

REGINALDO APARECIDO ALVES BUZELI

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES QUE CODIFICAM  
A PROTEÍNA BIP DE SOJA E ANÁLISE FUNCIONAL DE SEUS  
PROMOTORES**

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2001

REGINALDO APARECIDO ALVES BUZELI

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES QUE CODIFICAM  
A PROTEÍNA BIP DE SOJA E ANÁLISE FUNCIONAL DE SEUS  
PROMOTORES**

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  
2001

REGINALDO APARECIDO ALVES BUZELI

# **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES QUE CODIFICAM A PROTEÍNA BIP DE SOJA E ANÁLISE FUNCIONAL DE SEUS PROMOTORES**

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: 9 de Agosto de 2001.

---

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro  
(Conselheiro)

---

Prof. Sebastião Tavares de Rezende

---

Prof. Carlos Alberto Martinez Y Huaman

---

Dra Cláudia Teixeira Guimarães

---

Prof<sup>a</sup> Elizabeth Pacheco Batista Fontes  
(Orientadora)

**À Musicoterapeuta, Professora Dra. ANNA CECÍLIA MÜLLER CORRÊA, com seus quase 70 anos, cientista brilhante e pessoa grandiosa, pela amizade e pelos ensinamentos sobre a música e sobre importantes conceitos sobre a vida que deram uma nova perspectiva em minha vida. Com muito carinho, respeito e admiração.**

*Dedico*

**Aos meus Pais (José Festuci Buzeli e Elza Alves Buzeli), Irmãos (Susana, Silvana, Suzimar, Ricardo e Silmara) e aos meus cunhados (Rubens, Val e Fábio). Em especial, à Susana, Silvana e ao Val, por todo apoio durante esses anos em Viçosa.**

***Dedico***

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Fisiologia Vegetal e ao BIOAGRO, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

À Professora Dra. Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela competente orientação e pela valiosa colaboração durante a realização desse trabalho.

Aos conselheiros, Professores Dr. Maurílio Alves Moreira, Dr. Wagner Campos Otoni e Dr. Marcelo Ehlers Loureiro, pelas críticas e sugestões.

Aos membros da banca examinadora, Professores, Dr. Carlos Alberto Martinez Y Huaman, Dra. Cláudia Teixeira Guimarães, Dr. Marcelo Ehlers Loureiro e Dr. Sebastião Tavares de Rezende pela disposição, pelas críticas e pelas sugestões.

Ao Professor Dr. Wagner Campos Otoni pela amizade e pelo apoio.

Aos Professores do curso de Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos e agradável convívio, em particular aos Professores Dr. Paulo Roberto Mosquim, Dr. Raimundo Santos Barros e ao Dr. Fábio Murilo da Mata.

Aos funcionários do BIOAGRO e do Departamento de Biologia Vegetal.

A Júlio César de Mattos Cascardo, pela amizade, pelos ensinamentos e pela co-orientação durante meu aprendizado como estudante de Iniciação Científica.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Andreia, Adriana, Adriano, Antônio Augusto, Cristiano, Jefferson, Jocy, Leonardo, Lília, Luiz, Maxuel e Sônia, pela valorosa colaboração e pelo companheirismo.

À Marcelo Fontes, pela amizade e pelas valiosas informações sobre Purdue.

Aos amigos Leonardo Augusto Zebral, Luiz A. S. Contim, Rodrigo Ribeiro Leão e João Helbert Ferreira Pedra pela amizade, companheirismo e pelo apoio. Em especial, ao Aloisio Stein de Carvalho Dias pelo excelente convívio durante esses anos em Viçosa.

Aos colegas de curso, pelo companheirismo e pelos grandes momentos compartilhados.

À Zilda Alzira Soares pelos cortes anatômicos mostrados neste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao PADCT pelo financiamento do projeto.

## **BIOGRAFIA**

REGINALDO APARECIDO ALVES BUZELI, filho de José Festuci Buzeli e Elza Alves Buzeli, nasceu em 21 de setembro de 1973, em Morro Agudo - SP.

Em 1994, iniciou o Curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, obtendo o título de Engenheiro Agrônomo em 1999.

Durante a graduação desenvolveu dois trabalhos que foram publicados em The Journal of Biological Chemistry e Plant Science.

Em Março de 2000, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em Agosto de 2001.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>04</b>
2.1. A rota secretora.....	04
2.2. Chaperones moleculares.....	05
2.3. BiP ( <i>Binding Protein</i> ).....	07
2.4. Via de resposta a proteínas mal dobradas UPR no RE.....	09

2.5.	Organização e regulação da expressão dos genes BiP.....	12
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
3.1.	Isolamento e purificação dos clones genômicos de BiP.....	16
3.2.	Purificação de fragmentos de DNA de gel de agarose.....	16
3.3.	Marcação de sonda.....	17
3.4.	Isolamento de DNA genômico proveniente da bibliotecaλEMBL3.....	18
3.5.	Excisão do DNA recombinante isolado da bibliotecaλZAPII.....	18
3.6.	Isolamento de DNA plasmidial.....	19
3.7.	“Southern blot”.....	21
3.8.	Obtenção de células competentes de <i>E. coli</i> .....	22
3.9.	Obtenção dos sub-clones dos clones genômicos .....	22
3.10.	Confecção do mapa de restrição.....	24
3.11.	Reação de sequenciamento dos sub-clones.....	24
3.12.	Análises de comparação de sequências dos sub-clones.....	26
3.13.	Determinação do sítio de início da transcrição.....	26
3.13.1.	Reação de sequenciamento.....	26
3.13.2.	Reação de extensão de “primer”.....	27
3.13.3.	Gel de sequenciamento.....	28
3.14.	Clonagem do promotor.....	29
3.15.	Obtenção de células competentes de <i>Agrobacterium</i> sp.....	30
3.16.	Eletroporação de <i>Agrobacterium</i> sp.....	31
3.17.	Obtenção e cultivo de <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Havana <i>in vitro</i> .....	31
3.18.	Transformação de <i>Nicotiana tabacum</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	32
3.19.	Análises histoquímicas e microscópicas.....	33
3.20.	Análise da expressão do promotor de BiP sob diferentes condições de estresses.....	33
3.21.	Avaliação da atividade de GUS em discos foliares de tabaco.....	34
3.22.	Eletroforese em gel de acrilamida e detecção imunológica .....	34
3.23.	Clonagem do cDNA de BiP no vetor de expressão de bactéria pET16b.....	35
3.24.	Expressão da proteína BiP em <i>E. coli</i> e purificação da proteína recombinante.....	36
3.25.	Produção de anticorpos policlonais contra BiP.....	38
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
4.1.	Isolamento dos clones genômicos gsBiP6 e gsBiP9.....	39

4.2.	Mapa de restrição dos clones genômicos gsBiP6 e gsBiP9.....	39
4.3.	Caracterização molecular do clone gsBiP9.....	42
4.4.	Análise de seqüência de promotores de BiP.....	49
4.5.	Os genes quiméricos gsBiP6:GUS e gsBiP9:GUS exibem regulação similar aos genes BiP de plantas sob condições de estresses.....	55
4.6.	Distribuição espacial da atividade de GUS em folhas, caules e raízes transgênicas.....	59
4.7.	Um domínio cis-regulador é requerido para a expressão de BiP em meristemas.....	63
4.8.	Ativação de promotores de gsBiP6 e gsBiP9 por estresse osmótico....	66
4.9.	O domínio regulatório cis-atuante 2 contém seqüências UPRE funcionais e elementos que respondem a estresse osmótico .....	68
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>

