

CARLOS PRIMINHO PIROVANI

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA PROTEÍNA S-64, ENVOLVIDA NO
TRANSPORTE DE SACAROSE EM SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
JUNHO- 1999

CARLOS PRIMINHO PIROVANI

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA PROTEÍNA S-64, ENVOLVIDA NO
TRANSPORTE DE SACAROSE EM SOJA (*Glycine max* (L) Merrill)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 4 de março de 1999

Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva
(Conselheiro)

Prof. Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Conselheira)

Prof. Sebastião Tavares de Rezende

Prof. Wagner Campos Otoni

Prof. Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

A Deus, acima de tudo.

À minha esposa Nilza.

Aos meus pais Geraldo e Adelaide.

Aos meus irmãos Geraldo, Adelaide, José, Luís,
Margarida e Sebastião.

Aos meus amigos.

AGRADECIMENTO

À minha orientadora Dra. Elizabeth P. B. Fontes, pela compreensão, pela amizade e pelo apoio fundamental na realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do Curso.

Aos professores conselheiros Dr. Marco Aurélio Pedron e Silva e Dr^a. Maria Goreti de Almeida Oliveira, pelo apoio e pela disponibilidade.

À minha esposa Nilza, pelo amor, pelo incentivo constante e pela agradável companhia.

A todos os professores do Curso, pelo apoio e pela dedicação em ensinar.

Aos amigos que contribuíram diretamente para o êxito deste trabalho, em especial a Joci Neuby, Luiz Antônio e Cláudia Macêdo.

Aos amigos de república Osvaldo, Marcelo, João Luiz, Paulo, Dário e Geneilcimar, pelo companheirismo e pela amizade.

Aos funcionários do Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela colaboração e pela simpatia.

Aos colegas de Curso, pela amizade, pelo companheirismo e pelos momentos compartilhados.

Aos colegas de laboratório Júlio, Nelson, Soninha, Fátima, Rafaelo, Fabiana, Andréia, Andréa, João, Reginaldo, Eduardo, Poliane, Marcelo e Raul, pela amizade, pela simpatia e pelo bom convívio.

À amiga Sônia Madali Carolino Boseja, pela imensa colaboração nas correções dessa redação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

A todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao querido povo brasileiro.

BIOGRAFIA

CARLOS PRIMINHO PIROVANI, filho de Geraldo Pirovani e Adelaide Carvalho Pirovani, nasceu em Alegre, Estado do Espírito Santo, a 10 de agosto de 1971.

Em 1988 formou-se Técnico em Agropecuária pela EAFA em Alegre, ES.

Em fevereiro de 1997, diplomou-se Engenheiro-Agrônomo pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Em março de 1997, iniciou o Curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal nessa mesma Universidade, concentrando seus estudos na área de Biologia Molecular de Plantas.

CONTEÚDO

	Página
EXTRATO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. Características do transporte de sacarose em plantas	03
2.2. Transportadores de sacarose.....	06
2.3. SBP (“Sucrose Binding Protein”)	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Material vegetal	15
3.2. Clonagem molecular.....	15
3.2.1. Estratégia geral de clonagem	15
3.2.2. Descrição dos clones.....	17
3.2.2.1. Clonagem de regiões codificadoras e versões	
truncadas de s-64 em pET-16b	17

3.2.3. Mutação dirigida <i>in situ</i> na seqüência consenso de ligação à ATP/GTP.....	20
3.3. Expressão da proteína S-64, versões truncadas em <i>E. coli</i> e purificação das proteínas recombinantes	23
3.4. Transcrição e tradução <i>in vitro</i> de S-64.....	24
3.5. Isolamento de DNA plasmidial	26
3.6. Produção de anticorpos policlonais contra S-64	27
3.7. Isolamento de fração microsomal de sementes de soja	28
3.8. Eletroforese em gel de acrilamida e “immunoblotting”	29
3.9. Análise do domínio de oligomerização da proteína S-64	30
3.10. Ensaio de funcionalidade do sítio de ligação à GTP	30
3.11. Cultura de células embriogênicas de soja em suspensão	32
3.12. Eletroporação de células em suspensão	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. Peptídeo sinal da proteína S-64 reconhecido em <i>E. coli</i>	35
4.2. Proteína S-64 associada a membranas plasmáticas de células de cotilédones de soja	39
4.3. Peptídeo sinal de S-64 (não é clivado)	42
4.4. Proteína S-64 (forma oligômeros)	44
4.5. Sítio de ligação à GTP de S-64 (é funcional)	48
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

EXTRATO

PIROVANI, Carlos Priminho, M. S., Universidade Federal de Viçosa, junho de 1999.
Caracterização bioquímica da proteína S-64, envolvida no transporte de sacarose em soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Conselheiros: Marco Aurélio Pedron e Silva e Maria Goreti de Almeida Oliveira.

O cDNA da proteína S-64, homóloga à proteína de ligação à sacarose (SBP), foi previamente isolado de uma biblioteca de expressão de cotilédones de soja. A seqüência de aminoácidos deduzida da proteína S-64 apresenta 85% de identidade com a proteína de ligação à sacarose (SBP), um provável sinal, um sítio consenso de glicosilação e um sítio consenso de ligação à ATP/GTP. Nessa investigação, uma versão truncada da proteína S-64 foi expressa em *E. coli* e a proteína recombinante purificada, utilizada em ensaios de caracterização bioquímica. Além da alta conservação de seqüência com SBP, o fracionamento subcelular de cotilédones demonstrou que a proteína S-64 está associada a membranas. Consistente com sua localização subcelular, o terminal amino hidrofóbico da proteína parece ter função de Peptídeo sinal, uma vez que a proteína intacta não foi acumulada em *E. coli*, ao passo que a proteína S-64 isenta do Peptídeo sinal foi eficientemente sintetizada em bactéria. Provavelmente, o sistema de secreção da *E. coli* reconheceu o terminal hidrofóbico da proteína intacta, e a proteína recombinante foi secretada e degradada. No entanto, tradução *in vitro* do RNA sintético de S-64 usando reticulócitos de coelho, na presença de membranas microsomais pancreáticas caninas, demonstrou que o Peptídeo sinal de S-64 não é

clivado. Tal resultado indicou que a proteína S-64 é uma proteína de membrana do tipo II, e o seu terminal amino apresenta as funções de Peptídeo sinal, endereçando a proteína para o retículo endoplasmático; e domínio transmembrana, fixando a proteína na membrana plasmática. A capacidade de S-64 oligomerizar foi avaliada em géis semidesnaturantes e o seu domínio de oligomerização mapeado, correspondente aos aminoácidos 36 a 343, usando-se versões truncadas da proteína. A possibilidade de a proteína ligar-se à GTP por meio do seu sítio consenso de ligação a nucleotídeos foi determinada por “GTP dot blot”. A proteína S-64 liga-se à GTP, preferencialmente à ATP, uma vez que uma versão de S-64 produzida em *E. coli* foi marcada radioativamente por [³²Pα]-GTP, na presença de ATP não marcado como competidor. O sítio de ligação à GTP foi delimitado pelo teste de perda de função a partir de mutação dirigida *in situ*. De fato, mutação no putativo sítio de ligação a ATP/GTP bloqueia a referida atividade da proteína. Tais resultados estabelecem que a proteína S-64 é, de fato, uma proteína de ligação à GTP associada à membrana. A atividade de ligação à GTP da proteína pode estar envolvida na regulação da função da proteína como transportadora de sacarose.

ABSTRACT

PIROVANI, Carlos Priminho, M.S., Universidade Federal de Viçosa, June, 1999.
Biochemical Characterization of a Sucrose Binding Protein Homologue From Soybean (*Glycine max* L. (Merill)). Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.
Committee Members: Marco Aurélio Pedron e Silva and Maria Goreti de Almeida Oliveira

A sucrose binding protein (SBP) homologue, named S-64 protein, was previously identified by cloning its cDNA from a soybean cotyledon expression library. The deduced aminoacid sequence for S-64 shares 85% identity with the sucrose-binding protein (SBP), possesses a putative peptide signal, a potential site for N-linked glycosylation and a nucleotide (ATP/GTP)-binding consensus sequence. In this investigation, the S-64 gene and truncated versions of the cDNA were expressed in *E. coli* and the purified recombinant proteins were used in biochemical characterization assays. In addition to high sequence conservation with SBP, subcellular fractionation of cotyledon cells demonstrated that the S-64 protein is a membrane-associated protein. Consistent with its subcellular localization, the hydrophobic amino terminus of the protein seems to function as a signal peptide because an intact protein failed to accumulate in *E. coli*, whereas a peptide signal free-protein was efficiently produced in *E. coli*. Probably the secretion system of *E. coli* recognized the hydrophobic stretch of aminoacids and the heterologous protein was secreted and degraded. Nevertheless, *in vitro* translation of synthetic S-64 RNA using a cell-free system in the presence of microsomal membranes demonstrated that the S-64 signal peptide was not cleaved.

These results suggest that the S-64 is a type II membrane protein and its peptide signal may serve as dual function. It may address the synthesis of the protein to the endoplasmic reticulum (ER) and may target the protein to membranes. The ability of the protein to undergo oligomerization was analyzed in native gels. The S-64 oligomerization domain was mapped to an internal region of the protein, aminoacids 36 a 343, by assaying the ability of truncated versions of the proteins to oligomerize in native gels. The ability of the protein to associate with nucleotides through its conserved binding sequence was determined by a GTP-binding blot assay. The S-64 protein binds GTP, rather than ATP, because the *E. coli* produced S-64 was radiolabeled by [³² P α]-GTP in the presence of large excess of unlabeled ATP competitor. The GTP binding site was delimited by loss of function assays in which the ability of site directed mutants to retain the GTP binding activity was evaluated. In fact, mutation in the putative GTP/ATP binding site blocked GTP binding. These results established that the S-64 protein is, in fact, a GTP-binding membrane-associated protein. The GTP binding activity of S-64 may be involved in the regulation of the protein function.

1. INTRODUÇÃO

O transporte a longa distância de sacarose e outros compostos orgânicos na planta ocorre via fluxo em massa no floema (GALLET et al., 1992; STITT, 1996). A produção de sacarose nos órgãos-fonte, como folhas maduras, parece regular a taxa e direção do transporte de assimilados em plantas superiores. Similarmente, a remoção de sacarose nos órgãos-dreno em crescimento é que provê a força para a importação de sacarose e determina a taxa relativa de crescimento de órgãos-dreno em competição na planta (STITT, 1996). Uma característica agrônômica da soja, e outras plantas cultivadas, que merece atenção é a sua capacidade de enchimento de grãos, a qual depende da capacidade de produção de assimilados nas folhas maduras e da atividade dos transportadores envolvidos no carregamento e descarregamento do floema.

As proteínas carreadoras medeiam o transporte de sacarose através da membrana plasmática, desempenhando como principal função fisiológica a distribuição de carboidratos e, indiretamente, favorecem a mobilidade de todos os solutos translocados por fluxo em massa no floema (GALLET et al., 1992). Portanto, estudos e caracterização de transportadores de sacarose através da membrana plasmática são de grande importância para avanço no entendimento dos processos fisiológicos das plantas superiores. São conhecimentos que podem resultar em fundamentos teóricos para trabalhos posteriores de melhoria na capacidade de enchimento de grãos da espécie em questão. De fato, a atividade de transportadores na membrana plasmática de células de cotilédones em desenvolvimento parece estar intimamente relacionada ao período de acúmulo de reservas nas sementes (FRÖMMER e SONNERWALD, 1995; STITT, 1996).

Recentemente, foi isolado um cDNA de soja, de uma biblioteca de expressão, propagada em λ gt11, usando-se como sonda anticorpos contra proteínas de membranas parcialmente purificadas (MATRANGOLO, 1998). Esse cDNA, denominado pUFVS64, foi completamente seqüenciado e o seu produto é uma proteína de PM 64.000, denominada S-64, que apresenta 85% de identidade de seqüência com uma proteína de ligação à sacarose (SBP) (RIPP et al., 1988; GRIMES et al., 1992). A alta homologia de seqüência entre as proteínas S-64 e SBP indica analogia funcional e envolvimento de S-64 no transporte de sacarose através da membrana plasmática (MATRANGOLO, 1998).

A análise de funcionalidade da proteína S-64 foi conduzida por meio da tecnologia de inibição anti-senso em plantas de fumo transgênicas (PEDRA, 1998). Repressão anti-senso do gene *s-64* endógeno em fumo resultou em um maior acúmulo de amido nas folhas das plantas transgênicas e redução da taxa fotossintética. Em contraste, transgenes de fumo superexpressando o gene *s-64* apresentaram teor de amido reduzido nas folhas, quando comparados com plantas-controle. Essas modificações no particionamento de carboidratos reforçam a hipótese de que S-64 está realmente envolvida no transporte de sacarose. Embora esses estudos de inibição gênica tenham sido informativos no que se refere à identificação da função biológica associada à proteína S-64, o mecanismo bioquímico de atuação da proteína não foi elucidado. Assim, o objetivo geral dessa investigação consistiu na caracterização bioquímica da proteína S-64 da semente de soja, visando à identificação de atividades bioquímicas associadas à proteína. A estrutura primária da proteína S-64, deduzida da seqüência de nucleotídeos do clone cDNA, apresenta características estruturais bioquimicamente relevantes. Tais características incluem uma seqüência consenso de glicosilação, uma seqüência consenso de ligação à ATP ou GTP e uma extensão de 20 a 25 resíduos de aminoácidos no terminal amino da proteína altamente hidrofóbica, característica de um peptídeo sinal (MATRANGOLO, 1998). Assim, os objetivos específicos da presente investigação consistiram na caracterização bioquímica do peptídeo sinal de S-64 e na análise da funcionalidade da seqüência consenso de ligação à ATP/GTP. Além disso, propôs-se avaliar a capacidade de oligomerização da proteína, uma vez que a estrutura primária de S-64 apresenta moderada conservação de seqüência com proteínas de reserva, que formam trímeros no retículo endoplasmático, bem como identificar a localização subcelular da proteína S-64.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características do transporte de sacarose em plantas

Alocação é a distribuição das quantidades de carbono fixado que será distribuído entre as várias rotas metabólicas (TAIZ et al., 1991). Em tecidos-fonte, mecanismos regulatórios determinam as quantidades de carbono fixado que deverão ser estocadas, usualmente como amido metabolizado dentro das células da fonte, ou imediatamente transportadas para tecidos-dreno. Nestes tecidos, o transporte de açúcar é alocado para processos de crescimento e estocagem (GEIGER, 1987). Particionamento é a distribuição diferencial de fotoassimilados entre os diferentes órgãos da planta. Mecanismos de particionamento determinam a quantidade de carbono fixado distribuída nos tecidos-dreno específicos. O conhecimento das bases moleculares envolvidas no carregamento e descarregamento do floema, no particionamento e na alocação de assimilados é de grande interesse, devido aos seus importantes papéis na produtividade de uma cultura (SONNERWALD et al., 1991).

Em geral, o descarregamento de fotoassimilados do floema em sementes parece ser bem entendido. O embrião é isolado do tecido maternal, e os assimilados devem passar pelo espaço apoplástico antes de entrar na semente em desenvolvimento (THORNE, 1985). Assim, pelo menos duas membranas devem ser atravessadas e, possivelmente, dois diferentes conjuntos de transportadores são necessários.

De acordo com o mecanismo de translocação do fluxo em massa, o transporte de açúcares a longas distâncias, em plantas, depende do estabelecimento e da manutenção de um gradiente de pressão entre o floema da fonte e o floema do dreno.

Nesse modelo, amplamente aceito, o deslocamento do açúcar é relativamente passivo, ao passo que o carregamento e o descarregamento do floema governam a intensidade e direção do transporte no floema, uma vez que controla o fluxo de sacarose. Embora evidências demonstrem a importância da rota simplástica em alguns passos da rota de transporte de assimilados (SCHMALSTIG e GEIGER, 1985; MADORE e LUCAS, 1986), o transporte de açúcares através da membrana plasmática exerce controle predominante na maioria dos processos fisiológicos, como vazamento de assimilados no mesófilo, carregamento de sacarose no floema e descarregamento do açúcar nos órgãos-dreno (FRÖMMER e SONNERWALD, 1995). Nesses casos, proteínas carreadoras medeiam o transporte de sacarose através da membrana plasmática, desempenhando importante função fisiológica na distribuição de carboidratos e, indiretamente, na mobilidade de todos os solutos translocados por fluxo em massa no floema (GALLET et al., 1992).

O acúmulo de carbono em sementes em desenvolvimento é mediado por proteínas específicas da membrana plasmática (BUSH, 1993; OVERVOORDE et al., 1996). Na maioria das espécies leguminosas, sacarose é a forma predominante de carbono assimilado translocada das folhas fotossinteticamente ativas para os cotilédones em desenvolvimento (LIN et al., 1984). O influxo de sacarose em cotilédones de soja em desenvolvimento parece ter muitas características fisiológicas do influxo de sacarose em discos foliares (LICHTNER et al., 1981), em que prótons ou gradientes eletroquímicos são requeridos para a operação e, aparentemente, envolvem uma proteína carreadora. Consistente com esse mecanismo, têm sido demonstrados que, em espécies fixando $^{14}\text{CO}_2$, ou supridas com ^{14}C -sacarose, altos níveis de ^{14}C -sacarose são encontrados no apoplasto foliar, os quais são diretamente proporcionais à taxa de fotossíntese (GEIGER et al., 1973). Além disso, a adição de sacarose no apoplasto (WRIGHT e FISHER, 1981) e no floema isolado (DAIE, 1987 e 1989) resulta em rápida despolarização da membrana plasmática, indicando que existe um co-transportador de sacarose- H^+ na membrana plasmática (WILLIAMS et al., 1990). Essa hipótese foi reforçada com a identificação de uma H^+ -ATPase de *Arabidopsis thaliana*, denominada *AHA3* (DEWITT et al., 1991). Usando uma fusão do promotor *AHA3* com o terminal 5' da β -glucuronidase, estes autores revelaram que *AHA3* codifica uma H^+ -ATPase, específica do floema e que, provavelmente, gera a energia para a atividade secundária de transporte.

Evidências diretas que mostram um transporte ativo de sacarose através de membranas foram fornecidas por experimentos usando o impermeabilizante ácido p-cloromercuriobenzenossulfônico (PCMBS), que inibe a translocação de sacarose durante a fotossíntese (GIAQUINTA, 1976 e 1983). Nesses experimentos, PCMBS inibiu fortemente o transporte de sacarose quando suprido no apoplasto, indicando que a sacarose é deslocada do apoplasto para o simplasto do floema e, conseqüentemente, uma proteína está envolvida nesse processo. Complementando essas observações, estudos usando vesículas isoladas de membranas demonstraram que a translocação de sacarose para o interior das vesículas foi dependente de ΔpH e $\Delta\Psi$, coerentemente com o mecanismo de transporte ativo (BUCKHOUT, 1989; BUSH, 1989, 1990; SLONE e BUCKHOUT, 1991). A importância de uma etapa apoplástica no mecanismo de carregamento do floema tem sido evidenciada pelo desenvolvimento de fenótipos anormais, observados em plantas transgênicas expressando invertase de leveduras no apoplasto (SONNEWALD et al., 1991).

