

LEONARDO AUGUSTO ZEBRAL RODRIGUES

**ANÁLISE DA ATIVIDADE DO PROMOTOR DE BiP (Binding Protein)
DE SOJA EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TABACO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R696a
2005

Rodrigues, Leonado Augusto Zebral, 1974-
Análise da atividade do promotor de BiP (Binding
Protein) de soja em plantas transgênicas de tabaco /
Leonardo Augusto Zebral Rodrigues. – Viçosa : UFV, 2005.
xi, 62p. : il. ; 29cm.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 53-62.

1. Proteínas de ligação com DNA. 2. Biologia molecular.
3. Proteínas de choque térmico - Fisiologia. 4. Chaperones
moleculares. 5. Plantas - Efeito do estresse. 6. Retículo
endoplasmático. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22.ed. 572.68

LEONARDO AUGUSTO ZEBRAL RODRIGUES

**ANÁLISE DA ATIVIDADE DO PROMOTOR DE BiP (Binding Protein)
DE SOJA EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TABACO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA EM: 23 de fevereiro de 2005.

Sônia Madali Boseja Carolino
(Conselheira)

Valéria Monteze Guimarães

Andréa Miyasaka de Almeida

Fábio Murilo da Matta

Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

Aos meus pais **Valdir Rodrigues Pereira** e **Elza Zebral Rodrigues Pereira**, e ao meu irmão **Daniel Luis Zebral Rodrigues**, pelo apoio, amor e compreensão durante esses anos em Viçosa.

À professora Dr^a. **Elizabeth Pacheco Batista Fontes**, por ter me ensinado o que é pesquisa, pelo incentivo, exemplo de profissionalismo e, sobretudo, por seu apoio, amizade e compreensão no momento mais difícil da minha vida,

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Biologia Vegetal pela oportunidade de realização do curso e ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária pela oportunidade de realização deste trabalho.

À minha orientadora professora, Dr^a. Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pelo profissionalismo, competência, dedicação e amizade.

Aos meus conselheiros Dr^a. Sônia Madali Boseja Carolino, Dr^a. Maria Cristina Baracat Pereira e Dr. Marcelo Ehlers Loureiro pelo apoio e experiências compartilhadas.

Aos professores do Curso de Fisiologia Vegetal pelos ensinamentos, em especial, ao Dr. Wagner Campos Otoni, pela amizade, apoio e sugestões.

Aos membros da banca examinadora Dr^a. Andréia Miyasaka de Almeida, Dr^a. Sônia Madali Boseja Carolino, Dr^a. Valéria Monteze Guimarães e Dr. Fábio Murilo Da Matta pela disposição, críticas e valiosas sugestões.

Aos meus colegas de laboratório Anésia, Guilherme, Raphael, Simone, Dirce, Mariana, Ana Paula, André, Anete, Lilian, Serafim, Felipe, Meire e em especial a Alessandro, Carol, Sônia, Hebréia e Rejane, pelo auxílio, carinho, amizade e agradável convívio.

Aos grandes amigos conquistados aqui em Viçosa Alessandro Jaquiel Waclawovsky e André Fonseca von Tiesenhausen, pelo incentivo e ajuda incondicional.

À professora Dr^a. Renata Maria Strozi Alves Meira por ter cedido tão gentilmente os equipamentos do Laboratório de Anatomia Vegetal e à técnica deste laboratório, Vânia Maria Moreira Valente, pelos cortes anatômicos aqui mostrados.

Aos funcionários do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e do Departamento de Biologia Vegetal pela colaboração.

Aos colegas do curso de Fisiologia Vegetal.

À Capes, pelo financiamento do projeto.

A todos que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

LEONARDO AUGUSTO ZEBRAL RODRIGUES, filho de Valdir Rodrigues Pereira e Elza Zebal Rodrigues Pereira, nasceu em 04 de setembro de 1974, em Belo Horizonte, Minas Gerais.

Em fevereiro de 2003, graduou-se Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa/MG.

Em fevereiro de 2005, concluiu o Programa de Pós-Graduação, em nível de mestrado em Fisiologia Vegetal nessa mesma Universidade, com a defesa desta tese.

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. O retículo endoplasmático como porta de entrada da rota secretora.....	4
2.2. Chaperones moleculares.....	5
2.3. BiP (“Binding Protein”)	6
2.4. Via de resposta a proteínas mal dobradas UPR (Unfolded Protein Response) no retículo endoplasmático	8
2.5. Controle de qualidade da célula	9
2.6. Organização e regulação da expressão dos genes BiP	10
3. MATERIAL e MÉTODOS	13
3.1. Isolamento da região promotora do clone <i>gsBiP-9</i> e obtenção das deleções na sua extremidade 5’	13
3.2. Obtenção de células competentes de <i>Agrobacterium</i> sp.	16
3.3. Eletroporação de <i>Agrobacterium</i> sp.	16
3.4. Obtenção e cultivo de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Havana.....	17
3.5. Transformação de <i>Nicotiana tabacum</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	17
3.6. Isolamento de DNA genômico	19
3.7. Reações de PCR	19
3.8. Eletroforese de DNA em gel de agarose	20
3.9. Indução de estresses abióticos em discos foliares.....	20
3.10. Avaliação da atividade de <i>GUS</i> em discos foliares de tabaco.....	21

3.11. Análises histoquímicas e microscópicas	22
4. RESULTADOS	24
4.1. Análise de seqüência dos promotores de BiP.....	24
4.2. Os genes quiméricos <i>gsBiP6:GUS</i> e <i>gsBiP9:GUS</i>	28
4.3. Obtenção de plantas transgênicas para análise de atividade dos promotores de BiP.	33
4.4. Determinação da cinética enzimática para ensaios fluorimétricos com os promotores de BiP.....	34
4.5. O promotor de <i>gsBiP6</i> responde a várias condições de estresses	37
4.6. O promotor de <i>gsBiP9</i> é restrito a estresses que ativam a rota UPR	38
4.7. Identificação dos cis-elementos que respondem a estresses no promotor de <i>gsBiP6</i>	40
4.8. Identificação dos cis-elementos que respondem a estresses no promotor de <i>gsBiP9</i>	42
4.9. Distribuição espacial da atividade de <i>GUS</i> em plantas transgênicas com o promotor de BiP9.....	44
5. DISCUSSÃO	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

RESUMO

RODRIGUES, Leonardo Augusto Zebral, M. S., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2005. **Análise da atividade do promotor de BiP (Binding Protein) de soja em plantas transgênicas de tabaco.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Conselheiros: Sônia Madali Boseja Carolino, Maria Cristina Baracat Pereira e Marcelo Ehlers Loureiro.

A proteína BiP ("binding protein") de plantas tem sido descrita como um importante mediador de translocação, dobramento e montagem de proteínas recém-sintetizadas no lúmen do retículo endoplasmático, exibindo uma forte indução em resposta a uma variedade de estresses bióticos e abióticos. Apesar de sua relevância funcional, muito pouco se sabe com relação aos mecanismos de regulação da expressão dos genes BiP de plantas e da estrutura de seus promotores. Nesta investigação, dois promotores de BiP de soja, designados *gsBiP6* e *gsBiP9*, bem como diferentes extensões de suas extremidades 5' foram fusionados ao gene repórter beta-glucuronidase (*GUS*) e introduzidas em *Nicotiana tabacum* via transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Os promotores de *gsBiP6* e *gsBiP9* possuem *cis*-elementos gerais, característicos de promotores de genes de plantas, como as seqüências de transcrição CAAT e TATA, e *cis*-elementos que respondem a estresses do retículo endoplasmático (ERSE), além de seqüências relacionadas com o G-box. Ensaio de atividade de *GUS* em discos foliares transformados com os genes quiméricos *BiP6-GUS* e *BiP9-GUS* demonstraram que o promotor de *gsBiP6* é induzido por uma variedade de estresses, enquanto *gsBiP9* é induzido apenas por tunicamicina, um potente ativador da via de resposta a proteínas mal-dobradas (UPR). Além disso, análises histoquímicas de plantas transformadas com as construções *-358pbip6-gus* (BiP6) e *-2200pbip9-gus* (BiP9) revelaram que os promotores de BiP produziram um padrão intenso e uniforme de expressão de *GUS* em folhas, caules, raízes e meristemas apicais. Este padrão de distribuição espacial da atividade de *GUS* está correlacionado com uma expressão desses

genes em tecidos que apresentam alta atividade celular secretória e alta proporção de células em um processo ativo de divisão celular. Análises de deleções do promotor de *gsBiP9* em plantas transformadas identificaram dois domínios regulatórios *cis*-atuantes, denominados CRD-1 (-1090 a -670) e CRD-2 (-670 a +1), que são importantes para regulação espacial dos promotores de BiP em condições normais de desenvolvimento. A região de CRD-1 é caracterizada pela predominância quase absoluta de adenina e timina exibindo uma alta atividade do gene repórter *GUS*. Este domínio funcional possui uma atividade similar à de “enhancer”, já que é capaz de restaurar altos níveis de expressão quando fusionado diretamente à extremidade 5’ do promotor de BiP9. De fato, a atividade do gene repórter -glucuronidase (*GUS*) nas plantas contendo esse domínio regulatório *cis*-atuante foi praticamente idêntica àquela exibida pelo promotor inteiro. Além disso, a análise histoquímica e fluorimétrica de plantas contendo tais seqüências mostraram um aumento significativo na atividade do gene repórter *GUS*. A região de CDR-2 é caracterizada por conter elementos regulatórios positivos, que coordenam a expressão tecido-específica do promotor de *gsBiP9*, sendo capaz de restaurar em parte, os níveis de expressão basal do gene repórter *GUS*, uma vez que se detectou atividade do promotor em raízes e caule, entretanto, os níveis de expressão em folhas, principalmente na região dos feixes vasculares, não foram suficientemente altos e nem tão pouco de forma generalizada como visto nas construções contendo o promotor completo de BiP, sendo necessário seqüências adicionais delimitadas até a posição -1090 para uma alta atividade. Estes resultados sugerem que o controle da expressão dos genes BiP de plantas envolve múltiplos e complexos mecanismos e depende de uma complexa integração de múltiplos *cis*-elementos regulatórios no promotor.

ABSTRACT

RODRIGUES, Leonardo Augusto Zebal, M. S., Universidade Federal de Viçosa, February 2005. **Analysis of soybean BiP (binding protein) promoter activity in tobacco transgenic lines.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Committee members: Sônia Madali Boseja Carolino, Maria Cristina Baracat Pereira and Marcelo Ehlers Loureiro.

Plant BiP (binding protein) has been described as an important mediator of translocation, folding and assembly of nascent secretory proteins in the endoplasmic reticulum lumen and it responds to a variety of biotic and abiotic stresses. Despite its functional relevance, little is known about the regulation mechanisms of plant BiP gene expression and the structure of their promoters. Here, we have fused two BiP promoters, designated *gsBiP6* and *gsBiP9*, as well as different extensions of their 5'-flanking sequences to beta-glucuronidase (*GUS*) reporter gene and introduced into *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. The *gsBiP6* and *gsBiP9* promoters possess cis-regulatory elements of most plant promoters, such as CAAT e TATA boxes, in addition to potential regulatory cis-elements, such as endoplasmic reticulum stress elements (ERSE) and G-box-related sequences. *GUS* activity assays from leaf discs expressing *BiP6-GUS* e *BiP9-GUS* demonstrated that *gsBiP6* promoter is induced by a variety of stress conditions, whereas the induction of *gsBiP9* is restricted to tunicamycin treatment, a potent activator of the unfolded protein response (UPR) pathway. Furthermore, histochemical analysis of transgenic lines harbouring *-358pbip6-gus* (BiP6) and *-2200pbip9-gus* (BiP9) revealed that BiP promoters drove an intense and uniform pattern of *GUS* expression in leaves and stems, with the expression of BiP genes in tissues with high secretory activity and in regions of intense cell division. Promoter deletion analyses allowed to identify two *cis*-regulatory functional domains, designated CRD-1 (-1090 to -670) and CRD-2 (-670 to

+1), that are important for the spatially-regulated activation of *BiP* expression under normal plant development. CRD-1 corresponds to an AT-rich enhancer-like region, capable of promoting a significant increase in *GUS* activity in all analysed tissues. CDR-2 is able to maintain a basal expression of the reporter gene in root, stem and leaves and, most likely, it contains all the required elements of a eukaryotic promoter. In spite of that, the gene reporter expression levels driven by CRD-2 domain were not sufficiently high in these organs, and *GUS* activity were not detected in apical meristems. In fact, the BiP promoter activity in meristematic tissues requires the presence of a second activating domain CRD-1 (-1090 to -670), that corresponds to an AT-rich enhancer-like region, capable of promoting a significant increase in *GUS* activity in all analysed tissues. These results suggest that the tissue-specific control of *BiP* gene expression requires a complex integration of multiple *cis*-acting regulatory elements on the promoter.

1. INTRODUÇÃO

A translocação de proteínas, dos polissomos para o interior do retículo endoplasmático, marca o início do transporte através da via secretora. Esse compartimento fornece ambiente ótimo para o dobramento e o desdobramento, montagem, endereçamento subcelular e remoção proteolítica de proteínas (Chrispeels, 1991; Rexach *et al.*, 1994). Assim, o correto processamento de proteínas secretórias e transmembranas em estruturas multiméricas com a conformação adequada para seguir a via secretora ocorre no retículo endoplasmático (Helenius *et al.*, 1992). As proteínas que, por algum motivo, não alcançam a conformação nativa adequada, formam agregados protéicos no lúmen do retículo endoplasmático, que são reconhecidos ativando uma via de sinalização que coordena a regulação de uma série de genes envolvidos no mecanismo de defesa da célula, denominada via de resposta a proteínas mal-dobradas (Unfolded Protein Response - UPR) (Hurtley *et al.*, 1989). Esse comportamento revela a existência de mecanismos de “controle de qualidade” presentes no retículo endoplasmático, que atuam auxiliando proteínas nascentes a alcançarem a conformação nativa adequada para seguirem a via secretora e impedir que proteínas anormais, aquelas incapazes de desempenhar corretamente suas funções biológicas ou que comprometam o funcionamento normal das células eucarióticas, sejam endereçadas para outras organelas (Kreis e Lodish, 1986; Gething *et al.*, 1986; Copeland *et al.*, 1986; 1988; Lippincott-Schwartz *et al.*, 1988; Lodish, 1988; Rose e Doms, 1988).

Entre as proteínas de defesa das células contra estresses, destacam-se os chaperones moleculares, que são induzidos por uma variedade de estresses fisiológicos. Os chaperones são definidos como proteínas que facilitam o correto dobramento de outras proteínas *in vivo*, sendo requeridos para uma ampla gama de processos, incluindo dobramento e desdobramento de proteínas, oligomerização, endereçamento subcelular e remoção proteolítica (Pelham, 1989; Hammond e Helenius, 1995). Essas funções, aparentemente

diversas, são intermediadas pela capacidade em comum dos chaperones moleculares se ligarem a um polipeptídeo em estado não nativo e, conseqüentemente, evitar a sua entrada em uma rota de desdobramento improdutiva (Bukau *et al.*, 1996; Hiller *et al.*, 1996; Brodsky e McCracken, 1997; Csermely, 1997; Mathew *et al.*, 1998; Mayer *et al.*, 1998; Horwich *et al.*, 1999).

Os chaperones moleculares do retículo endoplasmático são constitutivamente expressos em baixos níveis em todas as células, entretanto, são induzidos pelo acúmulo de proteínas mal-dobradas no lúmen do retículo endoplasmático (Fontes *et al.*, 1991; Gething e Sambrook, 1992; Fontes *et al.*, 1996; Figueiredo *et al.*, 1997; Cascardo *et al.*, 2000). Estresses no retículo endoplasmático podem ativar a via de resposta a proteínas mal-dobradas (UPR), que é uma via de transdução de sinais que ocorre entre o retículo endoplasmático e o núcleo, ativando a expressão de diversos genes-alvos, envolvidos na manutenção da homeostase celular, por meio dos processos de translocação, glicosilação, degradação e transporte protéico (Fontes *et al.*, 1991; van Geremen *et al.*, 1997; Sidrauski *et al.*, 1998; Gonzalez *et al.*, 1999; Carolino *et al.*, 2003; Kimata *et al.*, 2003).

A proteína BiP (“Binding Protein”) constitui o chaperone molecular mais bem caracterizado do retículo endoplasmático, sendo que seu ortólogo da soja foi isolado e caracterizado pela equipe do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas – Bioagro/UFV (Fontes *et al.*, 1996; 1999; Figueiredo *et al.*, 1997; Alvim *et al.*, 2001; Cascardo *et al.*, 2000; 2001). Como chaperone molecular da classe HSP-70, a proteína BiP tem sido descrita como um importante mediador de translocação, dobramento, montagem e transporte de proteínas recém-sintetizadas no lúmen do retículo endoplasmático (Vitale *et al.*, 1993; Hartl, 1996).

Em plantas, a expressão de BiP é induzida em resposta a uma variedade de estresses bióticos e abióticos, como estresse hídrico, infestação por fungo, estresse nutricional, aclimatação ao frio e elicitores da resposta planta/patógeno (Denecke *et al.*,

1995; Kalinsky *et al.*, 1995; Figueiredo *et al.*, 1997; Cascardo *et al.*, 2001). Assim sendo, a proteína BiP parece ter uma função protetora geral contra uma diversidade de estresses impostos pelas condições adversas do ambiente. Apesar disso, a regulação da expressão dos genes BiP de plantas é extremamente complexa, existindo múltiplos mecanismos reguladores de controle da expressão de BiP de plantas (Cascardo *et al.*, 2000; 2001; Carolino *et al.*, 2003).

Recentemente, dois clones genômicos de soja (*gsBiP6* e *gsBiP9*) foram isolados e caracterizados, sendo que análises de deleções do promotor de *gsBiP6*, usando seqüências 5' fusionadas ao gene repórter β -glucuronidase (*GUS*), permitiram a identificação de dois domínios *cis*-regulatórios funcionais, que são importantes para a regulação espacial da expressão de BiP sob condições normais de desenvolvimento da planta (Buzeli *et al.*, 2002). Apesar disso, ainda não foram identificados os *cis*-elementos regulatórios, que conferem indutibilidade no promotor de BiP de plantas em resposta ao acúmulo de proteínas mal-dobradas no retículo endoplasmático, e diversas outras condições de estresses fisiológicos.

Nessa investigação, procedeu-se a uma análise do padrão de expressão do promotor do clone *gsBiP6* em plantas transgênicas de tabaco, sob diferentes condições de estresses abióticos. Além disso, a atividade do promotor do clone *gsBiP9* foi ensaiada em diferentes tecidos de tabaco transgênico, sob diferentes condições de estresses abióticos. Para isso, deleções em série no sentido 5' destes promotores foram obtidas e fusionadas ao gene repórter β -glucuronidase (*GUS*), buscando a possível identificação de *cis*-elementos regulatórios associados com a indução por estresses. Os resultados desses estudos sugerem que o controle da expressão dos genes BiP de plantas está sujeito a múltiplos e complexos mecanismos de regulação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O retículo endoplasmático como porta de entrada da rota secretora

A rota secretora é constituída pelo sistema de endomembranas, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, vesículas secretórias, membrana plasmática e compartimentos hidrolíticos (Morrè e Mollenhauer, 1974). Esses compartimentos subcelulares possuem estruturas morfológicas distintas e diferem no lúmen, quanto ao tipo de lipídios e conteúdo de proteínas, permitindo, com isso, síntese e modificação eficientes dos compostos que neles trafegam (Basshan e Raikhel, 1997). O endereçamento de proteínas secretórias para essas diferentes estruturas subcelulares requer seqüências adicionais (Bar-Peled *et al.*, 1996; Da Silva Conceição *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Jiang e Rogers, 1999; Sanderfoot e Raikhel, 1999; Vitale e Raikhel, 1999). Essa rota é o maior sítio de biossíntese, dobramento, montagem e modificação de inúmeras proteínas solúveis ou de membranas, bem como síntese e transporte de lipídios, polissacarídeos e glicoproteínas (Simons *et al.*, 1998).

O retículo endoplasmático é um dos maiores compartimentos da célula eucariótica, exibindo alta atividade de síntese de proteínas secretórias, por desempenhar o papel de passagem e distribuição de proteínas para o vacúolo (lisossomo em células animais), membrana plasmática e espaço extracelular (Morrè e Mollenhauer, 1974). Durante ou após o processo de translocação através da membrana do retículo endoplasmático, os polipeptídeos nascentes adquirem a conformação adequada para seguir a via secretora, podendo ainda, ocorrer modificações pós-traducionais, como adição de açúcares e clivagem por enzimas proteolíticas, além de outros processamentos (Helenius *et al.*, 1997; Crofts e Denecke, 1998; Drickamer e Taylor, 1998). As proteínas recém-sintetizadas, que não adquirem a

conformação adequada para a translocação, são retidas nesse compartimento e, posteriormente, direcionadas ao sistema proteolítico.

2.2. Chaperones moleculares

Os chaperones moleculares são definidos como sendo uma família de proteínas não relacionadas que têm como função facilitar o correto dobramento de outras proteínas *in vivo*, sendo requeridos para uma ampla variedade de processos fundamentais para o funcionamento normal das células, em condições normais ou sob estresses (Pelham, 1989; Ellis e van Der Vies, 1991; Martin e Hartl, 1993; Hammond e Helenius, 1995). Uma das principais características desse grupo de proteínas relaciona-se com a formação de ligações não covalentes com regiões interativas de outras proteínas, de modo a evitar que associações não produtivas e agregados protéicos sejam formados (Ellis *et al.*, 1989; Pelham, 1989; Rothman, 1989; Gething e Sambrook, 1992; Galili *et al.*, 1998). Dessa maneira, os chaperones moleculares se associam e estabilizam uma conformação instável e, através de ciclos controlados de ligação e desligamento com o peptídeo nascente, facilitam o correto dobramento *in vivo* dessas proteínas (Knittler e Haas, 1992; Tatu e Helenius, 1997).