	<b>APÊNDICE I.....</b>	<b>86</b>
<b>1.</b>	<b>Clonagem molecular, expressão heteróloga e purificação da proteína BiP (<i>Binding Protein</i>) de soja (<i>Glycine max</i>) e produção de anticorpos.....</b>	<b>87</b>
1.1.	Clonagem molecular do cDNA de soyBiPD no vetor de expressão em bactérias pET16b.....	87
1.2.	Indução, confirmação da identidade da proteína recombinante por meio de “Western blot” e purificação da proteína BiP.....	88
1.3.	Produção da proteína BiP em alta escala.....	89
1.4.	Produção e análise da especificidade de anticorpos.....	89

## RESUMO

BUZELI, Reginaldo Aparecido Alves, M. S., Universidade Federal de Viçosa, August 2001. **Caracterização molecular de genes que codificam a proteína BiP de soja e análise funcional de seus promotores.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Conselheiros: Wagner Campos Otoni, Marcelo Ehlers Loureiro e Maurílio Alves Moreira.

A proteína BiP (Binding Protein) está envolvida no dobramento correto de proteínas secretórias e retenção no RE de proteínas dobradas ou montadas incorretamente. BiP também atua auxiliando na solubilização de agregados protéicos durante períodos de estresses. Dois clones de BiP de soja, denominados gsBiP6 e gsBiP9, foram isolados a partir das bibliotecas genômicas provenientes dos fagos  $\lambda$ EMBL3 e  $\lambda$ ZAP II, respectivamente. 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 elementos G-box. Os promotores de BiP foram fusionados ao gene repórter *gus* e usados para transformar *Nicotiana tabacum* via *A. tumefaciens*. Análises histoquímicas de plantas transformadas com as construções -358pbip6-*gus* ou -2200pbip9-*gus* revelaram que os promotores de BiP produziram um padrão uniforme de expressão de GUS em folhas, caules e raízes. Intensa atividade histoquímica de GUS foi observada nos feixes vasculares de folhas, caule e raízes e em regiões de traço foliar, assim como, no meristema apical, local onde ocorre intensa divisão celular. Este padrão de distribuição espacial da atividade de GUS sugere estar 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. Coerente com esta observação, a atividade histoquímica de GUS é muito menos intensa no parênquima xilemático. Deleções do promotor de gsBiP6 foram conduzidas na orientação 5' - 3' (-138pbip6-*gus*) e no interior do clone  $\Delta(-226/-82)$ pbip6-*gus*. Análise dessas deleções em plantas transformadas, identificaram 2 domínios regulatórios *cis*-atuantes, denominados CRD1 (-358 a -226) e CRD2 (-226 a -82). A região CRD1 exibe atividade de *enhancer*, já que foi capaz de restaurar altos níveis de expressão basal do gene repórter *gus*, quando ligada à extremidade 5' na posição -82 do promotor de BiP6. A região CRD2 contém tanto *cis*-elementos regulatórios positivos quanto *cis*-elementos negativos que contribuem para o padrão tecido-específico de expressão controlado pelo promotor de gsBiP6. A expressão do gene repórter na região do procâmbio em raízes, no meristema apical e no floema de caule foi absolutamente dependente da região CRD2. Em contraste, deleção de CRD2 resultou em acúmulo acentuado de atividade de GUS no parênquima xilemático. A ativação dos promotores BiP6 e BiP9 em resposta ao acúmulo de proteínas anormais no retículo endoplasmático (UPR) e em respostas a estresse osmótico foi avaliada em discos foliares transgênicos. Tratamento dos discos foliares com tunicamicina, ativador da via UPR, e com PEG, indutor de um estresse osmótico, induziu a expressão de GUS, sob o controle do promotor BiP6 e do promotor BiP9. A deleção da região

CRD2 (-226 a -82) no promotor BiP6 causou a perda da inducibilidade da expressão gênica em resposta a tunicamicina e PEG, indicando que CRD2 contém elementos *cis*-atuantes de resposta a estresse. De fato, dois *cis*-elementos conservados atuantes na via UPR (UPRE) foram identificados na região CRD2. Coletivamente, estes resultados sugerem que o controle da expressão de BiP em plantas depende de uma complexa integração de múltiplos *cis*-elementos regulatórios no promotor.

## ABSTRACT

BUZELI, Reginaldo Aparecido Alves, M. S., Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2001. **Molecular characterization of genes that encoding soybean BiP protein and promoters functional analysis.** Advisor: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Committee members: Wagner Campos Otoni, Marcelo Ehlers Loureiro e Maurílio Alves Moreira.

The binding protein BiP is involved in the correct folding of secretory proteins and retention in the RE of unfolded proteins. BiP also prevents nonproductive intermolecular interactions of folding intermediates and subsequent misaggregation of proteins during stress conditions. We have isolated two genomic clones named gsBiP6 and gsBiP9 from  $\lambda$ EMBL3 and  $\lambda$ ZAP II genomic libraries, respectively. The gsBiP6 and gsBiP9 promoters have general motifs founded in plant gene promoters, such as CAAT and TATA sequence, and specific motifs, such as endoplasmatic reticulum stress response element (ERSE) and G-box elements. The BiP promoters were fused to the reporter gene  $\beta$ -glucuronidase (GUS) and introduced into tobacco plants

via *Agrobacterium tumefaciens* transformation. Histochemical analysis of transformed plants with the constructions -358pbip6-gus or -2200pbip9-gus revealed that the BiP promoters produced a uniform pattern of the GUS expression in leaves, stems, and roots. Intense GUS histochemical activity was observed in the vascular region of leaves, stems and roots, and in the leaf trace region as well as in the apical meristem, place where intense cellular division happens. This pattern of space distribution of the GUS activity suggests to be correlated with an expression of those genes in places that have high cellular secretory activity and high proportion of cells in an active process of cellular division. Coherent with this observation, the histochemical activity of GUS is much less intense in the xylem parenchyma. The gsBiP6 promoter deletions were driven in the 5' - 3' orientation (-138pbip6-gus) and intern region  $\Delta(-226/-82)$ pbip6-gus. Analysis of those deletions in transformed plants identified two regulatory domains cis-acting, denominated CRD1 (-358 to -226) and CRD2 (-226 to -82). The CRD1 exhibits enhancer activity, since it was capable to recuperate high levels of basal expression of the gus reporter gene when linked to the extremity 5' in the position -82 of the BiP6 promoter. The CRD2 contains positive regulatory cis-elements, as negative regulatory cis-elements that contribute to the specific pattern of expression controlled by the gsBiP6 promoter. The reporter gene expression in the root procambium region, in the apical meristem and in the phloem stem, was absolutely dependent on the CRD2. In contrast, CRD2 deleted resulted in accentuated accumulation of GUS activity in the xylem parenchyma. The activation of the BiP6 and BiP9 promoters, in response to the unfolded proteins response in the endoplasmatic reticulum (UPR) and osmotic stress condition, were evaluated in transgenic leaf disks. Leaf disks incubated with tunicamycin, activator of the UPR, and with PEG, inductor of an osmotic stress, induced the expression of GUS, under the BiP6 and BiP9 promoters control. The CRD2 (-226 to -82) deleted in the BiP6 promoter caused the loss of the induction of the expression in response to tunicamycin and PEG, indicating that CRD2 contains responsive cis-acting elements under stress conditions. In fact, two conserved cis-acting elements in the UPR (UPRE) were identified in the CRD2. Collectively, these results suggest that the control of the expression of BiP in plants depends on a complex integration of multiple regulatory cis-elements in the promoter.