A expressão de invertase exógena no compartimento apoplástico de folhas resultou em decréscimo do nível de sacarose no apoplasto do floema. Nesse caso, a sacarose é clivada em hexoses nas folhas e desaparece o exsudato no tubo de seiva, resultando-se num fenótipo de crescimento reduzido, devido à ineficiência da planta em realizar o carregamento de sacarose no floema. Coletivamente, esses resultados indicam que ocorrem carreadores ativos de sacarose em plantas superiores. Porém, a existência dessa rota de carregamento apoplástico não exclui a existência de translocação simplástica de sacarose, conforme demonstrado para algumas espécies de plantas, como cucurbitáceas (MADORE e LUCAS, 1986; VAN BEL et al., 1988). A cinética de absorção de sacarose em células de plantas superiores revela a existência de duas fases, uma mediada por um co-transportador de próton/sacarose, que apresenta alta afinidade, e outra fase de baixa afinidade, que é independente de próton (DELROT, 1981).

A flotação de tecidos foliares por muitas horas em meio simples contendo sacarose induz o aparecimento de novos sistemas de absorção de sacarose. A localização e a sensibilidade desses transportadores a agentes químicos diferem daqueles encontrados em tecidos frescos (SAKR et al., 1993). Embora o mecanismo de efluxo de sacarose não seja tão compreendido, estudos com vesículas de membranas plasmáticas têm evidenciado que as proteínas que medeiam o efluxo de sacarose não são as mesmas que medeiam a absorção ativa de sacarose (LALOI et al., 1993).

2.2. Transportadores de sacarose

A identificação e a caracterização de proteínas responsáveis pelo transporte de sacarose, através da membrana plasmática de células de plantas, são importantes para o entendimento da regulação do transporte de sacarose em plantas. Existem três grupos de proteínas envolvidas no transporte de sacarose. O primeiro compreende um grupo de proteínas de 36 a 50 kDa, identificado, primeiramente, por LI et al. (1991). O segundo é representado por uma proteína com massa estimada em 55 kDa, que foi identificada por complementação em levedura deficiente em invertase e modificada para sintetizar sintase da sacarose da batata no citoplasma. A estrutura primária deduzida para essa proteína revela características estruturais de proteínas transportadoras de membranas. A proteína é altamente hidrofóbica e apresenta 12 domínios de transmembrana (RIESMEIER et al., 1993). O terceiro grupo é constituído por uma proteína de 62 kDa, inicialmente identificada pela sua forte afinidade de ligação ao análogo de sacarose, 6'-deoxi-6'-(4-azido-2-hidroxi)-benzamido-sacarose (6'-HABS), e denominada SBP ("Sucrose Binding Protein") (RIPP et al., 1988).

Marcação diferencial com N-etilmaleimida (NEM) indicou a presença de um polipeptídeo de 42 kDa, protegido por sacarose, em frações membranosas de feijão grão (*Phaseolus vulgaris* L.) (PICHELIN-POITEVIN et al., 1987) e de folha de beterraba (GALLET et al., 1989). Pelo menos três linhas de evidências suportam o argumento de que o polipeptídeo de 42 kDa esteja envolvido no transporte de sacarose. Primeiramente, anticorpos contra os polipeptídeos da faixa de 42 kDa da membrana plasmática de beterraba inibiram o transporte de sacarose em protoplastos de feijão grão (LEMOINE et al., 1989) e em vesículas de membrana plasmática de beterraba (GALLET et al., 1992), mas não afetaram o transporte de aminoácidos (LEMOINE et al., 1989; GALLET et al., 1992). Além disso, separação de proteínas de membrana plasmática por filtração gélida e cromatografia de troca iônica, seguida por reconstituição em proteolipossomos, mostrou que a mais alta atividade de transporte de sacarose estava associada com a fração enriquecida com a banda de 42 kDa (LI et al., 1994). Finalmente, a transição fonte/dreno em folha de beterraba foi acompanhada pelo aparecimento do transportador de sacarose sensível a NEM e da banda adicional da região de 42 kDa da membrana plasmática (LEMOINE et al., 1992). No entanto, todas as tentativas em clonar o cDNA que codifica esse provável transportador de sacarose não têm sido bem-sucedidas.

Recentemente, cDNAs que codificam potenciais co-transportadores de próton/sacarose, denominados *SoSUT1* de espinafre (RIESMEIER et al., 1992) e *StSUT1* de batata (RIESMEIER et al., 1993), foram isolados por meio do sistema de complementação de leveduras mutantes. Esses cDNAs foram utilizados como sondas heterólogas para isolamento dos genes homólogos *SUC1* e *SUC2* de *Arabidopsis thaliana* (SAUER e STOLZ, 1994) e *PmSUC1* e *PmSUC2* de *Plantago major*, a partir de bibliotecas de cDNA de tecidos vasculares (GAHRTZ et al., 1994). Todos esses genes são expressos no floema, com *PmSUC2* e *StSUT1* localizadas especificamente nas células companheiras (RIESMEIER et al., 1993; STADLER et al., 1995), conforme demonstrado por hibridização *in situ*. Além disso, a expressão de *PmSUC1* é coordenada com o acúmulo de reservas na semente (GAHRTZ et al., 1996).

A inibição anti-senso do transportador *StSUT1* de batata revelou que esse gene apresenta função vital no carregamento do floema e particionamento de carboidratos e é essencial para o crescimento e desenvolvimento normais de plantas de batata (RIESMEIER et al., 1993). Plantas anti-senso de batata apresentaram aumento nos níveis de amido e carboidratos solúveis nas folhas e decréscimo em raízes em crescimento. Além disso, as folhas apresentaram taxa de fotossíntese reduzida, quando comparadas com as das plantas-controle. Por meio da expressão de *StSUT1* de batata em oócitos de *Xenopus*, combinado com métodos eletrofisiológicos e fluxo de radiotraçadores, foram determinados os efeitos do potencial de membrana e as concentrações externas de sacarose e H^+ na cinética de transporte da proteína *StSUT1*. O potencial de membrana afeta a taxa máxima de transporte e a afinidade aparente do transportador por sacarose e H^+ . As propriedades cinéticas são consistentes com um modelo ordenado simultaneamente, com oito estádios, com H^+ ligado ao transportador antes da sacarose, mas ambos são transportados, simultaneamente, através da membrana (BOORER et al., 1996).

Complementação de um mutante artificial de levedura deficiente na absorção de sacarose foi usada para isolar o gene *SUT1* de tomate, que codifica um co-transportador próton/sacarose (KÜHN et al., 1996). Muitas linhas de evidências estabeleceram que a principal função de *SUT1* está no carregamento do floema e no transporte a longa distância. Quando expresso em levedura, o *SUT1* apresentou propriedades bioquímicas similares às apresentadas pelos transportadores de sacarose envolvidos na absorção de sacarose em vesículas de membranas plasmáticas de folhas. *SUT1* é expressa no floema, e sua indução é coordenada com o desenvolvimento da

capacidade de exportação das folhas. Adicionalmente, repressão anti-senso de SUT1 em plantas transgênicas inibe a exportação de sacarose das folhas. Além disso, repressão anti-senso de *SUT1* com promotor específico das células companheiras do floema indica que *SUT1* é transcrito nas células companheiras (RIESMEIER et al., 1994). Estudos similares, realizados com o gene *SUC2*, confirmaram a teoria do carregamento apoplástico do floema, indicando que o promotor *SUC2* dirige a expressão para o floema em folhas e raízes de *Arabidopsis thaliana* (TRUERNIT e SAUER, 1995). Esses resultados indicaram que a proteína SUC2 pode estar envolvida no carregamento e descarregamento do floema.

Análise da seqüência de aminoácidos de oito membros da família de transportadores SUT e SUC de plantas (Tabela 1), disponíveis no banco de dados internacional, revelou uma seqüência de aminoácidos altamente hidrofóbica, constituída de 12 domínios de transmembrana (WARD et al., 1998). Tais proteínas possuem massa molecular relativa de 55.000 e pertencem ao segundo grupo de transportadores de sacarose descritos em plantas.

Tabela 1 – Família de transportadores de sacarose SUT1 em plantas, cujos alinhamentos foram feitos, usando-se o algoritmo Clustal para todas as seqüências de SUT1 disponíveis no banco de dados, cultura-fonte, identidade de seqüências de aminoácidos (%), tamanho em número de aminoácido, e números de acesso e referências

Nome	Fonte	Identidade (%)	Comprimento (aminoácidos)	Número de acesso	Referência
StSUT1	Batata	100	516 aa	542087	RIESMEIER et al., 1993
LeSUT1	Tomate	94,7	511 aa	575299	FRÖMMER et al., dados não public.
NtSUT1	Fumo	85,8	507 aa	1076644	FRÖMMER et al., dados não public.
SoSUT1	Espinafre	65,9	525 aa	549000	RIESMEIER et al., 1992
BvSUT1	Beterraba	65,1	523 aa	1076259	FRÖMMER et al., dados não public.
PmSUC2	Plantago	64,7	510 aa	1086253	GAHRTZ et al., 1994
RcSCR1	Ricinus	64,5	533 aa	542020	WEIG et al., 1996
AtSUC2	Arabidopsis	64,1	512 aa	481131	SAUER e STOLZ, 1994

Fonte: WARD et al., 1998.

Representantes do terceiro grupo de transportadores de sacarose foram identificados por técnicas de fotoafinidade. Nesse caso, o derivado da sacarose, 6'-deoxi-6'-(4-azido-2-hidroxi)-benzamido-sacarose (6'-HABS), foi utilizado para identificar proteínas de membrana que se ligam à sacarose, em preparações microsomais de cotilédones de soja em desenvolvimento (10 dias após o florescimento) (RIPP et al., 1988). Previamente, foi demonstrado que 6'-HABS comportava-se como inibidor competitivo do influxo de [¹⁴C]sacarose, em protoplastos isolados de cotilédones de soja em desenvolvimento. A competição, presumivelmente, resultou da ação do 6'-HABS como inibidor competitivo para o transportador de sacarose, substituindo-se a sacarose no sítio ativo do carreador (HITZ, 1986). Assim, marcação fotolítica de proteínas de membrana com ¹²⁵I-6'-HABS resultou na identificação predominante de uma proteína de cerca de 62 kDa, denominada SBP ("Sucrose Binding Protein") (RIPP et al., 1988). Essa proteína foi purificada de frações microsomais de cotilédones por precipitações sequenciais e cromatografia de troca iônica e, em seguida, empregada na produção de anticorpos policlonais. Esses anticorpos reconheceram especificamente uma proteína da membrana plasmática em sessões preparadas de cotilédones, conforme demonstrado por técnica de imunocitoquímica (RIPP et al., 1988).

Os anticorpos policlonais contra SBP apresentaram ligações cruzadas com um polipeptídeo de 62 kDa em vesículas de membrana plasmática purificada de folhas de espinafre (RIESMEIER et al., 1993). Estudos de imunolocalização em folhas totalmente expandidas dessa espécie mostraram que o polipeptídeo é localizado especificamente na membrana plasmática dos tubos de seiva. As membranas plasmáticas dos tubos de seiva não foram imunomarcadas em folhas jovens, nas quais o floema não continha membros maduros dos tubos de seiva. A presença de uma proteína homóloga em *Vicia faba* foi confirmada, uma vez que anticorpos contra SBP de soja inibiram a absorção de sacarose em células de transferência (FLEUW et al., 1992). Usando os mesmos anticorpos, estudos imunocitoquímicos falharam em detectar uma proteína homóloga em folhas maduras de beterraba (WARMBRODT et al., 1989).

Anticorpos policlonais contra o polipeptídeo de 42 kDa, pertencente ao grupo I de transportadores, inibiram seletivamente a absorção de sacarose em protoplastos de mesófilo de feijão (LEMOINE et al., 1989), ao passo que nas mesmas condições experimentais o soro contra SBP não teve nenhum efeito sobre a absorção de sacarose (GALLET et al., 1992). A falha na inibição da absorção de sacarose pelo soro anti-SBP

não implica, necessariamente, que esse polipeptídeo não esteja envolvido na absorção de sacarose, pode ser que ele seja fracamente antigênico ou que as vesículas utilizadas no experimento venham de células do mesófilo. Em soja, o polipeptídeo de 62 kDa parece ser mais concentrado nas membranas plasmáticas dos tubos de seiva (WARMBRODT et al., 1989). Em bases funcionais, o peptídeo de 42 kDa está envolvido no transporte de sacarose em raízes e folhas de beterraba. Porém, as altas concentrações de soro necessárias para a inibição do influxo e a inibição parcial geralmente observada não permitem excluir que outros polipeptídeos possam estar envolvidos na absorção de sacarose, nessa mesma espécie (GALLET et al., 1992).

2.3. SBP (“Sucrose Binding Protein”)

A proteína SBP foi inicialmente identificada em cotilédones de soja e purificada destes, usando-se técnicas de fotoafinidade (RIPP et al., 1988). Um cDNA que codifica SBP foi isolado de uma biblioteca de expressão, utilizando-se como sonda anticorpos contra SBP purificada (GRIMES et al., 1992). Esta proteína, deduzida da seqüência de nucleotídeos, possui 524 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 62 kDa. A identidade do clone foi confirmada pela comparação da seqüência de 20 resíduos de aminoácidos do terminal amino obtida a partir da proteína purificada. Os aminoácidos são idênticos àqueles da região adjacente ao terminal amino da proteína deduzida a partir do cDNA *sbp*. Esse alinhamento indicou que o clone de cDNA isolado codifica a proteína SBP, que apresenta um peptídeo sinal aparentemente removido da proteína no retículo endoplasmático. Além disso, a expressão em bactéria do cDNA de *sbp*, sem a seqüência que codifica o amino terminal, resultou na síntese de uma proteína de 62 kDa, imunologicamente relacionada com SBP (GRIMES et al., 1992).

Análise comparativa de seqüência revelou que a proteína SBP não apresenta nenhuma homologia considerável com outras proteínas já caracterizadas. A tentativa de alinhamento de regiões dessa proteína com seqüências conhecidas de invertase não caracterizou nenhum domínio homólogo à invertase (GRIMES et al., 1992). Além disso, as seqüências consenso MNDPNG e WECVDF de invertase de tomate (KLANN et al., 1991) mostraram-se ausentes da SBP de 62 kDa. Aparentemente, a função da SBP de 62 kDa não é meramente a clivagem de sacarose em hexoses.

Os transcritos do gene *sbp* são detectáveis em altos níveis em tecidos-dreno, incluindo folhas novas em formação e cotilédones (GRIMES et al., 1992). Além disso, o gene *sbp* exibe uma expressão temporal, que está coordenada com a absorção de sacarose no cotilédone. Tem sido demonstrado que o acúmulo da proteína SBP nas frações microsomais de cotilédones em desenvolvimento é coordenado com o acúmulo do seu mRNA, estando presente até o 26^o dia de desenvolvimento. Em contraste, OVERVOORDE et al. (1997) demonstraram que SBP é degradada em sementes durante a germinação, em um padrão similar ao das proteínas de reserva. Dados de imunoflorescência indicaram que a proteína SBP estava associada especificamente com as células companheiras do floema (GRIMES et al., 1992). A proteína SBP foi localizada na membrana plasmática de células cotiledonares, estando associada com regiões especializadas da membrana plasmática, as quais são invaginadas no citoplasma da célula (RIPP et al., 1988; GRIMES et al., 1992). No entanto, a estrutura primária deduzida para SBP indicou que a proteína é altamente hidrofílica, não contendo nenhum domínio de aminoácidos hidrofóbicos ou α -hélices anfipáticas, características da hélice transmembrana. Tais observações indicam que SBP é uma proteína envolvida no transporte de sacarose, mas não desempenha esta função independentemente (GRIMES et al., 1992). No entanto, tem sido demonstrado que a expressão do cDNA de SBP em leveduras mutantes para o gene da invertase é suficiente para promover absorção de sacarose através da membrana plasmática (OVERVOORDE et al., 1996). SBP medeia a absorção de sacarose em concentrações não-saturáveis de 30 mmol/L, sendo específica para sacarose e relativamente insensível a tratamentos com reagentes sulfidril modificados. Alteração do pH externo ou tratamento prévio das células de levedura com protonóforos não afetou significativamente a taxa de absorção de ¹⁴C-sacarose. Estes autores demonstraram que SBP medeia a absorção de sacarose independentemente do movimento de H⁺ e de outras proteínas da planta.

“Immunoblottings” com frações enriquecidas pelas faces internas e externas de membrana plasmática localizaram a proteína SBP na face externa. A associação da proteína SBP com membranas foi avaliada por meio de solubilização dessa proteína com sais e detergentes (OVERVOORDE et al., 1994). Tratamentos de vesículas de membranas plasmáticas purificadas com KCl e KI 1 mol/L liberaram menos de 35% de SBP das membranas, ao passo que tratamentos com uréia 4 mol/L ou Na₂CO₃ 4 mol/L, pH 11,5, provocou a dissociação de 50 e 70% da proteína dessas membranas, respectivamente. O detergente SDS, em concentrações de 0,5, 1 ou 10 vezes a

concentração crítica das micelas, solubilizou a proteína SBP efetivamente; os detergentes não-iônicos triton-X-100 e CHAPS ($C_{32}H_{58}N_2O_7S$) solubilizaram entre 65 e 75% da referida proteína. Esses resultados indicaram que, embora SBP seja uma proteína periférica de membrana, grande proporção da proteína se encontra fortemente ligada à membrana. Por meio de tradução e do processamento co-traducional *in vitro* da proteína SBP, usando-se lisados de reticulócitos de coelho e membranas microsossomais pancreáticas caninas, tem sido demonstrado que uma proporção da proteína conserva o peptídeo sinal. Nesse caso, a presença deste peptídeo na proteína processada pode ser indicativo de que SBP é uma proteína de membrana do tipo II (OVERVOORDE et al., 1994).

A proteína SBP apresenta homologia estrutural e de seqüência com proteínas de reservas de semente da família da vicilina, proteínas que se organizam em homotrímeros nos corpos protéicos (OVERVOORDE et al., 1997). Essas similaridades inclui uma seqüência repetida, que forma a base da estrutura característica das proteínas da família das vicilinas. Análise por centrifugação e eletroforese em gel não-redutor de SDS-poliacrilamida demonstraram que a SBP parece se organizar em complexos oligoméricos, que são indicativos da existência de homodímeros e homotrímeros da proteína.

Recentemente, um cDNA de soja foi isolado de uma biblioteca de expressão, propagada em λ gt11, usando-se como sonda anticorpos contra proteínas de membranas parcialmente purificadas. Esse cDNA, denominado pUFVS64, foi completamente seqüenciado, sendo o produto codificado por esse clone e deduzido da seqüência de nucleotídeos do cDNA uma proteína de PM 64.000, denominada S-64 (MATRANGOLO, 1998).

Análise comparativa da estrutura primária de proteínas revelou algumas regiões de conservação moderada entre a proteína S-64 e diversas proteínas de reserva de leguminosas e globulinas de cereais. Porém, a maior identidade de seqüência observada (85%) foi com a proteína SBP, previamente identificada em sementes de soja (GRIMES et al., 1992) (Figura 1). A alta identidade de seqüência entre S-64 e SBP constitui forte indicativo de que a proteína S-64 é funcionalmente análoga e está provavelmente envolvida no transporte de sacarose em células de plantas (MATRANGOLO, 1998).

De fato, a análise de funcionalidade da proteína S-64 conduzida por meio da tecnologia de inibição anti-senso em plantas de fumo transgênicas suportou o

argumento do envolvimento dessa proteína no transporte de sacarose (PEDRA, 1998). Repressão anti-senso do gene *s-64* endógeno em fumo resultou em um maior acúmulo de amido nas folhas das plantas transgênicas e redução da sua taxa fotossintética. Em contraste, transgenes de fumo superexpressando o gene *s-64* apresentaram teor de amido reduzido nas folhas, quando comparados com os das plantas-controle. Essas modificações no particionamento de carboidratos reforçam a hipótese de que S-64 está realmente envolvida no transporte de sacarose

É bem provável que a família de proteínas transportadoras de 62 kDa esteja envolvida no descarregamento do floema, pois estas foram detectadas em órgão-dreno no sistema de transporte de sacarose de baixa afinidade (RIPP et al., 1988; GRIMES et al., 1992). As demais famílias de transportadores, em sua maioria envolvidas no carregamento do floema, fazem parte de um sistema de transporte saturável e de alta afinidade. Normalmente, esses transportadores requerem potencial de membrana, mantido por atividade de ATPases específicas das células companheiras, para efetuar em co-transporte de próton/sacarose (WARD et al., 1998).