A maioria dos chaperones moleculares pertence à classe das proteínas denominadas “Heat Shock Protein” (HSP). Em particular, existe uma extensa família de proteínas dessa classe, conhecidas como HSP-70, que participa de diversos processos celulares, incluindo dobramento de proteínas recém-sintetizadas, tráfego intracelular de proteínas e proteção durante estresses (McKay, 1993; Höhfeld *et al.*, 2001). As proteínas dessa família compartilham uma alta conservação na sua estrutura primária, exercendo várias funções como chaperone molecular e, além disso, são formadas por dois domínios funcionais: o domínio aminoterminal, altamente conservado, de ligação à ATP e baixo “turnover”; e o

domínio carboxiterminal, de ligação ao substrato (Kassenbrock e Kelly, 1989; Milarski e Morimoto, 1989).

As proteínas que pertencem à família de choque térmico (HSP) estão presentes em todas as organelas das células eucarióticas. Aquelas, residentes no retículo endoplasmático, podem ter a síntese induzida por exposição ao frio, calor, estresse hídrico, ataque de patógenos, ou, potencialmente, por qualquer tratamento que possa perturbar o dobramento de proteínas no lúmen dessa organela (Cabane *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1994; Kalinski *et al.*, 1995).

2.3. BiP (“Binding Protein”)

A proteína BiP (Binding Protein) pertence à família de proteínas não relacionadas, conhecidas como chaperones moleculares da classe HSP-70. BiP é o chaperone molecular mais bem caracterizado do retículo endoplasmático e tem como principal função, auxiliar o correto dobramento de proteínas nascentes através da formação de ligações não covalentes com regiões interativas dessas proteínas, de modo a evitar associações não produtivas e agregados protéicos que irão prejudicar o correto funcionamento da célula (Chrispeels, 1991; Fontes *et al.*, 1991; 1996; Figueiredo *et al.*, 1997; Cascardo *et al.*, 2000; 2001; Alvim *et al.*, 2001; Carolino *et al.*, 2003; Kimata *et al.*, 2003).

Apesar de sua homologia com outras proteínas da classe HSP-70, existem algumas diferenças na estrutura primária que são biologicamente relevantes. BiP possui um peptídeo sinal na extremidade aminoterminal, que é responsável por seu endereçamento para o retículo endoplasmático. Além disso, BiP possui uma sequência de quatro resíduos de aminoácidos na sua extremidade carboxiterminal, que constitui o sinal de retenção da proteína nessa organela (Pelham, 1989; 1990; Denecke *et al.*, 1992; Townsley *et al.*, 1994).

Dessa forma, BiP acompanha o fluxo secretório junto com as demais proteínas que estão endereçadas a outras organelas ou que serão secretadas. Não obstante, um receptor localizado nas cisternas de transição retículo endoplasmático-Golgi, captura BiP, reciclando a proteína do compartimento *cis*-Golgi para o retículo endoplasmático (Lewis *et al.*, 1990; Semenza *et al.*, 1990; Hsu *et al.*, 1992; Elmendorf e Haldar, 1993; Lee *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 1993).

A remoção do tetrapeptídeo de retenção no retículo endoplasmático de BiP, localizado na sua extremidade carboxiterminal, faz com que a proteína seja secretada normalmente (Munro e Pelham, 1987). Em mamíferos, esse tetrapeptídeo de retenção é KDEL, enquanto em leveduras e plantas é HDEL (Munro e Pelham, 1987; Pelham, 1989; Boston *et al.*, 1991; Denecke *et al.*, 1991; 1992; Fontes *et al.*, 1991).

Assim como outros chaperones moleculares, a proteína BiP está envolvida na translocação de proteínas nascentes para o lúmen do retículo endoplasmático (Vogel *et al.*, 1990; Sanders *et al.*, 1992; Brodsky *et al.*, 1993; Gilmore, 1993; Vitale *et al.*, 1993), dobramento correto de proteínas (Gething *et al.*, 1986; Munro e Pelham, 1986; Pelham 1988; Cheng *et al.*, 1989; Goloubinoff *et al.*, 1989), montagem de proteínas oligoméricas (Bole *et al.*, 1986; Hendershot *et al.*, 1987; Knittler e Haas, 1992), retenção no retículo endoplasmático de proteínas mal-dobradas (Bole *et al.*, 1986; Dorner *et al.*, 1987; 1988; Kassenbrock *et al.*, 1988), auxiliando também, a solubilização de agregados protéicos durante estresses (Munro e Pelham, 1986; Horwich *et al.*, 1993). Além disso, a proteína BiP está envolvida na etiquetagem de proteínas que serão degradadas (Dorner *et al.*, 1987; Kassenbrock *et al.*, 1988; Lodish, 1988; Hurtley *et al.*, 1989) e no “controle de qualidade”, restringindo o transporte intracelular, de modo a permitir que apenas aquelas proteínas montadas e dobradas corretamente prossigam na rota secretora (Hurtley *et al.*, 1989).

Uma célula submetida a condições normais de crescimento apresenta uma expressão de BiP constitutivamente baixa. Apesar disso, uma série de estresses fisiológicos induz a síntese de BiP (Lee, 1987). Recentemente, foram descobertos novos mecanismos de indução da expressão de BiP em resposta a estresses bióticos e abióticos, sugerindo que existem, além da via de resposta a proteínas mal-dobradas (UPR), outras rotas que controlam a expressão de BiP em plantas (Jelito-van Dooren *et al.*, 1999; Cascardo *et al.*, 2000).

2.4. Via de resposta a proteínas mal-dobradas (Unfolded Protein Response – UPR) no retículo endoplasmático

A via de resposta a proteínas mal-dobradas (UPR) é uma via de sinalização que comunica o retículo endoplasmático com o núcleo, ativando a expressão de diversos genes-alvo envolvidos na manutenção da homeostase celular, por meio dos processos de translocação, glicosilação, degradação e transporte protéico (Lee, 1992; Kimata *et al.*, 2003). Essa via de sinalização é induzida após o acúmulo de proteínas mal-dobradas dentro do retículo endoplasmático (Boston *et al.*, 1996; Denecke, 1996; Gething, 1999), resultando no aumento da transcrição de genes que codificam proteínas residentes nessa organela, tais como a proteína BiP (Shamu *et al.*, 1994; Sidrauski *et al.*, 1996; 1998; Figueiredo *et al.*, 1997; van Geremen *et al.*, 1997; Foti *et al.*, 1999; Saloheimo *et al.*, 1999).

Os genes que respondem a UPR têm em comum, em seus promotores, o elemento de resposta a proteínas mal-dobradas (Unfolded Protein Response Element - UPRE). Esse elemento de resposta é necessário e suficiente para ativar a transcrição de genes que respondem a esta rota (Kohnno *et al.*, 1993). Apesar da rota UPR ser conservada para todas as células eucarióticas, sua transdução de sinal é melhor compreendida em leveduras (Shamu *et al.*, 1994; Shamu e Walter, 1996; Sidrauski *et al.*, 1996; Sidrauski e Walter, 1997; Welihinda

et al., 1997; Sidrauski *et al.*, 1998; Gonzalez *et al.*, 1999) e em mamíferos (Brewer *et al.*, 1997; 1999; Yoshida *et al.*, 1997; Foti *et al.*, 1999).

A ativação da rota UPR em leveduras, mamíferos, plantas e fungos pode ser realizada pela prevenção da glicosilação de proteínas secretórias, utilizando-se, por exemplo, o antibiótico tunicamicina (Fontes *et al.*, 1991; Figueiredo *et al.*, 1997; Kimata *et al.*, 2003). Dessa forma, a superexpressão de genes envolvidos no auxílio do dobramento ou modificação pós-traducional de proteínas dentro do retículo endoplasmático, tais como BiP, consegue aliviar o estresse no retículo endoplasmático (Koizumi *et al.*, 1999; Leborgne-Castel *et al.*, 1999; Alvim *et al.*, 2001).

2.5. Controle de qualidade da célula

As proteínas secretórias que não alcançam uma estrutura tridimensional biologicamente funcional são retidas no retículo endoplasmático e, posteriormente, endereçadas para a maquinaria de proteólise no citossol. A proteína BiP participa diretamente desse mecanismo de controle de qualidade da célula, associando-se com proteínas mal-dobradas para endereçá-las à rota de degradação no citoplasma, após sua prolongada retenção no retículo endoplasmático (Brodsky *et al.*, 1999; Horwich *et al.*, 1999). Esse processo é conhecido como degradação de proteína mal-dobrada associada ao retículo endoplasmático (ERAD) e exerce papel fundamental no controle de qualidade, degradando seletivamente proteínas que não conseguiram dobrar-se corretamente (Brodsky *et al.*, 1999; DiCola *et al.*, 2001).

2.6. Organização e regulação da expressão dos genes BiP

Em seres humanos, leveduras e algumas espécies vegetais, BiP está presente como cópia única (Anderson *et al.*, 1994; Ting e Lee, 1988; Normington *et al.*, 1989). Por outro lado, em fumo, *Arabidopsis* e soja, BiP pertence a uma pequena família gênica, que responde diferentemente a estresses abióticos (Denecke *et al.*, 1991; Kalinski *et al.*, 1995; Figueiredo *et al.*, 1997). Em soja, BiP é codificado por uma família multigênica, cujos membros isolados apresentam expressão e regulação diferencial, sendo denominados de *soyBiP A*, *soyBiP B*, *soyBiP C* e *soyBiP D* (Figueiredo *et al.*, 1997; Cascardo *et al.*, 2001).

Promotores de BiP, em várias espécies, demonstraram a existência de múltiplos elementos de controle, alguns dos quais redundantes, apresentando geralmente dois “TATA box” e de dois a cinco “CAAT box”. O gene BiP de humano possui uma seqüência, na sua região promotora, capaz de responder ao acúmulo de proteínas anormais no retículo endoplasmático, induzindo a transcrição (Resendez *et al.*, 1988). Ensaios de expressão transiente demonstraram que a seqüência -129 a -90 (40 pb) do gene BiP de rato, quando ligada em *cis* à seqüência codificadora do gene repórter CAT (cloranfenicol acetil-transferase), confere indutibilidade a promotores constitutivos em resposta ao acúmulo de proteínas anormais no retículo endoplasmático. O mapeamento preciso dessa região do DNA mostrou que ela possui múltiplos elementos de controle (Resendez *et al.*, 1988).

Comparações de elementos que respondem a estresses no retículo endoplasmático (ERSE) de vários organismos revelaram a presença da seqüência consenso CCAATN₉CCACG, que funciona como elemento *cis* atuante de resposta ao acúmulo de proteínas mal-dobradas no retículo endoplasmático (Lee, 1992; Yoshida *et al.*, 1998). Além desse *cis*-elemento, denominado ERSE-I, foi demonstrado que um segundo *cis*-elemento, designado ERSE-II, também é capaz de ativar promotores de BiP de mamíferos em resposta a estresses típicos do retículo endoplasmático (Roy e Lee, 1999; Kokame *et al.*, 2001). Em

leveduras, outros dois *cis*-elementos funcionais foram identificados no promotor de BiP. Um deles consiste em uma região rica em guanina e citosina, que é responsável pela expressão constitutiva do gene e, o outro, consiste em um elemento de resposta ao estresse térmico (HSE), presente em outras proteínas da classe HSP-70, mas ausente no gene BiP de plantas e mamíferos (Mori *et al.*, 1992; Anderson *et al.*, 1994).

Em plantas, a regulação dos genes BiP tem sido avaliada, principalmente, por meio da detecção do acúmulo de proteínas e de seu mRNA em diferentes órgãos em resposta a diferentes estresses (Vitale *et al.*, 1993). Esses experimentos têm demonstrado que a expressão de BiP de plantas é induzida tanto em resposta ao acúmulo de proteínas anormais no retículo endoplasmático, quanto ao aumento da atividade secretora da célula (Galili *et al.*, 1998).

A síntese de BiP é aumentada em mutantes de milho que sintetizam uma proteína zeína defeituosa em dobramento (Boston *et al.*, 1991; 1996; Fontes *et al.*, 1991; Coleman *et al.*, 1995; Gillinkin *et al.*, 1997). Similarmente, os tratamentos com o antibiótico tunicamicina ou com β -mercaptoetanol induzem eficientemente a síntese de BiP em células de plantas (Denecke *et al.*, 1996). A expressão de BiP de plantas também é induzida em resposta a diversas condições de estresses bióticos e abióticos, tais como estresse nutricional, ataque por insetos, infecção por fungos, estresse hídrico, baixas temperaturas e elicitores da resposta à patogênese (Anderson *et al.*, 1994; Denecke *et al.*, 1995; Kalinsky *et al.*, 1995; Fontes *et al.*, 1996; 1999; Figueiredo *et al.*, 1997; Picoli *et al.*, 2001).

Tem sido demonstrado que a expressão de BiP de plantas também é altamente regulada em condições normais de desenvolvimento da planta. Em tabaco, o mRNA de BiP acumula predominantemente em tecidos com alta atividade secretora, tais como em tecidos com alta proporção de células em processo ativo de divisão celular (Denecke *et al.*, 1991; Buzeli *et al.*, 2002; Carolino *et al.*, 2003). Em soja, os membros da família multigênica de

BiP estão sujeitos a regulação diferencial tecido-específica (Cascardo *et al.*, 2001), sendo que a expressão dos genes é regulada por eventos de desenvolvimento associados à alta atividade secretora da célula (Kalinski *et al.*, 1995; Fontes *et al.*, 1996). Utilizando-se diferentes construções de seqüências 5' do gene de *gsBiP6* ligadas transcricionalmente ao gene *GUS*, pelo menos dois domínios funcionais foram identificados (Buzeli *et al.*, 2002). O domínio *cis*-atuante 1 (CDR-1), caracterizado pela predominância quase absoluta da adenina e timina, exibe uma atividade similar à de “enhancer”, já que é capaz de restaurar altos níveis de expressão quando fusionado diretamente ao promotor mínimo de BiP, que por si só é reprimido em tabacos transgênicos. O domínio *cis*-atuante 2 (CRD-2) contém elementos regulatórios positivos e negativos que coordenam a expressão tecido-específica do promotor de *gsBiP6*. De fato, a atividade desse promotor em regiões meristemáticas de raízes, no meristema apical e no floema, está associada à presença do domínio CRD-2. Entretanto, a deleção desse domínio anulou a expressão de *GUS* nas células do floema e intensificou a atividade do gene repórter no parênquima xilemático do caule (Buzeli *et al.*, 2002). Apesar dos experimentos de deleção do promotor de *gsBiP6* permitirem a identificação de pelo menos dois domínios *cis*-regulatórios funcionais, em virtude do complexo padrão de regulação dos genes BiP em plantas, torna-se necessário um estudo mais abrangente das regiões promotoras desse gene, uma vez que muito pouco se sabe com relação à presença de elementos *cis*-atuantes funcionais nos promotores de BiP de plantas.

3. MATERIAL e MÉTODOS

3.1. Isolamento da região promotora do clone *gsBiP9* e obtenção das deleções na sua extremidade 5'

A região promotora do gene *gsBiP9* (Buzeli *et al.*, 2002) foi amplificada, via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando os oligonucleotídeos específicos T3 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3' (que anela em seqüências do vetor pUC118, incorporando o sítio *EcoRI* na extremidade 5' do fragmento amplificado) e o BiP9Ps9PR 5'-CTCTCACACCTGCAGACACACTTTG-3', (que origina o sítio de *PstI*, sublinhado, na posição +22 relativa ao sítio de início de transcrição de *gsBiP9*), conforme descrito na Tabela 1. Assim, o fragmento amplificado de 2209 pb que corresponde à região promotora com todos os seus elementos conservados, foi digerido com as enzimas *EcoRI/PstI* e clonado no vetor de transformação de plantas pCAMBIA 1381-Z, previamente preparado de acordo com as técnicas-padrão de clonagem em plasmídeos (Sambrook *et al.*, 1989), sendo, posteriormente, transferido para *Agrobacterium tumefaciens* estirpe LBA-4404, para obtenção de plantas transgênicas de tabaco (Pedra *et al.*, 2000; Alvim *et al.*, 2001). O clone resultante pUFV329 contém a região promotora de *gsBiP9* fusionada ao gene repórter *GUS*.

De posse do seqüenciamento completo da região promotora do clone *gsBiP9* e a localização dos seus elementos conservados característicos dos promotores gerais de plantas (www.genome.ad.jp/sit/sit.html), quatro deleções na sua extremidade 5' foram realizadas. Para isso, o DNA do clone pUFV329 foi amplificado via PCR, utilizando-se quatro conjuntos diferentes de oligonucleotídeos específicos. O primeiro conjunto de oligonucleotídeos BiP9P186F e BiP9Ps9PR gerou um fragmento de 186 pb contendo apenas as seqüências "CAAT box" e "TATA box" que foi transferido para pCAMBIA 1381-Z originando o clone pUFV384, e, posteriormente, transferido para *Agrobacterium tumefaciens*

LBA 4404, originando o clone pUFV391. O segundo conjunto de oligonucleotídeos BiP9P296F e BiP9Ps9PR gerou um fragmento de 296 pb contendo as seqüências “CAAT box” e “TATA box”, três dos elementos que respondem a estresse no retículo endoplasmático do tipo I (ERSE-I) e o único elemento que responde a estresse no retículo endoplasmático do tipo II (ERSE-II), que foi transferido para pCAMBIA 1381-Z originando o clone pUFV351, e, posteriormente, transferido para *A. tumefaciens* LBA 4404, originando o clone pUFV392. O terceiro conjunto de oligonucleotídeos BiP9P670F e BiP9Ps9PR gerou um fragmento de 670 pb contendo as seqüências “CAAT box” e “TATA box”, todos os quatro elementos que respondem a estresse no retículo endoplasmático do tipo I (ERSE-I) e o único elemento que responde a estresse no retículo endoplasmático do tipo II (ERSE-II), que foi transferido para pCAMBIA 1381-Z originando o clone pUFV557, e, posteriormente, transferido para *A. tumefaciens* LBA 4404, originando o clone pUFV595. Finalmente, o quarto conjunto de oligonucleotídeos BiP9P1090F e BiP9Ps9PR gerou um fragmento de 1090 pb contendo as seqüências “CAAT box” e “TATA box”, todos os quatro elementos que respondem a estresse no retículo endoplasmático do tipo I (ERSE-I), o único elemento que responde a estresse no retículo endoplasmático do tipo II (ERSE-II) e uma seqüência rica em adenina e timina, que foi transferido para pCAMBIA 1381-Z originando o clone pUFV559, e, posteriormente, transferido para *A. tumefaciens* LBA 4404, originando o clone pUFV597.

Os demais clones descritos na Tabela 1 correspondem a deleções do promotor de *gsBiP6* e já foram descritos previamente (Buzeli *et al.*, 2002).