## 1. INTRODUÇÃO

O início do transporte através da via secretora é caracterizado pela translocação de proteínas dos polissomos para o interior do Retículo Endoplasmático (RE). Neste compartimento, as proteínas são processadas e posteriormente endereçadas para diferentes estruturas subcelulares ou secretadas, passando pelo complexo de Golgi (REXACH et al., 1994; CHRISPEELS, 1991). O dobramento correto das proteínas transmembranas e secretórias em estruturas multiméricas ocorre no RE (HELENIUS et al., 1992). Estruturas terciárias e quaternárias corretas são requeridas para o transporte de proteínas recém sintetizadas para o complexo de Golgi. Proteínas que, por algum motivo, não atingem a conformação correta, tendem a formar agregados, permanecem no RE e são degradadas por enzimas proteolíticas (HURTLEY et al., 1989). A presença de um fator restritivo no tráfego de proteínas revela a existência de mecanismos de "controle de qualidade" que atuam impedindo que proteínas anormais, portanto incapazes de desempenhar suas funções biológicas, sejam enviadas para outras organelas ou secretadas (LIPPINCOTT-SCHWARTZ et al., 1988; LODISH, 1988; ROSE & DOMS, 1988; COPELAND et al., 1986, 1988; GETHING et al., 1986; KREIS et al., 1986).

A proteína BiP é um chaperone molecular residente no RE, e membro da família de proteínas que respondem ao choque térmico (HSP70). BiP possui um importante papel na translocação de proteínas nascentes através da membrana do Retículo Endoplasmático. Associado a outros chaperones

chamadas reticuloplasminas, BiP facilita a translocação, dobramento correto e maturação de proteínas recém sintetizadas, evitando interações não-produtivas (VITALE et al., 1993). BiP pode também se ligar a proteínas mal dobradas redirecionando-as para degradação (HORWICH et al., 1999; MATHEW et al., 1998; MAYER et al., 1998; BRODSKY & MCCRAKEN, 1997; HILLER et al., 1996). No processo de translocação co-traducional de proteínas secretórias para o lúmen do RE, a proteína BiP pode atuar selando a extremidade do *translocom* voltada para o lúmen do retículo endoplasmático (RE) ou ligando-se às proteínas no lúmen do *translocom*, minimizando o movimento retrógrado das proteínas nascentes que se encontram no mesmo (MATLACK et al., 1999; HAMMAN et al., 1998). Além disso, BiP associa-se a polipeptídeos nascentes assim que são translocados para o lúmen do RE, auxiliando o dobramento e a montagem correta através da formação de complexos intermediários, evitando a formação de agregados de proteínas no RE (THULASIRAMAN & MATTS, 1996; SANDERS et al., 1992; NGUYEN et al., 1991).

A rota de resposta a proteínas mal dobradas (UPR, “Unfolded Protein Response”) é induzida após o acúmulo de proteínas mal dobradas dentro do lúmen do RE e resulta no aumento da expressão de genes que codificam proteínas residentes no RE e proteínas responsáveis pela ativação da UPR (FOTI et al., 1999; GONZALEZ et al., 1999; SIDRAUSKI et al., 1998; SIDRAUSKI & WALTER, 1997; VAN GEMEREN et al., 1997; WELIHINDA et al., 1997; COX & WALTER, 1996; SHAMU & WALTER, 1996; SIDRAUSKI et al., 1996; SHAMU et al., 1994). O antibiótico tunicamicina, um potente ativador da rota UPR, induz o aumento da expressão do mRNA de BiP e consequentemente da proteína em vários sistemas vegetais (FIGUEIREDO et al., 1997; D'AMICO et al., 1992; FONTES et al., 1991). Em plantas, a síntese de BiP é intensa nas células normais com atividade secretora elevada e nas células em que as proteínas, por algum motivo, não atingiram a conformação nativa (ZHANG & BOSTON, 1992; BOSTON et al., 1991; FONTES et al., 1991; DORNER et al., 1988). A expressão de BiP em plantas também aumenta em resposta a estresses bióticos e abióticos, como o estresse hídrico, infestação por fungo, estresse nutricional, aclimação ao frio e elicitores da resposta planta/patógeno (FIGUEIREDO et al., 1997; DENECKE et al., 1995; KALINSKI et al., 1995; ANDERSON et al., 1994).

O gene BiP já foi isolado e caracterizado em vários organismos, estando presente em humanos, leveduras e algumas espécies vegetais, como espinafre e tomate, como cópia única (ANDERSON et al., 1994; NORMINGTON et al., 1989; TING & LEE, 1988). Em contraste, em fumo e *Arabidopsis*, ele pertence a uma pequena família gênica e responde diferencialmente a estresses (FIGUEIREDO et al., 1997; DENECK et al., 1991; KALINSKI et al., 1995). Em soja, BiP é codificado por uma família multigênica, cujos membros isolados, apresentam expressão órgão específica diferenciada e são denominados de soyBiPA, soyBiPB, soyBiPC e soyBiPD (CASCARDO et al., 2001). Além disso, tem sido demonstrado que os membros da família multigênica da soja são diferencialmente regulados em resposta a estresse osmótico (CASCARDO et al., 2000). Em espinafre e soja, condições específicas de estresse e eventos de desenvolvimento causam discrepâncias entre o nível do acúmulo da proteína BiP e de seu mRNA correspondente, sugerindo que mecanismos pós-traducionais também podem estar envolvidos no controle da síntese de BiP em plantas (KALINSKI et al., 1995; ANDERSON et al., 1994). Coletivamente essas observações indicam que mecanismos complexos e múltiplos controlam a expressão de BiP em plantas. A presente investigação teve como objetivos primordiais o isolamento e caracterização molecular de genes BiP da soja, bem como análise da atividade de seus promotores sob

diferentes condições de estresses e nos diferentes órgãos da planta. A elucidação dos mecanismos de regulação e da expressão da família dos genes BiP em plantas pode ser particularmente útil na obtenção de plantas transgênicas tolerantes a estresses e com a síntese aumentada de proteínas de alto valor biológico em órgãos de reserva.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. A rota secretora**

A translocação de proteínas dos polissomos para o interior do retículo endoplasmático (RE) marca o início do transporte através da via secretora. A rota secretora é o maior sítio de biossíntese, dobramento, montagem, e modificação de proteínas solúveis ou de membrana, bem como síntese e transporte de lipídeos, polissacarídeos e glicoproteínas (SIMONS et al., 1998). Esta rota é constituída pelo sistema de endomembranas, retículo endoplasmático (RE), complexo de Golgi, vesículas secretórias, membrana plasmática e compartimentos hidrolíticos

(lisosomos em células animais e vacúolos em células vegetais) (MORRÉ, 1974).