↓

S-64 MATRAKLSLAIFLFFLLALISNLALGKCLKETEVEE.DPELVTCQHQCQQQRQYTESDKRT
SBP -GM-T-----F-----F----F--C-----E-----Q----G---V

S-64 CLQQCD...SMKQEREKQVEEETREK.....EEEHQEQHEEEQDQNPYVFEEEDKDFS
SBP ---S--RYHR-----IQ-----KEEESRER---Q-----.-E---I-----E

S-64 TRVETEGGSIRVLKKFTEKSKLLQGNENFRLAILEARAHTFVSPRHFDSEVVLFNIGRA
SBP -----R-----I-----F-----

S-64 VLGLVRESETEKITLEPGDMIHIPAGTPLYIVNRDENEKLLLAMLHIP..VSTPGKFEEF
SBP ----SE-----D--F-----VS-----

S-64 FGPGGRDPESVLSAFSWNVLQAALQTPKGKLERLFNQNEGSIFKISRERVR**ALAPTKKS**
SBP -A-----NV-D-----R---QV-----

S-64 SWWPFGGESKAQFNIFSKRPTFSNGYGRLTEVGPDD.EKSWLQRLNLMLTFT**INITQRSNS**
SBP -----P-----I-----D-----

S-64 **TIHYN**SHATKIALVMDGRGHLQISCPHMSSRS.DSKHDKSSPSYHRISADLKPGMVFFVVP
SBP -----I-----SH-----S-----

S-64 PGHPFVTIASNKENLLIICFEVMVRDNKKFTFAGKDNIVSSLDNVAKELAFNYPSEMVNG
SBP -----M----NA-----

S-64 VFE-----RKESLFFPFELPSEERGRAVA
SBP --LLQRFLERKLIIGRLYHLPKD----F-----R-----

Fonte: MATRANGOLO (1998)

Figura 1 - Análise de comparação de seqüência entre as proteínas S-64 e SBP ("Sucrose Binding Protein"). Os pontos representam "Gaps" que foram introduzidos para permitir melhor alinhamento das seqüências. Os traços indicam os aminoácidos idênticos. A seqüência de aminoácidos do peptídeo sinal encontra-se sublinhada e o provável sítio de clivagem proteolítica, indicado por uma seta (↓). O sítio de ligação à ATP/GTP encontra-se em negrito e a seqüência consenso de glicosilação, destacada de azul.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Sementes da variedade de soja Cristalina foram germinadas em papel germiteste e as plântulas, transferidas para vasos de 2,6 dm³ contendo substrato composto de três partes de solo, uma parte de areia lavada, uma parte de esterco bovino curtido e 2 kg de superfosfato simples por m³ do substrato. A data da antese floral foi registrada, sendo a coleta das sementes realizada no vigésimo dia após a antese. O material vegetal, após coletado, foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em “freezer” a -80 °C, para posterior extração de frações microssomais.

3.2. Clonagem molecular

3.2.1. Estratégia geral de clonagem

Os fragmentos de DNA a serem clonados foram liberados de pUFVS64 (MATRANGOLO, 1988) ou amplificados por PCR (“Polimerase Chain Reaction”) e separados por eletroforese em géis de agarose 1%, contendo brometo de etídio 0,1 µg/mL. Em seguida, os fragmentos de DNA de interesse foram isolados e purificados em gel de agarose, utilizando-se o “Kit Prep-A-Gene” (BIORAD), conforme recomendações do fabricante. Após a separação eletroforética, a região do gel de agarose que continha o fragmento de interesse foi cortada e dissolvida em perclorato de sódio 4,5 mol/L, a 55 °C. A “Matriz Prep-A-Gene” foi adicionada na relação de 5 µL de

matriz para cada μg de DNA e a suspensão, incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a adsorção do DNA à sílica, a amostra foi lavada três vezes com o tampão de lavagem (BIORAD) contendo etanol 70%. O DNA foi eluído em água a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos.

Os vetores de clonagem utilizados (pET-16b, pGEM7Zf(-), pUC118) foram digeridos com as enzimas apropriadas e desfosforilados. A reação de desfosforilação foi conduzida com a enzima fosfatase alcalina, em presença de Tris-HCl 50 mmol/L, pH 9,0, MgCl_2 1 mmol/L e ZnCl_2 0,1 mmol/L, por uma hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A reação de ligação dos fragmentos de DNA ao vetor foi conduzida de acordo com técnicas-padrão de clonagem molecular em plasmídios (SAMBROOK et al., 1989). O fragmento de DNA a ser clonado e o vetor foram utilizados na razão molar entre 3:1 e 5:1, em um volume final de $15\text{ }\mu\text{L}$, na presença da enzima T_4 DNA ligase (GIBCO/BRL), em Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,5, MgCl_2 7 mmol/L e DTT (ditiotretitol) 1 mmol/L. A reação foi incubada a $14\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 horas.

As células competentes foram preparadas de acordo com SAMBROOK et al. (1989). Células de *E. coli* JM109 e BL21(DE₃) foram crescidas em meio LB até atingirem uma absorbância a 600 nm (A_{600}) de 0,5, incubadas no gelo por 10 minutos e concentradas cinco vezes por centrifugação a 5.000 x g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 10 minutos, em MgCl_2 100 mmol/L. Após nova incubação no gelo por 10 minutos, essas células foram coletadas por centrifugação a 5.000 x g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por cinco minutos, ressuspensas em um volume de CaCl_2 100 mmol/L, equivalente à metade do volume original do meio de cultura, e incubadas no gelo por 20 minutos. Em seguida, essas células foram coletadas por centrifugação a 5.000 x g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por cinco minutos, concentradas 10 vezes pela ressuspensão em CaCl_2 100 mmol/L e glicerol 15%, aliqüotadas em volume de $200\text{ }\mu\text{L}$ e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o uso.

Para transformação, foram adicionados $7\text{ }\mu\text{L}$ da reação de ligação a uma alíquota de células competentes JM109; a suspensão foi mantida a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Após um choque térmico de dois minutos a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi adicionado 1 mL de meio LB, seguido de incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, por uma hora. As células foram concentradas por centrifugação, ressuspensas em $100\text{ }\mu\text{L}$ de meio LB e espalhadas em placas contendo LB (sólido) e ampicilina $100\text{ }\mu\text{g/mL}$, para seleção de colônias transformantes. O DNA plasmidial, isolado de bactérias transformadas, foi digerido com as enzimas de restrição apropriadas e separado por eletroforese em gel de agarose 1% para identificação do

clone de interesse. As colônias recombinantes foram armazenadas em glicerol 40% a 80 °C. Para expressão da proteína em bactéria, aproximadamente 30 ηg de DNA recombinante foram utilizados para transformação da estirpe de *E. coli* BL21(DE₃).

3.2.2. Descrição dos clones

3.2.2.1. Clonagem de regiões codificadoras e versões truncadas de *s-64* em pET-16b

Com o objetivo de expressar a proteína S-64 inteira em bactéria, um fragmento de 1.700 pb foi liberado de pUFVS64 com *Nco*I, sítio interno do cDNA (posição 18) e *Bam*HI, sítio do "polillinker" do vetor de clonagem pUC119. O fragmento foi purificado de gel de agarose e inserido no sítio *Nco*I/*Bam*HI do vetor de expressão em bactéria pET-16b, sob o controle do promotor da T7 RNA polimerase, resultando no clone pUFV39 (Figura 2).

Com a finalidade de expressar em bactéria uma versão da proteína S-64 isenta de peptídeo sinal e fundida com uma calda de histidina, no terminal amino, derivada do vetor de expressão em bactéria pET-16b, foram sintetizados dois "primers" específicos. O primeiro, S64XHOF (5' AAG AAA **CTC GAG** GTC GAA GA 3'), coordenadas 103 e 121 do cDNA, gera um sítio para a enzima de restrição *Xho*I. O segundo "primer", SEF97R (5' PAT ACA TTC CCC **GAA TTC** AGC CAC CTC C 3'), coordenadas 1.498 e 1.524, gera um sítio para a enzima de restrição *Eco*RI, imediatamente adjacente ao "stop codon". Esses "primers" foram utilizados para amplificar um fragmento de S-64 de aproximadamente 1.400 pb por meio de PCR. Na reação de PCR, foram utilizados 20 ηg de DNA plasmidial de pUFVS64; 80 ρmol de cada "primer" supracitado, dNTP's 0,25 mmol/L cada; 20 unidades de Pfu polimerase (STRATAGENE), Tris-HCl 20 mmol/L, pH 8,2, KCl 10 mmol/L, (NH₄)₂SO₄ 6 mmol/L, triton X-100 0,1% (v/v) e soro albumina bovino (BSA) 10 μg/mL, para um volume final de 100 μL. As condições de reação adotadas foram: 1 minuto e 30 segundos a 94 °C, seguido de 30 ciclos (45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 45 °C e 2 minutos a 72 °C) e 10 minutos a 72 °C. A reação procedeu-se em termociclador modelo PLTC-200 (MJ RESEARCH). O fragmento amplificado de aproximadamente 1.400 pb foi purificado, digerido com *Eco*RI e inserido no sítio *Eco*RI/*Sma*I de pGEM7Zf(-), resultando em pUFV96 (Figura

3). Em seguida, o fragmento *XhoI* foi liberado de pUFV96 e inserido no sítio *XhoI* de pET-16B na orientação senso, resultando em pUFV120.

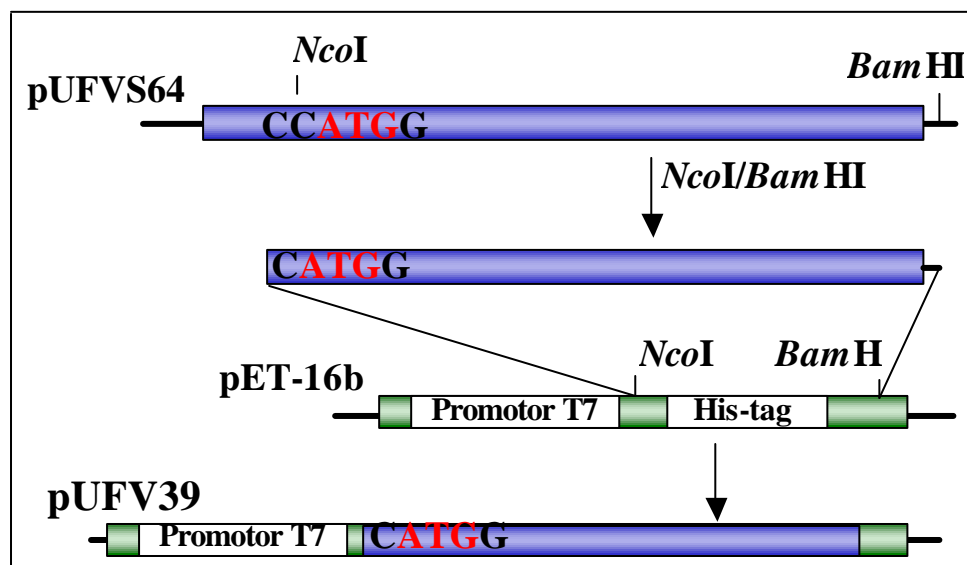


Figura 2 – Esquema da clonagem da região codificadora de *s-64* em pET-16b. O clone pUFVS64 foi digerido com *NcoI* e *BamHI*, e o inserto liberado foi inserido nos sítios *NcoI* e *BamHI* de pET-16b, resultando no clone pUFV38. Na etapa de digestão do vetor pET-16b, a seqüência codificadora da calda de histidina (His-tag) foi removida.

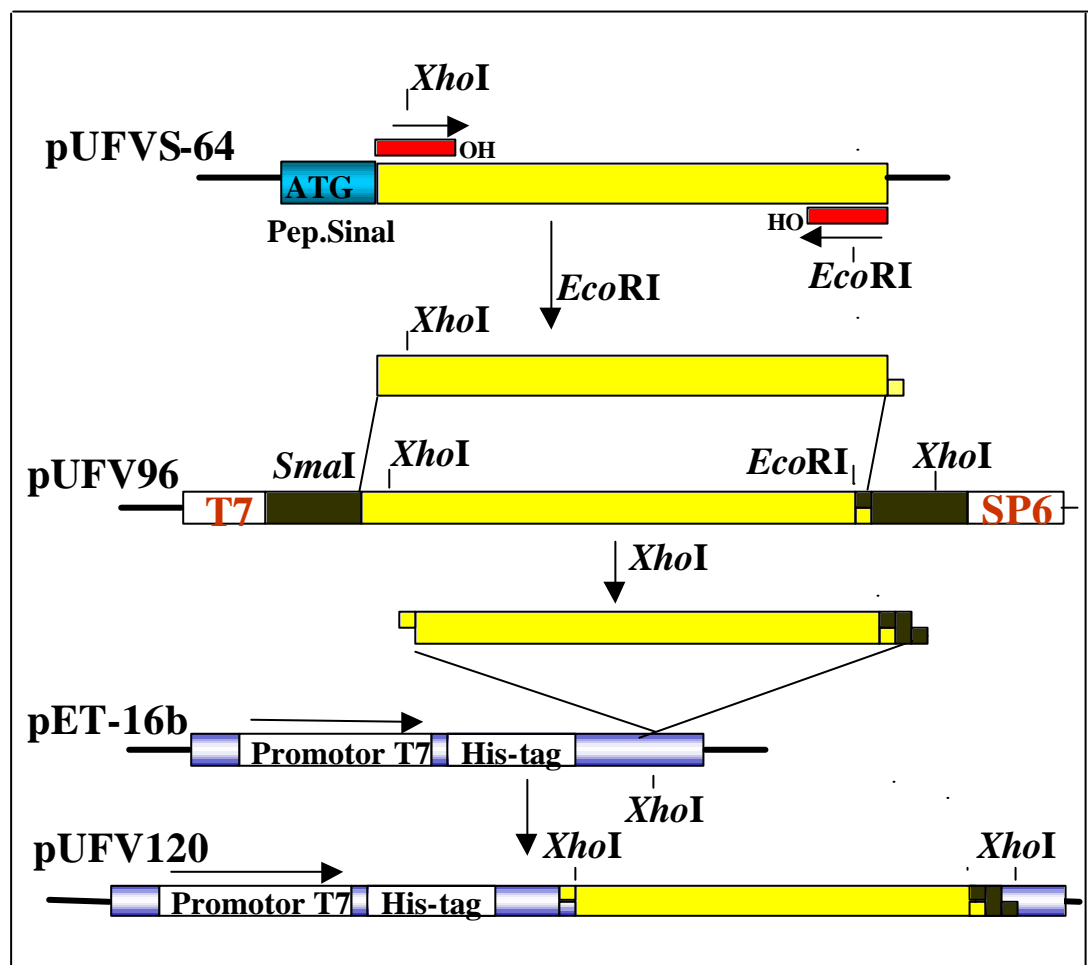


Figura 3 – Esquema de clonagem do fragmento do cDNA de *s-64*, posições 113 a 1.513, em pET-16b. O clone pUFVS64 foi usado como molde para amplificação com Pfu polimerase, utilizando-se “primers” específicos, de forma a criar um sítio XhoI, imediatamente adjacente ao 5’ do peptídeo sinal, e um sítio EcoRI na extremidade 3’. Um fragmento de 1.400 pb foi amplificado, digerido com EcoRI e inserido nos sítios SmaI e EcoRI de pGEM7Zf⁽⁻⁾, resultando no clone pUFV96. O fragmento XhoI de pUFV96 foi liberado e inserido no respectivo sítio de pET-16b, resultando no clone pUFV120.

A fim de expressar em bactéria uma versão truncada de S-64 (aminoácidos 36 a 343, fundidos com uma calda de histidina), um fragmento de 919 pb foi liberado de pUFVS64 com a enzima de restrição *Sau3AI* (posições 122 e 1.041 do cDNA), separado por eletroforese, purificado do gel de agarose e inserido no sítio *BamHI* de pET-16B. O clone obtido foi denominado pUFV50 (Figura 4).

3.2.3. Mutação dirigida *in situ* na seqüência consenso de ligação à ATP/GTP

A mutação foi criada por meio de amplificação de fragmentos de pUFVS64 com “primers” específicos, de forma a criar sítios únicos para enzimas de restrição e as mutações desejadas. Para amplificação de um fragmento de 876 pb da extremidade 5’, foram utilizados os “primers forward” SPI97F (5’ PTC ACT GCA GTC ACC ATG GCG ACC A 3’), coordenadas 1 e 21, os quais geram um sítio para *PstI* (em destaque); e o “primer reverse” SGTPXBAR (5’ GCT TTT CTC TAG AGG GGC CAA CG 3’), coordenadas 853 e 876, o qual gera um sítio *XbaI*. Para amplificação de um fragmento de 667 pb da extremidade 3’, foram utilizados os “primers forward” SGTPXBAF (5’ GGC CCC TCT AGA GAA AAG CTE 3’), coordenadas 857 e 878, os quais geram um sítio *XbaI* (em destaque); e o “primer reverse” SEF97R (5’ PAT ACA TTC CCC GAA TTC AGC CAC CTC C 3’), coordenadas 1.498 e 1.524, o qual gera um sítio *EcoRI* (em destaque). As mutações criadas nos “primers” SGTPXBAF e SGTPXBAR, coordenadas 860 a 866, além de criarem um sítio *XbaI*, alteram a seqüência consenso de ligação à ATP/GTP ALAPTKKS (Ala-Leu-Pro-**Tre-Lys**-Lys-Ser), para ALAPLEKS (Ala-Leu-Ala-Pro-**Leu-Glu**-Lys-Ser).

O clone pUFVS-64 foi usado como molde para as reações de “PCR”. As condições de reações foram as mesmas descritas no item 3.2.2.1. O fragmento da região 5’, amplificado com os “primers” SPI97F e SGTPXBAR, e o fragmento da região 3’, amplificado com os “primers” SGTPXBAR e SEF97R, foram purificados, utilizando-se o “Kit Prep-A-Gene” (BIORAD), digeridos com as enzimas *PstI/XbaI* e *XbaI/EcoRI*, respectivamente, novamente purificados e, em seguida, inseridos simultaneamente no sítio *PstI/EcoRI* de pUC118, de acordo com técnicas-padrão de clonagem (SAMBROOK et al., 1989), o que resulta no clone pUFV193, mutado na seqüência consenso de ligação à ATP/GTP (Figura 5).