Tabela 1: Descrição dos clones e sub- clones de *gsBiP6* e *gsBiP9*

	Clone	Descrição	Tamanho (pb)	Vetor	Célula Hospedeira	Clone Genômico	Iniciador	Sítio gerado
1	pUFV321	Fragmento <i>EcoRI/PstI</i>	2209	pCAMBIA1381Z	JM-109	<i>gsBiP9</i>	BiP9Ps9PR/ T3	<i>EcoRI/</i> <i>PstI</i>
2	pUFV329	Fragmento <i>EcoRI/PstI</i>	2209	pCAMBIA1381Z	LBA-4404	<i>gsBiP9</i>	-----	-----
3	pUFV379	Fragmento <i>HindIII/PstI</i>	186	PBSIIKS+	JM-109	<i>gsBiP9</i>	BiP9Ps9PR/ BiP9P186F	<i>HindIII/</i> <i>PstI</i>
4	pUFV384	Fragmento <i>Sall/PstI</i>	186	pCAMBIA1381Z	JM-109	<i>gsBiP9</i>	-----	-----
5	pUFV391	Fragmento <i>Sall/PstI</i>	186	pCAMBIA1381Z	LBA-4404	<i>gsBiP9</i>	-----	-----
6	pUFV351	Fragmento <i>BamHI/PstI</i>	296	pCAMBIA1381Z	JM-109	<i>gsBiP9</i>	BiP9Ps9PR/ BiP9P296F	<i>BamHI/</i> <i>PstI</i>
7	pUFV392	Fragmento <i>BamHI/PstI</i>	296	pCAMBIA1381Z	LBA-4404	<i>gsBiP9</i>	-----	-----
8	pUFV557	Fragmento <i>BamHI/PstI</i>	670	pCAMBIA1381Z	DH-5	<i>gsBiP9</i>	BiP9Ps9PR/ BiP9P670F	<i>BamHI/</i> <i>PstI</i>
9	pUFV595	Fragmento <i>BamHI/PstI</i>	670	pCAMBIA1381Z	LBA-4404	<i>gsBiP9</i>	-----	-----
10	pUFV559	Fragmento <i>EcoRI/PstI</i>	1090	pCAMBIA1381Z	DH-5	<i>gsBiP9</i>	BiP9Ps9PR/ BiP9P1090F	<i>EcoRI/</i> <i>PstI</i>
11	pUFV597	Fragmento <i>EcoRI/PstI</i>	1090	pCAMBIA1381Z	LBA-4404	<i>gsBiP9</i>	-----	-----
12	pUFV228	Fragmento <i>Sall/EcoRI</i>	397	pCAMBIA1381Z	JM-109	<i>gsBiP6</i>	6BiPS60PR/ M13F	<i>Sall/</i> <i>EcoRI</i>
13	pUFV287	Fragmento <i>Sall/EcoRI</i>	397	pCAMBIA1381Z	LBA-4404	<i>gsBiP6</i>	-----	-----
14	pUFV301	Fragmento <i>Sall/EcoRI</i>	260	pCAMBIA1381Z	JM-109	<i>gsBiP6</i>	-----	<i>Sall/</i> <i>EcoRI</i>
15	pUFV306	Fragmento <i>Sall/EcoRI</i>	260	pCAMBIA1381Z	LBA-4404	<i>gsBiP6</i>	-----	-----
16	pUFV302	Fragmento <i>Sall/BamHI</i>	138	pUC118	JM-109	<i>gsBiP6</i>	6BiPB12099F/ M13R	<i>Sall/</i> <i>BamHI</i>
17	pUFV305	Fragmento <i>Sall/BamHI</i>	138	pCAMBIA1381Z	JM-109	<i>gsBiP6</i>	-----	-----
18	pUFV307	Fragmento <i>Sall/BamHI</i>	138	pCAMBIA1381Z	LBA-4404	<i>gsBiP6</i>	-----	-----
19	pUFV330	-----	-----	pCAMBIA1381Z	LBA-4404	-----	-----	-----

3.2. Obtenção de células competentes de *Agrobacterium* sp.

Agrobacterium tumefaciens, estirpe LBA 4404, foi plaqueada em meio Rhizo [(extrato de levedura 0,5 % (p/v), caseína 0,05 % (p/v), manitol 0,8 % (p/v), sulfato de amônio 0,2 % (p/v), cloreto de sódio 0,5 % (p/v), pH 6,6)] (Tepfer e Casse-Delbart, 1987), contendo 100 µg/L de estreptomicina e colocada em câmara incubadora de crescimento a 28 °C por cerca de 12 a 16 horas. Após esse período de crescimento, uma colônia isolada foi utilizada como inóculo em 50 mL de meio Rhizo seletivo, e incubado a 28 °C, sob agitação durante 12 horas. Em seguida, a solução foi centrifugada a 16.000 x g por 10 minutos a 4 °C. As células precipitadas foram lavadas quatro vezes em igual volume com água Milli-Q autoclavada, ressuspensas em 2,0 mL de meio GYT [glicerol 10 % (v/v), extrato de levedura 0,125 % (p/v), triptona 0,25 % (p/v)] e estocadas a -80 °C.

3.3. Eletroporação de *Agrobacterium* sp.

As construções de DNA, contendo o fragmento do promotor inteiro e suas sucessivas deleções fusionadas ao gene repórter *GUS* no vetor pCAMBIA 1381-Z, foram utilizadas para eletroporação de *Agrobacterium* sp. para posterior transformação de plantas, mediada por *A. tumefaciens*. Para isso, 1,0 µL da diluição 1:5 do DNA mini-prep (com aproximadamente 100 ng de DNA) de cada clone foi adicionada a 40 µL de células competentes de *A. tumefaciens* estirpe LBA-4404 e eletroporados em cuvetas de 2,0 mm a 2500 volts, por cerca de 4 a 5 mili-segundos, utilizando-se o eletroporador "Gene Pulser II" (BIO-RAD). Em seguida, foi adicionado cuidadosamente à cuveta, 1,0 mL de meio Rhizo sem antibiótico [extrato de levedura 0,5 % (p/v), caseína 0,05 % (p/v), manitol 0,8 % (p/v), sulfato de amônio 0,2 % (p/v), cloreto de sódio 0,5 % (p/v), pH 6,6]. Essa mistura foi transferida para um recipiente do tipo "ependorf", incubada por duas horas a 28 °C e,

posteriormente, concentrada em 100 µL e plaqueada em meio Rhizo seletivo contendo estreptomicina 100 mg/mL (antibiótico que atua interferindo na síntese protéica de células bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas resultando na morte celular dessas bactérias) e canamicina 50 mg/mL (gene de resistência presente no vetor de clonagem). As placas foram mantidas em câmaras de incubação a 28 °C por três dias ininterruptos; entre as colônias que se desenvolveram, uma foi selecionada para confirmação e posterior preparo do estoque de glicerol de cada clone em *Agrobacterium*. Estes clones foram utilizados para transformar tabaco, cujo diagnóstico da transformação foi feito por PCR.

3.4. Obtenção e cultivo de plantas de *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana

Após a desinfestação de sementes de *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana, por meio de imersão em solução de hipoclorito de sódio 2,0 % (v/v) durante 15 minutos, as sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri contendo o meio MS sólido [sais de MS (Murashige e Skoog, 1962) 0,43 % (p/v), inositol 0,005 % (p/v), ácido nicotínico 0,1 % (p/v), piridoxina 0,1 % (p/v), tiamina-HCl 1 % (p/v), pH 5,7]. Após a germinação, as plântulas foram transferidas individualmente para recipientes tipo “magenta” (Sigma Chemical Company, CA. EUA) contendo meio de cultura MS, acrescido de sacarose 3 % (p/v) e mantidas em câmaras de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 °C.

3.5. Transformação de *Nicotiana tabacum* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Inicialmente, a agrobactéria transformada com o clone de interesse foi crescida em 2,0 mL de meio Rhizo, contendo estreptomicina 100 mg/L (Sigma Chemical Company, CA.

EUA) e canamicina 50 mg/L (Sigma Chemical Company, CA. EUA), a 28 °C, sob agitação por um período de 36 horas. Em seguida, as soluções de *Agrobacterium* foram utilizadas para inocular 50 mL de meio Rhizo contendo os agentes seletivos descritos acima. Após um período de 16 a 24 horas de crescimento a 28 °C sob agitação, cada solução contendo as bactérias transformadas foi precipitada por centrifugação a 8.000 x g por 5 minutos a 14 °C, e, individualmente, ressuspensas em meio líquido MS, acrescido de sacarose 3 % (p/v), até a obtenção de DO₆₀₀ = 0,4 – 0,5. Explantes foliares (discos foliares ou qualquer tecido com potencial de regeneração) de *N. tabacum* L. cv. Havana, foram incubados sob agitação com as agrobactérias transformadas, por 15 minutos. Após esse período, os explantes foram separados, lavados com água Milli-Q autoclavada e secos com o auxílio de papel de filtro estéril. Os explantes foram distribuídos, com a parte adaxial voltada para cima, em placas de Petri contendo o meio MS sólido, onde foram co-cultivados por dois dias. Em seguida, foram transferidos para placas de Petri contendo meio MS acrescido de sacarose 3 % (p/v), suplementado com timentim (500 mg/L) (SmithKline Beecham Pharmaceuticals, EUA), higromicina (50 mg/L) (Sigma Chemical Company, CA. EUA) e benzilaminopurina (0,5 mg/L) (Sigma Chemical Company, CA. EUA). Foram mantidos nessa condição por aproximadamente quinze dias, sendo transferidos a cada duas semanas, para outras placas de Petri de maneira que a concentração de timentim após quarenta e cinco dias fosse de 300 mg/L. Em todos os estádios posteriores à co-cultura, uma pressão de seleção foi mantida utilizando-se higromicina na concentração de 50 mg/L. Os tecidos transformantes e diferenciados em brotos foram transferidos para recipientes do tipo “magenta” com meio apropriado para indução de raízes. As plantas transgênicas foram mantidas *in vitro* em câmaras de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 °C. Após o desenvolvimento do sistema radicular dos regenerantes o subcultivo dos explantes foi feito em intervalos de quinze dias, possibilitando as análises histoquímicas e

fluorimétricas de *GUS* para determinação da atividade do promotor em condições normais ou sob diferentes condições de estresses.

3.6 Isolamento de DNA genômico

Aproximadamente 100 mg de folhas das plantas transgênicas foram maceradas em nitrogênio líquido. Em seguida, foram adicionados 500 µL de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 50 mM; NaCl 500 mM; β-mercaptoetanol 10 mM e SDS 1,0 %). Incubou-se a mistura 65 °C, por 10 minutos, e acrescentou-se KOAc, na concentração final de 2,0 M. Procedeu-se à centrifugação, por 10 minutos, a 16000 x g, a 4 °C. Removeram-se cerca de 450 µL do sobrenadante, que foi novamente centrifugado. Os ácidos nucleicos foram precipitados do sobrenadante com isopropanol gelado 50 % (v/v), lavados com etanol 70 % (v/v), secos a vácuo por 20 minutos e ressuspensos em 100 µl de água Milli-Q autoclavada, contendo RNase 100 mg/L.

3.7 Reações de PCR

O DNA total isolado das plantas transgênicas foi usado como molde para Taq polimerase em reações de PCR, usando-se dois oligonucleotídeos específicos do gene *hpt-II*. Os oligonucleotídeos utilizados foram HPT-F (5'-GCTTCTGCGGGCGATTTGTGTACG-3') e HPT-R (5'-TCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGG-3'). Na reação, foram adicionados 0,4 µM de cada oligonucleotídeo, MgCl₂ 2,0 mM, Tris-HCl 2,0 mM pH 8,4, KCl 50 mM, dNTP 100 µM, 10 ηg do DNA genômico e 1 U de Taq polimerase. As condições de reação utilizadas foram: 94 °C por 180 segundos, seguido de 40 ciclos (94 °C

por 45 segundos; 55 °C por 90 segundos; 72 °C por 90 segundos), finalizando com 72 °C por 420 segundos.

3.8 Eletroforese de DNA em gel de agarose

As amostras de DNA genômico, bem como os produtos da reação de PCR, foram analisados por meio de corrida eletroforética (100 Volts) em gel de agarose 1 %, contendo brometo de etídio 0,001 %, e visualizados no sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA).

3.9 Indução de estresses abióticos em discos foliares

Para verificar a indução da síntese de BiP de plantas em resposta ao acúmulo de proteínas anormais no retículo endoplasmático ou frente ao aumento da atividade secretora da célula, discos foliares de tabaco (com diâmetro de 10 mm), foram retirados de plantas transformadas e não-transformadas e incubados, logo em seguida, sob leve agitação (100 rpm), em 20 mL de meio MS₀ líquido (Murashide e Skoog, 1962), suplementado com diferentes agentes que simulam tais condições. Para isso, utilizamos: tunicamicina (5,0 µg/mL), que é um potente inibidor da glicosilação de proteínas por bloquear a incorporação dos dois primeiros resíduos de N-Acetilglicosamina no oligossacarídeo nascente (Lee, 1992; Cascardo *et al.*, 2000; 2001); polietilenoglicol (PEG-8000 a 10 %), foi utilizado por não penetrar nas células, não ser degradado, não causar toxidez devido ao seu alto peso molecular e simular os efeitos de um déficit hídrico da ordem de -1,4 MPa nas plantas submetidas a esta condição (Hasegawa *et al.*, 1984; Cascardo *et al.*, 2000); ácido etilenoglicol tetra-acético (EGTA a 2,0 mM), foi utilizado por ser um agente quelante dos íons Ca²⁺ e, assim, atuar aumentando a atividade da Na/K-ATPase, reduzindo a habilidade

do Na^+ inibir essa bomba e, portanto, influenciando diretamente na homeostase celular e na ligação do fator de transcrição (CBF) ao “CAAT box”, que em baixas concentrações de Ca^{2+} , é intensificada devido uma taxa de dissociação mais lenta entre os oligômeros. Durante o estresse os níveis de Ca^{2+} citossólico aumentam como um resultado da mobilização de Ca^{2+} de compartimentos intracelulares (Trewavas, 1999; Trewavas e Malho, 1998; Meldonesi e Pozzan, 1998). Também utilizamos o ácido salicílico (250 μM), por ser um agente que simula o ataque de patógenos. As plantas quando atacadas por agentes externos reagem produzindo uma série de modificações metabólicas relacionadas ao metabolismo secundário. Embora os mecanismos de indução da resistência ao ataque de patógenos ainda seja desconhecido, um dos principais sinais endógenos envolvido é o ácido salicílico agindo na cascata de transdução de sinal (Taiz e Zeiger, 2004; Bowler e Fluhr, 2000; Dangl *et al.*, 2000). Por fim, para verificar a indução da síntese de BiP frente ao aumento da atividade secretora da célula utilizamos o ácido indol acético (AIA a 50 μM), porque além de atuar no alongamento celular e no processo de divisão celular, a auxina está envolvida nas respostas ao estresse. Além disso, os promotores de BiP de plantas têm um elemento de resposta à auxina (AuxRE) que se liga a fatores de transcrição, os quais se tornam ativos na presença de auxina (Taiz e Zeiger, 2004).

Após 48 horas de incubação nos tratamentos citados, esses discos foliares foram coletados e utilizados para a extração de proteínas e análises fluorimétricas para verificação da indução da síntese de BiP, através da determinação da atividade de *GUS* (Jefferson *et al.*, 1987).

3.10. Avaliação da atividade de *GUS* em discos foliares de tabaco

Os discos foliares retirados das plantas submetidas aos tratamentos citados acima, foram macerados em nitrogênio líquido e ressuspensos em 1,0 mL do tampão de ensaio de

GUS [Tampão fosfato de sódio 100 mmol/L, pH 7,0; EDTA 10 mmol/L, pH 8,0; sarcosil 0,1 % (p/v); Triton X-100 0,1 % (v/v); β -Mercaptoetanol 10 mmol/L]. Em seguida, foram centrifugados a 18.000 x g, por 15 minutos, a 4 °C. O extrato protéico foi utilizado para análise da atividade de *GUS*.

Para determinação da atividade de *GUS* preparamos três repetições de cada amostra contendo, 25 μ L do extrato protéico, proveniente dos discos foliares e 25 μ L do tampão de ensaio de *GUS* [$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 100 mM (pH 7.0), EDTA 10 mM, sarcosil 0,1 % (w/v), Triton X-100 0,1 % (v/v)), contendo 2,0 mmol do substrato fluorescente “4-metil umbeliferil glucuronídeo”. A mistura foi incubada a 37 °C no escuro. Após 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 950 μ L de Na_2CO_3 0,2 mol/L. A atividade enzimática foi determinada com o uso do Fluorômetro DyNA Quant (Hoefer), utilizando-se MUG como padrão de calibração. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

3.11. Análises histoquímicas e microscópicas

As análises histoquímicas e microscópicas foram feitas em tecidos de folhas, caules, meristemas apicais e raízes, sendo que o material vegetal dos diferentes órgãos das plantas de tabaco foi colhido e seccionado, utilizando-se um micrótomo manual de mesa. Posteriormente, os cortes foram incubados no tampão de ensaio de *GUS* [$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 100 mM pH 7,0; $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM; $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM; Triton X-100 0,1% (v/v) e X-Gluc 1,0 mM] (McCABE *et al.*, 1988; Lacorte, 1998), por um período de 3 a 4 horas, a 37 °C, no escuro. Após o desenvolvimento da coloração azul, proveniente da atividade da enzima β -glucuronidase nos tecidos vegetais, os pigmentos foram removidos por meio de lavagens utilizando-se uma solução de 1 metanol : 3 acetona (v/v). Após sucessivas

lavagens, os tecidos clarificados foram mantidos em uma solução de 1 água : 1 glicerol (v/v), e as lâminas montadas foram fotografadas no microscópio Olympus AR 70, utilizando-se a câmera Olympus (PM-C35DX).

4. RESULTADOS

4.1 Análise de seqüência dos promotores de BiP

Embora vários promotores de BiP de mamíferos e de leveduras tenham sido descritos (Mori *et al.*, 1992; Kohno *et al.*, 1993; Foti *et al.*, 1999), pouco se sabe sobre os promotores de BiP de plantas. O seqüenciamento e análise de aproximadamente 390 pb da região promotora de *gsBiP6* de soja revelou uma série de elementos conservados característicos dos promotores gerais de plantas (Figura 1A), dentre eles, um elemento “TATA box” (mostrado em marrom), 100 % conservado com outros genes de plantas, foi localizado à posição -40 relativa ao sítio de início da transcrição (Buzeli *et al.*, 2002). Também foram localizados dois “CAAT box” na orientação invertida (ATTGG, mostrado em verde), localizados às posições -93 e -123 relativo ao sítio de início de transcrição, um elemento de resposta a auxina (mostrado em cinza) que confere inducibilidade a esse fitorregulador quando ligado a um promotor mínimo (Li *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1994), duas seqüências homólogas ao elemento ERSE-I e uma ao ERSE-II, que respondem a estresses no retículo endoplasmático (Yoshida *et al.*, 1997; Roy e Lee, 1999; Kokame *et al.*, 2001; Okada *et al.*, 2002). O primeiro ERSE-I com a seqüência 5’ GACGTGAGGGTGTCCCAAG 3’ está localizado entre as coordenadas -163 e -145 (mostrado em azul) e o segundo elemento do tipo ERSE-I possui a seqüência 5’ CCAGTTTTATTGGCCAAAC 3’, estando localizado entre as coordenadas -137 e -117. Foi observado também a presença de um outro *cis*-elemento de natureza reguladora em potencial, do tipo ERSE-II, (ATTGGNCCACG/A; Kokame *et al.*, 2001), nas coordenadas -97 a -87 em *gsBiP6*. O elemento conservado que responde a estresses no retículo endoplasmático (ERSE) foi identificado em genes BiP de vários organismos, entre eles, mamíferos, plantas, fungos e insetos, e apresenta a seqüência consenso 5’ CCAATN₉CCACG 3’. Em alguns organismos, este elemento apresenta-se

repetido na região promotora do gene BiP, podendo apresentar até quatro cópias, que possivelmente são resultados da duplicação durante a evolução (Yoshida *et al.*, 1998).

O seqüenciamento e análise do clone *gsBiP9* confirmaram sua identidade e revelaram que ele apresenta 5.146 pb, sendo que sua região promotora possui 2.209 pb e contém seqüências conservadas características de promotores gerais de plantas (Figura 1B), como as seqüências dos elementos “TATA box” e “CAAT box”, além das seqüências consenso específicas de genes da classe HSP-70. O elemento “TATA box” (mostrado em marrom) está localizado a 22 pb do sítio de início da transcrição e o elemento “CAAT box” (mostrado em verde), a 73 pb do sítio de início da transcrição. Observa-se a presença da seqüência homóloga ao elemento que responde a estresses no retículo endoplasmático, do tipo II, ERSE-II, coordenadas -185 a -175 (sublinhado na figura 1) e do tipo I, ERSE-I, repetida quatro vezes (mostrado em azul escuro). O primeiro ERSE, tipo I, aqui denominado ERSE-I.I, com a seqüência 5’ CCACTGCCACATAGGAGTC 3’, está localizado às coordenadas -552 e -534; o segundo ERSE-I.II com a seqüência 5’ CCCTTGATAAGTT GAGGTC 3’, às coordenadas -280 e -262; o terceiro ERSE-I.III com a seqüência 5’ GCCATTGGTTGGAACAAGC 3’, às coordenadas -219 e -201 e, finalmente, o ERSE-I.IV com a seqüência 5’ GCATTTCATTGGTCCACG 3’ às coordenadas -193 e -175. Além desses elementos, existem dois elementos com certo nível de homologia com G-box (CAGGTG), coordenadas -180 e -170; -245 e -239, e seus CE (coupling element), coordenadas -155 e -147; -275 e -270; -306 e -301. Os elementos G-box são encontrados em diversos genes induzidos por estímulos do meio ambiente e, freqüentemente, necessitam de elementos acopladores, denominados CE, para sua ativação transcricional em respostas aos estímulos fisiológicos e do meio ambiente (Giuliano *et al.*, 1988).