Esses compartimentos possuem estruturas morfológicas distintas e diferem no lúmen, quanto ao tipo de lipídeos e conteúdo de proteína, permitindo com isso uma síntese e modificação eficientes dos compostos que neles trafegam (BASSHAN & RAIKHEL, 1997). O endereçamento de proteínas secretórias para estas diferentes estruturas subcelulares requer seqüências adicionais (JIANG & ROGERS, 1999; SANDERFOOT & RAIKHEL, 1999; VITALE & RAIKHEL, 1999; WANG et al., 1998; DA SILVA CONCEIÇÃO et al., 1997; BAR-PELED et al., 1996) e, sua transferência ocorre em conjunto com a tradução, sendo o mecanismo denominado de co-translocação.

A presença de um poro aquoso denominado *translocom* permite a passagem da proteína pela membrana do RE. Após a passagem da região carboxi-terminal do polipeptídeo nascente, o peptídeo sinal de endereçamento é liberado do *translocom* e é clivado pela ação da enzima peptidase sinal (VITALE et al., 1993). A proteína é então liberada no lúmen do RE e o peptídeo sinal é rapidamente degradado por proteases. Durante ou após o processo de translocação através das membranas do RE, os polipeptídeos nascentes adquirem conformação adequada para translocação, podendo ainda ocorrer modificações pós-traducionais como adição de açúcares e clivagem por enzimas proteolíticas, além de outros processamentos (DRICKAMER & TAYLOR, 1998; HELENIUS et al., 1997).

As reticuloplasminas são proteínas do RE que participam do processo de translocação de polipeptídeos nascentes. Estas proteínas possuem em comum uma seqüência carboxi-terminal KDEL/HDEL (DENECKE et al., 1992; PELHAM, 1989), que funciona como sinal de retenção geral para proteínas residentes no RE. Entre eles, estão os chaperones moleculares, proteína dissulfeto-isomerase e proteínas que se ligam ao cálcio (TATU & HELENIUS, 1997; ZHANG et al., 1997; PELHAM, 1989). As proteínas recém-sintetizadas que não adquirirem conformação adequada para translocação serão, na maioria dos casos, retidas nesse compartimento. A seleção de proteínas a serem exportadas do RE inclui não somente uma discriminação entre as proteínas residentes na organela, mas também a presença de um processamento para aquisição da conformação protéica correta, mediado por

chaperones moleculares. A maioria desses eventos ocorre ou inicia-se no RE, que conseqüentemente possui grande número de proteínas residentes para realizar tais funções (HARTL, 1996). A proteína denominada *Binding Protein* (BiP) é o chaperone molecular mais bem caracterizada do RE.

## 2.2. Chaperones moleculares

Chaperone molecular é um termo que tem sido amplamente empregado para definir uma família de proteínas, não relacionadas, encontradas em todos os organismos e que são fundamentais para o funcionamento das células em condições normais ou sob estresses (MARTIN & HARTL, 1993; ELLIS & VAN DER VIES, 1991). 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 nas células (GETHING & SAMBROOK, 1992; ELLIS et al., 1989). Assim, eles se associam e estabilizam uma conformação instável, e através de ciclos controlados de ligação e desligamento facilitam o correto dobramento *in vivo* das proteínas (KNITTLER & HAAS, 1992).

Os chaperones não agem diretamente direcionando as proteínas para uma rota molecular correta. Ao invés disso, eles reduzem as interações improdutivas (VITALE et al., 1993), sendo assim, os chaperones moleculares previnem a formação de estruturas incorretas que podem expor de maneira transiente regiões carregadas eletricamente ou hidrofóbicas, normalmente envolvidas nas interações com outras proteínas. Os chaperones moleculares estão presentes em todos os compartimentos celulares onde ocorre dobramento e montagem de proteínas (HARTL, 1996). Desse modo, são requeridos para uma ampla variedade de processos, incluindo dobramento e desdobramento de proteínas, oligomerização, endereçamento sub-celular e remoção proteolítica. Essas funções, aparentemente diversas, são mediadas pela capacidade em comum entre essas proteínas se ligarem a um polipeptídeo em um estado não nativo e, conseqüentemente, evitar a entrada do mesmo em uma rota de dobramento improdutiva (BRODSKY &

McCRACKEN, 1997; CSERMELY, 1997; RASSOW et al., 1997; BUKAU et al., 1996).

A maioria dos chaperones moleculares pertencem à classe de proteínas denominadas “heat shock proteins” (HSP). Em particular, existe uma extensa família, conhecida como “heat shock 70” (HSP70), cujos membros compartilham uma alta conservação da estrutura primária e exercem uma variedade de funções como chaperones. Proteínas HSP70 estão envolvidas no dobramento de proteínas, na montagem e desmontagem de complexos oligoméricos, síntese e degradação de proteínas e translocação de polipeptídeo através de membranas (McKAY, 1993). As proteínas que respondem ao choque térmico podem ter a síntese induzida por exposição ao frio, calor, estresse hídrico, ataque de patógenos, ou eventualmente qualquer tratamento ambiental que possa perturbar o dobramento das proteínas (KALINSKI et al., 1995; ANDERSON et al., 1994; CABANE et al., 1993).

### **2.3. BiP (*Binding Protein*)**

As proteínas de choque térmico (HSP 70) são conhecidas como proteínas que respondem a estresses. O chaperone molecular residente no retículo endoplasmático, denominado BiP (*Binding Protein*) é um membro das HSP 70. A análise da estrutura primária dessas proteínas indica uma extraordinária conservação durante o processo evolutivo (ELLIS, 1990; MUNRO & PELHAM, 1986). A identificação inicial da proteína BiP ocorreu em linfócitos B, por meio da observação de que BiP associava-se transientemente com cadeias pesadas de imunoglobulinas até a montagem do anticorpo completo. Na ausência da síntese de cadeias leves, a proteína BiP formava associação estável com as

cadeias pesadas (HENDERSHOT, 1990; BOLE et al., 1989, 1986; HENDERSHOT et al., 1987; MUNRO & PELHAM, 1986; HAAS & WABL, 1983;).

A proteína BiP pode ser detectada no lúmen do RE tanto na forma monomérica livre, quanto formando dímeros e agregados de alto peso molecular (FREIDEN et al., 1992; NGUYEN et al., 1991), sendo ambas as formas interconversíveis (CASCARDO et al., 2000; KNITTLER & HAAS, 1992). Apesar da homologia entre BiP e outras proteínas da classe HSP 70, existem algumas diferenças no nível de estrutura primária que são relevantes. BiP possui um peptídeo-sinal na extremidade amino-terminal que é responsável pelo seu endereçamento para o RE e uma seqüência de quatro resíduos de aminoácidos (HDEL/KDEL) na região carboxi-terminal que constitui o sinal de retenção da proteína nesse compartimento celular (TOWNSLEY et al., 1994; DENECKE et al., 1992; PELHAM, 1990, 1989). Assim sendo, BiP acompanha o fluxo secretório junto com as demais proteínas que estão endereçadas para outras organelas ou que serão secretadas. Contudo, um receptor localizado nas cisternas de transição RE-Golgi captura BiP, reciclando a proteína do compartimento *cis*-Golgi para o RE (ELMENDORF & HALDAR, 1993; LEE et al., 1993; TANG et al., 1993; HSU et al., 1992; LEWIS & PELHAM, 1990; SEMENZA et al., 1990). A remoção do tetrapeptídeo de retenção no RE de BiP, localizado na região carboxi-terminal da proteína, faz com que a proteína seja secretada (MUNRO & PELHAM, 1987). Em mamíferos, o tetrapeptídeo de retenção de BiP é KDEL enquanto que, em leveduras e plantas é HDEL (TOWNSLEY et al., 1994; DENECKE et al., 1992, 1991; BOSTON et al., 1991; FONTES et al., 1991; PELHAM, 1989; MUNRO & PELHAM, 1987).

