



Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Departamento de Ciências Biológicas



Clonagem e expressão heteróloga do peptídeo S1RALF4 em *Escherichia coli*

Projeto de pesquisa para TCC

Orientado: Felipe Georgete Scola

Orientador: Daniel S. de Moura

Piracicaba/SP
2023

1. Introdução

Primeiramente descoberto em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), os *rapid alkalization factors* (RALFs) são peptídeos hormonais de aproximadamente 5kDa que atuam como hormônios ubíquos no reino vegetal. Esses peptídeos podem ser encontrados em diversas espécies vegetais, entre dicotiledôneas e monocotiledôneas (CAMPBELL; TURNER, 2017) mas quase sempre possuindo sua característica principal de alcalinização apoplástica e inibição do crescimento radicular (PEARCE et al., 2001).

Além das diferenças entre táxons, uma mesma espécie pode apresentar diversas isoformas de RALFs, dentro dos quais se assemelham estruturalmente e funcionalmente, mas que individualmente se distinguem por grau de expressão regional, por participação em atividades distintas no metabolismo (MORATO DO CANTO et al., 2014) ou em respostas a estresses bióticos e abióticos (WANG et al., 2020).

Dentre os processos, os RALFs participam do processo de regulação da integridade e do crescimento do tubo polínico (GE et al., 2017), inibição do hipocótilo e redução do crescimento radicular em *A. thaliana* e *Solanum lycopersicum* (PEARCE et al., 2001; HARUTA et al., 2014). Eles podem ainda se relacionar com a floração através de seu receptor quinase FERONIA (WANG et al., 2020b) e afetar a mobilização de cálcio intracelular (GJETTING et al., 2020).

Com relação aos RALFs de *Solanum lycopersicum* (atualmente denominados de SIRALFs), algumas pesquisas mostram alguns de seus papéis fisiológicos como seu papel na inibição da germinação do pólen e na capacidade de SIPRALF (SGN-U324197 ou Solyc07g063030.1) afetar a elongação do tubo polínico (Covey et al., 2010). Entretanto, muito se tem pesquisado sobre os peptídeos RALFs em *A. thaliana*, principalmente tendo em vista sua praticidade, o que resultou em um menor investimento em pesquisas com tomateiro (*S. lycopersicum*).

Dentro do grupo dos SIRALFs, SIRALF4 (solyc02g089080) ganha destaque pois sua conformação final é obtida por splicing alternativo com a retirada de éxons (FERNANDEZ-POZO 2015). Além disso, outro fator que destaca este peptídeo em relação aos outros é o fato de ser o RALF mais expresso nas folhas de tomateiro (THE TOMATO GENOME CONSORTIUM, 2012). A partir disso, o presente estudo visa explorar mais a fundo as pesquisas sobre os SIRALFS, especialmente SIRALF4, através da clonagem do gene, expressão heteróloga e ensaios para melhor compreensão das funções na fisiologia do tomateiro.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Compreender melhor o papel dos peptídeos hormonais RALF para *Solanum lycopersicum* e para as plantas.

2.2. Objetivos Específicos

- Clonagem do gene SIRALF4 (solyc02g089080) em *E. coli*.
- Expressão heteróloga da proteína
- Ensaio de alcalinização em células em suspensão
- Ensaio de inibição de radicular

3. Metodologia

3.1. Clonagem

A clonagem do gene deve se iniciar com a extração de RNA, que será realizada conforme o protocolo do fabricante (Quick-Zol, Ludwig). Após a extração de RNA, adiciona-se uma etapa com DNAses livres de RNAses (RQ1) e, caso necessário, uma re-extração com Quick-Zol para aumentar o grau de pureza da amostra. Em seguida, o cDNA será sintetizado por meio de transcriptase reversa utilizando a enzima SCRIPT 3.0 Reverse Transcriptase (Cellco), seguindo o protocolo do fabricante, seguido de uma PCR Touch Down utilizando a enzima ‘TAQ *High Fidelity*’ com primers específicos para o fragmento de interesse. Neste ponto uma corrida em gel de agarose 1,5% é realizada para confirmar a PCR (MORATO DO CANTO et al., 2014).

Os fragmentos amplificados são clonados segundo a técnica de clonagem ‘Gateway’, ou seja, são inseridos em um vetor de entrada “pENTR/D-TOPO” e posteriormente inseridos no vetor de expressão “pDest17”, as bactérias serão cultivadas em meio SOB/SOC com a adição de antibióticos específicos. Por fim, a confirmação final ocorre com a extração do plasmídeo seguido de sequenciamento genético (MORATO DO CANTO et al., 2014).

