

Proposta para bolsa PIBIC – CNPEM

Pesquisadora: Dra. Lucia Mattiello – PPB – CTBE

Análise de transportadores de K⁺ de cana-de-açúcar através da complementação de leveduras mutantes

Introdução

A cana-de-açúcar é uma das mais importantes espécies vegetais cultiváveis do mundo, sendo o Brasil o principal produtor. Contudo, pouco se sabe sobre os mecanismos fisiológicos e moleculares da obtenção e funcionalidade de nutrientes na cana-de-açúcar. O potássio (K⁺) é o macronutriente mais absorvido pelas plantas, podendo corresponder a até 10% da massa fresca. Os transportadores de K⁺ são importantes para a obtenção do íon do solo, movimentos estomáticos, tolerância a estresses, mas principalmente por participarem do processo de carregamento e descarregamento de fotoassimilados para/do floema. Em *Arabidopsis thaliana* e *Vicia faba* alguns transportadores foram estudados, contudo não possuímos informações sobre essas proteínas em espécies de importância agrônômica como a cana-de-açúcar.

A atividade fotossintética é controlada pela força do dreno, portanto existe um balanço entre o fornecimento da fonte e a demanda do dreno. Adicionalmente, as atividades das enzimas relacionadas com a fotossíntese e a expressão de genes são modificadas com a demanda do dreno, talvez por isso, abordagens transcriptômicas focalizaram primariamente o crescimento vegetativo dos colmos (tecido dreno) de cana-de-açúcar durante a maturação dos entrenós acumuladores de sacarose. Sem a compreensão dos mecanismos que governam essa relação fonte-dreno, será mais difícil a obtenção de variedades que acumulam mais sacarose.

O potássio é o macronutriente mais extraído pela cana-de-açúcar, sendo que a maior parte permanece nos colmos e 45% nas folhas. O potássio é bastante conhecido por participar em processos de ativação enzimática, principalmente com aqueles relacionados com a fotossíntese. Em condições de extrema deficiência de K⁺ já foi reportado a diminuição da quantidade de clorofilas a e b além da diminuição de açúcares.

Para a manutenção de um bom funcionamento celular os organismos necessitam muitas vezes manter concentrações de solutos dentro de suas células muito diferentes do meio externo. Para isso existem proteínas transportadoras integrais transmembrana (também chamados de transportadores ou canais iônicos), que possuem a função básica de carregar solutos contra o gradiente de concentração. Graças a elas o potássio é mantido em concentrações muito mais altas dentro das células quando comparado com o meio extracelular. Todos os canais de K⁺ conhecidos, são relacionados à uma única família proteica, mas a diversidade entre os diferentes membros da família de canais de potássio está nas várias maneiras possíveis que fazem com que o poro do canal se abra. Eles são encontrados em células de bactérias, archeobactérias e eucariotos – tanto de plantas quanto de animais – e suas seqüências de aminoácidos são facilmente identificáveis, pois canais de potássio possuem um segmento altamente conservado denominado *K⁺ channel signature sequence*.

Em plantas o potássio está envolvido em diversas funções, tais como: movimentos osmoticamente controlados, carregamento e/ou descarregamento de cátion no xilema, nutrição catiônica, controle do

volume citosólico, sinalização celular, importantes funções durante o alongamento celular dependente de auxina, tolerância a estresses abióticos, carregamento e/ou descarregamento de carboidratos fotossintetizados para o floema.

A partir das folhas maduras (fonte) os fotoassimilados e K^+ são alocados no floema e transportados para o tecido dreno. Essa relação é tão forte que até mesmo a deficiência moderada de K^+ suprime a translocação de fotoassimilados.

Os transportadores ou canais de K^+ possuem importantes papéis na obtenção de K^+ do solo e sua distribuição por toda a planta. Em *Arabidopsis* existem, no mínimo, 35 genes que codificam para sistemas de transporte de K^+ para formarem canais monoméricos ou heteroméricos e podem ser divididos em três classes: *inward-rectifying K^+ channel* (K_{in}), *outward-rectifying K^+ channel* (K_{out}) e os transportadores de alta afinidade. O termo *rectifying* indica que o fluxo de potássio é em apenas uma direção, mas estudos indicam que fosforilações podem provocar modificações pós-traducionais e o fluxo ser em ambas direções.

Membros da família AKT2/3 são expressos no sistema vascular de *Arabidopsis*, milho, *Vicia faba* e *Populus* e podem estar envolvidos com o carregamento de açúcares nas células do floema.