BiP possui diversas funções que estão sempre relacionadas com a ligação de BiP às superfícies interativas de proteínas, prevenindo a ocorrência de interações intra e intermoleculares que possam gerar polipeptídeos anormais nas células (LANDRY & GIERASCH, 1994; GETHING & SAMBROOK, 1992; VIERLING, 1991; ELLIS et al., 1989). Assim como outros chaperones moleculares, a proteína BiP, está envolvida na translocação de proteínas para o lúmen do RE (BRODSKY et al., 1993; GILMORE, 1993; VITALE et al., 1993; SANDERS et al., 1992; NGUYEN et al., 1991; VOGEL et al., 1990), dobramento correto de proteínas (CHENG et al., 1989;

GOLOUBINOFF et al., 1989; PELHAM, 1988; GETHING et al., 1986; MUNRO & PELHAM, 1986), montagem de proteínas oligoméricas (KNITTLER & HAAS, 1992; HENDERSHOT et al., 1987; BOLE et al., 1986), retenção no RE de proteínas dobradas ou montadas incorretamente (KASSENBRÖCK et al., 1988; DORNER et al., 1988, 1987; BOLE et al., 1986), auxiliando na solubilização de agregados protéicos durante períodos de estresses (HORWICH et al., 1993; MUNRO & PELHAM, 1986). Além disso, BiP está envolvida na etiquetagem de proteínas que serão degradadas (HURTLEY et al., 1989; KASSENBRÖCK et al., 1988; LODISH, 1988; DORNER et al., 1987) 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).

Ensaio de co-imunoprecipitação revelou que a proteína BiP da soja se associa transitoriamente com as subunidades da proteína de reserva  $\beta$ -conglícinina da soja (FONTES et al., 1996). A proteína BiP possui na região amino-terminal um domínio conservado, que exibe alta afinidade de ligação ao ATP e baixo “turnover”, sugerindo que o ATP desempenha um papel regulatório na atividade de BiP e que a proteína não possui função enzimática (FLYNN et al., 1989; KASSENBRÖCK & KELLY, 1989). O sítio de ligação a ATP confere a BiP uma atividade ATPásica, sendo que a sua ligação ao substrato necessita da ligação de um ATP e, para que o complexo seja desfeito é necessário que ocorra a hidrólise do nucleotídeo. Em presença de análogos não hidrolisáveis de ATP, o chaperone BiP permanece ligado ao substrato e o complexo não pode ser desfeito (HENDRICK & HARTL, 1993; PARSEL & LINDQUIST, 1993). Outro domínio, este presente na região carboxi-terminal, é mais variável e reconhece determinadas regiões nos polipeptídeos aos quais se liga (KASSENBRÖCK & KELLY, 1989).

Em condições normais de crescimento, BiP é expressa constitutivamente em baixos níveis. No entanto, uma série de estresses fisiológicos, como deficiência de glicose, inibidores de glicosilação, tratamento com 2-mercaptoetanol, presença de aminoácidos análogos e cálcio ionóforo, 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 UPR (*Unfolded Protein Response*),

outras rotas controlando a expressão de BiP em plantas (CASCARDO et al., 2000; JELITTO-VAN DOOREN et al., 1999). Essas condições de estresse têm como denominador comum a promoção do acúmulo de proteínas mal dobradas no RE.

#### **2.4. Via de resposta a proteínas mal dobradas UPR (*Unfolded Protein Response*) no RE**

A expressão de proteínas mutantes defeituosas no dobramento ou o tratamento de células com agentes que promovem desnaturação ou impedem dobramentos de proteínas, ativam uma via de sinalização comunicando o RE com o núcleo (LEE, 1992). Essa via de transdução de sinal, designada via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR), é induzida após o acúmulo dessas proteínas dentro do RE e resulta em um aumento na transcrição de genes que codificam proteínas residentes no RE (SALOHEIMO et al., 1999; SIDRAUSKI et al., 1998; FIGUEIREDO et al., 1997; VAN GEREMEN et al., 1997).

A indução da expressão dos genes BiP, em resposta à presença de proteínas mal dobradas no RE, ocorre no nível de transcrição. Uma seqüência de 22 pb, presente nos promotores dos genes BiP e denominada UPRE (“unfolded protein response element”), tem sido identificada em vários genes BiP, pertencentes a diversos organismos: KAR2/BiP de levedura (KOHNO et al., 1993; MORI et al., 1992), BiP de espinafre (ANDERSON et al., 1994), GRP78/BiP de mamíferos (FOTI et al., 1999), BiP dos fungos *Aspergillus awamori* e *Aspergillus niger* (VAN GEREMEN et al., 1997). Este elemento de resposta é necessário e suficiente para ativar a transcrição de genes que respondem a esta rota (KOHNO et al., 1993). A rota UPR existe em todas as células eucarióticas e a sua transdução de sinal é mais bem compreendida em leveduras (GONZALEZ et al., 1999; SIDRAUSKI et al., 1998; SIDRAUSKI & WALTER, 1997; WELIHINDA et al., 1997; COX & WALTER, 1996; SHAMU & WALTER, 1996; SIDRAUSKI et al., 1996; SHAMU et al., 1994) e mamíferos (BREWER et al., 1999, 1997; FOTI et al., 1999; YOSHIDA et al., 1997).

Quatro componentes da via UPR de *Saccharomyces cerevisiae* foram caracterizados, sendo eles, UPRE, Ire1p, tRNA ligase e Hac 1p. A proteína

Ire1p contém um peptídeo-sinal na extremidade amino-terminal, um único domínio transmembrana localizado na parte central da proteína e um domínio cinase no terminal carboxílico. Ire1p é uma proteína transmembrana serina-treonina tipo cinase localizada na membrana do RE (COX et al., 1993), sendo o componente que transmite o sinal do RE para o núcleo (WANG et al., 1998). O terminal amino, localizado no lúmen do RE, é responsável pela detecção das variações na concentração de proteínas mal dobradas. A região carboxi-terminal da proteína, voltada ou para o núcleo ou para o citossol, exibe atividades de cinase e endonuclease. A ativação de cinase ocorre por meio de oligomerização e transfosforilação de proteínas Ire1p vizinhas na membrana, o que, por sua vez, leva-a atividade de endonuclease (WANG et al., 1998; SHAMU & WALTER, 1996). Este mecanismo de transmissão de sinal através da membrana do RE é similar ao da membrana plasmática de células de eucariotos superiores (SHAMU & WALTER, 1996). A atividade endonuclease de Ire1p é responsável pelo início do processamento do pré-mRNA que codifica o transcritor Hac1, específico para transativação de genes regulados pela via UPR (SIDRAUSKI et al., 1998).