A)

-2161 **gaattc**ggtaatatatatatatatatatatatatatatatatatanatatatatat
-2091 atatanatgtttntatagtatatataatgagaataaatnactttttatttattaacanatttata
-2021 naatgttganggataaaaataatTTTTTaaataatttatatagnagatcatntnttttagtnctcant
-1951 tcaaantanatnntaataaaaaananatanantatcgatatagatacngaagttaagcttaactttt
-1881 ttttaattccttaaattagttaatgattttttgtccctaaaaaattatgtttttattagtcctcgcgaa
-1811 tttttgaaaaattaatTTTaatatttcttattttttgttaataatgtcacaatttataaggtttaaaatt
-1741 atcataaattatttttaataatTTTTTaaaaaaatgggtgattgaaaaccaccagtaagtgtaaaactat
-1671 taatacaacgaactaaattaaaagcagttttttaaaattcggagagattaataaaaaatatatttttaatt
-1601 aatatatgatataataataatggatagacactggtaagatattaatgaaattttaaatacaata
-1531 caataatTTTctatttattgatatttaataaatttttattactttttgaaatcatttagtacttaagataa
-1431 tataaattaaaaacattTTTTTaatTTTTTatcataattttgaattaaaaaaacgcggactccttttc
-1391 tagattgcatcctccttcaattgataaattatagatatagagaattgtaaaaatgattcTTTTTaaaaaa
-1321 atcaacatcctgataaaggaacaaccaatttttatngtaattcaattacatttgaacantattttatt
-1251 tatgaaaataacttcttattgcatTTtagtttggtttataaattTTTaaattaaaataaaatccattttata
-1181 atgtcattattgtcctaaataattttaaTTTtacgagaattaaataaaaataaagtgtTTTTTTTaaatata
-1111 aatagtcataatgagaattTGGTaa**gaaTTC**tacataatGGGaaataaatatgattTTTTTTattaatataa
-1041 attaatagcattttgatagaaaaaatatattTTTTTaaattaatttatataaataaaaaatattaat
-971 tatcagttcaaattaaaataatgataaaaaataaaaatagattattaatcaatggtgatgaaattttaa
-901 taaataatataattattTTTTTatttTgtcaaatgtaatcaattaaattttactTTTTTgaataattagtact
-831 taaagataatattaattaaaaaacattatcTTTTTaatgcaatataatgatataaacattattaaggtt
-761 taaattgtcattttggTTTTTccataattTTTTTaaatttatgattttaattttctggattttaattataa
-691 catttgattTTTTTctaattttataaatGGAT**CC**tattGGTccttcttaTTaagttaattataaaattaacaa
-621 aaattattaattattaaaaaaattaataaattcaatatttctccataatattgtattttgtttcacttc
-551 **cactgccacataggagtc**caccaatagtaacaatatattaggattaataattTTTTTattaatattttaat
-481 tattaataaattttattttaacttataattaaattaaatatttataatcataattattaataaatt
-411 tactgaggatcaaaaatctcaatttataaaaactaaaaataaaaaattttaaatttagaagcaacaagat
-341 tataatttagcatatgataaaaataatataatgatgataagaaagag**gatcc**tagatgattg**cccttgata**
-271 **agttgaggtc**gtaaagatggacggcacaggtgttccaacactagaacgaat**gccattggttgaacaag**
-201 caaaaggc**gcatttccattggtccacg**tcatcatttagtgacatggt**cgagcgtcaagcctt**caaattcag
-131 gaattgaccaggtttgggcaactacataaaagcctctcgctcctcgt**gcaatttcaaaatt**acattacac
-61 tctcttcgacctcgcatcgaccttcaact**ttaacctatt**ccacttgaatcgtaaagcctt**T**gctagaag
+71 aagaga**caaagtgtgtctgCAG**gtgtgagagagagagca**ATG**gctggctcgtgggcacgccc

B)

-350 tagagtacattttaaagattatcagtgTTTTTaaataaatttatattataattttaaattttttataataa
-281 aatttaattgtaatttgatttatataatttattattatataataatttcatttgattaaattaaca**ca**
-211 **tatg**tttgactaaaatcctagttttgaataaatgaagcaaagaatga**gacgtgaggtgtcccc**caagcaaa
-141 aagga**ccagttttattggc**caaacatgctttctcaaccttag**attgg**tccacatcagc**catatg**acaa
-71 tgctcgtacttgcaagtgagcact**tataaat**ggcgaagtccccgccgtgaaactcaatagaaacctacaa
-1 **T**catcgtccatcgagaaaaggaagaaaaagaaacaaggtgacatcat**ATG**gcttgctcgttttctcgc
+70 gg

Figura 1: Sequência de nucleotídeos dos promotores de *gsBiP9* e *gsBiP6*. As regiões promotoras de *gsBiP9* (A) e *gsBiP6* (B) estão representadas, sendo identificado o sítio +1 da transcrição que está localizado a 47 bases do códon de iniciação, representado pela base

timina em rosa, em ambos promotores. Em vermelho, estão os sítios das enzimas de restrição que foram utilizadas na estratégia de clonagem, sendo que, os sítios de restrição criados por mutação dirigida *in situ* estão evidenciados em letras maiúsculas e, os oligonucleotídeos utilizados, em caixas. Em verde e marrom, estão as seqüências consenso CAAT e TATA, respectivamente. Os elementos que respondem a proteínas mal-dobradas, do tipo I, estão representados em azul escuro e os do tipo II, estão sublinhados em *gsBiP9* e em *gsBiP6*. Em cinza, está representado o elemento que responde a auxina (AuxRE) em ambos promotores.

Uma análise comparativa entre os promotores de *gsBiP6* e *gsBiP9* está apresentada na Figura 2. Diversas seqüências conservadas (93 – 100 % de identidade) que sobrepõem-se aos elementos reguladores em potencial descritos acima foram identificadas pelo alinhamento de seqüências 5' flanqueadoras dos dois promotores (circundadas pelos quadrados). As características conservadas dos promotores de BiP incluem regiões rica em adenina e timina (em negrito) e duas seqüências CAAT (separadas por 30 bp) na orientação reversa.

```

gsBiP9  ATTTTAATTATTAATAAATTTTATTTAACTTATAATTAATTAATATCTTTAATA-ATCATAATTATTAATTAATAA-TTTA
gsBiP6  -----TAGAGTACATTTAAAAGATTATCAGTGTTTAAAAATAAAATTTA

gsBiP9  C-TGAGGATCAAAAATCTCAATTTATAAACTAAAAATAAAA-ATTTAAAAATTTAGAAGCAACAAGATTATAATTTAGCA
gsBiP6  TATTATAATTTAAATTTTATAAATAAAATTTAATTGTAATTTGATTTATATATTTA-----TTATTATATATAAATTT-CA

gsBiP9  TATG-ATAAAATATAATATATGATGATAAGAAGAGGATCCTAGATGATTGCCCTTGATAAGTTGAGGTCGTAAAGATGGACG
gsBiP6  TTTGTATTAAATTAACACAT-ATG-TTTGACTAAAATCCTAGTT-----TTGAATAAATGAAG----CAAAGAATGAGA

gsBiP9  GCACAGGTGTCCCAA-CACTAGAACGAATGCCATTGGTTGGAACAAGCAAAGGCGCATTTCCATTGGTCCACGTCATCAT
gsBiP6  CGTGAGGTGTCCCAAGCAAAGGACCAGTTTATTGGCCAGAACAATGCTTTCTCAACCTTAGATTGGTCCACATCAGCAC

gsBiP9  TAGTTGACATGTTCCGAGCGT-CAAAGCTTCAAATTCAGGAATTGA---CCAGGTTTGGGCACTACATAAAAGCCTCTCGCTCC
gsBiP6  ATATGACATGCTCCGTACTTGCGAAGTGAGCACTATAAATGGCGAAGTCCCCGCGTGAAACTCAATAGAAACCTA-CAATTC

gsBiP9  CTCGTGCAATTTCAAATACATTACACTCTCTTCGACCTCGCATCGACCTTCAACTTAACCTATTCCACTTGTAAATCGTA
gsBiP6  ATCGTCCATC-----

gsBiP9  AACGCTTTGCTAGAGAAGAGACAAAGTGTGTGTGTGTGTGAGAGAGAGAGCA--ATG
gsBiP6  -----GA-GAAAAG-GAA-GAAAAGAAA-----CAAGGTGACATCATCATG

```

Figura 2: Análise comparativa entre os promotores *gsBiP6* e *gsBiP9*. As seqüências conservadas (93 – 100 % de identidade) são mostradas circundadas pelos quadrados. A região rica em AT está indicada em negrito e o elemento TATA está sublinhado em negrito, bem como o sítio +1.

4.2 Os genes quiméricos *gsBiP6:GUS* e *gsBiP9:GUS*

Para analisar o padrão de expressão dos promotores de *gsBiP6* e *gsBiP9* e identificar seqüências específicas responsáveis pelo controle da expressão dos genes BiP nos diferentes órgãos sob condições normais e de estresses, várias extensões dos promotores de *gsBiP6* e *gsBiP9* foram fusionadas a *GUS* no vetor de expressão em plantas, pCAMBIA1381-Z (Figuras 3, 4 e 5).

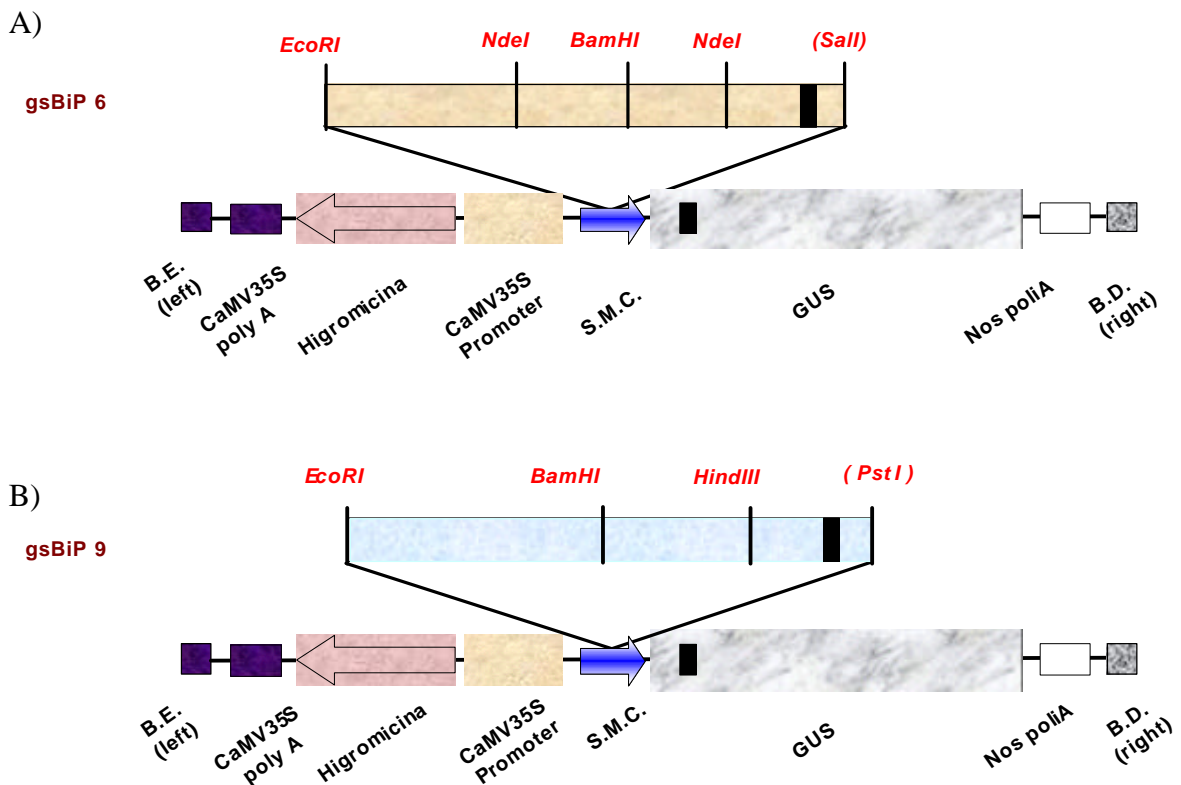


Figura 3: Esquema de clonagem do promotor de *gsBiP6* e *gsBiP9* de soja no vetor de transformação de plantas pCAMBIA 1381-Z. A) Esquema do promotor de *gsBiP6* mostrando os sítios das enzimas de restrição utilizados na estratégia de clonagem e a localização do TATA box indicada pela caixa preta. Também é mostrado o esquema do T-DNA de pCAMBIA 1381-Z com o gene de resistência a higromicina (seta rosa), o sítio múltiplo de clonagem (seta azul) e o gene *GUS* (seta cinza). B) Esquema do promotor de *gsBiP9* mostrando os sítios das enzimas de restrição utilizados na estratégia de clonagem e a localização do TATA box indicada pela caixa preta. Também é mostrado o esquema do T-DNA de pCAMBIA 1381-Z com o gene de resistência a higromicina (seta rosa), o sítio múltiplo de clonagem (seta azul) e o gene *GUS* (seta cinza).

Para *gsBiP6*, as deleções foram conduzidas na orientação 5' 3' e em regiões internas do promotor (Figuras 4A e 4B). Assim, a primeira construção, denominada *-358pbip6-gus* ou, simplesmente, *BiP6*, possui 358 pb de regiões 5' flanqueadoras (Buzeli *et al.*, 2002) e contém todos os elementos conservados citados anteriormente, incluindo os dois ERSE-I e o único ERSE-II, que estão localizados entre os sítios de restrição *NdeI/NdeI*, o G-box, mas não o elemento CE. Na segunda construção, a região *NdeI/NdeI* foi removida e a seqüência de nucleotídeos foi religada originando a construção denominada $\Delta(-226/-82)$ *pbip6-gus* ou, simplesmente, *pUFV306*, que, por sua vez, não contém as duas seqüências UPRE-I, o único ERSE-II e o G-box. Finalmente a construção *-138pbip6-gus* ou, simplesmente, *pUFV307*, possui seqüências do promotor que se estende até a posição -138, a partir do sítio de início de transcrição, incluindo a região com a seqüência TATA e as duas seqüências CAAT invertidas.

A)

ta gagtacatttaaagattatcagtgtttaaaaataaatttatattataatttaaattttttataat aa
 aa ttaattgtaatttgatttatatatttattattatattataaatttcatttgattaaattaaca ca
 ta tgtttgactaaaatcctagttttgaataaatgaagcaaagaatgAGACGTGAGGTGTCCCaagca aa
 aa ggaaccagttttattggccaaacatgctttctcaaccttagattgggtccacatcagca catatg aca
 tg ctcgacttgcaagtgagcactataaatggcgaagtccccgccgtgaaactcaataga aaccta caa
 tT CATCGTCCATCGAGAAAAGGAAGAAAAAGAAACAAGGTGACATCATCATGCTTGCTCG TTTTCT CGC
 GG

B)

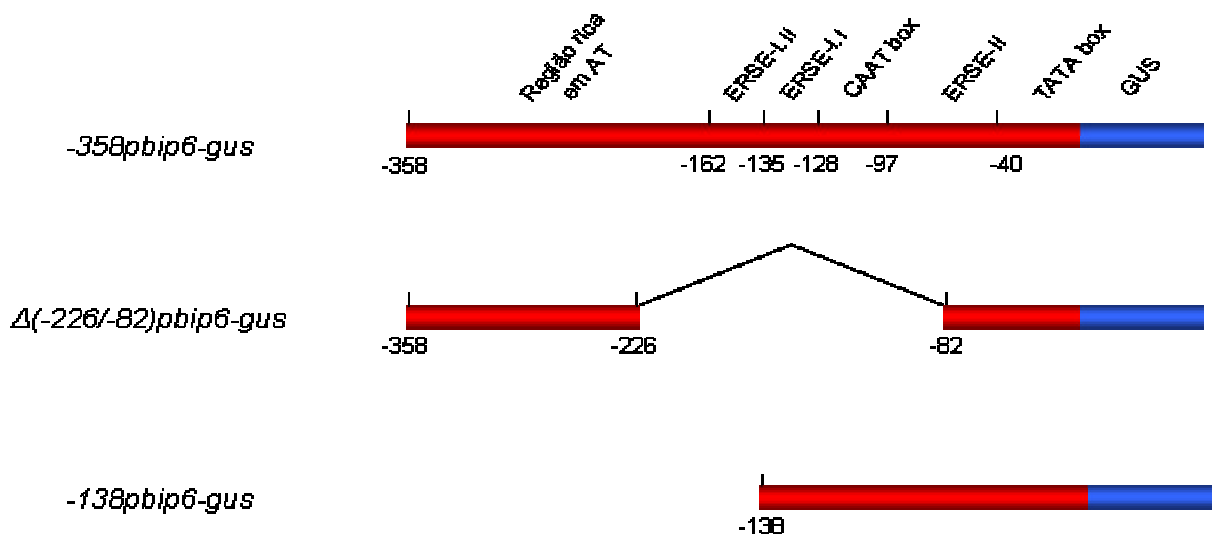


Figura 4: Esquema das construções utilizadas para análise do padrão de expressão do promotor de *gsBiP6*. A) Seqüência de nucleotídeos do promotor de *gsBiP6* mostrando além dos elementos conservados já citados, o local onde foram realizadas as deleções, mostrados pelos triângulos em preto e os sítios da enzima *NdeI* utilizados na estratégia de clonagem, mostrados em azul. B) Esquema ilustrativo para visualização das deleções mostrando os elementos conservados que foram deletados e os fragmentos obtidos.

Para *gsBiP9*, as deleções foram conduzidas apenas na orientação 5' 3' do promotor (Figuras 5A e 5B). Assim, a primeira construção, denominada *-2200pbip9-gus* ou, simplesmente, *BiP9*, possui 2.209 pb contendo toda a região 5', incluindo a região rica em adenina e timina, os quatro ERSE-I (ERSE-I.I, ERSE-I.II, ERSE-I.III e ERSE-I.IV), o único ERSE-II, os G-box e seus respectivos CE, o "TATA box" e o "CAAT box" (Figura 5). A segunda construção, denominada *-1090pbip9-gus* ou, simplesmente, *pUFV597*, possui 1090 pb de região 5' flanqueadora, contendo a região rica em adenina e timina, os quatro UPRE-I e o único ERSE-II, os G-box e seus respectivos CE, o "TATA box" e o "CAAT box". A terceira construção, denominada *-670pbip9-gus* ou, simplesmente, *pUFV595*, se estende 670 pb a partir do sítio de início de transcrição, contendo os quatro ERSE-I e o único ERSE-II, os G-box e seus respectivos CE, a seqüência TATA e a seqüência CAAT. A quarta construção, denominada *-296pbip9-gus* ou, simplesmente, *pUFV392*, possui 296 pb da região promotora, contendo três ERSE-I e o único ERSE-II, os G-box e seus respectivos CE, a seqüência TATA e a seqüência CAAT. A quinta construção, denominada *-186pbip9-gus* ou, simplesmente, *pUFV391*, possui 186 pb de região 5' flanqueadora, contendo apenas as seqüências "TATA box" e "CAAT box".

-1111 aatagtcataatgagaatttggttaa **gaaTTC**tacataatgggaataaatatgatttttttattaatataa
 -1041 attaatagcattttgatagaaaaaaa tatatttttttaaattatattatataataataaaaaatattaat
 -971 tatcagttcaaattaaaataatgat aaaaaataaaatagattattaatcaatggtgatatgaaattttaa
 -901 taaataatataattatttttttattt gtcaaatgtaatcaattaaattttactttttgaataattagtact
 -831 taaagataatattaattaaaaaaca ttatcttttttaatgcaatataatgatataacattattaagtt
 -761 taaattgtcattttgggtttccata atttttttaaatttatgatttttaattttcttgattttaattataa
 -691 catttgatttttctaattttataaat **ggatCC**tattggctcttcttattaagttaattataaattaacia
 -621 aaattattaattattaaaaaattaa taataattcaatattttctccataatattgtattttggttcacttc
 -551 **caactgccacataggagtc**caccaat agtaacaatatattaggattaataattttttattaatattttaat
 -481 tattaataaattttattttaacttat aattaattaaatatctttaataatcataattattaattaataatt
 -411 tactgaggatcaaaaatctcaattt ataaaactaaaaataaaaaatttaaaaatttagaagcaacaagat
 -341 tataatttagcatatgataaaaataataatataatgat**gataaga**aga **ggatcct**tagatgattg**cccttgata**
 -271 **agttgaggtc**gtaaagatggacggcacaggtgttcccaacactagaacgaat**gcc attggttgaacaag**
 -201 caaaaggc**gcatttccattgggtccacg**tcatcatttagtgacatggt**cgagcgtca_aagctt**caaattcag
 -131 gaattgaccaggtttgggactaca taaaagcctctcgctccctcgt**gcaatttcaaaatt**acattacac
 -61 tctcttcgacctcgcatcgcacctt caact**taacctatt**ccacttgaatcgtaaacgctt**T**gctagaag
 +71 aagagacaaaagtgtgt**ctgCAG** gt gtgagagagagagca**ATG**gctggctcgtgggcacgccc

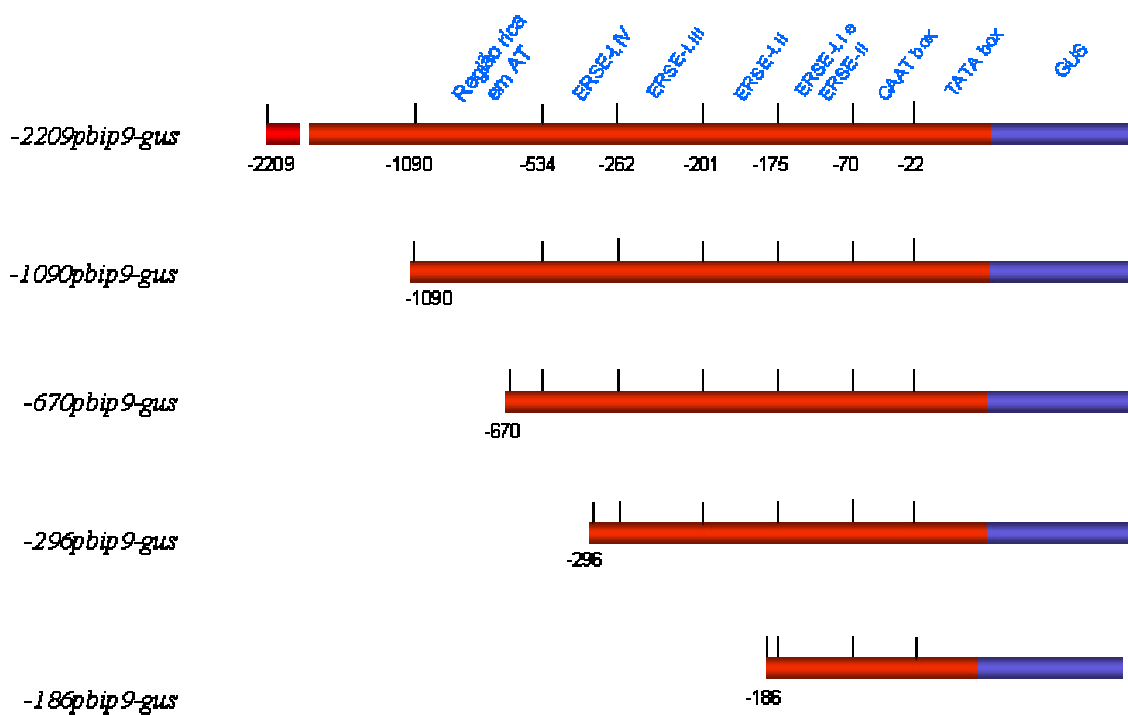


Figura 5: Esquema das construções utilizadas para análise do padrão de expressão do promotor de gsBiP9. A) Seqüência de nucleotídeos do promotor de gsBiP9 mostrando além dos elementos conservados já citados, o local onde foram realizadas as deleções (triângulos pretos) e os sítios das enzimas de restrição utilizados na estratégia de clonagem, mostrados em vermelho. B) Esquema ilustrativo para visualização das deleções mostrando os elementos conservados que foram deletados e os fragmentos obtidos.