Os transcritos de AKT2/3 aumentam gradualmente durante o período de luz, com seu pico de expressão ao meio dia, e decrescem com o fim do dia. A indução por luz também é dependente de CO_2 , indicando que os fotoassimilados regulam a expressão do AKT2/3. Em experimentos nos quais metade das rosetas eram sombreadas e a outra metade recebia luz, apenas as rosetas iluminadas apresentavam aumento de expressão do AKT2/3.

No mutante *akt2/3* os fotoassimilados vazavam do floema para as células adjacentes indicando ineficiência para a realocação de açúcares para o tecido vascular, assim, o AKT2/3 afeta o carregamento do floema e do transporte à longa distância provavelmente pela modulação do potencial elétrico do floema.

A proteína AKT2 é existente apenas em plantas superiores e pode sofrer alteração por fosforilação deixando de ser apenas um transportador K_{in} (*nonrectifying*) e passar a tanto transportar o K^+ para dentro ou para fora da membrana. Plantas com perda de função do AKT2 apresentam dificuldade em carregar o floema com fotoassimilados, já que o K^+ participa da regulação do *simporter* sacarose/ H^+ nas células do floema.

Recentemente, surgiram evidências de que o K^+ circulante no floema seria um estoque de energia descentralizada. Neste modelo, o K^+ é lançado no floema por tecidos fonte, local onde existe grande aporte de energia química. Um gradiente transmembrana de K^+ é então transportado pelo floema para outras partes da planta, como, por exemplo, para os tecidos dreno. Essa energia contida como um gradiente de K^+ pode ser utilizada para abertura de canais (como AKT2-like) para a passagem de K^+ pela membrana. Esse sistema permite o carregamento/recarregamento do floema sem custo energético para as células companheiras, já que, essa energia viria através da alocação de K^+ para o floema pelos tecidos fonte e pelo sequestro de K^+ pelos tecidos dreno. Plantas *knockout akt2-1* apresentaram diferenças fenotípicas em dias curtos em comparação com o tipo selvagem, fenótipo este restaurado quando o alelo AKT2 era colocado sob controle de um promotor específico de células companheiras, indicando que as diferenças fenotípicas do *akt2-1* podem ser atribuídas à perda de função do AKT2 no floema.

O gene *VFK1* de *Vicia faba*, descrito também como transportador de K^+ , parece ter a função oposta do gene *AKT2/3*. Os autores observaram uma maior expressão de *VFK1* em tecidos drenos, podendo-se inferir uma relação entre o transporte de K^+ e o acúmulo de sacarose em plantas.

O aumento da produtividade da cana-de-açúcar pode não depender somente da capacidade fotossintética de suas folhas, mas também da demanda por fotoassimilados pelos tecidos dreno, portanto, o estudo da expressão dos transportadores de potássio da cana-de-açúcar em tecidos fonte e tecidos dreno e em experimentos de sombreamento para criar uma força dreno maior é de suma importância para compreender os mecanismos que podem ajudar a melhorar a produtividade da cana-de-açúcar.

1.4. Levedura como modelo para a análise funcional de proteínas transportadoras

Mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* são muito importantes para o teste de complementação. O uso de linhagens de leveduras com deficiências apropriadas permitiu que diferentes carregadores fossem identificados em plantas, tais como transportadores de sacarose, e de aminoácidos entre outros.

Leveduras deficientes em canais de potássio também já foram utilizadas em diversos estudos para a determinação da função do canal hipotético. A levedura *S. cerevisiae* apresenta três tipos de transportadores específicos para potássio codificados pelos genes *TRK1*, *TRK2*, *TOK1*. Cada um desses sistemas de transporte apresenta uma grande similaridade na seqüência de transportadores de K^+ que são funcionalmente conhecidos em bactérias, plantas e células animais. Mutantes deletados para os genes *TRK1* e *TRK2* são incapazes de crescer em meios com baixa concentração de K^+ . O gene *TOK1* codifica um canal de potássio dependente de voltagem, mas sua função ainda não foi completamente esclarecida pois leveduras com mutações nesse gene são inviáveis.

Este projeto tem como objetivo principal identificar e caracterizar transportadores de K^+ de cana-de-açúcar através de duas estratégias: (1) busca por sequências ortólogas de cana-de-açúcar (ou em sorgo já que essa espécie possui mais de 90% de identidade com a cana-de-açúcar e apresenta o genoma completo) à aquelas já estudadas em *Arabidopsis thaliana* e *Vicia faba*. Para as sequências selecionadas serão desenhados primers e clonados para testes de complementação em leveduras mutantes para a capacidade de transportar K^+ .

Nesta proposta o aluno de IC irá desenvolver habilidades e aprender técnicas de biologia molecular para avaliar a expressão de genes.