Outros estresses no RE, diferentemente da indução de síntese de proteínas pela via UPR, podem também ocasionar o bloqueio do aparato de tradução por meio da fosforilação do transcritor de tradução eIF2 $\alpha$  (HARDING et al., 1999). Uma cinase transmembrana residente no retículo (PERK) é responsável pela fosforilação do transcritor de tradução eIF2 $\alpha$ . Ao contrário de Ire1p, PERK, atenua a tradução de proteínas em resposta a um estresse no RE (HARDING et al., 1999). Desse modo, a UPR e a inibição da tradução em função de estresses no RE ocorrem por rotas paralelas. Ambas se iniciam por cinases transmembranas residentes no RE, que apresentam domínios lumenais similares, e envolvem um evento de autofosforilação.

A ativação dos genes que respondem à via UPR ocorre quando Hac1p se liga a UPRE. Hac 1p é uma proteína de ligação a DNA que possui homologia com fatores de transcrição da família dos zíper de leucina. A atividade desta proteína é controlada pelo “splicing” programado do seu mRNA (COX & WALTER, 1996). A ligação do mRNA de Hac1 clivado pela Ire1p é conduzida pela tRNA ligase (SIDRAUSKI et al., 1996). O processamento programado do

mRNA de Hac 1p só ocorre mediante a presença de Ire1 ativo e funcional (COX & WALTER, 1996).

A tRNA ligase catalisa o ligamento dos exons de RNA gerados pela ação da tRNA endonuclease, estando assim envolvida no processamento do pré-tRNA. Em leveduras, a tRNA ligase se localiza nas proximidades dos poros nucleares e interage com a tRNA endonuclease para processar pre-tRNA (CLARK & ABELSON, 1987). A junção dos exons do mRNA de Hac1 é catalisada pela enzima tRNA ligase. Uma vez que o processamento do mRNA necessita do acoplamento da reação de clivagem e ligação, pelo menos uma porção do Ire1p tem que se localizar na membrana interna do núcleo para colaborar com a tRNA ligase no processamento do mRNA de Hac 1p (SIDRAUSKI et al., 1996). Este processamento do Hac 1p é independente do espliceossomo e controla a concentração funcional da proteína codificada (GONZALEZ et al., 1999).

A ativação da UPR em levedura, mamíferos, plantas e fungos pode ser realizada pela prevenção da glicosilação de proteínas secretórias utilizando-se tunicamicina, deprivação de glicose no meio, ou pela prevenção da formação de pontes dissulfeto, utilizando-se agentes redutores como o  $\beta$ -mercaptoetanol ou DTT (ditiotreitól). Genes regulados por estes tratamentos incluem BiP (FIGUEIREDO et al., 1997; FONTES et al., 1991), *PDI1* (que codifica a isomerase da dissulfeto) (SALOHEIMO et al., 1999), *EUG1* (que codifica uma proteína similar a PDI) e *FKB2* (que codifica a isomerase peptidil-prolil cis-trans). Estes genes codificam proteínas que auxiliam no dobramento correto de proteínas secretórias (SHAMU et al., 1994). A superexpressão de genes envolvidos no dobramento ou modificação pós-traducional de proteínas dentro do RE consegue aliviar o estresse no retículo (ALVIM et al., 2001; LEBORGNE-CASTEL et al., 1999; KOIZUMI et al., 1999), fornecendo evidências da função biológica desses genes. Por outro lado, a diminuição na expressão de um desses genes tende a diminuir a atividade secretora da célula (ROBINSON et al., 1996).

## **2.5. Organização e regulação da expressão dos genes BiP**

Tem sido proposto que os genes BiP possuem um ancestral comum, que divergiu de outras HSP 70 tão logo surgiram os primeiros organismos eucariotos. Alternativamente, os genes de BiP poderiam ter evoluído independentemente de outros membros da família HSP 70 após a duplicação de um gene ancestral (DENECKE et al., 1991; NICHOLSON et al., 1990). Em seres humanos, leveduras e algumas espécies vegetais BiP está presente em cópia única (ANDERSON et al., 1994; NORMINGTON et al., 1989; TING & LEE, 1988). Por outro lado, em fumo, *arabidopsis* e soja, BiP pertence a uma pequena família gênica e responde diferencialmente a estresse osmótico (FIGUEIREDO et al., 1997; KALINSKI et al., 1995; DENECKE et al., 1991). Em contraste, BiP de espinafre não responde ao estresse hídrico e está presente em cópia única (ANDERSON et al., 1994). Em soja, BiP é codificado por uma família multigênica, cujos membros isolados, apresentam expressão e regulação diferencial e são denominados de soyBiPA, soyBiPB, soyBiPC e soyBiPD (CASCARDO et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 1997).

Com relação às seqüências transcritas, o gene BiP de levedura não apresenta intron, enquanto em rato, homem e espinafre, o gene é composto por sete introns e oito exons. No nematóide *Caenorhabditis elegans* o gene BiP contém três introns (ANDERSON et al., 1994; PIRDOUX & ARMSTRONG, 1992; TING & LEE, 1988; WOODEN et al., 1988). Promotores de BiP em várias espécies demonstraram a existência de múltiplos elementos de controle, alguns dos quais são redundantes, apresentando geralmente dois "TATA box" e dois a cinco "CAAT box". O gene BiP de humano possui uma seqüência na região do promotor capaz de responder ao acúmulo de proteínas anormais no RE, induzindo a transcrição (RESENDEZ et al., 1988). Ensaio 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 (clorafenicol acetil-transferase) conferia induzibilidade a promotores constitutivos em resposta ao acúmulo de proteínas anormais no RE (WOODEN et al., 1991; RESENDEZ et al., 1988). O mapeamento preciso dessa região no DNA mostrou que ela possui múltiplos elementos de controle, alguns dos quais funcionalmente redundantes (WOODEN et al., 1991).

Em leveduras, a análise do promotor de BiP (Kar2) revelou que a resposta as proteínas mal dobradas no RE deve-se a uma região de 22 pb

(MORI et al., 1992). O alinhamento dessa seqüência com UPR (*unfolded protein response element*) de BiP de rato, homem e de HSP94 de galinha, revelou a existência da seqüência consenso GGAAGGCAGCTGGA (KOHNO et al., 1993; MORI et al., 1992; CHANG et al., 1987). Em espinafre, o elemento UPR foi descrito como sendo a seqüência TCAACGGGCAGG (ANDERSON et al., 1994). Comparações de elementos que respondem a estresses no retículo endoplasmático (ERSE) de vários organismos revelam a presença da seqüência consenso CCAATN<sub>9</sub>CCACG, que funciona como elemento *cis* atuante de resposta ao acúmulo de proteínas mal-dobradas no RE (YOSHIDA et al., 1998; LEE et al., 1992). Além do elemento UPR, outros dois elementos em *cis* foram identificados no promotor de BiP de leveduras e consistem em uma região rica em GC que é responsável pela expressão constitutiva e um elemento de resposta ao estresse térmico (HSE), presente em outras proteínas da classe HSP 70, mas que está ausente no gene BiP de plantas e mamíferos (ANDERSON et al., 1994; MORI et al., 1992).