3.2. Expressão heteróloga

Para a expressão heteróloga são utilizadas as bactérias clonadas na etapa anterior, a princípio inocula-se uma placa de petri com meio LB sólido [triptona (10 g/L); extrato de levedura (5 g/L); NaCl (10 g/L); ágar bacteriológico (16 g/L)], que cresce a 37°C por 1 d. Após isso, duas colônias são coletadas e transferidas para 5 mL de LB líquido com 50-100 µg/mL de ampicilina, que ficarão sob agitação de 200 rpm a 37°C *overnight* até saturar. O inóculo inicial saturado é adicionado a um Erlenmeyer de 1 L contendo 500 mL do mesmo LB e incuba-se sob as mesmas condições até que a densidade óptica esteja entre 0,6 e 0,9. Atingida a densidade ótica desejada, adiciona-se 0,05% de lactose (g/L) ao meio LB divididos em duas partes: uma primeira (75%) no início da cultura e o restante (25%) após 3 h. Após a adição da segunda parte da lactose, deixa-se a cultura crescer por mais 6 h. As células são centrifugadas em tubos Falcon de 50 mL (5000 rpm, 4°C, 5 min) e o precipitado é armazenado a -20°C até posterior utilização (MORATO DO CANTO et al., 2014).

3.3. Purificação

As bactérias são ressuspensas em solução tampão de pH 8 (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-base; 8 M uréia, pH 8,0) permanecendo em agitação orbital por 1 h. A solução então passa para uma etapa de lise celular em bomba Parr com gás nitrogênio, por duas vezes seguidas (10 min cada) sob pressão interna de 1500 psi. Com as células lisadas, o material passa novamente por agitação (30 min) e é centrifugado (10500 rpm; 24°C; 40 min) deixando o conteúdo proteico de interesse dissolvido em solução (MORATO DO CANTO et al., 2014).

O material passa então por uma coluna de cromatografia de afinidade usando uma resina de níquel (Ni-NTA, Qiagen) já equilibrada com solução tampão TRIS pH 8, seguida de lavagem da coluna com 15 mL de tampão TRIS pH 6,3 e eluição da proteína com coleta através de 5 mL de solução TRIS pH 3,3. Em seguida, os peptídeos seguem para uma etapa de diálise em uma membrana de nitrocelulose contra uma solução de 0,2% (v/v) de ácido fórmico (4°C sob agitação suave). A solução é trocada 6 vezes em 4 d, e termina com a liofilização do material. Em seguida, os peptídeos passam por uma purificação final e quantificação em HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*), o produto liofilizado é dissolvido em 1 mL de ácido fórmico 0,1% (v/v) e injetado em uma coluna C18-HPLC semipreparativa de fase reversa (Kromasil), na corrida é utilizado um gradiente de 0 a 40% de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (v/v) com fluxo de 1 mL/min. Por fim, repete-se o procedimento da purificação para quantificação (DRESSANO et al., 2017).

3.4. Ensaios Biológicos

Um ensaio de alcalinização das amostras é realizado com o intuito de confirmar a presença do peptídeo correto, tendo em vista a característica de alcalinização dos RALFs. Sua preparação acontece com o uso de uma cultura de células em suspensão de tabaco (BY-2), que são semanalmente transferidas para novo meio de cultura MS para suspensão celular (4,3 g de sais MS/MURASHIGE & SKOOG; 30 g/L sacarose; 10 mL de solvente B1-Inositol; 3 g/L KH₂PO₄; 100 uL 2,4-D a 10 mM) e são utilizadas 3-5 pós-transferência. Aliquotas de 2 mL da suspensão são distribuídas em uma placa de 24 poços, e ficam equilibrando por 1 h a 130 rpm a 25°C. No momento de início do ensaio, são adicionados os peptídeos produzidos, sob diferentes concentrações e mantendo também poços-controle do ensaio, o pH é medido usando um medidor Orion modelo EA940 nos tempos 0, 5, 15 e 30 minutos (MORATO DO CANTO et al., 2014).

O ensaio de crescimento radicular ocorre com meio de cultura MS/MURASHIGE & SKOOG (0,4% ágar, m/v). Sementes esterilizadas são colocadas em placas de petri controle e com diferentes concentrações do peptídeo produzido, as placas então são colocadas para crescimento no sentido vertical sob luz constante e temperatura de 24°C. Após 48 h, uma solução esterilizada dos peptídeos recombinantes é adicionada e incubada por mais 72 h sob as mesmas condições para posterior medição do comprimento radicular (MORATO DO CANTO et al., 2014).

4. Cronograma

	1º Mês	2º Mês	3º Mês	4º Mês	5º Mês	6º Mês
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X
Clonagem do gene na bactéria	X	X				
Produção e purificação do peptídeo		X	X	X		
Experimentos peptídeo-planta				X	X	X
Escrita da conclusão do TCC					X	X

5. Resultados esperados

Espera-se que ao final do projeto tenha-se obtido uma bactéria modificada e que se tenha produzido uma quantidade de SIRALF4 suficiente para os experimentos. Além disso, espera-se ter adaptado os protocolos para os ensaios biológicos e ensaios de caracterização do peptídeo.

