denominado *AtPLAC8-11* a partir de um alinhamento entre os 17 diferentes genes pertencentes à família gênica PLAC8 em *Arabidopsis*. O objetivo geral deste trabalho foi estudar *AtPLAC8-11.1* e verificar a existência do transcrito alternativo *AtPLAC8-11.2*, previsto *in silico*. Linhagens mutantes *knockdown* e *knockout* para *AtPLAC8-11.1*, com inserção de T-DNA no promotor e primeiro éxon do gene foram utilizadas para inferir função do em frente a condições de estresses abióticos.

INTRODUÇÃO

A morte celular pode ser conduzida por uma via de sinalização ativa, conservada e geneticamente programada, conhecida como morte celular programada (*Programmed Cell Death* - PCD) (MAIZEL, 2015; KABBAGE et al., 2017). A PCD direciona a eliminação seletiva de células durante o desenvolvimento vegetal e/ou em resposta a patógenos e sinais de estresse, de maneira a controlar o número de células, eliminando células danificadas ou desnecessárias, de modo a atingir e manter a homeostase celular (DICKMAN et al., 2017; AMBASTHA et al., 2015; PETROV et al., 2015). A PCD é parte integrante do ciclo de vida das plantas, sendo observada em diferentes etapas durante o desenvolvimento vegetal, como na formação de xilema, maturação de sementes, senescência foliar e vários processos reprodutivos das plantas, além de estar envolvida durante as interações planta-patógeno e estresses ambientais. Inversamente ao profundo conhecimento das formas de PCD em animais (por exemplo, a apoptose), o estudo sobre a regulação da PCD em plantas é limitado e as complexas redes moleculares que direcionam e controlam as diferentes formas de PCD em plantas recém estão sendo estabelecidas (DANEVA et al., 2016).

Uma maneira de obter informações sobre os mecanismos genéticos, moleculares e fisiológicos da PCD em plantas, em diferentes níveis de complexidade (celular ou organismo), dá-se através da identificação de mutantes de *Arabidopsis thaliana* que exibam morte celular de maneira desregulada (CZARNOCKA et al., 2017). Um dos mutantes mais bem estudados, em termos de PCD, é o *lsd1* (LESION SIMULATING DISEASE 1) (DIETRICH et al., 1997). Pesquisadores propuseram em seu trabalho uma rede denominada "AtLSD1 -deathosome",

composta por vários genes relacionados ao controle da PCD em plantas (Figura 1). Com os resultados obtidos através de duplo-híbrido em levedura foi apresentado um diagrama que descreve as interações entre os principais reguladores de morte celular conhecidos com seus parceiros de interação.

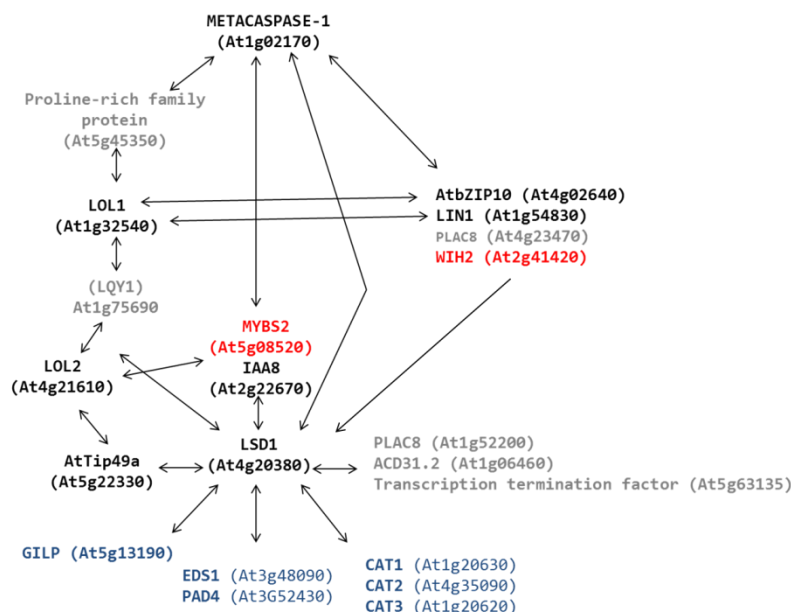


Figura 1 - Rede denominada "deathosome": Diagrama que descreve as interações entre os reguladores de morte celular conhecidos e seus parceiros de interações através de um duplo híbrido em levedura. Genes em cinza não foram caracterizados e os genes em vermelho são aqueles que foram caracterizados desde a última atualização do deathosome. Em azul estão os novos genes que fazem parte do deathosome. Adaptado de Coll, Eppl e Dangel (2011).