O promotor do gene BiP de rato possui uma região com atividade “enhancer” (LIN et al., 1986), correspondendo a região entre os nucleotídeos -85 e -480 que contém domínios repetidos em série, homólogo a outros fatores “enhancers” celulares e virais (CHANG et al., 1987). Duas seqüências de onze nucleotídeos com atividade de “enhancer” são também comuns aos genes BiP de rato e promotores de HSP 70 no homem (LIN et al., 1986; WU et al., 1986). Uma atividade de “enhancer” foi descrita também para o elemento de resposta ao choque térmico (HSE) em HSP 70 de *Drosophila* (BIENZ & PELHAM, 1986). Além de responder a estes diferentes estímulos através do elemento em *cis* CCAATN<sub>9</sub>CCACG, a expressão do gene BiP de mamíferos é trans-ativada pelo fator de transcrição CBF/NF-Y, que interage com o elemento em *cis* CCAAT (ROY et al., 1996; WOODEN et al., 1991; SANTORO et al., 1988). A ligação do CBF ao CAATT box é associada ao nível interno de íons Ca<sup>2+</sup> presentes no núcleo. Em baixas concentrações de íons cálcio no núcleo, a ligação de CBF ao promotor é intensificada, devido a uma taxa de dissociação mais lenta entre os oligômeros.

Em plantas, a regulação dos genes BiP tem sido avaliada principalmente por meio da detecção

do acúmulo de proteínas e seu mRNA em diferentes órgãos e em respostas a diferentes estresses (VITALE et al., 1993). Estes experimentos tem demonstrado que a expressão de BiP de plantas é induzido tanto em resposta ao acúmulo de proteínas anormais no RE, 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., 1996). Assim também, a expressão transiente de faseolinas mutantes em protoplastos de tabaco e o tratamento com agentes que promovem desnaturação de proteínas no RE, tais como tunicamicina e  $\beta$ -mercaptoetanol, induzem 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 (FONTES et al., 1999; FIGUEIREDO et al., 1997; FONTES et al., 1996; KALINSKI et al., 1995; DENECKE et al., 1995; ANDERSON et al., 1994).

Tem sido demonstrado que a expressão de BiP de plantas também é altamente regulada em condições normais de desenvolvimento da planta. Em tabaco, mRNA de BiP acumula predominantemente em tecidos com alta atividade secretora, tais como em tecidos com alta proporção de células em ativo processo de divisão celular (DENECKE et al., 1991). Em soja, os membros da família gênica de BiP estão sujeitos a regulação diferencial tecido-específica (CASCARDO et al., 2001) e a expressão dos genes BiP é regulada por eventos de desenvolvimento associados por alta atividade secretora celular

(FONTES et al., 1996; KALINSKI et al., 1995). Apesar do complexo padrão de regulação dos genes BiP em plantas, 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 e purificação dos clones genômicos de BiP**

O isolamento de potenciais clones genômicos de BiP para a posterior caracterização das regiões promotoras foi feito por meio de um *Screening* de duas bibliotecas genômicas de soja, propagadas em fagos  $\lambda$ ZAP II (título de  $9,75 \times 10^9$  fagos/mL) e em fagos  $\lambda$ EMBL3 (título de  $5 \times 10^8$  fagos/mL). Alíquotas de 10  $\mu$ L de diluições em série da biblioteca  $\lambda$ ZAP II ou  $\lambda$ EMBL3 foram usadas para inocular 100  $\mu$ L de cultura de bactéria *E. coli* LE392 ou NM538 crescidas por 12 horas em LB. Após 20 minutos, à essa suspensão foram adicionados 7 mL de “Top agarose” 0,7% fundida, vertendo-se todo o volume em placas de Petri contendo o meio LB sólido (2,0 g de LB, 1,5 g de ágar, 100 mL de água), que foram incubadas a 37 °C, durante 12 horas, até o aparecimento das lises. Em seguida, as placas foram incubadas a 4 °C, por 1 hora, e o DNA foi transferido para membrana de náilon. As membranas foram incubadas durante 15 minutos em solução de desnaturação (NaOH 0,5 mol/L, NaCl 1,5 mol/L), seguido por 15 minutos em solução de neutralização (Tris-HCl 0,5 mol/L, pH 7,0, NaCl 3 mol/L) e SSC 2X (NaCl 1,5 mol/L, citrato de sódio 0,15 mol/L, pH 7,0). O DNA foi imobilizado por ultravioleta, utilizando “UV Stratlinker 2400” (Stratagene) e hibridizado com os insertos dos clones pUFV-4 (região amino-terminal do cDNA de BiPD) e pUFV-42 (cDNA completo de BiPD), marcados

com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP. Os potenciais clones positivos isolados foram purificados, por meio de "screenings" sucessivos (3X) para a obtenção de inóculos homogêneos.

### **3.2. Purificação de fragmentos de DNA de gel de agarose**

Os fragmentos de DNA, utilizados em subclonagens e preparo de sondas, foram purificados de gel de agarose com o auxílio do "kit Pre-A-Gene DNA Purification Systems", da BIORAD, conforme instruções do fabricante. Após eletroforese, a região excisada do gel que continha o DNA de interesse foi dissolvida com 3 volumes de perclorato de sódio 45 mol/L a 50 °C. Em seguida, foi adicionado Prep-A-Gene matrix, em uma relação de 5  $\mu$ L de matrix/ $\mu$ g de DNA e a mistura foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente, sob agitação ocasional. Após centrifugação por 30 segundos a 16.000 x g, o precipitado foi lavado duas vezes com 25 volumes de perclorato de sódio 45 mol/L e, em seguida, com tampão de lavagem (BIORAD). Posteriormente, foi seco à temperatura ambiente. O DNA foi eluído da resina pela adição de água e, após centrifugação, o sobrenadante contendo o DNA foi armazenado a -20 °C até uso.

### **3.3. Marcação de sonda**

Os fragmentos de DNA dos clones pUFV-4 (região amino-terminal do cDNA de BiPD) e pUFV-42 (cDNA completo de BiPD), previamente isolados e purificados de géis de agarose, foram marcados usando o "Primer-It Fluor Fluorescence Labelling Kit" (BIORAD) ou "Random Primer Labelling RPM 1633" (Amershan). Aproximadamente 100 ng do fragmento de DNA e oligonucleotídeos foram desnaturados a 100 °C por 5 minutos e colocados imediatamente a 0 °C. Em seguida, a mistura foi incubada com 1U da enzima Klenow, dNTPs e Flúor-12-UTP a 37 °C por 30 minutos. Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de EDTA 0,2 mmol/L. Para

eliminação de Flúor-12-UTP não incorporado, a sonda foi precipitada usando etanol 70% (v/v) e acetato de sódio 0,3 mol/L, pH 4,8 por 2 horas a -20 °C. Após centrifugação a 14.000 x g por 15 minutos, a sonda foi ressuspensa em água. Alternativamente, a sonda foi marcada com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP, utilizando o Kit “Random Primer Labelling RPM 1633” (Amershan), de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.4. Isolamento de DNA genômico proveniente da biblioteca $\lambda$ EMBL3**