4.3 Obtenção de plantas transgênicas para análise de atividade dos promotores de BiP.

Os genes quiméricos descritos foram utilizados para transformação de *Agrobacterium tumefaciens* e, posteriormente, inseridos em plantas de *Nicotiana tabacum*. Transformantes primários foram selecionados, em cultura de tecidos, com base na sua resistência à higromicina, gene de resistência presente no vetor de transformação de plantas pCAMBIA 1381-Z (Van Den Elzen *et al.*, 1985; Benveniste e Davies, 1973). Em seguida, as plantas foram testadas pela incorporação do gene *hptII*, por meio da análise de PCR (Figura 6). Todas as linhagens obtidas mostraram-se positivas, tendo sido amplificado um fragmento esperado de aproximadamente 750 pb a partir de DNA extraído da folhas de plantas transformadas, mas não de plantas não transformadas (Figura 6, canaleta 2). Embora tenha também ocorrido amplificação inespecífica de um fragmento de aproximadamente 250 pb a partir do DNA das linhagens transformadas, provavelmente esse fragmento está contido no locus T-DNA, uma vez que também se observa sua presença na amplificação do DNA controle pCAMBIA 1301 (Figura 6, canaleta 3) e pCAMBIA 1381-Z (Figura 6, canaleta 4), mas não a partir de DNA extraído de plantas não transformadas (Figura 6, canaleta 2). A canaleta 1 representa o controle das soluções, uma vez que não contém os oligonucleotídeos.

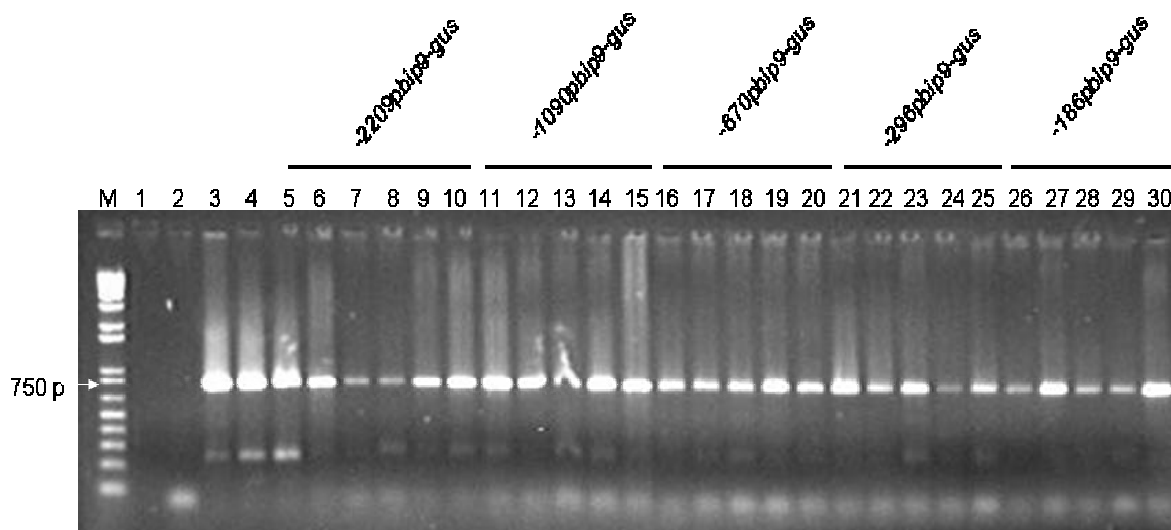


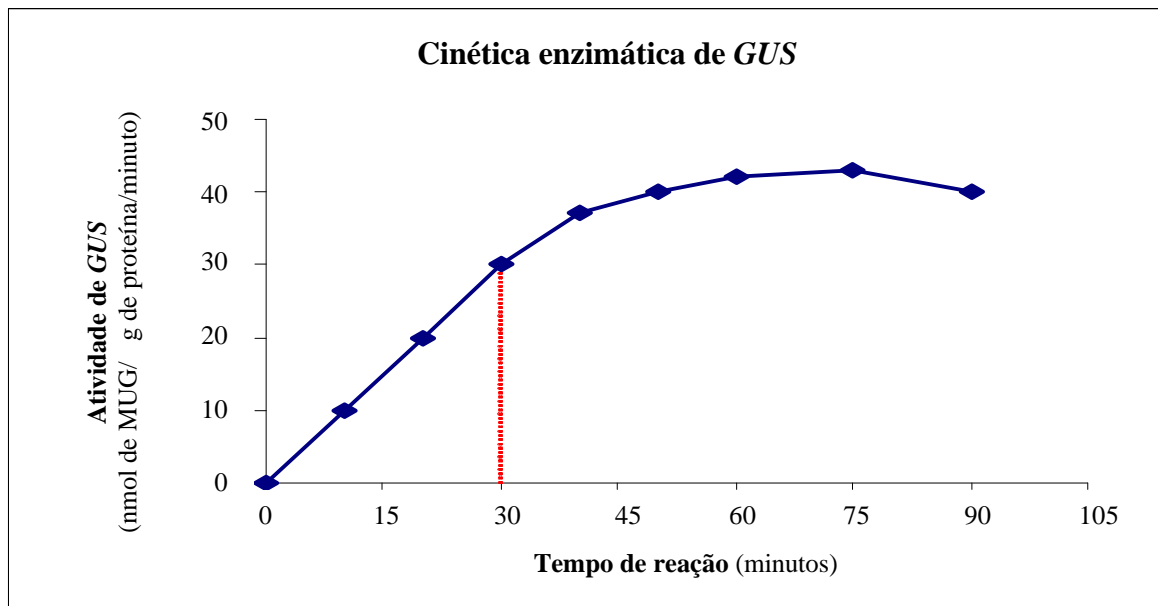
Figura 6: Análise de PCR das plantas transgênicas. O DNA total foi isolado de plantas transgênicas e usado como molde em reações de PCR, com iniciadores específicos para o gene *hptII*. O fragmento amplificado contendo cerca de 750 pb é indicado pela seta. “M” representa o marcador de peso molecular (kb). A canaleta 1, representa o controle das soluções uma vez que não contém os oligonucleotídeos; a canaleta 2, representa o DNA extraído de plantas não transformadas e as canaletas 3 e 4, representam o DNA controle de pCAMBIA 1301 e pCAMBIA 1381-Z, respectivamente. As canaletas de 5 a 10, 11 a 15, 16 a 20, 21 a 25 e 26 a 30, representam o DNA extraído das plantas transformadas com o promotor completo de BiP9 e suas sucessivas deleções, respectivamente.

4.4 Determinação da cinética enzimática para ensaios fluorimétricos com os promotores de BiP

Em geral, eventos de desenvolvimento e exposição das células a agentes que provocam o acúmulo de proteínas mal-dobradas no retículo endoplasmático resultam na indução dos genes BiP de plantas (Galili *et al.*, 1998; Boston *et al.*, 1996). Já foi demonstrado que a família gênica de BiP exibe uma expressão órgão-específica e que o tratamento com tunicamicina induz a expressão de todos os membros analisados da família gênica de BiP de soja (Cascardo *et al.*, 2000).

Uma vez que os genes BiP de soja são induzidos por tunicamicina, um potente ativador da via de resposta a proteínas mal-dobradas no retículo endoplasmático (Cascardo *et al.*, 2000), discos foliares de linhagens transgênicas independentes, contendo os transgenes -2200**pbip9-gus** (BiP9) e -358**pbip6-gus** (BiP6), foram incubados com esse antibiótico por, 48 horas, e analisados quanto à cinética de atividade de *GUS*, para determinação do tempo de reação (Figura 7A), e regulação correta dos genes quiméricos, para avaliar a funcionalidade desses promotores (Figura 7B).

A)



B)

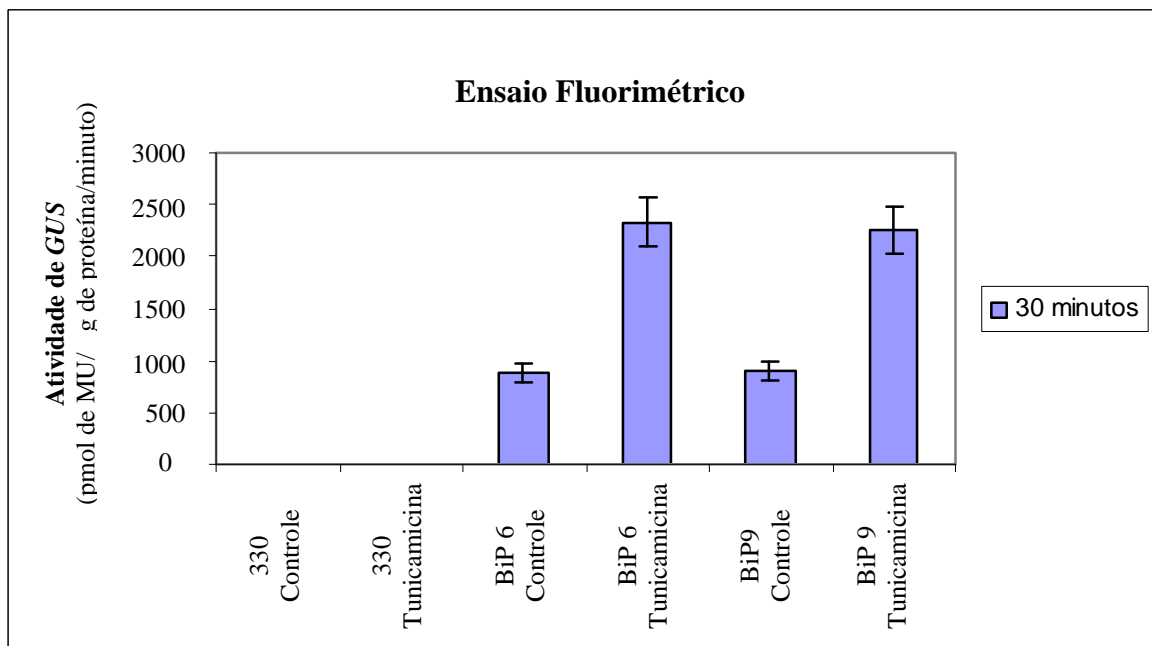


Figura 7: Indução dos promotores *gsBiP6* e *gsBiP9* por tunicamicina. A) Determinação da cinética da atividade específica da enzima *gus*. Para tanto, ensaios enzimáticos com tempos de 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 105 minutos foram realizados e, a atividade da enzima, foi determinada no fluorímetro, sendo trinta minutos, o melhor tempo para a reação. B) Ambos os promotores de BiP de soja são induzidos por tunicamicina. Após a incubação, os discos foliares, separados em três repetições, foram retirados do meio, secos em papel de filtro e submetidos ao ensaio fluorimétrico, sendo realizado duas leituras para cada amostra. As barras representam o erro padrão do experimento.

4.5 O promotor de *gsBiP6* responde a várias condições de estresses

Tem-se demonstrado que BiP de plantas responde a uma variedade de condições de estresses bióticos e abióticos, tais como déficit hídrico, infestação por fungo, ataque por insetos, estresse nutricional, aclimatação por baixas temperatura e elicitores da resposta a patogênese (Kalinski *et al.*, 1995; Fontes *et al.*, 1996; Figueiredo *et al.*, 1997; Fontes *et al.*, 1999; Picoli *et al.*, 2001). Com a finalidade de avaliar a contribuição dos promotores de BiP na regulação da resposta a diversas condições de estresses fisiológico, a expressão do gene quimérico *-358BiP6-gus* foi examinada por meio da detecção da atividade do gene repórter *GUS*, sob diferentes condições de estresses (Figura 8). O promotor de *gsBiP6* induziu a expressão de *GUS*, em resposta à tunicamicina, um ativador da rota UPR, cerca de três vezes mais que o não tratado. Este resultado confirmou que o gene quimérico *BiP6-gus* é corretamente regulado por tunicamicina, uma vez que sua indução foi similar àquela observada em estudos anteriores, por meio da detecção do acúmulo de RNA de BiP (Cascardo *et al.*, 2000). Similarmente, aumento na atividade de *GUS*, embora com diferente intensidade, foi detectado em resposta a diversas condições de estresses, tais como: tratamento com ácido salicílico, EGTA, AIA e PEG (Figura 8). Estes resultados indicam que o gene *gsBiP6* de soja é transcricionalmente regulado em respostas a vários estresses abióticos. Além disso, sugerem a existência de *cis*-elementos regulatórios no promotor de *gsBiP6* funcionalmente responsivos a AIA, PEG e EGTA. De fato, conforme descrito na Figura 1A, a análise de seqüência do promotor *gsBiP6* demonstrou a existência de *cis*-elementos regulatórios como candidatos em potencial na regulação do gene BiP em resposta a AIA (seqüência consenso tgtccc), PEG (seqüência consenso acgtg) e EGTA (CAAT box). Entretanto, experimentos adicionais são necessários para confirmar e localizar precisamente estes *cis*-elementos regulatórios no promotor *gsBiP6*.

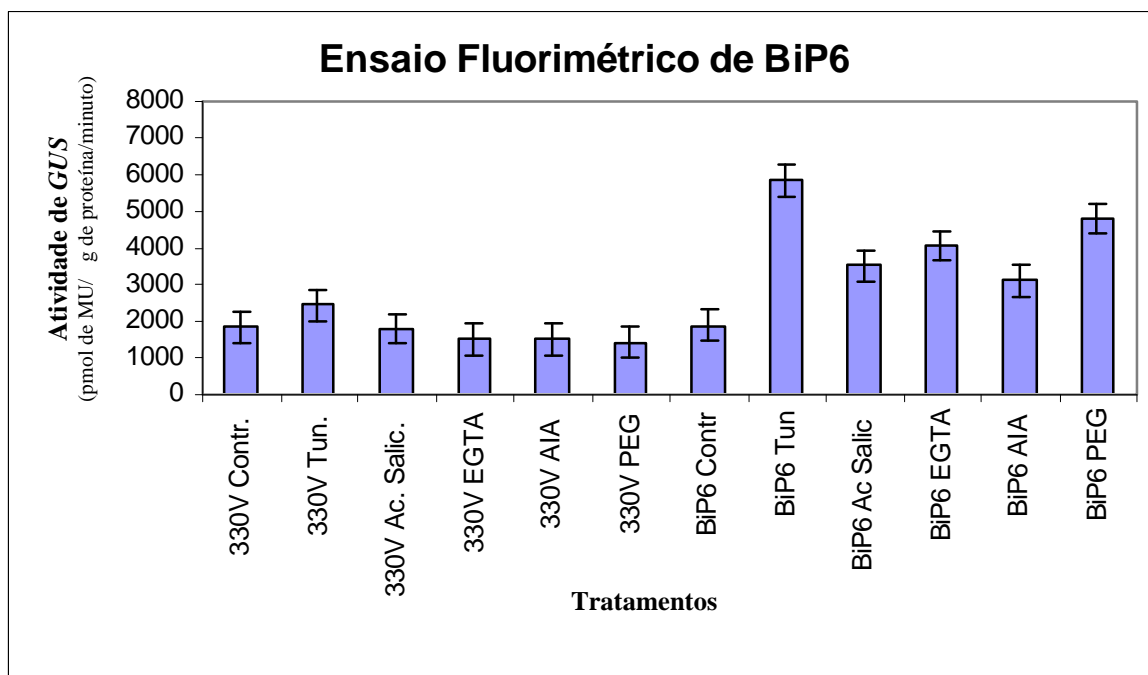


Figura 8: O promotor de *gsBiP6* responde a uma variedade de estresses. A atividade da enzima β -glucuronidase foi determinada por meio de ensaio fluorimétrico, de extratos de proteína total obtidos de discos foliares, separados em três repetições, de plantas transformadas apenas com o vetor pCAMBIA 1381-Z (330V) e plantas transformadas com o promotor de *gsBiP6*. A atividade do promotor foi determinada após 48 horas de tratamento com tunicamicina 5,0 μ g/mL, ácido salicílico 250 μ M, EGTA 2,0 mM, AIA 50 μ M e PEG a 10 %, sendo realizado duas leituras para cada amostra. As barras representam o erro padrão do experimento.

4.6 O promotor de *gsBiP9* é restrito a estresses que ativam a rota UPR

De maneira similar ao item 4.5, a regulação da expressão do gene *BiP9* foi examinada por meio da detecção da atividade de *GUS* em discos foliares de linhagens transgênicas, expressando o gene quimérico *-2200bip9-gus*, sob diferentes condições de estresses (Figura 9). Embora o tratamento com tunicamicina tenha promovido uma forte indução do promotor de *gsBiP9*, não foi observada nenhuma indução estatisticamente significativa nas células tratadas com os outros simuladores de estresses. O gene *gsBiP9* foi previamente caracterizado e, por análise de seqüência da região codificadora, identificado

como sendo uma forma alélica do gene *soyBiPD* (Cascardo *et al.*, 2000; 2001). Os resultados de análise de promotor do gene *gsBiP9* estão consistentes com o padrão de expressão do gene *soyBiPD*, previamente avaliado por RT-PCR semi-quantitativo (Cascardo *et al.*, 2000; 2001). Em condições normais, o gene *soyBiPD* é constitutivamente expresso em todos os órgãos de soja analisados (Cascardo *et al.*, 2001), porém somente é induzido por agentes que ativam a via UPR, não sendo induzido por estresse osmótico (Cascardo *et al.*, 2000). Em contraste, o gene *soyBiPA*, que corresponde a *gsBiP6* (Buzeli *et al.*, 2002), é induzido tanto por tunicamicina quanto por PEG, que simula o déficit hídrico (Cascardo *et al.*, 2000). Coletivamente, estes resultados indicam que a resposta de BiP ao déficit hídrico e demais estresses testados, ocorre por meio de uma rota de sinalização distinta da via UPR, sendo tais rotas controladas independentemente por diferentes componentes. Enquanto tanto o promotor de *gsBiP6* quanto o promotor de *gsBiP9* são regulados por tunicamicina, apenas *gsBiP6* responde aos outros estresses fisiológicos testados. Além disso, a amplitude da resposta à tunicamicina é muito mais acentuada que os demais estresses, indicando que componentes diferentes daqueles da via UPR estão envolvidos na via de sinalização que regula a expressão de BiP sob as demais condições de estresses.

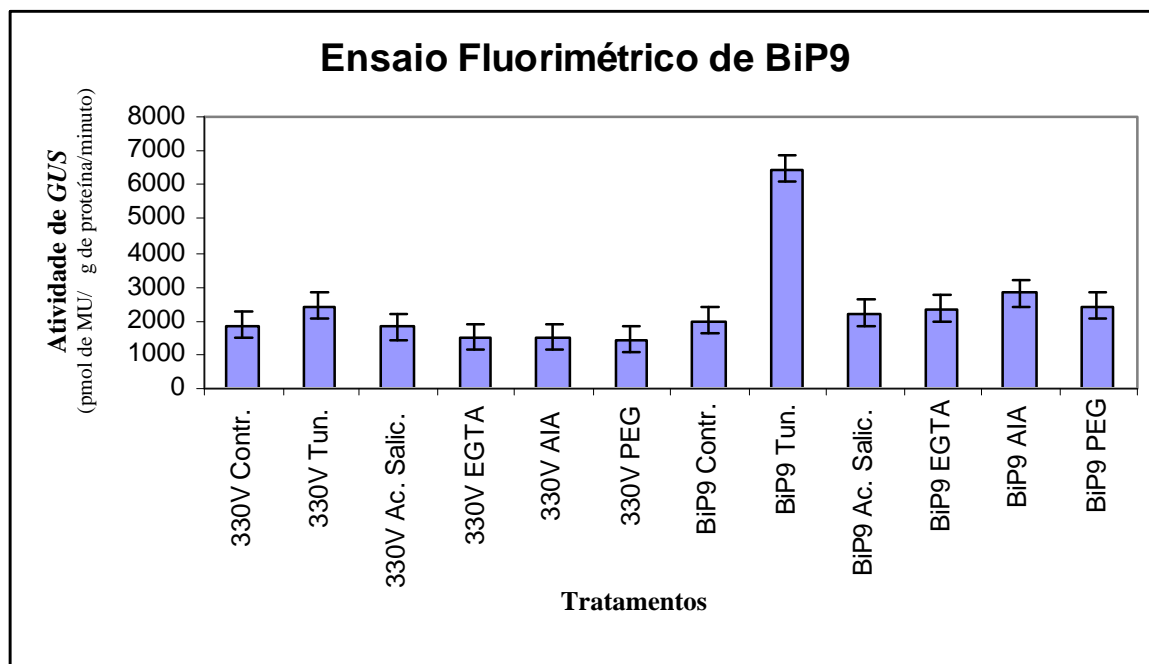


Figura 9: A atividade do promotor de *gsBiP9* é restrita a UPR. A atividade da enzima β -glucuronidase foi determinada por meio de ensaio fluorimétrico, de extratos de proteína total obtidos de discos foliares, separados em três repetições, de plantas transformadas apenas com o vetor pCAMBIA 1381-Z (330V) e plantas transformadas com o promotor de *gsBiP9*. A atividade do promotor foi determinada após 48 horas de tratamento com tunicamicina 5,0 μ g/mL, ácido salicílico 250 μ M, EGTA 2,0 mM, AIA 50 μ M e PEG a 10 %, sendo realizado duas leituras para cada amostra. As barras representam o erro padrão do experimento.

