

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FACTORES DE TRANSCRIÇÃO QUE REGULAM A EXPRESSÃO DO GENE *NHX1* EM ARROZ.

Plano trabalho

O desenvolvimento e produtividade das plantas são fortemente afectados pela elevada salinidade. De modo a garantir a sobrevivência nestes ambientes adversos, as plantas evoluíram no sentido de adoptarem uma série de mecanismos de protecção. A resposta e adaptação das plantas à salinidade consiste numa série de alterações nos seus processos fisiológicos, bioquímicos, celulares e moleculares. Nestas condições, a expressão de muitos genes é alterada, sendo esta alteração regulada através de factores de transcrição (FT). Um bom exemplo é o gene *NHX1*. Este gene codifica para uma bomba Na^+/H^+ e a sua expressão é altamente induzida por níveis elevados de NaCl. O estudo da regulação transcricional dos genes que respondem à elevada salinidade, nomeadamente do gene *NHX1*, irá contribuir para a compreensão das vias reguladoras, que controlam a expressão dos genes de resposta à salinidade em particular e aos stresses abióticos em geral.

O principal objectivo deste projecto é a identificação e caracterização funcional de novos FT que regulam a expressão do gene *NHX1* de arroz.

Tarefas:

A identificação dos factores de transcrição que regulam o gene *OsNHX1* vai ser realizada utilizando a técnica de Yeast One Hybrid (Y1H). Neste sentido já foram construídas 4 estirpes de levedura ("bait strains") com fragmentos (~500 pb cada) do promotor do gene *OsNHX1*. Estas estirpes, em conjunto com uma biblioteca de expressão de cDNA de arroz induzido pela elevada salinidade (construída no nosso laboratório), serão utilizadas para a técnica de Y1H.

1- Identificação dos factores de transcrição que regulam a expressão do *OsNHX1*

Cada estirpe de levedura contendo um dos fragmentos do promotor do gene *OsNHX1*, será transformada com a biblioteca de expressão de cDNA. As leveduras transformadas com as duas construções serão então crescidas em meio selectivo de modo a seleccionar os clones em que há interacção proteína - DNA. Dos clones de levedura seleccionados serão extraídos os respectivos plasmídeos, que serão posteriormente sequenciados de modo a identificar o factores de transcrição que contêm.

2- Validação dos resultados obtidos por "Yeast One Hybrid"

A validação da interacção proteína (factor de transcrição) – DNA (promotor) será, inicialmente, realizada por re-transformação individual de levedura com cada um dos plasmídeos entretanto isolados (tarefa 3). Se esta re-transformação voltar a indicar uma possível interacção, será então necessário recorrer a técnicas *in vitro* para a confirmação final. A técnica utilizada será então o “gel/band gift assay”. Para realizar esta técnica será necessário sobre-exprimir e purificar a proteína em estudo. As proteínas serão sobre-expressas em *E.coli*, em fusão com uma cauda de 6xHIS, utilizando vectores de expressão baseados na tecnologia de GATEWAY™. Depois de purificada em coluna (agarose Ni-NTA), a proteína será utilizada nos ensaios de interacção *in vitro*.

3- Análise funcional dos novos factores de transcrição através de estudos de expressão.

Depois de confirmada a interacção entre o factor de transcrição isolado e o promotor do gene *OsNHX1* é necessário proceder à análise funcional deste(s) gene(s). Se se isolarem vários factores de transcrição que interajam com o promotor do gene *OsNHX1*, serão seleccionados apenas o(s) mais interessantes para caracterizar funcionalmente. Esta análise será inicialmente realizada através de estudos de expressão (real time RT-PCR), os quais consistirão em analisar os níveis de transcrição do gene em resposta ao stress provocado pela salinidade e secura, durante vários tempos de exposição.

Em termos de perspectivas futuras, a análise funcional destes genes poderá passar pela sobre expressão ou silenciamento destes genes em *Arabidopsis* ou arroz, para perceber de que modo é que estes genes estão associados ao fenótipo da planta e qual o seu papel na regulação dos genes a jusante na cadeia de transdução de sinal de resposta à salinidade.

Duração e carga horária: de 6 meses a um ano, 35 horas semanais.

Local de realização: Laboratório de Engenharia Genética de Plantas, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras

Orientador: Nelson Saibo, saibo@itqb.unl.pt

Tel: 214469644

Numero de estagiários: 1