- Extração de DNA genômico
- Análise de sequências de DNA com uso de softwares específicos
- Desenho de primers
- Reação de PCR para amplificação de genes
- Clonagem de genes em vetores do sistema Gateway
- Gel de agarose
- Clonagem em *E. coli*
- Extração de DNA plasmidial
- Clonagem em leveduras
- Teste de complementação
- Extração de DNA plasmidial de leveduras

Materias e métodos

Material Vegetal

As plantas de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 serão cultivadas a partir de toletes obtidos de colmos gentilmente cedidas pelo CTC (Piracicaba, SP). Os colmos serão seccionados e selecionados de acordo com a massa fresca para homogeneização do conteúdo de reserva para brotação. Os toletes serão plantados em bandejas de plástico com substrato Plantmax® e mantidos a pleno sol até a sua brotação. Para os experimentos utilizaremos plantas com cerca de 15 dias após o plantio.

Clonagem

Para todos os processos de clonagem de genes, optamos pela utilização do sistema Gateway (Invitrogen) e assim eliminar a etapa de digestão com enzimas de restrição já que as sequencias não são completamente conhecidas.

Serão buscados em banco de dados públicos as sequencias ortólogas do gene AKT2/3 de Arabidopsis em outras gramíneas, já que não existe tal sequencia nos bandos de dados de cana-de-açúcar. A partir dessas sequencias de gramíneas, serão desenhados primers (que podem ser degenerados) para tentativas de amplificação do gene de cana-de-açúcar a partir de DNA genômico de folhas de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 cultivada em campo coletadas e armazenadas imediatamente em nitrogênio líquido e acondicionadas em freezer -80°C até seu processamento. Cada gene será amplificado por PCR utilizando primers específicos com a sequencia necessária (CACC na região 5 do primer direto) para clonagem em *frame* no vetor pENTR (através do pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit de acordo com as especificações do fabricante). As colônias transformantes serão selecionadas em placas de meio LB contendo 50µg de kanamicina por mL. Colônias isoladas de bactérias serão selecionadas, o DNA plasmidial extraído com o uso do kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen) e sequenciado para verificação do *frame* e do sucesso da clonagem. Após essa primeira etapa, cada um dos genes serão transferidos para o vetor de destino Gateway® pYES-DEST52 Vector através da reação de recombinação homóloga executada pelo kit Gateway® LR Clonase® Enzyme Mix (Invitrogen). O vetor pYES resultante da recombinação será clonado em bactéria *E. coli* DH5α e selecionada em placas contendo 50µg de ampicilina por mL. Colônias isoladas de bactérias serão selecionadas, o DNA plasmidial será extraído com o uso do kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen) e sequenciado para verificação do *frame* e do sucesso da clonagem. O vetor pYES-DEST52 com cada um dos genes de cana serão clonados na cepa de levedura CY162 [MATa, Dtrk1, trk2::pCK64, his3, leu2, ura3, trp1, ade2] com o uso do kit Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 (Clontech) de acordo com as especificações do fabricante. Após a verificação do sucesso da clonagem em levedura através da extração de DNA plasmidial e digestão e/ou sequenciamento, as leveduras transformadas e os controles negativos (vetor sem inserto e leveduras não-transformadas) serão avaliadas em meio restritivo, ou seja, sem a presença de uracila.

Teste de complementação

Para avaliação da funcionalidade dos genes como transportadores de K⁺, as leveduras serão transformadas com os genes ortólogos, com o vetor vazio e com insertos desconhecidos da biblioteca

serão avaliados em meio de cultura restritivo. A cepa de levedura CY162 não cresce sem a presença do aminoácido essencial uracila no meio. Contudo, quando transformada com o vetor pYES, esse aminoácido é produzido, assim apenas as transformantes serão capazes de crescer no meio SC-URA (meio sintético sem o aminoácido uracila). Para os transformantes com genes ortólogos: cada um deles será pré-cultivado em meio SC-URA suplementado com 100mM de K^+ a 30°C por uma dia. Um mililitro de cada cultura será centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante descartado. As células serão então lavadas três vezes no mesmo meio SC-URA na ausência de K^+ e no final serão diluídas neste meio para atingir uma OD_{600} de 1.0. Essas diluições serão utilizadas para a produção de diluições seriadas 1:10 que serão plaqueadas em meio solido com diferentes concentrações de KCl (0; 0,2 mM; 50 mM e 100 mM) e a análise do crescimento será feito 2-7 dias após o plaqueamento. Existe também a alternativa de verificar o crescimento através do monitoramento da OD_{600} das leveduras em meio SC-URA líquido com as diferentes concentrações de K^+ . O esperado é que a complementação do fenótipo permita o crescimento da levedura em concentrações baixas de KCl. Serão feitas também placas controle com as mesmas concentrações de NaCl para descartar efeito no crescimento devido à osmolaridade de meio.