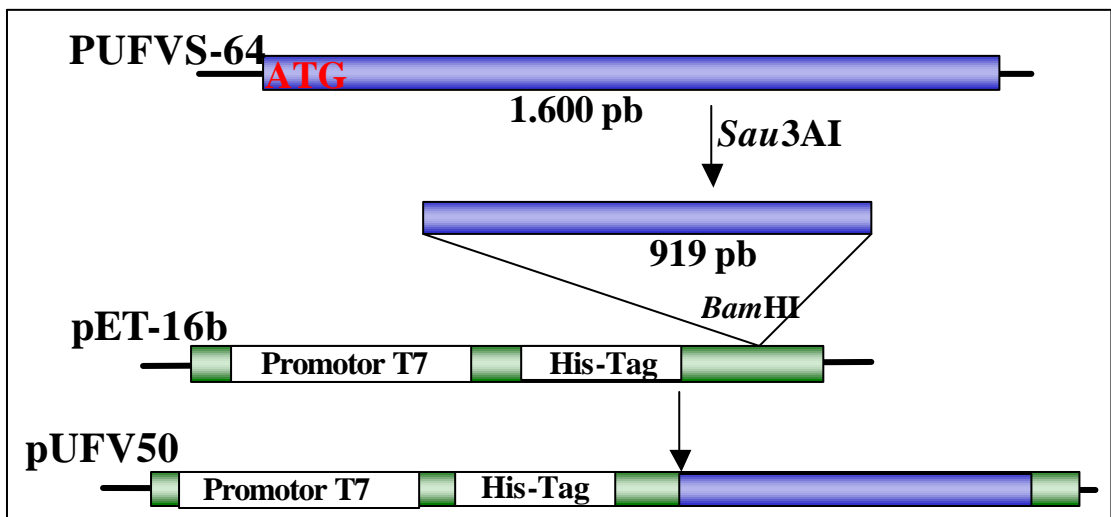


Figura 4 – Esquema de clonagem do fragmento *Sau3AI* de S-64 em pET-16b. O clone pUFVS-64 foi digerido com *Sau3AI*, e o inserto liberado de 919 pb foi purificado e inserido no sítio *BamHI* de pET-16b, resultando no clone pUFV50.

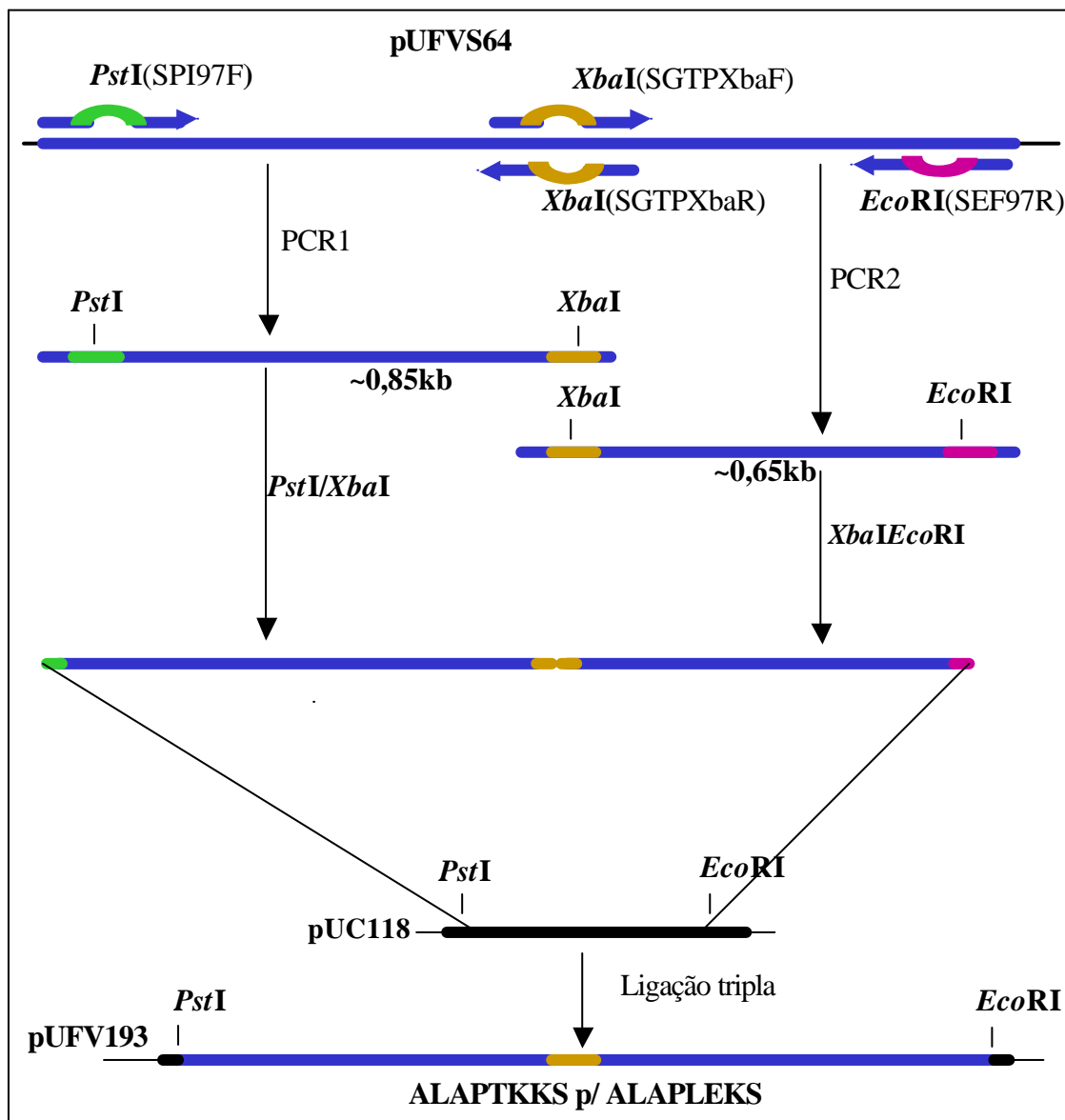


Figura 5 – Mutação *in situ* do sítio de ligação à ATP/GTP de S-64. Dois fragmentos de S-64 foram individualmente amplificados, usando-se os “primers” SPI97F e SGTPXbaR (PCR1) ou os “primers” SGTPXbaF e SEF97R (PCR2). Os fragmentos amplificados, após digeridos com *Pst*I/*Xba*I (PCR1) e *Xba*I/*Eco*RI (PCR2), foram inseridos por ligação tripla em pUC118 digerido com *Pst*I/*Eco*RI, resultando no clone pUFV193, que contém o sítio de ligação à ATP/GTP mutado.

3.3. Expressão da proteína S64, versões truncadas em *E. coli* e purificação das proteínas recombinantes

A expressão das proteínas recombinantes foram conduzidas em *E. coli* BL21(DE₃), que contém um gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor *lac* (NOVAGEN). A indução da síntese das proteínas recombinantes com IPTG, em 100 mL de meio de cultura, foi conduzida conforme as recomendações do “pET System Manual” (NOVAGEN). Células de *E. coli* transformadas com as construções de DNA de interesse foram crescidas a 37°C, em meio LB contendo ampicilina 50 µg/L, até atingirem A_{600nm} 0,7 a 0,8, quando foram submetidas à indução com IPTG 2 mmol/L, por quatro horas. Como controle, foi utilizada a estirpe de *E. coli* BL21(DE₃) não transformada. Após indução, as células foram mantidas no gelo por cinco minutos, para cessar o crescimento. Uma alíquota de 50 µL de meio de cultura de cada clone foi separada em SDS-PAGE, para confirmar a indução da síntese da proteína recombinante.

A purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade foi realizada em condições desnaturantes, seguindo-se basicamente as recomendações do fabricante (NOVAGEN). As células induzidas com IPTG foram coletadas por centrifugação a 5.000 x g, por cinco minutos; em seguida, ressuspensas em tampão de ligação 1X (Tris-HCl 40 mmol/L, pH 7,9, Imidazol 10 mmol/L, NaCl 1 mol/L e uréia 6 mol/L); rompidas mecanicamente por ultra-sonicação em “Ultrasonic Homogenizer 4710 Series” (COLE PARMER); incubadas no gelo por uma hora; e centrifugadas a 39.000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 µm e aplicado em coluna de cromatografia contendo a resina “Chelating Sepharose” (Pharmacia) ativada com Ni⁺⁺.

Para empacotamento da coluna cromatográfica, a resina “Chelating Sepharose” (Pharmacia), quelante de metais, foi homogeneizada por inversão e, em seguida, empacotada por gravidade em uma coluna de polipropileno (10 x 0,5 cm). Após a drenagem do etanol 20%, a resina foi lavada com 7,5 mL (3 volumes) de H₂O deionizada e equilibrada com 12,5 mL (5 volumes) de tampão de troca 1 X (NiSO₄ 50 mmol/L e uréia 6 mol/L), seguido de 7,5 mL (3 volumes) de tampão de ligação 1 X (Tris-HCl 40 mmol/L, pH 7,9, Imidazol 10 mmol/L, NaCl 1 mol/L e uréia 6 mol/L). O extrato bruto de proteínas foi aplicado à coluna de “Chelating Sepharose”, equilibrada com o tampão de ligação 1 X. A coluna foi lavada com 25 mL (10 volumes) de tampão

de ligação 1 X e 15 mL (6 volumes) de tampão de lavagem 1 X (Tris-HCl 40 mmol/L, pH 7,9, Imidazol 60 mmol/L, NaCl 1 mol/L e uréia 6 mol/L), antes da eluição da proteína com 15 mL (6 volumes) de tampão de eluição 1 X (Tris-HCl 20 mmol/L, pH 7,9, Imidazol 1 mol/L, NaCl 0,25 mol/L e uréia 6 mol/L), em frações de 0,75 mL. As frações contendo as diferentes versões da proteína S-64 foram identificadas por SDS-PAGE, usando-se gel de acrilamida 10% (p/v), conforme descrito por LAEMMLI (1970). As frações enriquecidas para a proteína recombinante foram reunidas e mantidas a -20°C .

3.4. Transcrição e tradução *in vitro* de S-64

O cDNA de *s-64* foi liberado de pUFVS64 (MATRANGOLO, 1998), utilizando-se a enzima de restrição *EcoRI*. O fragmento liberado, de aproximadamente 1,6 kb, que corresponde à região codificadora do gene *s-64*, foi isolado e purificado em gel de agarose, usando-se o “Kit Prep-a-Gene” (BIORAD), conforme recomendações do fabricante. O fragmento purificado foi inserido no sítio *EcoRI* do vetor de transcrição *in vitro* pGEM7Zf(-), conforme esquematizado na Figura 6. O clone obtido, denominado pUFV34, contém o cDNA na orientação reversa. O isolamento de DNA plasmidial de pUFV34, em grande escala, foi feito, utilizando-se o “Plasmid Maxi Kit” (QIAGEN).

A síntese do RNA de S-64 *in vitro* foi conduzida, empregando-se um kit de transcrição *in vitro* (PROMEGA), de acordo com as recomendações do fabricante. O capeamento do RNA sintetizado foi realizado juntamente com a reação de transcrição *in vitro*. A reação de transcrição foi conduzida em Tris-HCl 40 mmol/L, pH 7,9, MgCl_2 6 mmol/L, espermidina 2 mmol/L e NaCl 10 mmol/L, DTT 10 mmol/L, 50 unidades de RNasina[®], ATP, CTP, UTP 0,5 mmol/L, GTP 0,05 mmol/L, GPPPG (análogo do CAP), 0,5 mmol/L, 5 μg de DNA plasmidial de pUFV34 linearizado com a enzima de restrição *XbaI* e 80 unidades de SP6 RNA polimerase. Após incubação a 30°C por uma hora, foram adicionadas mais 80 unidades de SP6 RNA polimerase. A reação prosseguiu por mais uma hora a 30°C . Em seguida, os produtos da reação foram tratados com 10 unidades de DNase livre de RNase por 30 minutos, a 37°C .

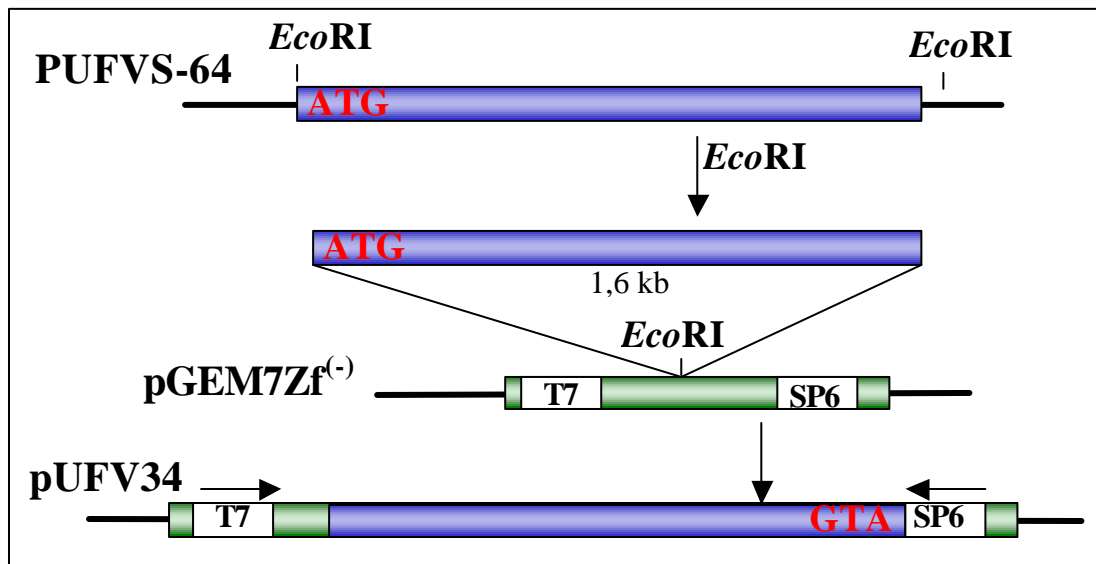


Figura 6 – Esquema de clonagem do cDNA de S-64 em pGEM7Zf⁽⁻⁾, vetor de transcrição *in vitro*. O clone pUFVS64 foi digerido com *EcoRI*, e o inserto liberado foi clonado em pGEM7Zf⁽⁻⁾, no respectivo sítio, na orientação reversa, resultando no clone pUFV34.

O RNA sintético foi extraído com igual volume de uma mistura de fenol:clorofórmio (1:1), sob agitação por um minuto e seguido de centrifugação a 12.000 x g por cinco minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, o RNA sintético foi reextraído da fase aquosa com igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), precipitado com etanol 70%, na presença de acetato de sódio 0,3 mol/L a -20 °C, por 30 minutos, e recuperado por centrifugação a 12.000 x g por cinco minutos à temperatura ambiente. O precipitado foi lavado com etanol 70%, secado a vácuo e ressuspensão em 20 µL de H₂O livre de nuclease. O RNA foi quantificado a partir de leitura a 260 nm.

As reações de tradução *in vitro* e processamento co-traducional foram feitas, usando-se o sistema de lisado de reticulócito de coelho (PROMEGA), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram utilizados 35 µL de lisado de reticulócito de coelho, 1 µL da mistura de aminoácidos (menos cisteína), 1 µL de ³⁵S-cisteína (AMERSHAN), 1 µL de RNasin[®] e 2 µg de RNA total, em um volume final de 50 µL, na presença e ausência de membranas microssomais pancreáticas caninas. As reações foram incubadas a 30 °C por 60 minutos e os produtos, fracionados em SDS-PAGE, utilizando-se gel de acrilamida 10% (p/v), como descrito por LAEMMLI (1970). O gel foi tratado com “enhancer” (salicilato de sódio 1 mol/L, pH 6,0) por 30 minutos, e secado em papel-celofane, sendo o resultado revelado por auto-radiografia, após a exposição do gel ao filme de raios X por cinco dias.

3.5. Isolamento de DNA plasmidial

Os isolamentos de DNA's plasmidiais foram conduzidos, em pequena escala, pelo método da lise alcalina e adsorção de DNA em sílica, empregando-se o “Flexi Prep Kit” (Pharmacia Biotech) e, em grande escala, o “Plasmid Maxi Kit” (QIAGEN). Em ambos os métodos, inicialmente, as células foram rompidas pela lise alcalina, sendo o volume das soluções utilizadas ajustado de acordo com o volume inicial da cultura. As bactérias transformadas foram crescidas em meio LB, contendo 50 ou 100 µg/mL de ampicilina, por 12 a 16 horas. Após a centrifugação de 5.000 x g por dois minutos a 4° C, as células foram ressuspensas na solução I (glicose 50 mmol/L, Tris-HCl 25 mmol/L, pH 8,0 e EDTA 20 mmol/L). Em seguida, foram adicionadas, consecutivamente, à solução II (NaOH 0,2 mol/L e SDS 1%) e à solução III

(CH₃COOK 3 mol/L). O resíduo insolúvel foi descartado por centrifugação a 11.000 x g por 10 minutos.

Para isolamento em pequena escala, após a lise alcalina, o DNA plasmidial foi precipitado do sobrenadante pela adição de isopropanol, na concentração final de 42%, incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e coletado por centrifugação a 11.000 x g por 10 minutos. A suspensão “SephaglasTM FP” (Pharmacia Biotech) foi adicionada ao DNA plasmidial, seguido de lavagem com o tampão de lavagem (Pharmacia). O DNA foi eluído em água por cinco minutos, à temperatura ambiente.

Para o método de isolamento em grande escala, a lise alcalina foi conduzida conforme descrito previamente, porém que foram utilizados 100 mL de meio de cultura, RNase adicionada ao tampão I na concentração de 100 µg/mL e períodos de incubação, após a adição da solução II e da solução III, de cinco minutos à temperatura ambiente e 20 minutos a 0 °C, respectivamente. O lisado insolúvel de células foi removido por centrifugação a 20.000 x g por 30 minutos, a 4 °C. A solução de DNA, recuperada após a lise, foi aplicada na coluna “QIAGEN-tip 500” (QIAGEN), equilibrada com 10 mL do tampão QBT (MOPS 50 mmol/L, pH 7,0, NaCl 750 mmol/L, etanol 15% e triton X-100 0,15%). Após a drenagem por gravidade, a coluna contendo o DNA foi lavada por duas vezes com 30 mL do tampão QC (MOPS 50 mmol/L, pH 7,0, etanol 15% e NaCl 1mol/L). O DNA foi eluído da coluna com 15 mL do tampão QF (Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8,5, etanol 15% e NaCl 1,25 mol/L) e, em seguida, precipitado com 42% de isopropanol, lavado com 5 mL de etanol 70% e ressuspenso em 1 mL de H₂O.

3.6. Produção de anticorpos policlonais contra S-64

O imunógeno utilizado para imunização de coelhos foi a proteína recombinante produzida e purificada, por cromatografia de afinidade, a partir de bactérias transformadas com o clone pUFV120. Foram feitas cinco imunizações, com aproximadamente 0,8 µg de proteína, a intervalos de oito dias. Para a primeira imunização, a solução de proteína foi homogeneizada com igual volume de adjuvante “Freund’s” completo (GIBCO/BRL) e para as imunizações posteriores, utilizado o adjuvante “Freund’s” incompleto (GIBCO/BRL). As imunizações foram feitas por meio

de injeções intramusculares aplicadas semanalmente, nos músculos posteriores das patas traseiras do animal. O soro normal (controle) foi coletado antes da primeira imunização, e as frações de anti-soro foram coletadas a cada oito dias, a partir da terceira imunização. As coletas foram feitas por pequenas incisões em vasos sanguíneos marginais da orelha do coelho. As frações de anti-soro foram testadas por meio de “immunoblottings”.