6. Referências Bibliográficas

CAMPBELL, L.; TURNER, S. R. A Comprehensive Analysis of RALF Proteins in Green Plants Suggests There Are Two Distinct Functional Groups. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. January, p. 1–14, 24 jan. 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00037/full>>.

COVEY, P. A.; SUBBAIAH, C. C.; PARSONS, R. L.; PEARCE, G.; LAY, F. T.; ANDERSON, M. A.; RYAN, C. A.; BEDINGER, P. A. A Pollen-Specific RALF from Tomato That Regulates Pollen Tube Elongation. **Plant Physiology**, v. 153, n. 2, p. 703–715, 3 jun. 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/plphys/article/153/2/703/6109588>>.

DRESSANO, K.; CECILIATO, P. H. O.; SILVA, A. L.; GUERRERO-ABAD, J. C.; BERGONCI, T.; ORTIZ-MOREA, F. A.; BÜRGER, M.; SILVA-FILHO, M. C.; MOURA, D. S. BAK1 is involved in AtRALF1-induced inhibition of root cell expansion. **PLOS Genetics**, v. 13, n. 10, p. e1007053, 13 out. 2017. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1007053>>.

FERNANDEZ-POZO, N.; MENDA, N.; EDWARDS, J. D.; SAHA, S.; TECLE, I. Y.; STRICKLER, S. R.; BOMBARELY, A.; FISHER-YORK, T.; PUJAR, A.; FOERSTER, H.; YAN, A.; MUELLER, L. A. The Sol Genomics Network (SGN)—from genotype to phenotype to breeding. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D1036–D1041, 28 jan. 2015. Disponível em:

<<http://academic.oup.com/nar/article/43/D1/D1036/2439072/The-Sol-Genomics-Network-SGNfrom-genotype-to>>.

GE, Z.; BERGONCI, T.; ZHAO, Y.; ZOU, Y.; DU, S.; LIU, M.-C.; LUO, X.; RUAN, H.; GARCÍA-VALENCIA, L. E.; ZHONG, S.; HOU, S.; HUANG, Q.; LAI, L.; MOURA, D. S.; GU, H.; DONG, J.; WU, H.-M.; DRESSELHAUS, T.; XIAO, J.; CHEUNG, A. Y.; QU, L.-J. Arabidopsis pollen tube integrity and sperm release are regulated by RALF-mediated signaling. **Science**, v. 358, n. 6370, p. 1596–1600, 22 dez. 2017. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.aao3642>>.

GJETTING, S. K.; MAHMOOD, K.; SHABALA, L.; KRISTENSEN, A.; SHABALA, S.; PALMGREN, M.; FUGLSANG, A. T. Evidence for multiple receptors mediating RALF-triggered Ca²⁺ signaling and proton pump inhibition. **Plant Journal**, v. 104, n. 2, p. 433–446, 2020.

HARUTA, M.; SABAT, G.; STECKER, K.; MINKOFF, B. B.; SUSSMAN, M. R. A Peptide Hormone and Its Receptor Protein Kinase Regulate Plant Cell Expansion. **Science**, v. 343, n. 6169, p. 408–411, 24 jan. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1244454>>.

MORATO DO CANTO, A. et al. Biological activity of nine recombinant AtRALF peptides: Implications for their perception and function in Arabidopsis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 75, p. 45–54, fev. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.12.005>>.

PEARCE, G. et al. RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 22, p. 12843–12847, 23 out. 2001. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.201416998>>.

THE TOMATO GENOME CONSORTIUM. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. **Nature**, v. 485, n. 7400, p. 635–641, 30 maio 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature11119>>.

WANG, L. et al. RALF1-FERONIA complex affects splicing dynamics to modulate stress responses and growth in plants. **Science Advances**, v. 6, n. 21, p. eaaz1622, 20 maio 2020a. Disponível em: <<https://advances.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciadv.aaz1622>>.

WANG, L. et al. Receptor kinase FERONIA regulates flowering time in Arabidopsis. **BMC Plant Biology**, v. 20, n. 1, p. 26, 16 dez. 2020b. Disponível em: <<https://bmcpantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12870-019-2223-y>>.

7. Assinatura

Handwritten signature of Felipe G. Scola in black ink, written in a cursive style. The signature is positioned above a horizontal line.

Felipe G. Scola
Orientado

Daniel S. de Moura
Orientador



COMISSÃO DE ÉTICA AMBIENTAL NA PESQUISA - ESALQ/USP

CERTIFICAÇÃO DE DOCENTE

A Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa (CEAP), Ad Referendum, **CERTIFICOU** o Prof. Dr. **Daniel Scherer de Moura**, Departamento de Ciências Biológicas, pelo período de **28/04/2021 à 27/04/2024**.

Piracicaba, 18 de março de 2021.

Profa. Dra. Wanessa Melchert Mattos
Presidente da CEAP/ESALQ/USP