4.7 Identificação dos *cis*-elementos que respondem a estresses no promotor de *gsBiP6*

Para identificarem-se seqüências específicas responsáveis pelo controle da expressão da proteína BiP sob condições de estresses e/ou confirmar a funcionalidade dos elementos conservados citados anteriormente, deleções do promotor de *gsBiP6* foram conduzidas na orientação 5' 3' (-138*pbip6-gus*) e no interior do clone Δ (-226/-82)*pbip6-gus*, plantas transgênicas foram obtidas (Buzeli *et al.*, 2002) e a regulação da expressão do

gene BiP de plantas foi examinada por meio de ensaios fluorimétricos onde a atividade do gene repórter *GUS* foi avaliada sob diferentes condições de estresses (Figura 10).

A construção $\Delta(-226/-82)pbip6-gus$ não contém os dois ERSE-I, o único ERSE-II e o G-box. Já a construção $-138pbip6-gus$ não contém a região *EcoRI/BamHI*, entretanto, contém a região promotora básica, representada pelas seqüências TATA e duas seqüências CAAT invertidas. As deleções de seqüências do promotor BiP6 até a posição -138 (Figura 4) resultaram na completa perda da expressão de *GUS*. Aparentemente, a região remanescente que contém a seqüência conservada TATA (posição -40) e duas seqüências CAAT invertidas (posições -93 e -123) são totalmente reprimidas em transformantes estáveis de tabaco. Provavelmente, a região removida contribui para o alto nível de expressão basal de BiP. Consistente com esta observação, a seqüência delimitada pelos nucleotídeos -358 e -226 é capaz de restaurar altos níveis de expressão basal do gene repórter *GUS* quando ligada à extremidade 5' do promotor mínimo de BiP6 que engloba a seqüência TATA do promotor de *gsBiP6*, resultando na construção $\Delta(-226/-82)pbip6-gus$. De fato, a deleção [$\Delta(-226/-82)pbip6-gus$] causou a inativação do promotor em resposta ao tratamento com PEG ou tunicamicina. Consistentemente, os dados sugerem que a região possui os elementos ERSE e o G-box:ABRE:*gsBiP6*. A remoção da região -357 a -138 na construção $-138pbip6-gus$ foi suficiente para anular completamente a expressão de *GUS*. Isso poderia ser explicado pela ausência dos dois elementos CAAT invertidos, que são responsáveis pelo aumento da taxa de transcrição. Coletivamente, estes resultados indicam que a seqüência delimitada pelas posições -226 a -82 é requerida tanto para expressão basal do promotor BiP6 quanto para sua indutibilidade em resposta a tunicamicina e a PEG.

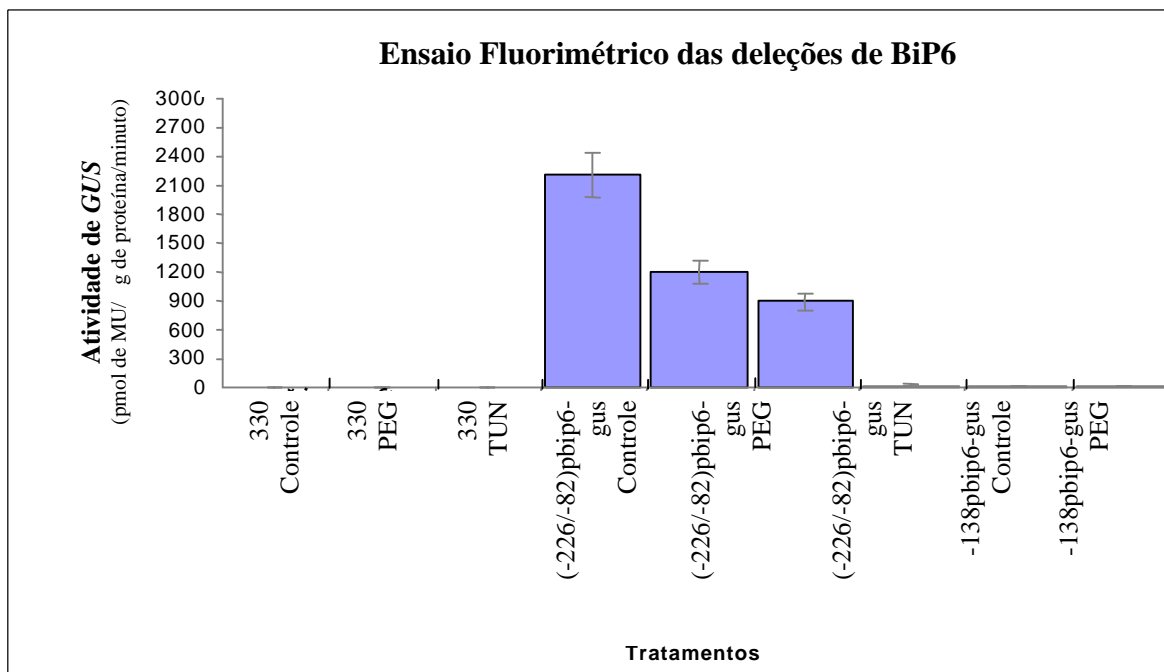


Figura 10: Análise das deleções do promotor de *gsBiP6* sob condições de estresse simuladas por PEG e tunicamicina. A atividade da enzima β -glucuronidase foi determinada por meio de ensaio fluorimétrico, de extratos de proteína total obtidos de discos foliares, separados em três repetições, de plantas transformadas apenas com o vetor pCAMBIA 1381-Z (330) e plantas transformadas com as construções $\Delta(-226/-82)pbip6-gus$ (pUFV306) ou $-138pbip6-gus$ (pUFV307). A atividade do promotor foi determinada após 48 horas de tratamento com tunicamicina (TUN) na concentração de 5,0 $\mu\text{g/mL}$ ou polietilenoglicol (PEG-8000) a 10 %, sendo realizado duas leituras para cada amostra. As barras representam o erro padrão do experimento.

4.8 Identificação dos *cis*-elementos que respondem a estresses no promotor de *gsBiP9*

Para identificar seqüências específicas responsáveis pelo controle da expressão da proteína BiP sob condições de estresses e/ou confirmar a funcionalidade dos elementos conservados citados anteriormente, deleções do promotor de *gsBiP9* foram conduzidas na orientação 5' 3' ($-186pbip9-gus$), ($-296pbip9-gus$), ($-670pbip9-gus$), ($-1090pbip9-gus$), plantas transgênicas foram obtidas e a regulação da expressão do gene BiP de plantas foi examinada, por meio da detecção do acúmulo de proteína, sob diferentes condições de

estresses (Figura 11). A ausência total de atividade da enzima β -glucuronidase nas plantas transformadas apenas com o vetor, aquelas transformadas com o gene *GUS* sem o promotor (330), indica que o padrão de atividade de *GUS* nas plantas transformadas com os genes quiméricos foi devido à presença de seqüências do promotor de BiP. As plantas transgênicas transformadas com o gene quimérico *BiP9-GUS* exibiram, conforme esperado, uma intensa atividade de *GUS*, quando tratadas com tunicamicina, uma vez que a atividade do promotor de *gsBiP9* é restrita a UPR, não respondendo aos demais agentes estressantes.

Deleções no sentido 5' do promotor de *gsBiP9* (-186*pbip9-gus*, -296*pbip9-gus*, -670*pbip9-gus* e -1090*pbip9-gus*) revelaram que a remoção das seqüências desse promotor até a posição -296 causou a perda completa da atividade de *GUS* em extratos protéicos de plantas tratadas com tunicamicina. Provavelmente, a região removida contribui para o alto nível de expressão basal do gene BiP. Consistente com essa observação, a seqüência contendo 1090 pb, a partir do sítio de início da transcrição, exibe uma alta atividade do gene repórter *GUS*. Essa região, caracterizada por uma seqüência rica em resíduos de adenina e timina, deve possuir um “enhancer” típico, sendo designada domínio regulatório *cis*-atuante 1 (CRD-1). De fato, a atividade do gene repórter β -glucuronidase (*GUS*) nas plantas contendo seqüências do promotor até a posição -1090 foi praticamente idêntica àquela exibida pelo promotor inteiro. Além disso, foi verificado que a seqüência de nucleotídeos até a posição -670 pb é capaz de restaurar, em parte, os níveis de expressão basal do gene repórter *GUS*, uma vez que se detectou um certo grau de atividade do gene repórter em extratos protéicos de plantas tratadas com tunicamicina, mas não com PEG. Apesar disso, os níveis de atividade não foram suficientemente altos. Esta seqüência de *gsBiP9* delimitada pela posição -670 foi designada domínio regulatório *cis*-atuante 2 (CRD-2), por não restaurar completamente a atividade do gene repórter *GUS* e requerer seqüências adicionais delimitadas até a posição -1090 para uma alta atividade.

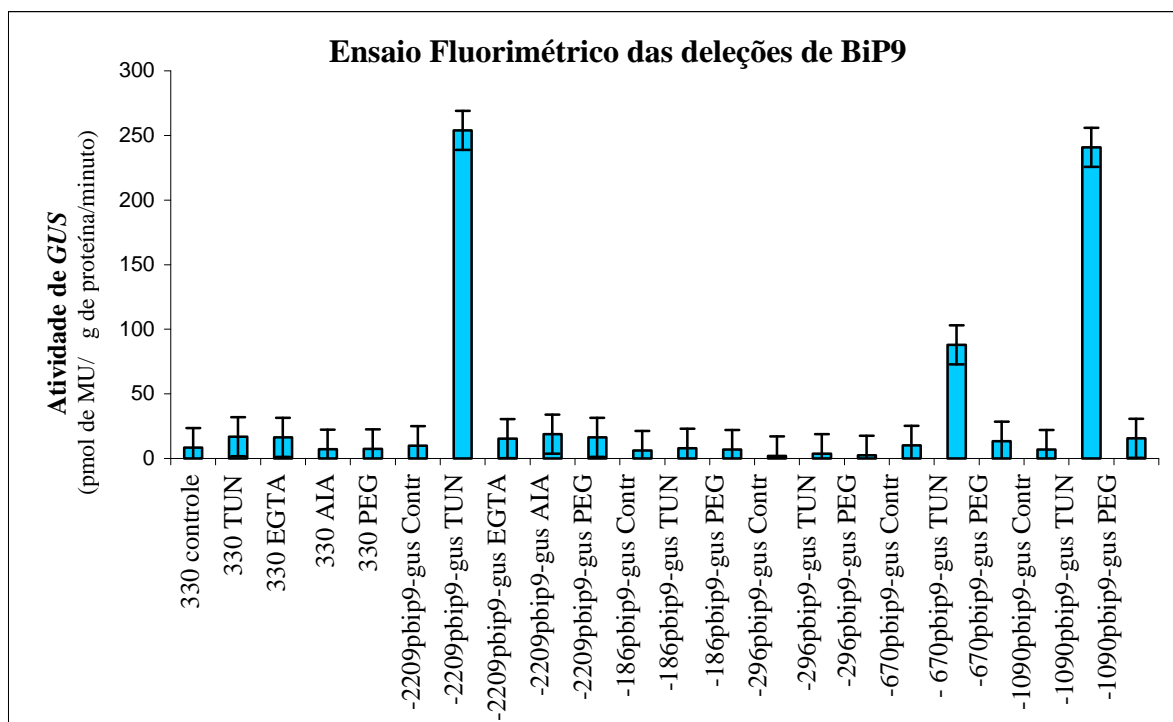


Figura 11: A atividade do promotor de *gsBiP9* é dependente do ERSE-I.IV e da região rica em adenina e timina. A atividade da enzima β -glucuronidase foi determinada por meio de ensaio fluorimétrico, de extratos de proteína total obtidos de discos foliares, separados em três repetições, de plantas transformadas apenas com o vetor pCAMBIA 1381-Z (330) e plantas transformadas com o promotor de *gsBiP9* (-2200*pbip9-gus*) e suas sucessivas deleções na orientação 5' 3': 186 pb (-186*pbip9-gus*), 296 pb (-296*pbip9-gus*), 670 pb (-670*pbip9-gus*), 1090 pb (-1090*pbip9-gus*). A atividade do promotor foi determinada após 48 horas de tratamento com tunicamicina 5,0 μ g/mL, EGTA 2,0 mM, AIA 50 μ M e PEG 10 %, sendo realizado duas leituras para cada amostra. As barras representam o erro padrão do experimento.

4.9 Distribuição espacial da atividade de *GUS* em plantas transgênicas com o promotor de BiP9 em condições normais de crescimento

Com o objetivo de determinar se o promotor de BiP confere um padrão de expressão tecido-específico, análises histoquímicas da expressão de *GUS* foram feitas em meristemas apicais, raízes, caules e folhas (Figuras 12A, B, C, D e E, respectivamente) de plantas não

transformadas (Wt), transformadas apenas com o vetor pCAMBIA 1381-Z e portanto sem a região promotora (330), transformadas com genes quiméricos *BiP6:GUS* e *BiP9:GUS* (Figura 3) e plantas transformadas com as deleções de *gsBiP9* (-186*pbip9-gus*, -296*pbip9-gus*, -670*pbip9-gus* e -1090*pbip9-gus*) (Figura 5B).

Análises histoquímicas das plantas transgênicas tratadas com tunicamicina demonstraram que o padrão de expressão do gene quimérico -358*pbip6-gus* foi idêntico àquele do gene quimérico -2200*pbip9-gus* (Figuras 12A, B, C, D e E, parte superior, respectivamente). Assim, nas plantas transformadas com esses genes quiméricos, foi observada uma intensa atividade de *GUS* no meristema apical (Figura 12A, parte superior); em raízes, a única região que não apresentou atividade de *GUS* foi a coifa (Figura 12B, parte superior); no caule, foi detectada a atividade de *GUS* predominantemente na região vascular (Figura 12C, parte superior); e em cortes longitudinais de folhas, uma intensa atividade histoquímica de *GUS* foi observada nos feixes vasculares e mesofilo (Figura 12D, parte superior), sendo que de modo geral, o promotor de BiP produz um padrão uniforme de expressão de *GUS* em folhas (Figura 12E, parte superior). A ausência total de coloração em todos tecidos analisados de plantas-controle, aquelas não transformadas (Wt) e aquelas transformadas com o gene *GUS* sem o promotor (330), indica que o padrão de coloração histoquímica de *GUS* nas plantas transformadas com os genes quiméricos foi devido à presença de seqüências do promotor de BiP (Figuras 12A, B, C, D e E, parte superior, respectivamente). Este padrão de distribuição espacial da atividade de *GUS* é correlacionado com tecidos que apresentam alta atividade celular secretora e alta proporção de células em franca divisão celular.

Deleções do promotor de *gsBiP9*, no sentido 5', (-186*pbip9-gus*, -296*pbip9-gus*, -670*pbip9-gus* e -1090*pbip9-gus*), revelaram que a remoção das seqüências desse promotor até a posição -296 causou a perda completa da expressão de *GUS* em meristemas apicais

(Figura 12A, parte inferior), raízes (Figura 12B, parte inferior), caules (Figura 12C, parte inferior) e folhas (Figura 12D e 12E, parte inferior). Provavelmente, a região removida contribui para o alto nível de expressão basal do gene BiP. Consistente com essa observação, o fragmento da seqüência contendo 1090 pb, a partir do sítio de início da transcrição, provocou um aumento significativo na atividade do gene repórter *GUS* em todos os tecidos analisados (Figuras 12A, B, C, D e E, parte inferior). Essa região, caracterizada por uma seqüência rica em resíduos de adenina e timina, deve possuir um “enhancer” típico sendo designada domínio regulatório *cis*-atuante 1 (CRD-1). De fato, a atividade do gene repórter -glucuronidase (*GUS*) nas plantas contendo seqüências do promotor até a posição -1090 foi praticamente idêntica àquela exibida pelo promotor inteiro. Além disso, foi verificado que a seqüência de nucleotídeos até a posição -670 pb, a partir do sítio de início da transcrição, é capaz de restaurar, em parte, os níveis de expressão basal do gene repórter *GUS*, uma vez que se detectou atividade do promotor em raízes (Figura 12B, parte inferior) e caule (Figura 12C, parte inferior). Verificou-se também, que os níveis de expressão em folhas, principalmente na região dos feixes vasculares, não foram suficientemente altos e nem tampouco de forma generalizada, como visto nas construções contendo o promotor completo de BiP (Figuras 12D e 12E). Concomitante a esse fato, nenhuma atividade foi detectada nos meristemas apicais (Figuras 12A, parte inferior). Assim sendo, a seqüência de *gsBiP9* delimitada pela posição -670 foi designada domínio regulatório *cis*-atuante 2 (CRD-2) por restaurar o nível basal de expressão de *GUS* e provavelmente conter os elementos regulatórios de um promotor mínimo eucariótico. Entretanto, a região CRD-2 não foi capaz de restaurar completamente a regulação tecido-específica do gene repórter *GUS* em altos níveis, requerendo seqüências adicionais delimitadas até a posição -1090 para uma alta expressão em regiões do meristema apical e folha.

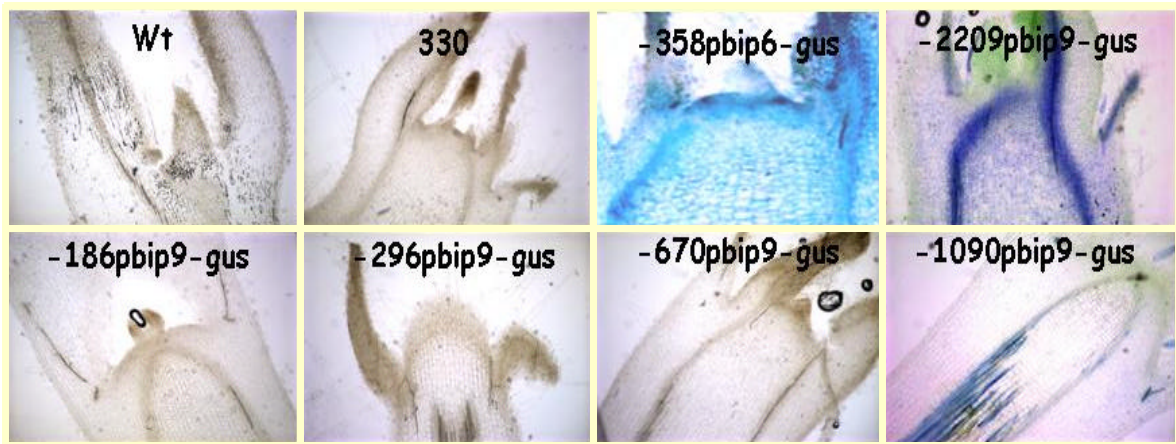


Figura 12A: Padrão de expressão do promotor de BiP em meristemas apicais de tabaco. A expressão de *GUS* foi analisada em cortes longitudinais de meristemas apicais de plantas não transformadas (Wt), transformadas apenas com o vetor pCAMBIA 1381-Z (330), transformadas com a construção *-358pbip6-gus* (BiP6) e *-2200pbip9-gus* (BiP9) e as sucessivas deleções de BiP9 (*-186pbip9-gus*, *-296pbip9-gus*, *-670pbip9-gus* e *-1090pbip9-gus*).

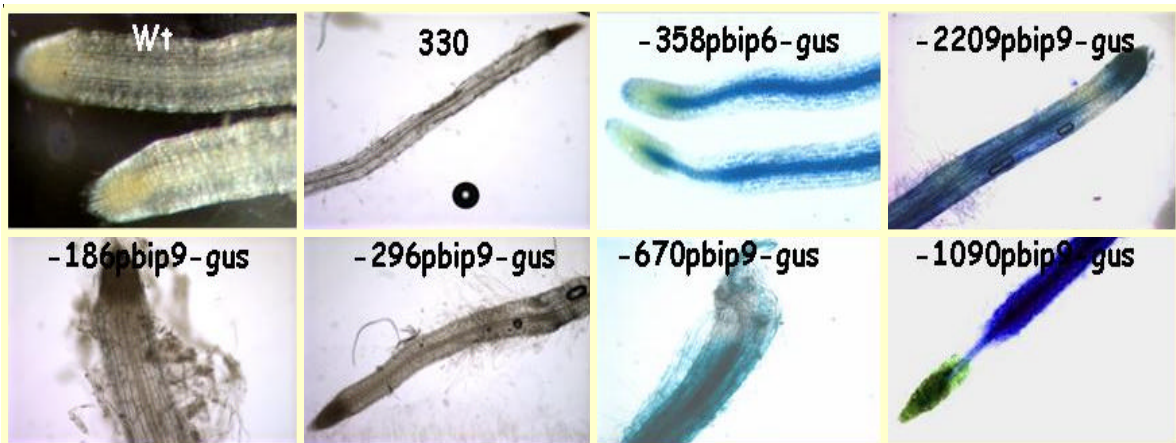


Figura 12B: Padrão de expressão do promotor de BiP em raízes de tabaco. A expressão de *GUS* foi analisada em raízes de plantas não transformadas (Wt), transformadas apenas com o vetor pCAMBIA 1381-Z (330), transformadas com a construção *-358pbip6-gus* (BiP6) e *-2200pbip9-gus* (BiP9) e as sucessivas deleções de BiP9 (*-186pbip9-gus*, *-296pbip9-gus*, *-670pbip9-gus* e *-1090pbip9-gus*).