Anticorpos monoespecíficos foram imunopurificados por afinidade, utilizando-se a proteína produzida em *E. coli*. A proteína recombinante, resultante da indução de pUFV120, após fracionada em SDS-PAGE, foi transferida para membrana de nitrocelulose. A membrana foi subsequentemente incubada, durante 10 horas, com o soro de melhor título na diluição de 1:50 (v/v), em TBS-T (Tris-HCl 10 mmol/L pH 7,6, NaCl 0,14 mol/L e Tween 20 0,1% v/v). As ligações inespecíficas foram removidas, mediante três lavagens de 15 minutos cada com TBS-T. Em seguida, anticorpos monoespecíficos para S-64 foram eluídos com 60 mL de glicina 0,1 mol/L, pH 2,9, durante incubação por uma hora. Após adição de 10 mL de TBS-T 10X, o pH da solução foi ajustado para 7,6, com NaOH, sendo o volume da solução de anticorpos completado para 100 mL. Os anticorpos específicos, mantidos em Tris-HCl 0,1 mol/L, NaCl 0,14 mol/L, Tween 20 0,1% (v/v) e azida sódica 0,02%, foram armazenados a -20°C .

3.7. Isolamento de fração microsomal de sementes de soja

A obtenção de fração microsomal foi feita de acordo com a metodologia descrita por RIPP et al. (1988). Sementes coletadas 20 dias após a floração foram trituradas em almofariz de porcelana com tampão de extração (sacarose 250 mmol/L, DTT 2,5 mmol/L, MgSO_4 10 mmol/L, gelatina 0,5%, Tris-HCl 25 mmol/L, pH 7,0 e PMSF 0,5 mmol/L), na proporção de 1 g de sementes para 2 mL do tampão. O resíduo insolúvel foi descartado por centrifugação a $13.000 \times g$ por 10 minutos, a 4°C . Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado a $50.000 \times g$ por 3,5 horas, a 15°C , e o precipitado, ressuspenso em Tris-HCl 10 mmol/L, pH 6,8, e DTT 2,5 mmol/L. Após a lavagem por duas vezes, o precipitado foi ressuspenso em $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 100 mmol/L, pH 7,5, em volume mínimo. As membranas foram rompidas com a adição de

uréia 1 mol/L, e após centrifugação a 13.000 x g por 15 minutos, a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e congelado a -80 °C.

3.8. Eletroforese em gel de acrilamida e “immunoblotting”

Os extratos de proteína total de bactérias, fração membranosa de sementes de soja e proteínas S-64 heterólogas purificadas foram analisados por SDS-PAGE 10%, seguido de “immunoblotting”. A eletroforese em géis de poliacrilamida contendo SDS foi realizada como descrito por LAEMMLI (1970), à exceção da concentração do gel de empilhamento, que foi de 5%. O extrato de proteína foi incubado por três minutos, a 100 °C, em tampão da amostra [glicerol 10% (v/v), SDS 2,3 %, azul-de-bromofenol 0,25%, 2-mercaptoetanol 5% (v/v) e Tris-HCl 62,5 mmol/L, pH 6,8], antes de ser aplicado no gel. A eletroforese foi conduzida por 14 horas, aproximadamente, a 48 V, no tampão de corrida (Tris-HCl 25 mmol/L, glicina 200 mmol/L, EDTA 1 mmol/L e SDS 3,5 mmol/L). Após a eletroforese, os géis foram corados em solução corante [metanol 25 % (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v) e “coomassie brilliant blue R250” 0,25 % (p/v)] por duas a três horas, e em seguida descorados em solução descorante [metanol 20% (v/v) e ácido acético glacial 7% (v/v)].

Em “immunoblottings”, após a eletroforese as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, usando-se o sistema de transferência da BIORAD, de acordo com as instruções do fabricante. Após as transferências (em aproximadamente uma hora, a 700 mA), as membranas de nitrocelulose foram incubadas com o reagente de bloqueio “Blotting Grade Blocker, Non-Fat Dry Milk” (BIORAD), por uma hora, à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas com TBS-T [Tris-HCl 10 mmol/L, pH 7,6, NaCl 0,14 mmol/L, Tween-20 0,1% (v/v)] três vezes, por 15 minutos cada lavagem, e incubadas com o anticorpo mono específico contra S-64, por quatro horas, sob agitação. Em seguida, foram feitas três lavagens de 15 minutos com TBS-T, e a membrana foi incubada com o anticorpo contra IgG conjugada com a fosfatase alcalina (SIGMA), numa diluição de 1:5.000, por duas horas. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada, usando-se o sistema de detecção NBT/BCIP (azul-de-nitrotetrazólio/5-bromo-4-cloro-indolilfosfato) (GIBCO/BRL).

3.9. Análise do domínio de oligomerização da proteína S-64

A formação de oligômeros e a localização do domínio de oligomerização da proteína S-64 foram determinadas, utilizando-se proteínas recombinantes purificadas. A proteína truncada (aminoácidos 36 a 343) e a proteína isenta do peptídeo sinal foram sintetizadas com uma calda de histidina (derivada do vetor de expressão pET-16b) fundida ao aminoterminal, o que permitiu a obtenção de frações purificadas das proteínas por cromatografia de afinidade, conforme descrito no item 3.6.

A detecção de oligômeros, estabilizados por pontes de dissulfeto, foi feita por fracionamento das proteínas purificadas em gel de SDS-PAGE, usando-se gel de acrilamida 10% (p/v). No entanto, as amostras foram preparadas com tampão da amostra sem 2-mercaptoetanol (agente redutor de pontes de dissulfeto). A identidade dos oligômeros foi confirmada por "immunoblottings" de géis semidesnaturantes.

3.10. Ensaio de funcionalidade do sítio de ligação à GTP

Para avaliar a funcionalidade do sítio de ligação à GTP da proteína S-64, a proteína intacta e sua versão mutada foram expressas em bactéria e purificadas, para análise por meio da técnica de "GTP dot blot". A síntese da proteína intacta em *E. coli* e sua purificação foram conduzidas conforme descrito anteriormente (item 3.3). Para produção da proteína mutada em *E. coli*, inicialmente o fragmento de cDNA mutado na seqüência que codifica o provável sítio de ligação à GTP foi amplificado de pUFV193 (Figura 5), utilizando-se os "primers" S64XHOF e SEF97R, digerido com *EcoRI* e inserido no sítio *EcoRI/SmaI* de pGEM7Zf(-), resultando-se em pUFV230 (Figura 7). Em seguida, o fragmento *XhoI* foi liberado de pUFV230 e inserido no sítio *XhoI* de pET-16B, resultando-se em pUFV232. Procedeu-se a indução e purificação da proteína heteróloga, a partir de pUFV232, de acordo com o "pET System Manual" (NOVAGEN), conforme descrito no item 3.5.

Para caracterizar o sítio de ligação à GTP, foi empregado o método descrito por McGRATH et al. (1984). Proteínas recombinantes purificadas, produzidas a partir dos clones pUFV120, pUFV50 e pUFV232, foram aplicadas diretamente sobre a membrana de nitrocelulose, usando-se um transferidor blot "BIO-DOTTM" (BIORAD) e uma

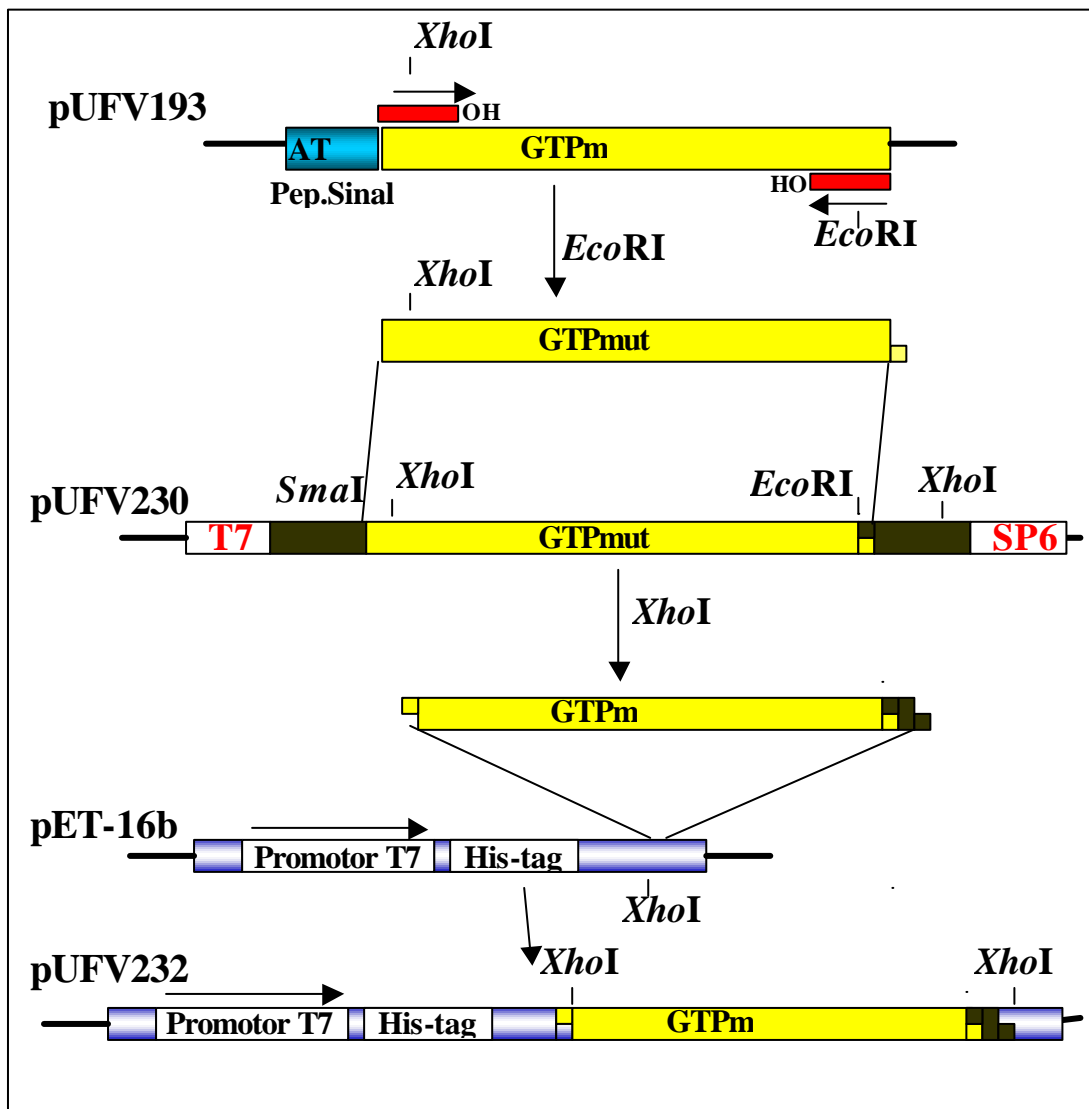


Figura 7 – Esquema da clonagem do fragmento de cDNA de *s-64*, posições 113 a 1.523, contendo mutação no sítio de ligação à GTP, em pET-16b. O DNA pUFV193 foi usado como molde para amplificação com Pfu polimerase, utilizando-se os “primers” S64XHOF e SEF97R, descritos anteriormente. O fragmento de 1.400 pb amplificado foi digerido com *EcoRI* e inserido nos sítios *SmaI* e *EcoRI* de pGEM7Zf⁽⁻⁾, resultando-se no clone pUFV230. Um fragmento *XhoI* de pUFV230 foi liberado e inserido no respectivo sítio de pET-16b, resultando-se no clone pUFV232.

bomba de vácuo manual. A membrana foi imediatamente lavada por duas vezes (10 minutos cada) em tampão de ligação [NaH_2PO_4 50 mmol/L, pH 7,5, MgCl_2 10 mmol/L, DTT 2 mmol/L, Tween 20 0,3% (v/v) e ATP 4 $\mu\text{mol/L}$]. Após as lavagens, a membrana de nitrocelulose foi incubada no tampão de ligação contendo 1 $\mu\text{Ci/mL}$ [$^{32}\text{P}\alpha$]-GTP (3000 Ci/mMol; Amersham), por duas horas. Em seguida, a membrana foi lavada seis vezes, por dois a cinco minutos cada vez, em tampão de ligação, e, após a secagem, a membrana foi exposta ao filme de raios X, na presença de “Intensifying screen WOLF L-PLUS505504LP” (SIGMA), e revelada por auto-radiografia.

3.11. Cultura de células embriogênicas de soja em suspensão

A suspensão de células embriogênicas de soja foi desenvolvida de acordo com a metodologia descrita por FINER e NAGASAWA (1988). Resumidamente, plantas de soja (*Glycine max* L. (Merrill) cv. Cristalina) foram crescidas em casa de vegetação, e 7 a 14 dias após o florescimento as vagens foram removidas e as sementes imaturas, excisadas.

As vagens imaturas de soja foram desinfestadas por imersão em álcool etílico 70% (v/v), por 20 a 30 segundos, e pela imersão em solução de hipoclorito de sódio 20% (v/v) e Tween-20 0,05% (v/v), por 20 minutos. Em seguida, foram lavadas por três vezes com água destilada e autoclavada. Os cotilédones foram removidos da semente para a cultura, de acordo com LAZZERI et al. (1985).

Tecidos embriogênicos proliferantes de soja foram obtidos de acordo com a metodologia de FINER e NAGASAWA (1988). Os cotilédones foram transferidos para um meio de cultura composto dos sais básicos de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com o complexo vitamínico do meio B5 (GAMBORG et al., 1968), mio-inositol 100 mg/L, sacarose 6% (p/v), 2,4-D (ácido 2-4-diclorofenoxiacético) 40 mg/L e ágar ("Sigma Chemical Company, USA") 0,8% (p/v), sendo o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem. O meio foi vertido em tubos de ensaio (25 x 150 mm de diâmetro) contendo, aproximadamente, 10 mL de meio em cada e tampados com tampas de polipropileno. Após o processo de autoclavagem e solidificação do meio, foi inoculado um cotilédone por tubo. As culturas foram transferidas para sala de crescimento, onde foram mantidas no escuro por uma semana. Após esse período, a cultura foi colocada a 28 °C, com um fotoperíodo de 16 horas, sob irradiância em torno

de 20 $\mu\text{molesm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Embriões e tecidos embriogênicos foram recultivados, a cada quatro a seis semanas, nesse meio. Em seguida, 20 a 50 mg de calos embriogênicos foram transferidos para frascos de 125 mL, contendo 35 mL de meio de cultura. Os frascos foram vedados e agitados a 100 rpm. A cultura em suspensão foi deixada a 28°C, com fotoperíodo de 16 horas e irradiância em torno de 20 $\mu\text{molesm}^{-2}\text{s}^{-1}$. O meio de cultura (meio 10A40N) consistiu-se em modificações dos sais básicos de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com o complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968), sacarose 6%, 2,4-D 5 mg/L e glutamina 15 mmol/L (pH 5,7). Nesse meio, a fonte de nitrogênio dos sais básicos de MS foi substituída por NH_4NO_3 10 mmol/L e KNO_3 30 mmol/L. O meio foi esterilizado em autoclave (1 atm por 15 minutos). As culturas em suspensão foram mantidas nas mesmas condições de temperatura e irradiância, com um período de subcultivo de uma semana. Para subcultivo, 20 a 50 mg de tecido embriogênico foram transferidos para 50 mL de meio 10A40N fresco.

3.12. Eletroporação de células em suspensão

O experimento de eletroporação foi conduzido de acordo com as metodologias descritas por LUONG et al. (1995), em eletroporador "Gene Pulser II", com unidade "Capacitance Extender II" (BIORAD). Células de soja em suspensão, após quatro dias de subcultivo, foram sedimentadas por centrifugação a 200 x g, lavadas três vezes com tampão de eletroporação [KCl 80 mmol/L, CaCl_2 5 mmol/L, MES (ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico) 10 mmol/L, pH 6,7, Manitol 0,425 mol/L] e concentradas duas vezes por ressuspensão em tampão de eletroporação. Em cubetas para eletroporação de 4 mm (BIORAD), foram adicionados 800 μL da suspensão celular, 10 μg de DNA plasmidial e 40 μg de ssDNA carreador. As amostras foram incubadas a 37°C por uma hora e, em seguida, incubadas no gelo por 10 minutos. Foram aplicados dois pulsos de 380 V, 975 μF , com tempo médio de 30 ms. Após o pulso elétrico, as cubetas foram incubadas no gelo por 15 minutos, e em seguida as suspensões celulares foram transferidas para erlenmeyers de 125 mL contendo 10 mL do meio 10A40N, descrito anteriormente. A cultura em suspensão foi mantida a 28 °C, por um fotoperíodo de 16 horas, sob uma irradiância em torno de 20 $\mu\text{molesm}^{-2}\text{s}^{-1}$ e agitação a 100 rpm. As

células foram eletroporadas na ausência de DNA ou com DNA recombinante de pUFV52 (MATRANGOLO, 1998). O clone pUFV52 correspondeu ao cDNA de S-64 na orientação *senso*, no vetor pMON921, sob o controle do promotor 35S e o sinal de terminação de transcrição do gene *rubS*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Peptídeo sinal da proteína S-64 reconhecido em *E. coli*

A proteína S-64 é sintetizada na semente de soja, em baixos níveis, e possui uma homologia moderada de seqüência com proteínas de reserva (MATRANGOLO, 1988). Essas características, associadas à alta eficiência de síntese e ao acúmulo de proteínas de reservas em sementes de soja, dificultam a purificação da proteína S-64 diretamente do material vegetal. No entanto, o sistema de expressão de proteínas em bactéria constitui ferramenta eficiente na produção de proteínas recombinantes. Normalmente, esses sistemas permitem a produção de proteínas de interesse em quantidades elevadas, o que facilita sua purificação a partir de extrato protéico bacteriano.

Inicialmente, duas versões do cDNA de *s-64* foram clonadas no vetor de expressão em bactéria pET-16b, sob o controle do promotor da T7 RNA polimerase (Figura 8). A primeira versão compreende à inserção do cDNA inteiro de *s-64*, no referido vetor de expressão, resultando-se no clone pUFV39. A segunda versão compreende a clonagem de um fragmento do cDNA de *s-64*, isento da seqüência que codifica o peptídeo sinal, resultando-se no clone pUFV120. A síntese das proteínas recombinantes foi conduzida em *E. coli*, estirpe BL21(DE₃), que possui um gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor *lac*. Na presença de IPTG, as bactérias

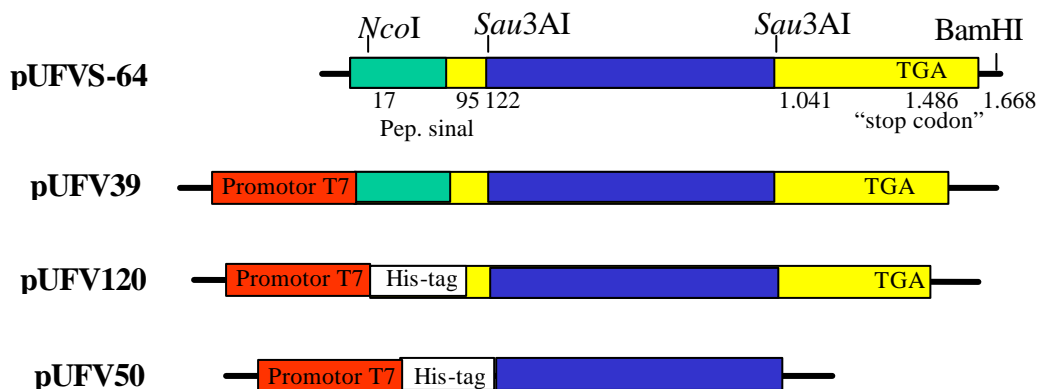


Figura 8 – Construções de DNA utilizadas para produzir as diferentes versões de S-64 em bactéria. No clone pUFVS64, a região codificadora do peptídeo sinal está destacada em verde (posições 17 a 95); o fragmento *Sau*3A1 está em azul (posições 122 a 1.041); o códon terminador TGA está indicado na posição 1.486. pUFV39 corresponde ao fragmento *Nco*I/*Bam*HI de pUFVS64 inserido no respectivo sítio em pET-16b. O clone pUFV120 corresponde a um fragmento de pUFVS64 (posições 116 a 1.512), inserido no sítio *Xho*I de pET-16b. O clone pUFV50 corresponde ao fragmento *Sau*3A1 de pUFVS-64 inserido no sítio *Bam*HI de pET-16b. Em cada plasmídeo, a transcrição dos genes quiméricos *s-64* está sob o controle do promotor e dos sinais regulatórios 3' do gene da T7 RNA polimerase.

transformadas com o DNA recombinante pUFV120 sintetizaram eficientemente a versão da proteína S-64 livre do peptídeo sinal e fundida a uma seqüência de histidinas no amino terminal, originária do vetor de expressão (Figura 9-A, linha 3). Essa proteína quimérica foi denominada proteína fundida (FP). A síntese da proteína FP foi inicialmente avaliada com base na sua mobilidade eletroforética e na indução por IPTG, em comparação com o extrato protéico de bactéria não transformada (Figura 9, comparar linha 1 com a 3). Além disso, a proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade a partir de extrato bacteriano (Figura 9, linha 5), sendo eficientemente retida em resinas de Ni^{++} , devido à presença da seqüência de histidinas no terminal amino.