Dois genes que codificam proteínas com motivo PLAC8 (*Placenta-specific 8*), At1g52200 e At4g23470, interagem com LSD1 e foram descritos como componentes do “LSD1-deathosome”. As proteínas contendo motivos PLAC8 formam uma grande família cujos membros podem ser encontrados em fungos, algas, plantas superiores e animais e foram relatadas como tendo funções variadas nos diferentes organismos nos quais são expressas (SONG et al., 2011). Em plantas, por exemplo, as proteínas contendo o domínio PLAC8 são componentes importantes como reguladores da divisão celular e a organogênese (LIBAULT; STACEY, 2010). Ademais, em humanos, PLAC8 é fundamental para a progressão do câncer de pâncreas, promoção da conversão tumorigênica e a superexpressão de PLAC8 nos fibroblastos murinos levou ao aumento na resistência a estímulos apoptóticos e a perda do controle do ciclo celular (KINSEY et al., 2014; CABREIRA-CAGLIARI et al., 2018; ROGULSKI et al., 2005).

O gene *AtPLAC8-11.1* (At1g52200), pertencente à família PLAC8, localiza-se no cromossomo 1 e codifica uma proteína de 190 aminoácidos. Sua função molecular é desconhecida, porém predições indicam envolvimento em resposta a estresses oxidativos. De acordo com o banco de informações TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*) a localização subcelular predita da proteína é na membrana plasmática. Ainda de acordo com o

TAIR, verifica-se que *AtPLAC8-11.1* é expresso em diversas estruturas da planta como os cotilédones, célula guarda, hipocótilo, meristema de inflorescência, raiz, caule e folha.

MATERIAIS E MÉTODOS

CLONAGEM E TRANSFORMAÇÃO: Inicialmente realizou-se amplificação das sequências codificantes do gene *AtPLAC8-11.1* e do splicing alternativo *AtPLAC8-11.2*, seguida pela clonagem dos fragmentos amplificados no vetor de entrada pENTR/D-TOPO e pela recombinação com os vetores de destino para superexpressão (pEarleyGate 100, 101 e 302), bem como nos vetores que possuem fusão com a proteína fluorescente GFP (*green fluorescent protein*) para estudos de localização e colocalização subcelular (pMDC43 e pMDC83). Plantas transgênicas foram geradas através do método de Floral Dipping com os vetores pEarleyGate recombinados e protoplastos de *A. thaliana* foram transformados com os vetores pMDC43 e 83. Além disso, reações de PCR quantitativa (RT-qPCR) foram realizadas para análise da expressão de *AtPLAC8-11.1* e *AtPLAC8-11.2*.

CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES: No presente trabalho, foram selecionados e adquiridos os mutantes CS852038 e CS378853 para o gene *AtPLAC8-11.1*, com inserção de T-DNA no promotor e no primeiro éxon do gene, respectivamente, a partir do banco de sementes *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC). Foi realizada a genotipagem das plantas mutantes e experimentos de estresses abióticos foram realizados. Experimentos envolvendo estresse salino foram realizados comparando plantas selvagens e *knockout*. As plântulas foram inicialmente crescidas em placas petri contendo meio MS (Murashige and Skoog Basal Salt Mixture) por seis dias. Após, as plântulas são transferidas para placas quadradas contendo meio MS (controle) ou meio MS suplementado com NaCl 100, 140 e 200 mM. A posição inicial da ponta da raiz é marcada na placa e após 10 dias o comprimento da raiz primária é então quantificado. A concentração de 100 mM de NaCl foi utilizada para realizar um experimento de germinação envolvendo sementes do tipo selvagem, *knockdown* e *knockout*. Também realizamos experimentos envolvendo estresse térmico, onde plântulas selvagens, *knockdown* e *knockout* crescidas em placa petri contendo meio MS por sete dias foram expostas a um tratamento térmico por 1 hora a 45 °C sendo analisada a recuperação e sobrevivência das plântulas após transcorridos 10 dias do tratamento térmico.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

CLONAGEM E TRANSFORMAÇÃO: Todas as etapas de clonagens e transformação foram confirmadas por PCR de colônia, digestão enzimática e sequenciamento, havendo confirmação total dos insertos e transformações realizadas. O presente trabalho apresenta pela primeira vez a confirmação experimental da existência e amplificação da forma alternativa de splicing *AtPLAC8-11.2*. Obtivemos dificuldades para a seleção de plântulas de *A. thaliana* superexpressando *AtPLAC8-11.1* em meio seletivo contendo o herbicida Basta. Mesmo apresentando características de transformantes (expansão dos cotilédones e emissão do primeiro par de folhas verdadeiras) e apresentarem fluorescência, as possíveis plântulas transformantes apresentavam tamanho de raiz reduzido, cessando seu crescimento após alguns dias. Tal fato pode ser explicado devido ao elevado nível de toxicidade do herbicida Basta e da superexpressão de um gene relacionado com PCD, sendo

assim, as plântulas transformantes podem não suportar tal situação, diminuindo o tamanho da raiz e cessando seu crescimento. As análises dos transcritos de *AtPLAC8-11.1* e *AtPLAC8-11.2* por qRT-PCR mostraram um maior nível de expressão em parte aérea de *A. thaliana* da forma canônica do gene *AtPLAC8-11.1* em condições normais de crescimento. Os estudos de localização subcelular mostraram que *AtPLAC811.1* e *AtPLAC811.2* estão localizados no retículo endoplasmático e possivelmente no complexo de Golgi.

CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES: Os resultados da RT-qPCR com a parte aérea das plantas com inserção de T-DNA no gene *AtPLAC8-11.1* e com plantas selvagens indicaram que as linhagens CS852038 são *knockdown* e as linhagens CS378853 são *knockout* para o gene *AtPLAC8-11.1*, em comparação com as plantas selvagens. Os experimentos envolvendo estresse salino mostraram que não houve diferença significativa na inibição do tamanho da raiz entre as plantas selvagens e mutantes nas concentrações testadas (100, 140 e 200 mM de NaCl). O estresse salino (100 mM de NaCl) tem efeito significativo nas primeiras 24 horas de germinação das sementes *knockout*. O estresse por calor mostrou afetar severamente o desenvolvimento e a taxa de sobrevivência das plântulas mutantes em comparação com as selvagens.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados mostraram a existência de *AtPLAC8-11.2*, sendo que a localização subcelular da forma canônica e da variante de splicing ocorre no retículo endoplasmático. O estresse salino não parece afetar significativamente as plantas mutantes, mas o estresse térmico mostrou ser prejudicial. Os estudos envolvendo o fenótipo das plantas *knockdown* e *knockout* para o gene AT1G522200 quando submetidas a diferentes estresses ambientais serão realizados bem como a análise dos níveis de expressão de *AtPLAC8-11.1* e *AtPLAC8-11.2* em diferentes tecidos de *A. thaliana* em condições controle e quando submetidas a diferentes estresses abióticos.

AGRADECIMENTOS: Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular Vegetal, no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para o desenvolvimento do mesmo, contou-se com bolsa de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação (MEC) e bolsa de doutorado do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e recursos financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

REFERÊNCIAS

AMBASTHA, Vivek; TRIPATHY, Baishnab C; TIWARI, Budhi Sagar. *Programmed cell death in plants: A chloroplastic connection*. Plant Signaling & Behavior, [s.l.], v. 10, n. 2, p.1-7, fev. 2015.

CABREIRA-CAGLIARI, Caroline et al. *Revising the PLAC8 gene family: from a central role in differentiation, proliferation, and apoptosis in mammals to a multifunctional role in plants*. Genome, [s.l.], v. 61, n. 12, p.857-865, dez. 2018.

COLL, N S; EPPLE, P; DANGL, J L. *Programmed cell death in the plant immune system*. Cell Death & Differentiation, [s.l.], v. 18, n. 8, p.1247-1256, 8 abr. 2011.

CZARNOCKA, Weronika et al. *The dual role of LESION SIMULATING DISEASE 1 as a condition-dependent scaffold protein and transcription regulator*. Plant, Cell & Environment, [s.l.], v. 40, n. 11, p.2644-2662, 26 jul. 2017.

DANEVA, Anna et al. *Functions and Regulation of Programmed Cell Death in Plant Development*. Annual Review Of Cell And Developmental Biology, [s.l.], v. 32, n. 1, p.441-468, 6 out. 2016.

DIETRICH, Robert A. et al. *A Novel Zinc Finger Protein Is Encoded by the Arabidopsis LSD1 Gene and Functions as a Negative Regulator of Plant Cell Death*. Cell, [s.l.], v. 88, n. 5, p.685-694, mar. 1997.

DICKMAN, Martin et al. *Reassessing apoptosis in plants*. Nature Plants, [s.l.], v. 3, n. 10, p.773-779, 25 set. 2017.

KABBAGE, Mehdi et al. *The Life and Death of a Plant Cell*. Annual Review Of Plant Biology, [s.l.], v. 68, n. 1, p.375-404, 28 abr. 2017.

KINSEY, Conan et al. *Plac8 Links Oncogenic Mutations to Regulation of Autophagy and Is Critical to Pancreatic Cancer Progression*. Cell Reports, [s.l.], v. 7, n. 4, p.1143-1155, maio 2014.

LIBAULT, Marc; STACEY, Gary. *Evolution of FW2.2-like (FWL) and PLAC8 genes in eukaryotes*. Plant Signaling & Behavior, [s.l.], v. 5, n. 10, p.1226-1228, out. 2010.

MAIZEL, Alexis. *A View to a Kill: Markers for Developmentally Regulated Cell Death in Plants*. Plant Physiology, [s.l.], v. 169, n. 4, p.2341-2341, dez. 2015.

PETROV, Veselin et al. *ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants*. Frontiers In Plant Science, [s.l.], v. 6, p.1-2, 18 fev. 2015.

ROGULSKI, Kenneth et al. *Onzin, a c-Myc-repressed target, promotes survival and transformation by modulating the Akt-Mdm2-p53 pathway*. Oncogene, [s.l.], v. 24, n. 51, p.7524-7541, 19 set. 2005.

SONG, Won-yong. et al. *Common functions or only phylogenetically related? The large family of PLAC8 motif-containing/PCR genes*. Molecules And Cells, [s.l.], v. 31, n. 1, p.1-7, jan. 2011.