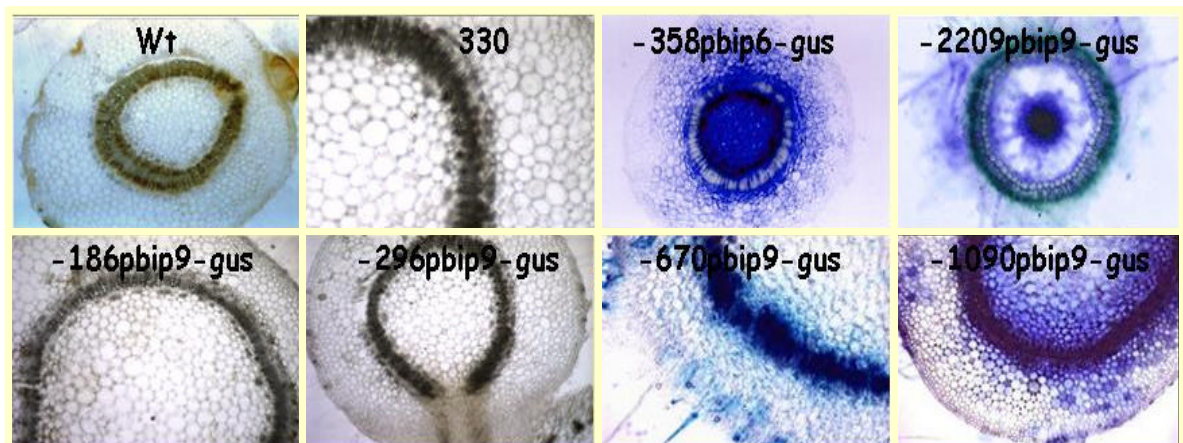


Figura 12C: Padrão de expressão do promotor de BiP em caules de tabaco. A expressão de *GUS* foi analisada em cortes transversais de caules de plantas não transformadas (Wt), transformadas apenas com o vetor pCAMBIA 1381-Z (330), transformadas com a construção *-358pbip6-gus* (BiP6) e *-2200pbip9-gus* (BiP9) e as sucessivas deleções de BiP9 (*-186pbip9-gus*, *-296pbip9-gus*, *-670pbip9-gus* e *-1090pbip9-gus*).

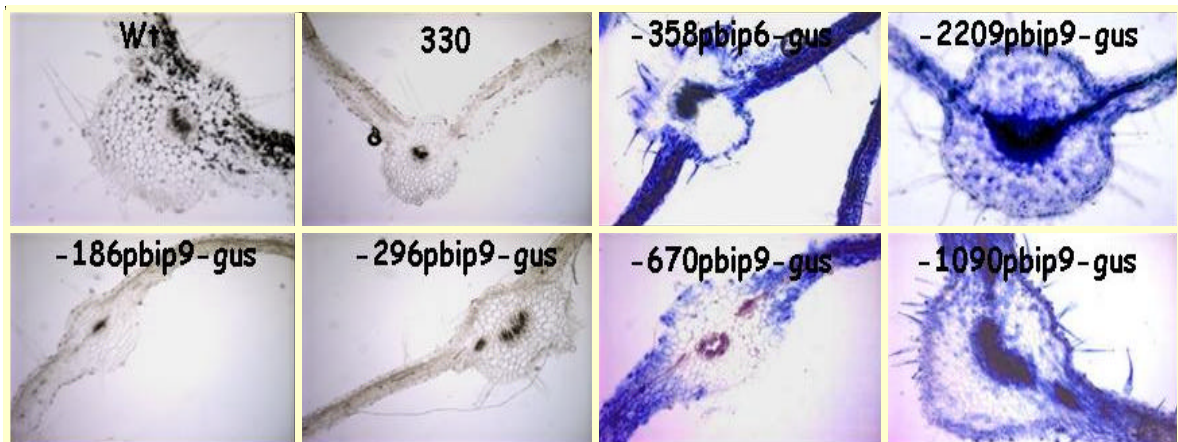


Figura 12D: Padrão de expressão do promotor de BiP em folhas de tabaco. A expressão de *GUS* foi analisada em cortes transversais de folhas de plantas não transformadas (Wt), transformadas apenas com o vetor pCAMBIA 1381-Z (330), transformadas com a construção *-358pbip6-gus* (BiP6) e *-2200pbip9-gus* (BiP9) e as sucessivas deleções de BiP9 (*-186pbip9-gus*, *-296pbip9-gus*, *-670pbip9-gus* e *-1090pbip9-gus*).

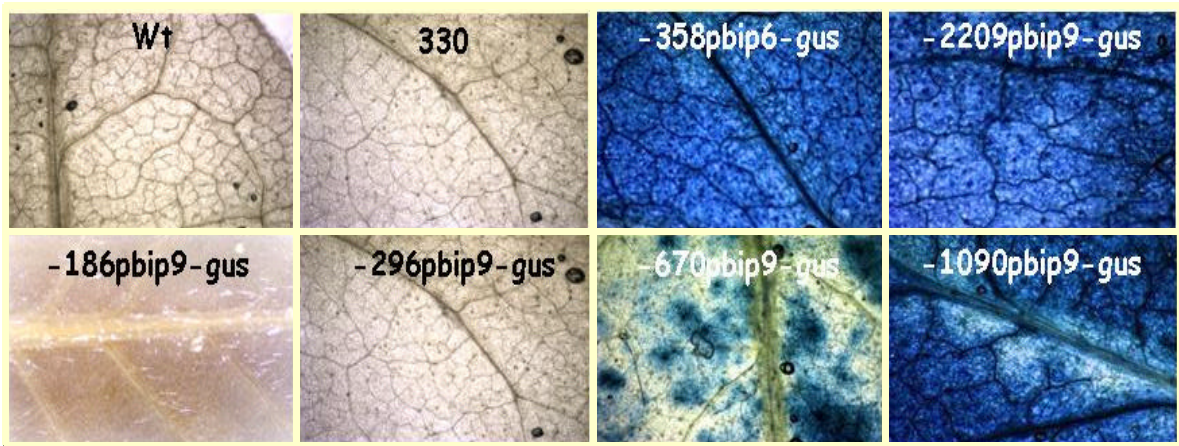


Figura 12E: Padrão de expressão do promotor de BiP em folhas inteiras de tabaco. A expressão de *GUS* foi analisada em folhas inteiras de plantas não transformadas (Wt), transformadas apenas com o vetor pCAMBIA 1381-Z (330), transformadas com a construção *-358pbip6-gus* (BiP6) e *-2200pbip9-gus* (BiP9) e as sucessivas deleções de BiP9 (*-186pbip9-gus*, *-296pbip9-gus*, *-670pbip9-gus* e *-1090pbip9-gus*).

5. DISCUSSÃO

Poucos estudos têm utilizado promotores de BiP de plantas fusionados a genes repórteres para identificar *cis*-elementos regulatórios que respondem a estresses, bem como para examinar a expressão tecido-específica dos genes BiP durante o desenvolvimento da planta (Cascardo *et al.*, 2000).

Os resultados apresentados indicam que a análise da expressão do gene repórter *GUS* reproduz corretamente a expressão tecido-específica de BiP, estando, a regulação espacial dos genes quiméricos *-358pbip6-gus* (BiP6) e *-2209pbip9-gus* (BiP9), consistente com o padrão de acúmulo do mRNA de BiP de tabaco sob condições de estresses que ativam a via UPR (Denecke *et al.*, 1991; Fontes *et al.*, 1991; Figueiredo *et al.*, 1997; Cascardo *et al.*, 2000; Alvim *et al.*, 2001). Também foi comprovado que a proteína BiP de plantas acumula-se predominantemente em tecidos associados a uma alta atividade secretora e uma elevada proporção de células em franca divisão (Fontes *et al.*, 1991; 1996). Além disso, foi mostrado que *gsBiP6* responde a uma variedade de estresses, enquanto a resposta de *gsBiP9*, fica restrita à tunicamicina. Finalmente, a presença dos dois domínios regulatórios *cis*-atuantes no promotor de BiP6, parece ser verificada também em BiP9.

Em geral, independente do tecido analisado, uma maior atividade de *GUS* sempre foi detectada em tecidos sob alta taxa de divisão celular, estando esse fato, consistente com as funções descritas para esse chaperone molecular em plantas. Apesar disso, sendo a coifa considerada uma estrutura dinâmica e complexa por “receber” os estímulos ambientais, sintetizar e secretar pequenas moléculas, nenhuma atividade de *GUS* foi observada nessa estrutura, sugerindo que esta ausência de expressão da expressão de *GUS* pode estar mais relacionada a uma especificidade do promotor, do que a uma baixa taxa metabólica desse tecido.

Foi demonstrado que o promotor de BiP6 modula a intensidade da expressão do gene repórter *GUS* em resposta aos estresses com tunicamicina, PEG, EGTA, AIA e ácido salicílico; e que embora a possível relação entre a função de BiP atuar durante o déficit hídrico, liberando Ca^{2+} no retículo endoplasmático e, assim, mantendo a turgescência celular ainda não tenha sido completamente elucidada, sabe-se que uma depleção gradual de Ca^{2+} intracelular promove um aumento na expressão dos genes de BiP6 por uma rota distinta daquela mediada por tunicamicina (Roy *et al.*, 1996; Morris *et al.*, 1997; Cascardo *et al.*, 2000), uma vez que BiP9 é induzido somente por agentes que ativam a rota UPR, não sendo

induzido por nenhum outro tipo de estresse. Além disso, a amplitude da resposta à tunicamicina é muito mais acentuada que os demais estresses, indicando que componentes diferentes daqueles da via UPR estão envolvidos na via de sinalização que regula a expressão de BiP sob as demais condições estressantes. Deste modo, BiP6 pode ter desenvolvido um mecanismo regulatório independente para coordenar eficientemente a demanda de BiP, com a indução de um grupo específico de proteínas secretórias envolvidas no mecanismo de resposta osmótico.

Utilizando diferentes construções de seqüências 5' do gene *BiP6*, ligadas transcricionalmente ao gene repórter *GUS*, dois domínios funcionais foram identificados nesse promotor, o domínio regulatório *cis*-atuante 1 (CRD-1) e o domínio regulatório *cis*-atuante 2 (CRD-2) (Buzeli *et al.*, 2002). A região CRD-1 compreende os nucleotídeos -358 a -226, sendo caracterizada pela predominância quase absoluta de adenina e timina. Esse domínio funcional exibe uma atividade similar a de “enhancer” já que é capaz de, por subtração, restaurar altos níveis de expressão quando fusionado diretamente à extremidade 5' -82 do promotor mínimo de BiP, que por si só é reprimido em tabaco transgênico. Já o domínio CRD-2, delimitado pelos nucleotídeos -226 a -82, contém elementos regulatórios positivos e negativos que coordenam a expressão tecido-específica do promotor de *gsBiP6*. Enquanto a atividade do promotor de BiP6 em regiões meristemáticas de raízes, como a região do procâmbio, meristema apical e floema, foi associada à presença do domínio CRD-2, sua deleção, construção $\Delta(-226/-82)pbip6-gus$, intensificou a expressão do gene repórter no parênquima xilemático do caule. O domínio CRD-2 contém duas seqüências CAAT na orientação invertida, que constitui uma característica funcional de promotores altamente ativos em células de elevado grau de proliferação (Maity e Crombrugghe, 1988). Além disso, a presença do elemento que responde a auxina (TGTCCC) no domínio CRD-2 sugere que o gene BiP de plantas seja também regulado por auxina. Este experimento de deleção do promotor de *gsBiP6* forneceu evidências de que a intensa atividade do gene repórter, observada no tecido vascular não foi resultado do movimento tendencioso da proteína *gus* para o floema, ou de maior disponibilidade do substrato, já que a deleção de CRD-2 alterou o padrão de expressão de *GUS* no tecido vascular. A construção *-358pbip6-gus* direciona alta atividade de *GUS* nas células do floema e a expressão do gene repórter praticamente não é detectável no parênquima xilemático. Entretanto, a deleção interna do domínio CRD-2 anulou a expressão de *GUS* nas células do floema, e intensificou a atividade de gene repórter no parênquima xilemático. Provavelmente, a alta expressão de *GUS* no

floema é o resultado da atividade elevada do promotor de BiP associada à alta atividade secretora das células do floema.

Da mesma forma, utilizando-se diferentes construções de seqüências 5' do gene *BiP9*, ligadas transcricionalmente ao gene repórter *GUS*, outros dois domínios funcionais, bastante similares àqueles vistos em BiP6, foram identificados nesse promotor, o domínio regulatório *cis*-atuante 1 (CRD-1) e o domínio regulatório *cis*-atuante 2 (CRD-2). CDR-1 compreende os nucleotídeos -1090 a -670, a partir do sítio de início da transcrição. Essa região, caracterizada pela predominância quase absoluta de adenina e timina exibe uma alta atividade do gene repórter *GUS*. Este domínio funcional possui uma atividade similar à de “enhancer”, já que é capaz de restaurar altos níveis de expressão quando fusionado diretamente à extremidade 5' do promotor de BiP9. De fato, a atividade do gene repórter -glucuronidase (*GUS*) nas plantas contendo esse domínio regulatório *cis*-atuante foi praticamente idêntica àquela exibida pelo promotor inteiro. Além disso, a análise histoquímica e fluorimétrica de plantas contendo tais seqüências provocaram um aumento significativo na atividade do gene repórter *GUS*. CDR-2 compreende os nucleotídeos delimitados pelas posições -670 a +1, a partir do sítio de início da transcrição, caracterizado por conter elementos regulatórios positivos, que coordenam a expressão tecido-específica do promotor de *gsBiP9*, sendo capaz de restaurar em parte, os níveis de expressão basal do gene repórter *GUS*, uma vez que se detectou atividade do promotor em raízes e caule, entretanto, os níveis de expressão em folhas, principalmente na região dos feixes vasculares, não foram suficientemente altos e nem tão pouco de forma generalizada como visto nas construções contendo o promotor completo de BiP, sendo necessário seqüências adicionais delimitadas até a posição -1090 para uma alta atividade.

Talvez, devido à alta identidade de diversas seqüências conservadas (93 – 100 %) observada pelo alinhamento de seqüências 5' flanqueadoras dos promotores de *gsBiP6* e *gsBiP9*, esses domínios *cis*-regulatórios exibam comportamentos tão similares.

Estes resultados sugerem que o controle da expressão dos genes BiP de plantas envolve múltiplos e complexos mecanismos e depende de uma complexa integração de múltiplos *cis*-elementos regulatórios no promotor.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvim, F.C.; Carolino, S.M.B.; Cascardo, J.C.M.; Nunes, C.C.; Martinez, C.A.; Otoni, W.C.; Fontes, E.P.B. (2001). Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. **Plant Physiology**, 126: 1042 – 1054.
- Anderson, J.V.; Li, Q.B.; Haskell, D.W.; Guy, C.L. (1994). Structural organization of the spinach endoplasmic reticulum-luminal 70- kilodalton heat-shock cognate gene and expression of 70- kilodalton heat-shock genes during cold acclimation. **Plant Physiology**, 104: 1359 – 1370.
- Bar-Peled, M; Basshan, D.C.; Raikhel, N.V. (1996). Transport of proteins in eukaryotic cells: more questions ahead. **Plant Molecular Biology**, 32: 223 – 249.
- Basshan, D.C.; Raikhel, N.V. (1997). Molecular aspects of vacuole biogenesis. **Advances in Botanical Research**, 25: 43 – 58.
- Benveniste, R.; Davies, J. (1973). Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, 42: 471 – 506.
- Blond-Elguindi, S.; Fourie, A.M.; Sambrook, J.F.; Gething, M-J.H. (1993). Regulation and phosphorylation of the soybean BiP forms. **Journal of Biological Chemistry**, 268: 12730 – 12735.
- Bole, D.G.; Hendershot, L.M.; Kearney, J.F. (1986). Post-translational association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chain and secreting hybridomas. **The Journal of Cell Biology**, 102: 1558 – 1566.
- Boston, R.S.; Fontes, E.P.B.; Shank, B.B. (1991). Increased expression of the maize immunoglobulin binding protein homolog b-70 in three zein regulatory mutants. **The Plant Cell**, 3: 497 – 505.
- Boston, R.S.; Viitanen, P.V.; Vierling, E. (1996) Molecular chaperones and protein folding in the plants. **Plant Molecular Biology**, 34: 191 – 222.
- Bowler, C.; Fluhr, R. (2000). The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. **Trends in Plant Science**, 5: 241 – 246.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248 – 254.
- Brewer, J.W.; Cleveland, J.L.; Hendershot, L.M. (1997). A pathway distinct from the mammalian unfolded protein response regulates expression of endoplasmic reticulum chaperones in non-stressed cells. **The EMBO Journal**, 16: 7207 – 7216.
- Brewer, J.W.; Hendershot, L.M.; Sherr, C.J.; Diehl, J.A. (1999). Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, 96: 8505 – 8510.

- Brodsky, J.L.; Hamamoto, S.; Feldheim, D.; Schekmam, R. (1993). Reconstitution of protein translocation from solubilized yeast membranes reveals topologically distinct roles for BiP and cytosolic Hsc 70. **The Journal of Cell Biology**, 120: 95 – 102.
- Brodsky, J.L.; McCracken, A.A. (1997). ER-associated and proteasome-mediated protein degradation: how two topologically restricted events came together. **Trends in Cell Biology**, 7: 151 – 156.
- Brodsky, J.L.; Wermer, E.D.; Dubas, M.E.; Goeckeler, J.L.; Kruse, K.B.; McCracken, A.A. (1999). The requirement for molecular chaperone during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. **Journal of Biological Chemistry**, 74: 3453 – 3460.
- Bukau, B.; Hesterkamp, T.; Lührink, J. (1996). Growing up in a dangerous environment: a network of multiple targeting and folding pathways for nascent polypeptides in the cytosol. **Trends in Cell Biology**, 6: 480 – 486.
- Buzeli, R.A.A.; Cascardo, J.C.M.; Rodrigues, L.A.Z.; Andrade, M.O.; Almeida, R.S.; Loureiro, M.E.; Otoni, W.C.; Fontes, E.P.B. (2002). Tissue-specific regulation of BiP genes: a cis-acting regulatory domain is required for BiP promoter activity in plant meristems. **Plant Molecular Biology**, 50: 757 – 771.
- Cabane, M.; Calvet, P.; Vincens, P.; Boudet, A.M. (1993). Characterization of chilling-acclimation-related proteins in soybean and identification of one as a member of the heat shock protein (HSP70) family. **Planta**, 190: 346 – 353.
- Carolino, S.M.B.; Vaez, J.R.; Irsigler, A.S.T.; Valente, M.A.S.; Rodrigues, L.A.Z.; Fontes, E.P.B. (2003). Plant *BiP* gene family: differential expression, stress induction and protective role against physiological stresses. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 15: 59 – 66.
- Cascardo, J.C.M.; Almeida, R.S.; Buzeli, R.A.A.; Carolino, S.M.B.; Otoni, W.C.; Fontes, E.P.B. (2000). The phosphorylation state and expression of soybean bip isoforms are differentially regulated following abiotic stresses. **The Journal of Biological Chemistry**, 275: 14494 – 14500.
- Cascardo, J.C.M.; Buzeli, R.A.A.; Almeida, R.S.; Otoni, W.C.; Fontes, E.P.B. (2001). Differential expression of the soybean BiP gene family. **Plant Science**, 160: 273 – 281.
- Cheng, M.Y.; Hartl, F.U.; Martin, J.; Pollock, R.A.; Kalousek, F.; Neupert, W.; Hallberg, E.M.; Hallberg, R.L.; Horwich, A.L. (1989). Mitochondrial heat-shock proteins hspP60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. **Nature**, 337: 620 – 625.
- Chrispeels, J. (1991). Sorting of proteins in the secretory system. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 42: 21 – 53.
- Coleman, C.E.; Lopes, M.A.; Gillikin, J.W.; Boston, R.S.; Larkins, B.A. (1995). A defective signal peptide in the maize high-lysine mutant *floury-2*. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, 92: 6828 – 6831.