A proteína FP purificada foi utilizada como antígeno na produção de anticorpos policlonais contra S-64, denominados anti-S-64. O soro anti-S-64 não apresentou reações cruzadas com proteínas bacterianas (Figura 9-B, linha 1) e foi eficiente em detectar indução da síntese da proteína FP em bactérias transformadas (linha 3). Em contraste, as bactérias transformadas com o clone pUFV39 falharam em expressar a proteína S-64 intacta, uma vez que a proteína heteróloga não foi detectada no extrato bacteriano, por meio de SDS-PAGE (Figura 9-A, comparar linha 2 e com a 1). Além disso, a sondagem do extrato bacteriano, usando-se soro anti-S-64, não detectou o acúmulo da proteína S-64 intacta a partir da indução do clone pUFV39 (Figura 9-B, linha 2).

A falha da bactéria em acumular a proteína S-64 intacta não foi devida a erros de clonagem no vetor de expressão, porque o seqüenciamento parcial do clone pUFV39 confirmou a manutenção da seqüência aberta de leitura do gene *s-64* (dado não mostrado). Assim, a presença do suposto peptídeo sinal provável na proteína recombinante inviabilizou seu acúmulo em bactéria. Provavelmente, esse peptídeo de S-64 foi reconhecido pelo sistema de secreção de bactéria e, como consequência, a proteína recombinante foi secretada e degradada por proteases. Resultados semelhantes foram obtidos por GRIMES et al. (1992) na tentativa de expressarem a proteína homóloga SBP em bactéria. Essa hipótese indica a funcionalidade do peptídeo sinal da proteína S-64 no endereçamento da proteína para o lúmen do retículo endoplasmático das células de soja.

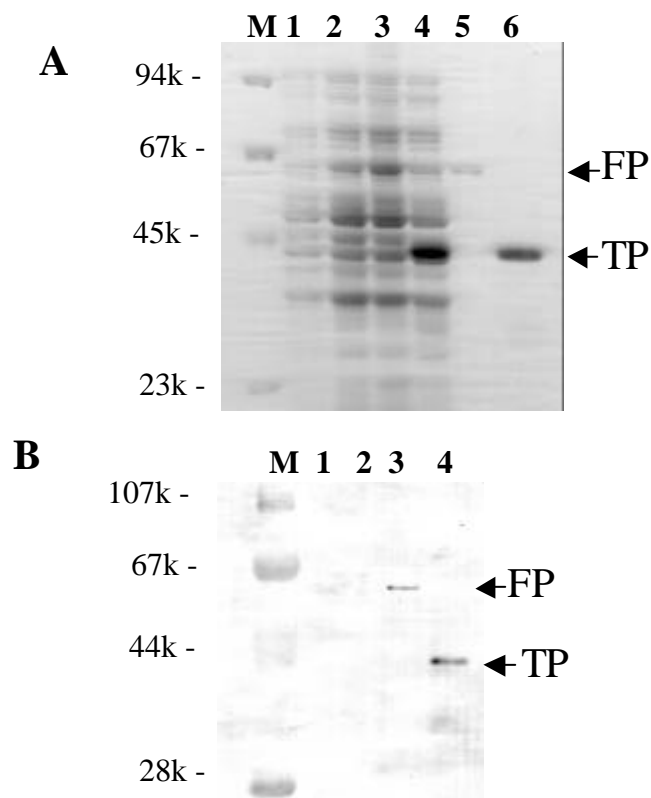


Figura 9 – Expressão de versões da proteína S-64 em bactéria, mediante a indução com IPTG 2 mmol/L. Em A, a coluna 1 corresponde ao extrato da estirpe de *E. coli* BL21(DE₃) não transformada (controle), e linhas 2, 3 e 4 correspondem a extratos de bactérias transformadas com pUFV39, pUFV120 e pUFV50, respectivamente. As linhas 5 e 6 correspondem, respectivamente, a proteínas recombinantes de pUFV120 e pUFV50 purificadas por cromatografia de afinidade ao Ni⁺⁺. As proteínas foram fracionadas em SDS-PAGE e coradas com azul-de-coomassie ("coomassie brilliant blue R-250"). Em B, as proteínas totais, como apresentadas em A, foram transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas com anti-S-64. As setas indicaram as bandas referentes à proteína S-64 isenta de peptídeo sinal (proteína fundida, FP) e proteína S-64 truncada (TP). M corresponde aos padrões de massa molecular.

4.2. Proteína S-64 associada a membranas plasmáticas de células de cotilédones de soja

A elevada identidade de sequência (85%) entre as proteínas S-64 e SBP indica similaridade funcional entre as proteínas no transporte de sacarose, através da membrana plasmática (MATRANGOLO, 1998). De fato, a expressão anti-senso do gene *s-64* em tabacos transgênicos alterou o particionamento de carboidratos nas folhas e inibiu o crescimento e desenvolvimento da planta, ao passo que a superexpressão do gene *s-64* acelerou a taxa de crescimento (PEDRA, 1998). Além disso, células em suspensão obtidas das plantas anti-senso apresentaram menor influxo de sacarose-¹⁴C do que células controle, enquanto, células de tabaco superexpressando S-64 mostraram taxa de influxo de sacarose elevada, em relação a células de planta-controle (dados não mostrados).

Para confirmar a hipótese de associação da proteína S-64 à membrana plasmática, frações microssomais de células de cotilédones de soja, obtidas por ultracentrifugação diferencial, foram sondadas com anti-S-64. A Figura 10-A mostra o padrão eletroforético em SDS-PAGE da fração membranosa (linha ME) e proteínas totais (linha ET) de cotilédones de soja 20 dias após a floração (20 DAF). Anticorpos contra S-64 não detectaram S-64 em extratos protéicos totais de cotilédones de soja (Figura 10-B, linha ET); dois polipeptídeos imunologicamente conservados, de aproximadamente 64 kDa, foram reconhecidos por anti-S-64, em frações microssomais (Figura 10-B, linha ME). Esse resultado é coerente com a presença da proteína S-64 na membrana plasmática dos cotilédones de soja.

Com a finalidade de identificar se esses polipeptídeos são produtos de diferentes genes ou diferentes formas pós-traducionalmente modificadas da mesma proteína, proteínas totais de células de soja em suspensão, eletroporadas com uma construção destinada à expressão transiente de S-64, foram sondadas com anticorpos contra S-64. A eficiência de expressão transiente do gene quimérico S-64 foi confirmada pelo aumento significativo do acúmulo da proteína S-64 em células eletroporadas (Figura 11, linha CE), em comparação com o acúmulo dessa proteína em extrato de proteínas totais de cotilédones 20 DAF (linha ET). A proteína codificada pelo cDNA isolado, pUFVS-64, e sintetizada em suspensões celulares possui uma migração eletroforética correspondente àquela do polipeptídeo da semente de soja de menor

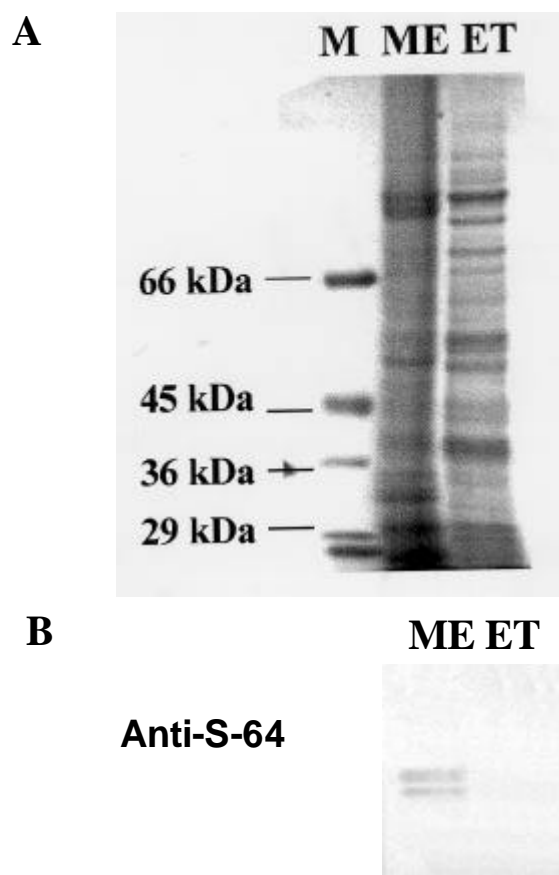
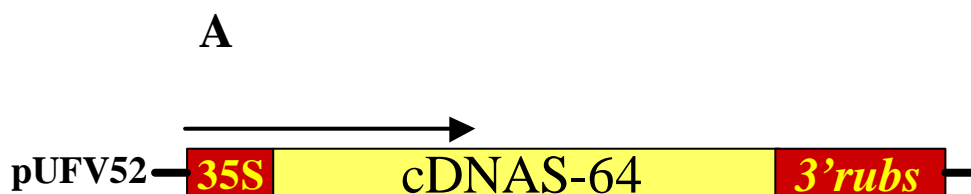


Figura 10 – Localização subcelular da proteína S-64. Cotilédones de soja 20 dias após a floração (DAF) foram triturados na presença de tampão contendo sacarose 250 mmol/L. Frações microssomais foram obtidas por centrifugações seqüenciais de 13.000 x g por 10 minutos e 50.000 x g por 3,5 horas. Em A, 15 μ L de extrato de membranas (ME) e 15 μ L de extrato de proteínas totais de cotilédones (ET) foram fracionados em SDS-PAGE. Em B, após fracionadas em SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas com anticorpo policlonal contra S-64. M corresponde aos padrões de massa molecular.



B

CE ET ME M

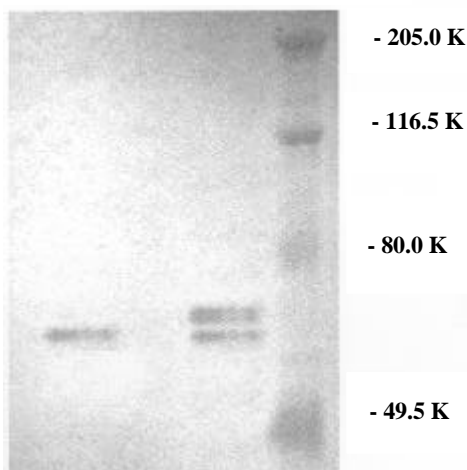


Figura 11 – A: mapa físico de S-64 no vetor de expressão em plantas, em pUFV52, o gene *s-64* está sob o controle do promotor 35S e dos sinais de terminação de transcrição do gene *rubs*. B: identificação do polipeptídeo correspondente a S-64; extrato de proteínas totais de células de soja eletroporadas com pUFV52 (CE), fração microssomal de sementes de soja colhidas 20 DAF (ME) e extrato de proteínas totais de sementes 20 DAF (ET) foram fracionados em SDS-PAGE e submetidos a “immunobloting”, usando-se anti-S64. M corresponde aos padrões de massa molecular pré-corados. Foram utilizados 50 µg de proteínas totais por amostra.

massa molecular (comparar as linhas CE com ME). Uma vez que suspensões celulares mantêm, eficientemente, a maquinaria funcional de biossíntese e processamento de proteínas, o acúmulo de apenas uma forma da proteína como produto da expressão transiente do gene quimérico S-64 constitui forte indicativo de que os dois polipeptídeos, imunologicamente conservados, da semente de soja são produtos de diferentes genes (MATRANGOLO, 1988). Coerente com esses resultados, a análise de “Southern blot” genômico de reconstituição do número de cópias tem revelado que existem, pelo menos, duas cópias homólogas ao gene S-64 no genoma da soja (dados não mostrados). Além disso, a proteína SBP, cujo cDNA foi isolado por GRIMES et al. (1992), possui 524 aminoácidos, enquanto a seqüência aberta de leitura de *s-64* codifica para uma proteína de 489 aminoácidos. Dada a identidade de seqüência elevada entre as duas proteínas (85%), o polipeptídeo de maior massa molecular, identificado na membrana plasmática de cotilédones de soja, provavelmente corresponda à proteína SBP.

4.3. Peptídeo sinal de S-64 (não é clivado)

A análise de hidrofobicidade da seqüência primária da proteína S-64 revelou tratar-se de uma proteína predominantemente hidrofílica, embora apresente algumas regiões hidrofóbicas. Dentre estas, a mais acentuada corresponde ao terminal amino da proteína, cuja hidrofobicidade é característica de um peptídeo sinal que direciona a síntese da proteína para o lúmen do retículo endoplasmático (MATRANGOLO, 1998). Além disso, essa seqüência amino hidrofóbica apresenta características de domínio transmembrana. A clivagem ou a preservação do peptídeo sinal de S-64 na proteína foi avaliada por transcrição, tradução e processamento co-traducional da proteína *in vitro*.

Primeiramente, o cDNA de *s-64* foi inserido no vetor de transcrição *in vitro*, pGEM7Zf(-), sob o controle do promotor da SP6 RNA polimerase para a orientação senso e T7 RNA polimerase para orientação anti-senso, resultando-se no clone pUFV34 (Figura 12-A). Conseqüentemente, a síntese do RNA de S-64 *in vitro* foi conduzida pela SP6 RNA polimerase. A integridade do RNA sintético foi avaliada em gel de agarose 1% (Figura 12-B, linha 1) e pode ser comparada com os transcritos para o gene da luciferase (linha 2), cuja proteína apresenta massa molecular de 62 kDa.

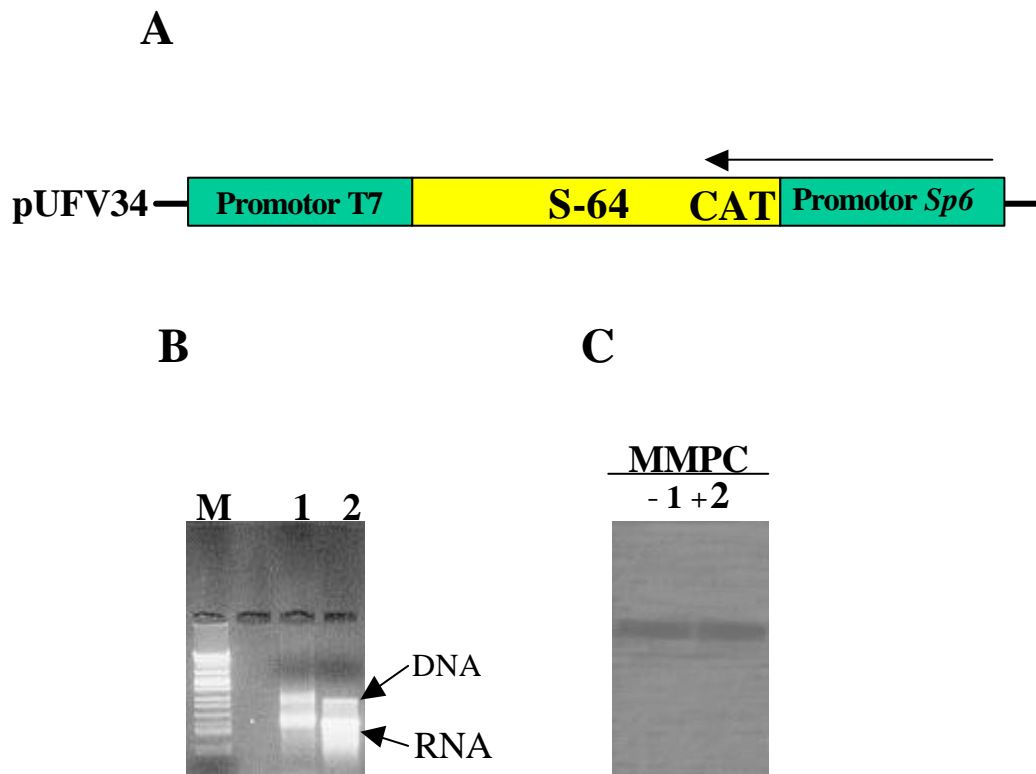


Figura 12 – A: mapa físico de S-64 no vetor de transcrição *in vitro*, em pUFV34, o gene *s-64* está sob o controle do promotor *sp6* para a orientação senso e o promotor T7, para a orientação anti-senso. B: o plasmídeo pUFV34 (2 μ g) foi utilizado para transcrição do gene *s-64*, por meio da atividade da SP6 RNA polimerase, linha M corresponde a padrões de DNA; linha 1 corresponde a 5 μ L de uma reação de transcrição de S-64 *in vitro*; linha 2 corresponde a 1 μ g de RNA da luciferase (proteína de 62 kDa), separados em gel de agarose 1%; e as setas indicam o RNA produzido e o DNA-molde. Em C, após tradução da proteína S-64, usando-se sistema de reticulócito de coelho e cisteína-³⁵S, 15 μ L da reação foram separados em SDS-PAGE e o gel foi incubado na presença de “enhancer” (salicilato de sódio 1 mol/L, pH 6,0), secado em papel-celofane e exposto ao filme de raios X por 72 horas; linha 1 corresponde à tradução na ausência de membranas microssomais pancreáticas caninas (MMPC) e, a linha 2, na presença de MMPC.

A reação da tradução de S-64 *in vitro* foi feita, usando-se o sistema de lisado de reticulócitos de coelho na ausência (Figura 12-C, linha 1) e na presença (linha 2) de membranas microssomais pancreáticas caninas (MMPC). O resultado obtido indica que o peptídeo sinal de S-64 não é clivado, uma vez que a presença de MMPC não alterou o padrão eletroforético dos produtos da reação de tradução (Figura 12-C, comparar linhas 1 e 2). O sistema de MMPC não falhou na clivagem do peptídeo sinal da proteína BiP da soja (MARTINS, 1996) quando empregado de forma similar. Esse resultado evidenciou que a proteína S-64 é uma proteína de membrana do Tipo II, cujo peptídeo sinal endereça a síntese da proteína para o retículo endoplasmático, mas permanece na proteína, funcionando como domínio transmembrana. Isso é coerente com a detecção da proteína na fração membranosa de cotilédones de soja e corrobora com seu possível papel como transportador de sacarose através da membrana plasmática.

4.4. Proteína S-64 (forma oligômeros)

A fim de avaliar a habilidade de oligomerização da proteína S-64, um fragmento *Sau3AI* de 919 pb (posições 122 a 1.041 do cDNA), correspondente à região codificadora da seqüência entre os aminoácidos 36 e 343, foi inserido no sítio *BamHI* do vetor de expressão em bactéria pET-16, sob o controle do promotor da T7 RNA polimerase, resultando-se no clone pUFV50 (Figura 8). A indução da síntese da proteína recombinante com IPTG resultou na expressão de uma versão truncada de S-64 com massa molecular de aproximadamente 43 kDa, fundida com uma calda de histidina na extremidade amino terminal, derivada do vetor de expressão (Figura 9-A e B, linha 4). Essa versão de S-64 produzida em bactéria foi purificada do extrato bacteriano, por cromatografia de afinidade, usando-se resinas de níquel, e foi denominada proteína TP (Figura 9-A, linha 6). As proteínas S-64 isentas de peptídeo sinal (proteína FP) e a versão truncada de S-64 (proteína TP) purificadas foram separadas por eletroforese (Figura 13-A, linhas I e T, respectivamente), na presença (+ β) e na ausência (- β) do agente redutor β -mercaptoetanol. Na presença de β -mercaptoetanol (+ β), as migrações eletroforéticas predominantes das proteínas FP (linha I) e TP (linha T) correspondem às suas formas monoméricas. No entanto, na

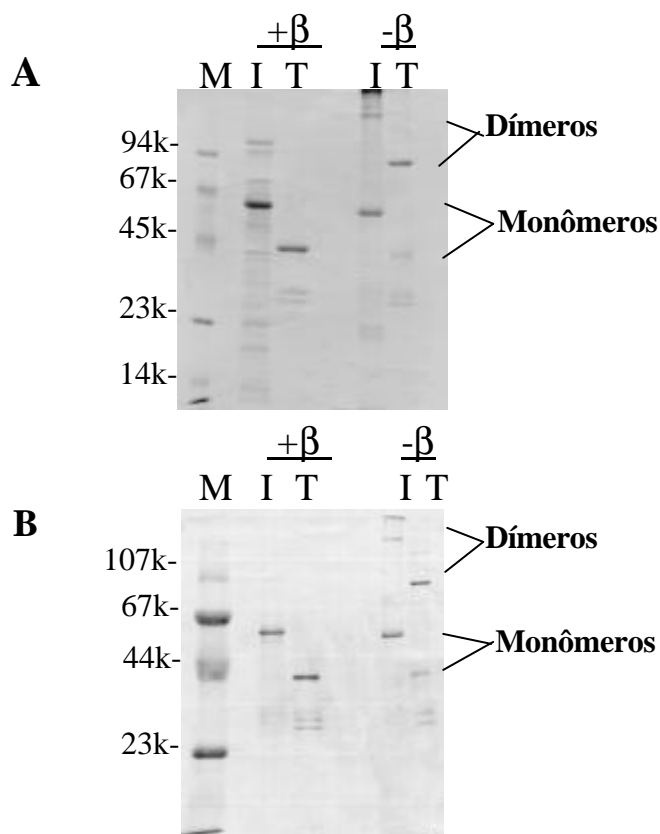


Figura 13 – Oligomerização da proteína S-64. Duas versões da proteína S-64 produzidas em bactéria, uma isenta do peptídeo sinal (linha I) e uma versão truncada correspondente à expressão de um fragmento *Sau3AI* de 919 pb em bactéria (linha T), foram separadas em SDS-PAGE, na presença ($+\beta$) e na ausência ($-\beta$) do agente redutor β -mercaptoenanol. Em A, o gel foi corado com azul-de-coomassie e em B, após SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para nitrocelulose e sondadas com anti-S-64. M corresponde aos padrões de massa molecular. Mônmeros e oligômeros são também indicados.

ausência do agente redutor ($-\beta$) ocorre o aparecimento de bandas com migração eletroforética equivalente ao dobro da massa molecular das versões da proteína na forma monomérica, indicando a formação de dímeros de S-64, estabilizados por ligações dissulfídicas. A versão truncada de S-64 apresentou maior proporção da forma dimérica no gel não-redutor, em comparação com S-64 isenta de peptídeo sinal (Figura 13-A, comparar linhas I e T, para a ausência de β -mercaptoetanol). A identidade dos oligômeros foi confirmada por “immunoblottings”, usando-se anti-S-64 como sonda (Figura 13-B).

Análise comparativa de seqüência revelou que a proteína S-64 e proteínas de reserva do tipo vicilina possuem homologia moderada de seqüência. Uma comparação direta de S-64 com provicilina e convicilina (Figura 14) indicou que estas proteínas possuem similaridades estruturais. Embora a identidade de seqüência entre S-64 e vicilinas não ultrapasse 26%, a similaridade de seqüência primária entre essas proteínas chega a 66%. Além disso, a proteína S-64 possui no terminal amino duas seqüências “motif CXXXX” conservadas (aminoácidos 42 a 46 e 60 a 64), encontradas no terminal amino da maioria das globulinas do tipo vicilinas, que formam oligômeros (KRIZ et al., 1990; GRIMES e OVERVOORDE, 1996). Adicionalmente, foram identificados 26 resíduos de aminoácidos altamente conservados em proteínas do tipo vicilinas. Análises desses resíduos conservados, no contexto da estrutura tridimensional, demonstraram a importância de tais resíduos no contato intramonômeros, favorecendo a oligomerização dessas proteínas (LAWRENCE et al., 1990). Desses 26 resíduos, 23 (88%) estão presentes na proteína S-64 (Figura 14).

Outra característica estrutural conservada nas proteínas tipo vicilinas é o “motif” LQ(R/K)F nas posições 56-59 e 33-36, nas seqüências da provicilina e convicilina, respectivamente (Figura 14, sublinhando-se o "motif" na posição 122 da proteína S-64). Esse “motif” é similar ao sinal de endereçamento da carboxipeptidase Y para o vacúolo em leveduras, tendo sido relatado funcionar como sinal de endereçamento das vicilinas para os corpos protéicos (NG et al., 1993). Essa região na proteína S-64 e na proteína homóloga SBP é LKKF, posições 122-125 da seqüência de S-64, sendo a segunda posição não conservada. Tem sido proposto que essa seqüência não conservada deve explicar parcialmente o endereçamento da proteína SBP para a membrana plasmática e não para o vacúolo ou corpos protéicos (OVERVOORDE et al., 1997). No entanto, essa característica pode ser irrelevante para discriminar funcionalmente a proteína S-64 e a homóloga SBP das proteínas do tipo vicilinas.

```

1                                     ↓                                     60
pUFVS64 .MATRAKLSL AIFLFFLLAL ISNLALGKLK ETEVEEDPEL VTCKHQCCQQ RQYTESDKRT
p08438 MAATTLKDSF PLLTLLGIAF LASVCLS... ..
p13918 .....ERSS... ..
61                                     120
pUFVS64 CLQQCDMSKQ EREKQVEEET REKEEEHQEQ HEEEQDQNPY VFEEKDFST RVETEGGSIR
p08438 .....SRSDQDNPF VFESNR.FQT LFENENGHIR
p13919 .....ESQERRNPF LFKSNK.FLT LFENENGHIR
121                                     180
pUFVS64 VLKKTEKSK LLOGNENFRL AILEARHTF VSPRHFDFSEV VLFNIKGRAV LGLVRESETE
p08438 LLQKFDQHSK LLENLQNYRL LEYKSKPHTI JLPQQTDAF ILVVLSGKAI LTVLLPNDRN
p13919 LLQRFDKRSD LFENLQNYRL VEYRAKPHTI FLPQHIDADL ILVVLSGKAI LTVLSPNDRN
. . . . .
181                                     240
pUFVS64 KITLEPGDMI HIPAGTPLYI VNRDENEKLL LAMLHIPVST PGKFEFFFGP GGRDPESVLS
p08438 SFSLERGKTI KLPAGTIGYL VNRDDEEDLR VLDLVIPVNR PGEPQSFLLS GNQNQPSILS
p13919 SYNLERGDTI KLPAGTTSYL VNQDDEEDLR LVDLVIPVNG PGKFQSFLLS GNQN..QYLR
. . . . .
241                                     290
pUFVS64 AFSWNVLQAA LQTPKGKLER LF.....NQNEGSIF KISRERVRAL APTKKSSWWP
p08438 GFSKNIEAS FNTQYKEIEK YHRRGLKDRR QRGQENVIV KISRKQIEEL NKNAKSSSKK
p13919 GFSKNIEAS YNTRYETIEK VLLEEQEQD. ....RKRR QQGEETDAIV KVS.....
. . . . .
291                                     ↓                                     350
pUFVS64 FGGESKAQFN IFSKRPTFSN GYGRLTEVGP DDEKSWLQRL NLMLTFTNIT QRSNSTIHYN
p08438 STLLESEPFN LRSREPIYSN KFGKFFEITP KRNPQ.LQDL NIFVNYVEIN EGSLLLPHYN
p13919 .....
. . . . .
351                                     400
pUFVS64 SHATKIALVM DGRGHLQISC PHMSSRSDS. K.....HDKSSPSYHR ISADLKPGMV
p08438 SRAIVIVTVN EGKGDFELVG QRNENQQGLR EYDEEQEQG EEEIRKQVQN YKAKLSPGDV
p13919 .....
. . . . .
401                                     460
pUFVS64 FVVPPGHPEV TIASNKENLL IICFEVMVRD NKKFTFAG.K DNIVSSLDNV AKELAFNYPS
p08438 LVIPAGYPVA IKASS.NLN LVGFGINAEN NQRYFLAGEE DNVISQIHKP VKELAFPGSA
p13919 .....
. . . . .
461                                     489
pUFVS64 EMVNGVFER KESLFFPEEL PSEERGRRAV A.....
p08438 QEVDTLLENQ KQSHFANAQP RERERGSQEI KDHLYSILGS F
p13919 .....

```

Figura 14 – Alinhamento da seqüência primária da proteína S-64 com proteínas de reserva de plantas. A seqüência de aminoácidos da proteína S-64 corresponde ao clone pUFVS64, e as seqüências p08438 e p13919 correspondem a um precursor da provicilina e a convicilina, respectivamente. Aminoácidos idênticos são destacados em vermelho. As posições correspondentes a início e término da seqüência de S-64 truncada (posição 36 e 343) estão indicadas com a seta (↓). As seqüências consenso CXXXC estão destacadas de azul. Resíduos de aminoácidos, altamente conservados entre as proteínas do tipo vicilinas e importantes para manutenção da estrutura tridimensional dessas proteínas, são indicados por círculos fechados (•) abaixo do alinhamento. O “motif” LQ(R/K)F encontra-se sublinhado. O alinhamento de seqüências foi feito, utilizando-se o programa “Swiss protein”.

A maior proporção de oligômeros formados pela versão truncada de S-64 (Figura 13, comparar linha I e T para $-\beta$) ocorreu, provavelmente, devido à manutenção do “motif” formador das pontes de dissulfeto intermonômeros, seqüência consenso CXXXC (KRIZ et al., 1990) na versão truncada de S-64 (Figura 14, destaque de azul), direcionando-se a oligomerização a partir da formação de pontes de dissulfeto. Esse resultado é coerente com a localização do domínio de oligomerização da proteína S-64, entre os aminoácidos 36 e 343. Além disso, enquanto a identidade de seqüência entre toda a extensão da proteína S-64 e vicilinas não ultrapassa 26%, a seqüência da versão truncada de S-64 chega a apresentar 36% de identidade com a região correspondente das vicilinas.

4.5. Sítio de ligação à GTP de S-64 (é funcional)

A proteína S-64 possui a seqüência de aminoácidos ALAPTKKS (posições 279-287), que difere da seqüência consenso (A,G)X(4N)GK(S,T) por apenas dois resíduos de aminoácidos (MATRANGOLO, 1998). Essa seqüência é comumente denominada seqüência consenso A (WALKER et al., 1982) ou “P-loop” (SARASTE et al., 1990) e foi derivada de análises de comparações de seqüências e estudos cristalográficos de diversas proteínas que ligam ATP ou GTP. A estrutura secundária deduzida para a proteína S-64 reforça a hipótese de que S-64 possui um sítio funcional de associação com nucleotídeos. A seqüência ALAPTKKS encontra-se no mesmo contexto da estrutura secundária do “motif A” ou “P-loop”, formando uma alça flexível entre regiões intramoleculares de α -hélice e β -conformação que, provavelmente, liga-se a um dos grupamentos fosfato do nucleotídeo (MATRANGOLO, 1998). Diante dessas informações estruturais, um ensaio *in vitro* para avaliar a funcionalidade da seqüência consenso de ligação à ATP ou GTP foi conduzido, por meio de “GTP dot blot”, usando-se [$^{32}\text{P}\alpha$]-GTP.

A proteína S-64 produzida em *E. coli* transformada com pUFV120 (Figura 15-A) e purificada por cromatografia de afinidade (Figura 15-B, linha 1) foi aplicada diretamente na membrana de nitrocelulose e incubada com [$^{32}\text{P}\alpha$]-GTP, na presença de ATP não-radioativo. De fato, a capacidade de GTP radioativo em marcar a proteína S-64 indica que a proteína S-64 se liga a GTP, sendo a intensidade do sinal radioativo

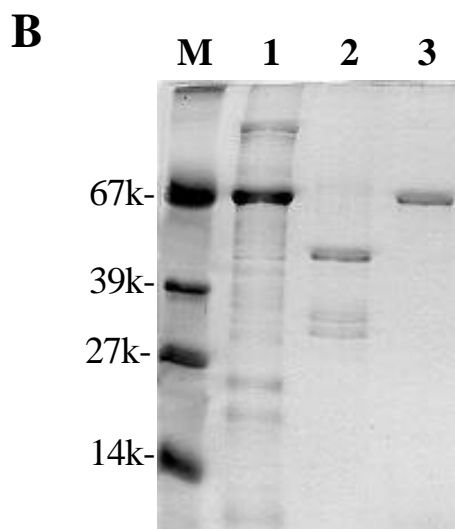
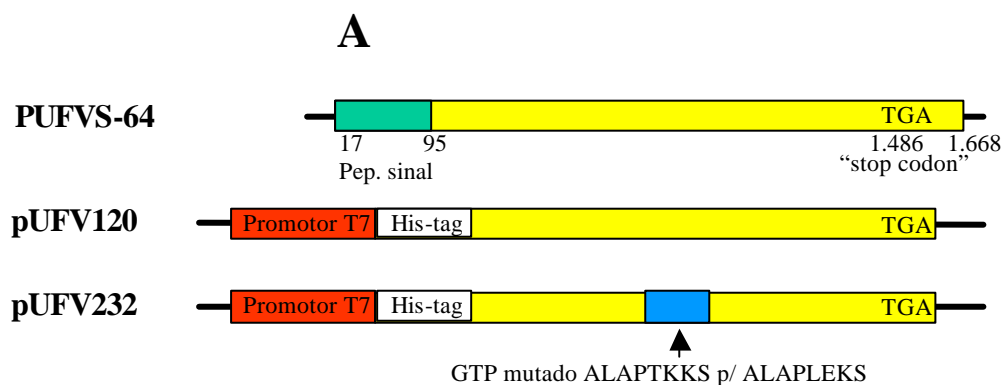


Figura 15 – Versões de S-64 produzidas em bactéria e purificadas. Em A, encontra-se a representação esquemática dos clones pUFV120 e pUFV232, em B, os clones pUFV120, pUFV50 e pUFV232 foram induzidos com IPTG 2 mmol/L, e as respectivas proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade a Ni^{++} e separadas por SDS-PAGE. Linha 1, proteína S-64 isenta de peptídeo sinal, produzida em bactéria (FP); linha 2, proteína S-64 truncada produzida em bactéria (TP); linha 3, proteína S-64 isenta de peptídeo sinal e com mutação no sítio de ligação à GTP, produzida em bactéria; e a linha M corresponde a padrões de massa molecular.

diretamente proporcional à quantidade de proteína ensaiada (Figura 16, linha 1). Uma vez que a proteína truncada, produzida em bactéria e purificada (Figura 15, linha 2), retém o sítio provável de associação com ATP ou GTP, a sua capacidade de ligar-se a GTP também foi avaliada (Figura 16, linha 3). Embora com menos eficiência, a proteína truncada retém a capacidade de ligar-se à GTP.

Com a finalidade de identificar precisamente o sítio de ligação à GTP, a seqüência consenso de ligação à ATP/GTP, ALAPTKKS, foi mutada para ALAPLEKS, usando-se uma estratégia de mutagênese dirigida *in situ* baseada em reações de PCR (Figura 5). Em seguida, o cDNA mutado foi transferido para o vetor pET-16b (Figura 15-A), e a proteína mutada foi sintetizada em bactéria, contendo extensões de histidinas no amino terminal e purificada por cromatografia de afinidade (Figura 15-B, linha 3). Mutações na seqüência consenso bloqueia totalmente a capacidade da proteína S-64 em ligar-se a GTP (Figura 16, linha 2). Esses resultados indicam que a proteína S-64 exibe a atividade de ligação à GTP e estabelecem que a seqüência ALAPTKKS corresponde ao seu sítio de ligação ao nucleotídeo.

Proteínas de ligação à GTP e associadas a membranas têm sido classificadas em duas subfamílias, as proteínas G heterotriméricas e as proteínas G pequenas (KAZIRO et al., 1991). Enquanto as proteínas G heterotriméricas contêm as subunidades α , β e γ , as proteínas G pequenas parecem similares à subunidade α livre, operando sem o heterodímero $\beta\gamma$. Geralmente, a subunidade α possui o sítio de ligação à GTP e a atividade de GTPase. Embora a proteína S-64 exiba atividade de ligar-se à GTP e esteja associada à membrana plasmática, ela difere das proteínas G clássicas, uma vez que forma homodímeros. Além disso, a identidade de seqüência entre S-64 e proteínas G identificadas em plantas está restrita ao sítio consenso de ligação ao nucleotídeo (WEISS et al., 1997).

A presença e a função de proteína G em plantas foram identificadas recentemente. Tem sido demonstrado que as proteínas G em plantas estão envolvidas em respostas a patógenos (VERA-ESTRELA et al., 1994), no controle da abertura de canais de K^+ em células-guarda, na ativação de canais de Ca^{++} e na transmissão de sinal induzido por luz azul (AHARON et al., 1998). Em mamíferos, essas proteínas estão envolvidas no transporte de vesículas na rota secretória e em cascata de transdução de sinal (YARFITZ e HURLEY, 1994). Levando-se em consideração que as proteínas G e S-64 possuem características estruturais distintas, provavelmente a atividade de ligação

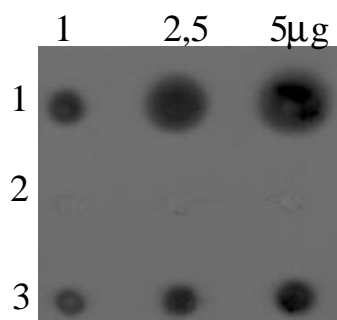


Figura 16 – Atividade de ligação à GTP da proteína S-64. Quantidades crescentes (1, 2,5 e 5 μ g) de proteína S-64 isenta de peptídeo sinal (linha 1), proteína S-64 isenta de peptídeo sinal e com mutação no sítio de ligação à GTP (linha 2) e versão truncada de S-64 (linha 3), produzidas em bactéria, foram aplicadas diretamente na membrana de nitrocelulose e incubadas na presença de [32 P α]-GTP. O resultado foi revelado por auto-radiografia, a partir da exposição da membrana de nitrocelulose ao filme de raios X, por 48 horas.