- Copeland, C.S.; Doms, R.W.; Bolzau, E.M.; Webster, R.G.; Helenius, A. (1986). Assembly of influenza virus hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport. **Journal of Cell Biology**, 103: 1179 – 1191.
- Copeland, C.S.; Zimer, K.P.; Wagner, K.R.; Healey, G.A.; Mellman, I.; Helenius, A. (1988). Folding, trimerization, and transport are sequential events in the biogenesis of influenza virus hemagglutinin. **The Cell**, 53: 197 – 209.
- Crofts, A.J.; Denecke, J. (1998). Calreticulin and calnexin in plants. **Trends in Plant Science**, 3: 396 – 399.
- Csermely, P. (1997). Proteins, RNAs and chaperones in enzyme evolution: a folding perspective. **Trends in Biological Science**, 22: 147 – 149.
- da Silva Conceição, A.; Marty-Mazars, D.; Bassham, D.C.; Sanderfoot, A.A.; Marty, F.; Raikhel, N.V. (1997). The syntaxin homolog AtPEP12p resides on a late post-golgi compartment in plants. **The Plant Cell**, 9: 571 – 582.
- Dangl, J.L.; Dietrich, R.A.; Thomas, H. (2000). Senescence and programmed cell death. In: Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville : American Society of Plant Physiologists, 1044 – 1100.
- Denecke, J.; Goldman, M.H.; Demolder, J.; Seurinck, J.; Botterman, J. (1991). The tobacco luminal binding protein is encoded by a multigene family. **The Plant Cell**, 3: 1025 – 1035.
- Denecke, J.; De Rycke, R.; Botterman, J. (1992). Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmatic reticulum contain a conserved epitope. **The EMBO Journal**, 11: 2345 – 2355.
- Denecke, J.; Carlsson, L.E.; Vidal, S. (1995). The tobacco homolog of mammalian calreticulin is present in protein complexes in vivo. **The Plant Cell**, 7: 391 – 406.
- Denecke, J. (1996). Soluble endoplasmic reticulum resident proteins and their function in protein synthesis and transport. **Plant Physiology and Biochemistry**, 34: 197 – 205.
- DiCola, A.; Frigerio, L.; Lord, J.M.; Ceriotti, A.; Roberts, L.M. (2001). Ricin A chain without its partner B chain is degraded after retrotranslocation from the endoplasmatic reticulum to the cytosol in plant cells. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, 98: 14726 – 14731.
- Dorner, A.J.; Bole, D.G.; Kaufman, R.J. (1987). The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins. **Journal of Cell Biology**, 105: 2665 – 2674.
- Dorner, A.J.; Krane, M.G.; Kaufman, R.J. (1988). Reduction of endogenous GRP 78 levels improves secretion of heterologous protein in CHO cells. **Molecular Cell Biology**, 8: 4063 – 4070.
- Drickamer, K.; Taylor, M. (1998). Evolving views of protein glycosylation. **Trends in Biological Sciences**, 23: 321 – 324.

- Ellis, R.J.; van Der Vies, S.M.; Hemmingsen, S.M. (1989). The molecular chaperone concept. **Biochemistry Soc. Symp.**, 55: 145 – 153.
- Ellis, R.J. e van Der Vies, S.M. (1991). Molecular chaperones. **Annual Review of Biochemistry**, 60: 321 – 347.
- Elmendorf, H.G. e Haldar, K. (1993). Identification and localization of ERD2 in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: separation from sites of sphingomyelin synthesis and implications for organization of the Golgi. **The EMBO Journal**, 12: 4763 – 4773.
- Figueiredo, J.E.F.; Cascardo, J.C.M.; Carolino, S.M.B.; Alvim, F.C.; Fontes, E.P.B. (1997). Water-stress regulation and molecular analysis of the soybean BiP gene family. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 9: 103 – 110.
- Fontes, E.P.B.; Silva, C.J.; Carolino, S.M.B. (1996). A soybean binding protein (BiP) homologue is temporally regulated in soybean seeds and associates detectably with normal storage proteins *in vitro*. **Brazilian Journal of Genetics**, 19: 305 – 312.
- Fontes, E.P.B.; Shank, B.B.; Wrobel, R.L.; Moose, S.P.; O'Brian, G.R.; Wurtzel, E.T.; Boston, R.S. (1991). Characterization of an immunoglobulin binding protein homolog in the maize floury-2 endosperm mutant. **The Plant Cell**, 3: 483 – 496.
- Fontes, M.A.; Otoni, W.C.; Carolino, S.M.B.; Brommonschenkel, S.H.; Fontes, E.P.B.; Fári, M.; Louro, R.P. (1999). Hyperhydricity in pepper plants regenerated *in vitro*: involvement of bip (binding protein) and ultrastructural aspects. **Plant Cell Reports**, 19: 81 – 87.
- Foti, D.M.; Welihinda, A.; Kaufman, R.J.; Lee, A.S. (1999). Conservation and divergence of the yeast and mammalian unfolded protein response. **Journal of Biological Chemistry**, 274: 30402 – 30409.
- Galili, G.; Sengupta-Gopalani, C.; Ceriotti, A. (1998). The endoplasmic reticulum of plant cells and its role in protein maturation and biogenesis of oil bodies. **Plant Molecular Biology**, 38: 1 – 29.
- Gething, M.J.; McCammon, K.; Sambrook, J. (1986). Expression of wild type and mutant forms of influenza hemagglutinin: the role of folding in intracellular transport. **The Cell**, 46: 939 – 959.
- Gething, M.J. e Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. **Nature**, 335: 33 - 45.
- Gething, M.J. (1999). Role and regulation of the ER chaperone BiP. **Sem. Cell Dev. Biology**, 10: 465 – 472.
- Gillink, J.W.; Zhang, F.; Coleman, C.E.; Bass, H.W.; Larkins, B.A.; Boston, R.S. (1997). A defective signal peptide tethers the *floury-2* zein to the endoplasmic reticulum membrane. **Plant Physiology**, 114: 345 – 352.
- Gilmore, R. (1993). Protein translocation across the endoplasmic reticulum: a tunnel with toll booths at entry and exit. **The Cell**, 75: 589 – 592.

- Goloubinoff, P.; Gatenby, A.A.; Lorimer, G.H. (1989). GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic bisphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. **Nature**, 337: 44 – 47.
- Gonzalez, T.N.; Sidrauski, C.; Dörfler, S.; Walter, P. (1999). Mechanism of non-spliceosomal mRNA splicing in the unfolded protein response. **The EMBO Journal**, 18: 3119 – 3132.
- Hammond, C.; Helenius, A. (1995). Quality control in the secretory pathway. **Current Opinion in Cell Biology**, 7: 523 – 529.
- Hartl, F.V. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, 381: 571 – 580.
- Hasegawa, P.M.; Bressan, R.A.; Handa, S.; Handa, A.K. (1984). Cellular mechanisms of tolerance to water stress. **Hortscience**, 19: 371-377.
- Helenius, A.; Marquardt, T.; Braakman, I. (1992). The endoplasmic reticulum as a protein-folding compartment. **Trends in Cell Biology**, 2: 227 – 231.
- Helenius, A.; Trobetta, E.S.; Hebert, D.N.; Simons, J.F. (1997). Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. **Trends in Cell Biology**, 7: 143 – 200.
- Hendershot, L.M.; Bole, D.; Köhler, G.; Kearney, J.F. (1987). Assembly and secretion of heavy chains that do not associate posttranslationally with immunoglobulin heavy chain-binding protein. **The Journal of Cell Biology**, 104: 761 – 767.
- Hiller, M.M.; Finger, A.; Schweiger, M.; Wolf, D.H. (1996). ER degradation of misfolded luminal proteins by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. **Science**, 273: 1725 – 1728.
- Höhfeld, J.; Cyr, D.M.; Patterson, C. (2001). From the cradle to the grave molecular chaperones that may choose between folding and degradation. **EMBO Reports**, 2: 885 – 890.
- Horwich, A.L.; Low, K.B.; Fenton, W.A.; Hirshfield, I.N.; Furtak, K. (1993). Folding in vivo of bacterial cytoplasmic proteins. **The Cell**, 74: 909 – 917.
- Horwich, A.L.; Weber-Ban, E.U.; Finley, D. (1999). Chaperone rings in protein folding and degradation. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, 96: 11033 – 11040.
- Hsu, V.W.; Shah, N.; Klausner, R.D. (1992). A brefeldin A-like phenotype is induced by the overexpression of a human ERD-2like protein, ELP-1. **The Cell**, 69: 625 – 653.
- Hurtley, S.M.; Bole, D.G.; Hoover-Litty, H. (1989). Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein BiP. **The Journal of Cell Biology**, 108: 2127 – 2136.
- Jefferson, R.A.(1987). Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reporter**, 5: 387 – 405.

- Jefferson, R.A.; Kavanagh, T.A.; Bevan, M.W. (1987). *GUS* fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, 6: 3901 – 3907.
- Jelito-van Dooren, E.P.W.M.; Vidal, S.; Denecke, J. (1999). Anticipating endoplasmic reticulum stress: A novel early response before pathogenesis-related gene induction. **The Plant Cell**, 11: 1935 – 1943.
- Jiang, L.; Rogers, J.C. (1999). Sorting of membrane proteins to vacuoles in plant cells. **Plant Science**, 146: 55 – 67.
- Kalinski, A.; Kowley, D.L.; Loer, D.S.; Foley, C.; Buta, G.; Herman, E.M. (1995). Binding- protein expression is subject to temporal, developmental and stress-induced regulation in terminally differential soybean organs. **Planta**, 195: 611 – 621.
- Karchi, H.; Miron, D.; Benyaacov, S.; Galili, G. (1995). The lysine-dependent stimulation of lysine catabolism in tobacco seed requires calcium and protein-phosphorylation. **The Plant Cell**, 7: 1963 – 1970.
- Kassenbrock, C.K.; Garcia, P.D.; Walter, P.; Kelly, R.B. (1988). Heavy-chain binding protein recognizes aberrant polypeptides translocated *in vitro*. **Nature**, 333: 90 – 93.
- Kassenbrock, C.K.; Kelly, R.B. (1989). Interaction of heavy chain binding protein with adenine nucleotides. **The EMBO Journal**, 8: 1461 – 1467.
- Kimata, Y.; Kimata, Y.I.; Shimizu, Y.; Abe, H.; Farcasano, J.C.; Takeochi, M.; Rose, D.M.; Cono, K. (2003). Genetic evidence for a role of BiP/Kar2 that regulates Ire1 in response to accumulation of unfolded proteins. **Molecular Biology of the Cell**, 14: 2559 – 2569.
- Knittler, M.R.; Haas, I.G. (1992). Interaction of BiP with newly-synthesized immunoglobulin light chain molecules: cycles of sequential binding and release. **The EMBO Journal**, 11: 1573 – 1581.
- Kohno, K.; Normington, K.; Sambrook, J.; Gething, M.J.; Mori, K. (1993). The promoter region of the yeast *KAR2* (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. **Molecular Cell Biology**, 13: 877 – 890.
- Koizumi, N.; Ujino, T.; Sano, H.; Chrispeels, M.J. (1999). Overexpression of a gene that encodes the first enzyme in the biosynthesis of asparagine-linked glycans makes plants resistant to tunicamycin and obviates the tunicamycin-induced unfolded protein response. **Plant Physiology**, 121: 353 – 361.
- Kokame, K.; Kato, H.; Miyata, T. (2001). Identification of ERSE-II, a new *cis*-acting element responsible for the ATF-6 dependent mammalian unfolded response. **Journal Biology Chemistry**, 276: 9199 – 9205.
- Kreis, T.E. e Lodish, H.F. (1986). Oligomerization is essential for transport of vesicular stomatitis viral glycoprotein to the cell surface. **The Cell**, 46: 929 – 937.
- Lacorte, C. (1998). β -glucuronidase. In: Brasileiro, A.C.M.; Carneiro, V.T.C. (1998). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília:EMBRAPA-SPI.

- Leborgne-Castel, N.; Jelito van-Dooren, E.P.W.M.; Crofts, A.J.; Denecke, J. (1999). Overexpression of BiP in tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress. **The Plant Cell**, 11: 459 – 469.
- Lee, A.S. (1987). Coordinated regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells. **Trends in Biochemistry Science**, 12: 20 – 23.
- Lee, A.S. (1992). Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family. **Current Opinion in Cell Biology**, 4: 267 – 273.
- Lee, H.; Gal, S.; Newman, T.C.; Raikhel, N.V. (1993). The arabdopsis ER retention receptor functions in yeast. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, 90: 11433 – 11437.
- Lewis, M.J.; Sweet, D.J.; Pelham, H.R.B. (1990). The ERD2 gene determinates the specificity of the luminal ER protein retention system. **The Cell**, 61: 1359 – 1363.
- Lippincott-Schwartz, J.; Bonifacino, J.S.; Yuan, L.C.; Klausner, R.D. (1988). Degradation from the endoplasmic reticulum: disposing of newly synthesized proteins. **The Cell**, 54: 209 – 220.
- Lodish, H.F. (1988). Transport of secretory and membrane glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi. **The Journal of Cell Biology**, 263: 2107 – 2110.
- Martin, J.; Hartl, F.U. (1993). Protein folding in the cell: molecular chaperones pathway. **Current Biology**, 1: 161 – 164.
- Mathew, A.; Mathur, S.K.; Morimoto, R.I. (1998). Heat shock response and protein degradation: regulation of HSF2 by the ubiquitin-proteasome pathway. **Molecular and Cellular Biology**, 18: 5091 – 5098.
- Mayer, T.U.; Braun, T.; Jentsch, S. (1998). Role of the proteasome in membrane extraction of a short-lived ER-transmembrane protein. **The EMBO Journal**, 17: 3251 – 3257.
- McKay, D.B. (1993). Structure and mechanism of the 70-kDA heat-shock-related proteins. **Advance in Protein Chemistry**, 44: 67 – 98.
- Meldonesi, J.; Pozzan, T. (1998). The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. **Trends in Biological Sciences**, 23: 10 – 14.
- Milarski, K.L.; Morimoto, R.I. (1989). Mutational analysis of the human HSP-70 protein: distinct domains for nucleolar localization and adenosine triphosphate binding. **The Journal of Cell Biology**, 109: 1947 – 1962.
- Mori, K.; Sant, A.; Khono, K.; Normington, K.; Gething, M.J.; Sambrook, J.K. (1992). A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins. **The EMBO Journal**, 11: 2583 – 2593.
- Morrè, D.J.; Mollenhauer. (1974). The endomembrane concept: a functional integration of the endoplasmic reticulum and golgi apparatus. **In: Dynamic Aspects of Plant Ultrastructure**, A. W. Robards, London.

- Morris, J.A.; Dorner, A.J.; Edwards, C.A.; Hendreshot, L.M.; Kaufman, J. (1997). Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. **Journal of Biological Chemistry**, 272: 4327 – 4334.
- Munro, S.; Pelham, H.R.B. (1986). A Hsp70-like protein in the ER: with the 78kDa glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. **The Cell**, 46: 291 – 300.
- Munro, S. e Pelham, H.R.B. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. **The Cell**, 48: 899 – 907.
- Murashige, T.; Skoog, F.A. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473 – 497.
- Normington, K.; Khono, K.; Kozutsumi, Y.; Gething, M.J.; Sambrook, J. (1989). *Saccharomyces cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. **The Cell**, 57: 1223 – 1236.
- Okada, T.; Yoshida, H.; Akezawa, R.; Negishi, M.; Mori, K. (2002). Distinct roles of ATF-6 and PERK in transcription during mammalian unfolded protein response. **Biochemistry Journal**, 366: 585 – 594.
- Pedra, J.H.F.; Delú-Filho, N.; Pirovani, C.P.; Contim, L.A.S.; Dewey, R.E.; Otoni, W.C.; Fontes, E.P.B. (2000). Antisense and sense expression of a sucrose binding protein homologue gene from soybean in transgenic tobacco affects plant growth and carbohydrate partitioning in leaves. **Plant Science**, 152: 87 – 98.
- Pelham, H.R.B. (1988). Coming in from the cold. **Nature**, 332: 776 – 777.
- Pelham, H.R.B. (1989). Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. **Annual Review of Cell Biology**, 5: 1 – 23.
- Pelham, H.R.B. (1990). The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends in Biochemistry Science*, 15: 483 – 486.
- Picoli E.A.T.; Figueira, M.L.; Otoni, W.C.; Carolino, S.M.B.; Almeida, R.S.; Silva, E.A.M.; Carvalho, C.R.; Fontes, E.P.B. (2001) Hyperhydricity in in vitro eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). **Plant Science**, 160: 857 – 868.
- Rassow, J.; von Ahsen, O.; Bömer, U.; Pfaner, N. (1997). Molecular chaperones: towards a characterization of the heat-shock protein family. **Trends in Cell Biology**, 7: 129 – 133.
- Resendez, E.J.; Wooden, S.K.; Lee, A.S. (1988). Identification of highly conserved regulatory domains and protein-binding sites in the promoters of the rat and human genes encoding the stress-inducible 78-kilodalton glucose-regulated protein. **Molecular Cell Biology**, 10: 4579 – 4584.
- Rexach, M.F.; Latterich, M.; Schekman, R.W. (1994). Characteristics of endoplasmic reticulum-derived transport vesicles. **The Journal of Cell Biology**, 126: 1133 – 1148.

- Rose, J.K.; Doms, R.W. (1988). Regulation of protein export from the endoplasmic reticulum. **Annual Review of Cell Biology**, 4: 257 – 288.
- Rothman, J.E. (1989). Polypeptide chain-binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells. **The Cell**, 59: 591 – 601.
- Roy, B.; Li, W.; Lee, A.S. (1996). Calcium-sensitive transcriptional activation of the proximal CAAT regulatory element of the *grp78/BiP* promoter by the human nuclear factor CBF/NF-Y. **Journal of Biological Chemistry**, 271: 28995 – 29002.
- Roy, B.; Lee, A.S. (1999). The mammalian endoplasmic reticulum stress response element consists of a evolutionarily conserved tripartite structure and interacts with a novel stress- inducible complex. **Nucleic Acids Reserch**, 27: 1437 – 1443.
- Saloheimo, M.; Lund, M.; Penttilä, M.E. (1999). The protein disulphide isomerase gene of the fungus *Thricoderma reesei* is induced by endoplasmic reticulum stress and regulated by the carbon source. **Molecular General Genetics**, 262: 35 – 45.
- Sanderfoot, A.A.; Raikhel, N.V. (1999). The specificity of vesicle trafficking coat proteins and SNARs. **The Plant Cell**, 11: 629 – 641.
- Sanders, S.L.; Whitfield, K.M.; Vogel, J.P. (1992). Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. **The Cell**, 69: 353 – 365.
- Semenza, J.C.; Hardwick, K.G.; Dean, N.; Pelham, H.R.B. (1990). ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. **The Cell**, 61: 1349 – 1357.
- Shamu, C.E.; Cox, J.S.; Walter, P. (1994). The unfolded protein response pathway in yeast. **Trends in Cell Biology**, 4: 56 – 60.
- Shamu, C.E.; Walter, P. (1996). Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. **The EMBO Journal**, 15: 3028 – 3039.
- Sidrauski, C.; Cox, J.S.; Walter, P. (1996). tRNA ligase is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response. **The Cell**, 87: 405 – 413.
- Sidrauski, C.; Walter, P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. **The Cell**, 90: 1031 – 1039.
- Sidrauski, C.; Chapman, R.; Walter, P. (1998). The unfolded protein response: an intracellular signaling pathway with many surprising features. **Trends in Cell Biology**, 8: 245 – 249.
- Simons, J.H.; Ebersold, M.; Helenius, A. (1998). Cell wall 1,6- β -glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on ER glucosidases I and II, and the molecular chaperone BiP/Kar2p. **The EMBO Journal**, 17: 396 – 405.
- Tang, B.I.; Wong, S.H.; Qi, X.I.; Low, S.H.; Hong, W. (1993). Molecular cloning, characterization, subcellular localization and dynamics of p23, the mammalian KDEL receptor. **The Journal of Cell Biology**, 120: 325 – 338.

- Tatu, U.; Helenius, A. (1997). Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. **The Journal of Cell Biology**, 136: 555 – 565.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2004). *Fisiologia Vegetal*, Artmed, Porto Alegre.
- Tepfer, M.; Casse-Delbart, F. (1987). *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. **Microbiological Science**, 4: 24 – 28.
- Ting, J.; Lee, A. (1988). A human gene encoding the 78,000 Dalton glucose-regulated protein and its pseudo-gene structure, conservation and regulation. **DNA**, 7: 275 – 286.
- Trewavas, A. (1999). Le calcium, c'est la vie: calcium makes waves. **Plant Physiology**, 120: 1 – 6.
- Trewavas, A.; Malhó, R. (1998). Ca²⁺ signaling in plants cells: the big network. **Current Opinion in Plant Biology**, 1: 428 – 433.
- Townsley, F.M.; Frigerio, G.; Pelham, H.R.B. (1994). Retrieval of HDEL proteins is required for growth of yeast cells. **The Journal of Cell Biology**, 127: 21 – 28.
- van Geremen, I.A.; Punt, P. J.; Drint-Kuyvenhoven, A. (1997). The ER chaperone encoding BiP A gene of black *Aspergilli* is induced by heat shock and unfolded proteins. **Gene**, 198: 43 – 52.
- van den Elzen, P.J.M.; Townsend, J.; Lee, K.Y.; Bedbrook, J.R. (1985). A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. **Plant Molecular Biology**, 5: 299 – 302.
- Vitale, A.; Ceriotti, A.; Denecke, J. (1993). The role of the endoplasmic reticulum in protein synthesis, modification and intracellular transport. **Journal of Experimental Botany**, 44: 1417 – 1444.
- Vitale, A.; Raikhel, N.V. (1999). What do proteins need to reach different vacuoles. **Trends in Plant Science**, 4: 149 – 155.
- Vogel, J.P.; Misra, L.M.; Rose, M.D. (1990). Loss of BiP/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast. **Journal of Cell Biology**, 110: 1885 – 1895.
- Wang, X.Z.; Harding, H.P.; Zhang, Y.; Jolicouer, E.H.; Kuroda, M.; Ron, D. (1998). Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. **The EMBO Journal**, 17: 5708 – 5717.
- Welihinda, A.A.; Tirasophon, W.; Green, S.R.; Kaufman, R. (1997). Gene induction in response to unfolded protein in the endoplasmic reticulum is mediated through Ire1p kinase interaction with a transcriptional coactivator complex containing Ada5p. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, 94: 4289 – 4294.
- Yoshida, H.; Haze, K.; Yanagi, H.; Yura, T.; Mori, K. (1997). Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. **The Journal of Biological Chemistry**, 273: 33741 – 33749.