à GTP de S-64 esteja associada a funções biológicas diferentes daquelas descritas para as proteínas G clássicas. No entanto, ensaios complementares devem ser conduzidos, a fim de elucidar possível relação bioquímica entre a atividade de a proteína S-64 ligar-se à GTP e o seu envolvimento no transporte de sacarose.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Previamente, usando como sonda anticorpos contra proteínas de membrana parcialmente purificadas, isolou-se de uma biblioteca de expressão um cDNA que codifica uma proteína, S-64, específica da semente de soja. O clone foi totalmente seqüenciado. A estrutura primária da proteína, deduzida da seqüência de nucleotídeos, possui 489 aminoácidos e peso molecular calculado em 64.000. A proteína possui um peptídeo sinal no terminal amino, uma seqüência consenso de glicosilação e um sítio de ligação à ATP/GTP. Além de apresentar identidade de seqüência moderada com proteínas da família das vicilinas, a proteína S-64 apresenta 85% de identidade de seqüência com uma proteína envolvida no transporte de sacarose em soja, SBP (“Sucrose Binding Protein”). Compatível com seu envolvimento no transporte de sacarose, as expressões senso e anti-senso de *s-64* alteraram drasticamente o particionamento de carboidratos em plantas de fumo.

Com o objetivo de caracterizar bioquimicamente a proteína, diferentes versões do cDNA de *s-64* foram clonadas no vetor de expressão em bactéria pET-16b, sob o controle do promotor da T7 RNA polimerase. Evidências indicam que o peptídeo sinal de S-64 é funcional. A estirpe de *E. coli* BL21(DE₃) não acumulou a proteína S-64 intacta, ao passo que uma versão da proteína isenta do peptídeo sinal foi sintetizada eficientemente em bactéria. Além disso, a proteína S-64 foi detectada na fração membranosa, indicando tratar-se de uma proteína secretória.

Anticorpos preparados contra S-64 foram eficientes em detectar duas proteínas homólogas de mobilidade eletroforética similares em membranas de cotilédones de soja. A expressão intencional do cDNA de *s-64* em células de soja em suspensão resultou no

acúmulo da proteína de menor massa molecular. Esses resultados indicaram que os dois polipeptídeos imunologicamente conservados da fração membranosa de cotilédones são produtos de genes diferentes, e o polipeptídeo de menor massa molecular corresponde à S-64. O polipeptídeo de maior massa molecular corresponde, provavelmente, à proteína homóloga SBP, uma vez que esta possui 524 aminoácidos, enquanto a seqüência aberta de leitura de S-64 codifica uma proteína de 489 aminoácidos.

Além de apresentar as características de um peptídeo sinal, os 27 aminoácidos do terminal amino da proteína S-64 apresentam características de um domínio transmembrana. Ensaio de transcrição, tradução e processamento co-traducional *in vitro*, usando-se lisado de reticulócitos de coelho, ³⁵S-cisteína e membranas microsomais pancreáticas caninas, demonstraram que o peptídeo sinal da proteína S-64 não é clivado. Esses resultados indicam que a S-64 é uma proteína de membrana do Tipo II, cujo peptídeo sinal não é clivado. Dessa forma, o peptídeo sinal de S-64 acumula as funções de endereçamento da síntese da proteína para o retículo endoplasmático e funciona como domínio de transmembrana, fixando a proteína na membrana plasmática. Isso é compatível com a localização da proteína na fração membranosa de cotilédones e com a atividade biológica da proteína como possíveis transportadores de sacarose através da membrana plasmática.

A homologia moderada de seqüência entre a proteína S-64 e proteínas de reserva formadoras de oligômeros indica que S-64 pode formar oligômeros. Uma versão truncada da proteína S-64 (aminoácidos 36 a 343) produzida em bactéria e purificada por cromatografia de afinidade apresentou mobilidade eletroforética correspondente ao dobro da massa molecular da proteína, na ausência de agente redutor β-mercaptoetanol, em proporções superiores à oligomerização apresentada pela proteína isenta de peptídeo sinal. Isso é compatível com a localização do domínio de oligomerização da proteína S-64 entre os aminoácidos 36 e 343.

Uma vez que a proteína S-64 possui uma seqüência consenso de ligação à ATP/GTP, ensaios de associação da proteína com nucleotídeos foram conduzidos. A funcionalidade do sítio de ligação à ATP/GTP, presente na estrutura primária da proteína S-64, foi avaliada por meio de “GTP dot blot” e mutação dirigida na respectiva seqüência consenso ALAPTKKS para ALAPLEKS. Mutação na seqüência consenso bloqueia totalmente a capacidade da proteína S-64 em ligar-se à GTP. Tais resultados indicam que a proteína S-64 exibe a atividade de ligação à GTP e estabelecem que a seqüência ALAPTKKS corresponde ao seu sítio de ligação ao nucleotídeo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHARON, G. S., GELLI, A., SNEDDEN, W. A., BLUMWALD, E. Activation of a plant membrane Ca^{2+} channel by $\text{TG}\alpha 1$, a heterotrimeric G protein α -subunit homologue. **FEBS Letters**, v.424, n.1, p.17-21, 1998.
- BUCKHOUT, T. J. Sucrose transport in isolated plasma membrane vesicles from sugar beet leaves. **Planta**, v.178, n.1, p.133-150, 1989.
- BOORER, K. J., LOO, D. D. F., FRÖMMER, W. B., WRIGHT, E. M. Transport mechanism of the cloned potato H^+ /sucrose cotransporter StSUT1. **The Journal of Biological Chemistry**, v.271, n.41, p.25139-25144, 1996.
- BUSH, D. R. Proton-coupled sucrose transport in plasmalemma vesicles isolated from sugar beet leaves. **Plant Physiology**, v.89, n.4, p.1318-1323, 1989.
- BUSH, D. R. Electrogenicity, pH-dependence, and stoichiometry of the proton-sucrose symport. **Plant Physiology**, v.93, n.4, p.1590-1596, 1990.
- BUSH, D. R. Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.44, p.513-542, 1993.
- DAIE, J. Sucrose uptake in isolated phloem of celery is a single saturable system. **Planta**, v.171, n.4, p.474-482, 1987.

- DAIE, J. Phloem loading of sucrose: update and opportunities in molecular biology. **Plant Molecular Biology**, v.7, n.1, p.106-115, 1989.
- DELROT, S. Proton fluxes associated with sugar uptake in *Vicia faba* leaf tissue. **Plant Physiology**, v.68, n.3, p.706-711, 1981.
- DEWITT, N. D., HARPER, J. F., SUSSMAN, M. R. Evidence for a plasma membrane proton pump in phloem cells of higher plants. **The Plant Journal**, v.1, n.2, p.121-128, 1991.
- DILLEUSCHNEIDER, M., HETHERINGTON, A., GRAZIANA, A., ALIBERT, G., BETA, P., HAIECH, J., RANGEVA, R. The formation of inositol phosphate derivatives by isolated membranes from *Acer pseudoplatanus* is stimulated by guanine nucleotides. **FEBS Letters**, v. 208, n.2, p.413-417, 1986.
- FINER, J. J., NAGASAWA, A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill.). **The Plant Cell**, v. 15, n.2, p.125-136, 1988.
- FLEUW, S., FRANCECHI, V. R., W. D., PATRICK, J. W. Antibody against the sucrose binding protein specifically inhibits sucrose-proton symport by transfer cell protoplasts of developing *Vicia faba* L. seed. **Plant Physiology**, v.99, n.1, p.7, 1992. Abstract.
- FRÖMMER, W. B., SONNERWALD. Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species. **Journal of Experimental Botany**, v.46, n.287, p.587-607, 1995.
- GAHRTZ, M., STOLZ, J., SAUER, N. A phloem-specific sucrose-H⁺ symporter from *Plantago major* L. supports the model of apoplastic phloem loading. **The Plant Journal**, v.6, n.5, p.697-706, 1994.
- GAHRTZ, M., STOLZ, J., SAUER, N. Expression of the PmSUC1 sucrose carrier de *Plantago major* L. is induced during seed development. **The Plant Journal**, v.9, n.1, p.93-100, 1996.
- GALLET, O., LEMOINE, R., LARSSON, C. The sucrose carrier of the plant plasma membrane. I. Differential affinity labeling. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.978, n.1, p.56-64, 1989.
- GALLET, O., LEMOINE, R., GAILLARD, C. Selective inhibition of active uptake of sucrose into plasma membrane vesicles by polyclonal sera directed against a 42

- kilodalton plasma membrane polypeptide. **Plant Physiology**, v.98, n.1, p.17-23, 1992.
- GAMBORG, O. L., MILLER, R. A., OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, n.2, p.151-158, 1968.
- GEIGER, D. R., GIAQUINTA, R. T., SOVONICK, S. A. Solute distribution in sugar beet leaves in relation to phloem loading and translocation. **Plant Physiology**, v.54, n.6, p.892-898, 1973.
- GEIGER, R. D. Understanding interactions of source and sink regions of plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.25, n.5, p.659-666, 1987.
- GIAQUINTA, R. T. Evidence for phloem loading from the apoplast, chemical modification of membrane sulfhydryl groups. **Plant Physiology**, v.57, n.6, p.872-875, 1976.
- GIAQUINTA, R. T. Phloem loading of sucrose. **Annual Review of Plant Physiology**, v.34, p.347-387, 1983.
- GRIMES, H. D., OVERVOORDE, P. J., HIPPEL, K. A 62-kD sucrose binding protein is expressed and localized in tissues actively engaged in sucrose transport. **The Plant Cell**, v. 4, n.12, p.1561-1574, 1992.
- GRIMES, H. D., OVERVOORDE, P. J. Functional characterization of sucrose binding protein-mediated sucrose uptake in yeast. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p.1217-1222, 1996. Special Issue
- HITZ, W. D., CARD, P. J., RIPP, K. G. Substrate recognition by a sucrose transporting protein. **Journal Biology Chemistry**, v.261, n.26, p.11986-11981, 1986.
- KAZIRO, Y., ITOH, H., KOZAZA, T., NAKAFUCO, M., SATOH, T. Structure and function of signal transducing GTP-binding proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v.60, p.349-400, 1991.
- KLANN, E., YELLE, S., CHETELAT, R. Molecular cloning and characterization of tomato fruit invertase. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PHYSIOLOGY, 8, 1991, Tucson. **Anais...** Tucson, AZ: Cold Spring, 1991. p.692.

- KRIZ, A. R., WALLAC, M. S., PAIVA, R. Globulin gene expression in embryos of maize viviparous mutants. Evidence for regulation of the *Glb1* gene by ABA. **Plant Physiology**, v.92, p.538-542, 1990.
- KÜHN, C., QUICK, W. P., SCHUIZ, A., SONNEWALD, U., FRÖMMER, W. B. Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. **The Plant Cell Environment**, v.19, n.9, p.1115-1123, 1996.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T₄. **Nature**, v. 227, n.1, p.680, 1970.
- LALOI, M., DELROT, S., M'BATCHI, B. Characterization of sugar efflux from sugar beet leaf plasma membrane vesicles. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.31, n.7, p.731-741, 1993.
- LAWRENCE, M. C., SUZUKI, E., VARGHESE, J. N., DAVIS, P. C., DONKELAAR, A. V., TULLOCH, P. A., COLMAN, P. M. The three-dimensional structure of the seed storage protein phaseolin at 3 Å resolution. **EMBO Journal**, v.9, n.1, p.9-15, 1990.
- LAZZERI, P. A., HILDEBRAND, D. F., COLLINS, G. B. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. **Plant Molecular Biology Report**, v.3, n.2, p.160-167, 1985.
- LEMOINE, R., DELROT, S., GALLET, O. The sucrose carrier of the plant plasma membrane. II. Immunological evidence. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.78, n.1, p.65-71, 1989.
- LEMOINE, R., GALLET, O., GAILLARD, C., FRÖMMER, W.B., DELROT, S. Plasma membrane vesicles from source and sink leaves. **Plant Physiology**, v.100, n.3, p.1150-1156, 1992.
- LI, Z. S., GALLET, O., GAILLARD, C., LEMOINE, R., DELROT, S. Reconstitution of active sucrose transport in plant proteoliposomes. **FEBS Letter**, v.289, n.1, p.117-120, 1991.
- LI, Z. S., NOUBHANI, A. M., BOURBOULOUX, A., DELROT, S. Affinity purification of sucrose binding protein from the plant membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.81, n.1219, p.389-397, 1994.

- LICHITNER, F. T., SPANSWIDK, R. M. Eletrogenic sucrose transport in developing soybean cotyledons. **Plant Physiology**, v.67, n.4, p.869-874, 1981.
- LIN, W., SCHMITT, M. R., HITZ, W. T. Sugar transport into protoplasts isolated from developing soybean cotyledons. Protoplasts isolation and general characteristics of sugar transport. **Plant Physiology**, v.75, n.4, p.936-940, 1984.
- LUONG, H. T., SHEWRY, P. R., LAZZERI, P. A. Transient gene expression in cassava somatic embryos by tissue electroporation. **Plant Science**, v.107, p.105-115, 1995.
- MADORE, M. A., LUCAS, W. J. Control of photoassimilate movement in source-leaf tissues of *Ipomea tricolor* Cav. **Planta**, v.171, n.2, p.197-204, 1986.
- MARTINS, M. F. **Caracterização molecular e análise da expressão do gene BIP da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 82p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- MATRANGOLO, F. S. **Caracterização de uma proteína secretória de soja e de sua interação com BiP**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 69p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- McGRATH, J. P., CAPON, J. D., GOEDDEL, D. V. Biochemistry of legume seed proteins. **NATURE**, v. 310, n.2, p.644, 1984.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.5, n.4, p.473-498, 1962.
- NG, J.D., KO, T., McPHERSON, A. Cloning, expression, and crystallization of jack bean (*Canavalia ensiformis*) canavalin. **Plant Physiology**, v.101, n.5, p.713-728, 1993.
- OVERVOORDE, P. J., CHAO, W. S., GRIMES, H. D. A plasma membrane sucrose-binding protein that mediates sucrose uptake shares structural and sequence similarity with seed storage proteins but remains functionally distinct. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.25, p.15898-15904, 1997.
- OVERVOORDE, P. J., FRÖMMER, W. B., SPENCER, D. A soybean sucrose binding protein independently mediates nonsaturable sucrose uptake in yeast. **The Plant Cell**, v.8, n.2, p.271-280, 1996.

- OVERVOORDE, P. J., GRIMES, H. D. Topographical analysis of the plasma membrane-associated sucrose binding protein from soybean. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.21, p.15154-15161, 1994.
- PEDRA, J. H. F. **Obtenção de plantas transgênicas de fumo (*Nicotiana tabacum*) expressando o gene *s-64* da soja (*Glycine max*)**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 43p. Dissertação (Monografia BQI 498 – Biologia) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- PICHELIN-POITEVIN, D., DELROT, S., M'BATCHI, B. Differential labeling of membrane proteins by N-methylmaleimide in the presence of sucrose. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 25, n.3, p.597-607, 1987.
- RIESMEIER, J. W., HIRNER, B., FRÖMMER, W. B. Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. **The Plant Cell**, v.5, p.1591-1598, 1993.
- RIESMEIER, J. W., WILIMITZER, L., FRÖMMER, W. B. Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. **EMBO Journal**, v. 13, n.1, p.1-7, 1994.
- RIESMEIER, J. W., WILLMITZER, L., FRÖMMER, W.B. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. **EMBO Journal**, v.11, n.13, p.4705-4713, 1992.
- RIPP, K. G., VIITANEN, P. B., HITZ, W. D. L. Identification of a membrane protein associated with sucrose transport into cells of developing soybean cotyledons. **Plant Physiology**, v.88, n.5, p.1435-1445, 1988.
- SAKR, S., LEMOINE, R. GAILLARD, C. DELROT, S. Effect of cutting on solute uptake by plasma vesicles from subarctic beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. **Plant Physiology**, v.103, n.1, p.49-58, 1993.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, E. F. T. **Molecular cloning – a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989. 3v.
- SARASTE, M., SIBBALD, P. R., WITTINGHOFER, A. The P-loop-a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. **Trends Biochemistry Science**, v.15, n.11, p. 430-434, 1990.

- SAUER, N., STOLZ, N. SUC1 e SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine tagged protein. **The Plant Journal**, v.6, n.1, p.67-77, 1994.
- SCHMALSTIG, J. G., GEIGER, D. R. Phloem unloading in developing leaves of sugar beet. I. Evidence for pathway through the symplast. **Plant Physiology**, v.79, n.1, p.237-241, 1985.
- SLONE, J. H., BUCKHOUT, T. J. Sucrose-dependent H⁺ transport in plasma membrane vesicles isolated from sugar beet leaves (*Beta vulgaris* L.). Evidence in support of the H⁺-symport model for sucrose transport. **Planta**, v. 183, n.3, p.584-589, 1991.
- SONNEWALD, U., BRAUER, M., VON SCHAEWEN, A. Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast, a powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions. **The Plant Journal**, v. 1, n.1, p.95-106, 1991.
- STADLER, R., BRANDNER, J., SCHULZ, A., GAHRTZ, M., SAUER, N. Phloem loading by the PmSUC2 sucrose carrier from *Plantago major* occurs into companion cells. **The Plant Cell**, v.7, n.10, p.1545-1554, 1995.
- STITT, M. Plasmodesmata play an essential role in sucrose export from leaves: a step toward an integration of metabolic biochemistry and cell biology. **The Plant Cell**. v. 8, n.4, p. 565-571, 1996.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant physiology**. California: Redwood City - Benjamin/Cummings. 1991. 689p.
- THORNE, J. H. Phloem unloading of C and N assimilates in developing seeds. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 36, p. 317-343, 1985.
- TRUERNIT, E., SAUER, N. The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of β -glucuronidase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by SUC2. **Planta**, v.196, n.3, p.564-570, 1995.
- VAN BEL, A. J. E., VAN KESTEREN, W. J. P., PAPENHUIJZEN, C. Ultrastructural indications for coexistence of symplastic and apoplastic phloem loading in *Commelina benghalensis* leaves. Differences in ontogenic development, spatial

- arrangement and symplastic connections of the two sieve tubes in minor vein. **Planta**, v.176, n.1, p.159-172, 1988.
- VERA-ESTRELA, R., HIGGINS, V. J., BLUMWALD, E. Plant defense response to fungal pathogens: G-protein mediated changes in host plasma membrane redox reactions. **Plant Physiology**, v.106, n.1, p.97-102, 1994.
- WALKER, J. E., SARASTE, M., RUNSWICK, M. J. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. **The EMBO Journal**, v.1, n.8, p.945-951, 1982.
- WARD, J. M., KÜHN, C., TEGEDER, M., FRÖMMER, W. B. Sucrose transport in higher plants. **International Review of Cytology**, v.178, n.1, p.41-71, 1998.
- WARMBRODT, R. D., BUCKHOUT, T. J., HITZ, W. D. Localization of a protein, immunologically similar to a sucrose-binding protein from developing soybean cotyledons, on the plasma membrane of sieve-tube members of spinach leaves. **Planta**, v.180, n.1, p.105-115, 1989.
- WEISS, C. A., WHITE, E., MA, H. H. H. The G protein α subunit (GP α 1) is associated with the ER and the plasma membrane in meristematic cells of *Arabidopsis* and cauliflower. **FEBS Letters**, v.407, n.3, p.361-367, 1997.
- WILLIAMS, L. E., NELSON, S. J., HALL, J. L. Characterization of solute transport in plasma membrane vesicles from cotyledons of *Ricinus communis* L. II. Evidence for a proton-coupled mechanism for sucrose and amino acid uptake. **Planta**, v.182, n.3, p.540-545, 1990.
- WRIGHT, J. P., FISHER, D. B. Measurement of the sieve tube membrane potential. **Plant Physiology**, v.67, n.4, p.845-848, 1981.
- YARFITZ, S., HURLEY, J. H. Transducing mechanisms of vertebrate and invertebrate photoreceptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.20, p.14329-14332, 1994.