O DNA do fago recombinante foi isolado pela técnica de lise líquida. *E. coli* estirpe NM-538 foi inoculada com o fago recombinante em 50 mL de NZCYM, contendo 0,2% (p/v) de maltose a 38 °C e 350 x g. Após a lise das bactérias, o DNA foi purificado, utilizando a extração por fenol-clorofórmio. Em 50 mL de meio, foram adicionados 10  $\mu$ L de DNase 10 mg/mL e 25  $\mu$ L de RNase 10 mg/mL e a mistura incubada a 37 °C, por duas horas. Em seguida, a solução foi centrifugada, por duas horas, a 20.000 x g e 4 °C. O precipitado do fago  $\lambda$  foi ressuspensa em 200  $\mu$ L de Tris-HCL 0,05 mol/L, pH 8,0, e o DNA foi extraído com 200  $\mu$ L de fenol-clorofórmio na proporção de 1:1, por três vezes. Em seguida, o DNA foi precipitado com etanol 70% (v/v) e acetato de sódio 0,3 mol/L, pH 4,8. Após centrifugação a 16.000 x g por 5 minutos, o DNA foi lavado com etanol 70% (v/v), seco a vácuo e ressuspensa em 100  $\mu$ L de água. Alternativamente, o DNA viral foi concentrado por meio de precipitação com PEG. Neste método, as enzimas DNase e RNase foram adicionadas na concentração final de 1  $\mu$ g/mL e incubadas por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 0,064 g/mL de NaCl, deixando 1 hora a 0 °C e o resíduo insolúvel foi descartado por centrifugação a 11.000 x g, por 10 minutos, a 4 °C. Ao sobrenadante, foi adicionado 0,088 g/mL de PEG-8.000, mantendo-se a mistura por 1 hora a 0 °C. O DNA foi recuperado por centrifugação a 11.000 x g por 20 minutos a 4 °C, e foi ressuspensa em 1,0 mL de Tris-HCL 0,05 mol/L, pH-8,0. A purificação do DNA foi feita pela extração com fenol-clorofórmio, como descrito acima.

### **3.5. Excisão do DNA recombinante isolado da biblioteca $\lambda$ ZAPII**

Inicialmente, foram crescidas, durante 16 horas, a estirpe de *E. coli* SOLR, em LB líquido, e XL1-Blue, em meio líquido LB suplementado com maltose 0,2% (p/v) e  $\text{MgSO}_4$  10 mmol/L. As células bacterianas foram centrifugadas e ressuspensas em  $\text{MgSO}_4$  10 mmol/L até  $\text{DO}_{600} = 1,0$ . Em um microtubo, foram incubados 200  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana XL1-Blue, 250  $\mu\text{L}$  do estoque de fagos isolados e purificados provenientes da biblioteca  $\lambda$ ZAP II e 1  $\mu\text{L}$  de “Ex Assist helper phage”, a 37 °C por 15 minutos. Em seguida, o volume do microtubo foi combinado com 3 mL de meio LB líquido e mantido a 37 °C sob agitação até ocorrerem as lises, quando os tubos foram aquecidos a 65 °C por 20 minutos. Após centrifugação a 14.000 x *g* por 15 minutos, o sobrenadante, contendo o fagemídeo, foi coletado em novo microtubo e armazenado a 4 °C. A 200  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana de SOLR em  $\text{MgSO}_4$  ( $\text{DO}_{600} = 1,0$ ) foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  do estoque de fagemídeos, mantendo-se a 37 °C por 15 minutos e, após o período de incubação, o inóculo foi plaqueado em meio sólido LB, suplementado com ampicilina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). O crescimento das colônias foi realizado a 37 °C por 12 a 16 horas.

### **3.6. Isolamento de DNA plasmidial**

O isolamento do DNA plasmidial, em pequena e média escala, foi conduzido pelo método da lise alcalina e adsorção de DNA em partículas de sílica, usando o "FlexiPrep Kit" (Pharmacia Biotech) e, em grande escala, por meio de gradiente de cloreto de cério (SAMBROOK et al., 1989) ou “Plasmid Maxi Kit” (QIAGEN). Em todos os métodos, inicialmente, as células foram rompidas pelo método de lise alcalina, sendo o volume das soluções utilizadas ajustado de acordo com o volume inicial da cultura. A bactéria transformada foi crescida em meio LB, contendo 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina, por 12 a 16 horas. Após centrifugação, 5.000 x *g* por 2 minutos à temperatura ambiente, as células foram ressuspensas na solução I (glicose 50 mmol/L, Tris-HCl 25

mmol/L, pH 8,0, EDTA 20 mmol/L), sob agitação. Em seguida, foi adicionado a solução II [NaOH 0,2 mol/L, SDS 1% (v/v)] e a solução III (CH<sub>3</sub>COOK 1 mol/L), em seqüência. O resíduo insolúvel foi descartado por centrifugação a 11.000 x g por

10 minutos. O sobrenadante recebeu diferentes tratamentos de acordo com o método de isolamento plasmidial utilizado.

Para os métodos de isolamento em pequena e média escala, após a lise alcalina, o DNA plasmidial foi precipitado pela adição de isopropanol, na concentração final de 42% (v/v), incubado por 10 minutos a temperatura ambiente, e coletados por centrifugação a 11.000 x g por 10 minutos. À suspensão de "Sephaglass™ FP" (Pharmacia Biotech) foi adicionada ao DNA plasmidial, e em seguida, lavada com "Wash Buffer" (Pharmacia Biotech) e com etanol 70% (v/v). O DNA foi eluído em água por 5 minutos à temperatura ambiente.

Para o método de isolamento em grande escala, a lise alcalina foi conduzida conforme descrito anteriormente, exceto que após a adição da solução II a mistura foi colocada no gelo por 10 minutos, e após a adição da solução III foi colocada no gelo por mais 15 minutos. Após a lise alcalina, o DNA foi precipitado do sobrenadante pela adição de isopropanol, na concentração final de 42% (v/v), coletado por centrifugação a 11.000 x g por 15 minutos a 4 °C e ressuscitado em TE, contendo 0,86 g/mL de brometo de etídio e cloreto de céσιο (d = 1,55 g/mL). O gradiente de densidade de CsCl foi formado por centrifugação a 55.000 x g por 24 horas. O DNA plasmidial foi visualizado por meio de luz ultravioleta, isolado do gradiente, precipitado com etanol 70% (v/v) e ressuscitado em água.

Alternativamente, o isolamento de DNA plasmidial em grande escala foi conduzido utilizando o "Plasmid Max Kit" (Qiagen). A lise alcalina foi conduzida conforme descrito previamente, exceto que RNase foi adicionada ao tampão I na concentração de 100 µg/mL. O lisado insolúvel de células foi removido por centrifugação a 20.000 x g por 30 minutos, a 4 °C. A solução de DNA, recuperada após a lise, foi aplicada na coluna "QIAGEN-tip 500" (QIAGEN), equilibrada com 10 mL do tampão QBT [MOPS 50 mmol/L, pH 7,0, NaCl 750 mmol/L, etanol 15% (v/v), triton X-100 0,15% (v/v)]. Após a drenagem por gravidade, a coluna contendo o DNA foi lavada por duas vezes com 30 mL do

tampão QC [MOPS 50 mmol/L, pH 7,0, etanol 15% (v/v), NaCl 1 mol/L]. O DNA foi eluído da coluna com 15 mL do tampão QF [Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8,5, etanol 15% (v/v), NaCl 1,25 mol/L] e, em seguida, precipitado com 42% (v/v) de isopropanol, lavado com 5 mL de etanol 70% (v/v) e ressuspendido em 1 mL de H<sub>2</sub>O.

### **3.7. “Southern blot”**

O DNA recombinante, extraído de clones isolados, foi digerido com várias enzimas de restrição e separado por eletroforese. Após eletroforese, o gel foi incubado por 15 minutos na solução de depurinação (HCl 0,25 mol/L), seguido por incubação na solução de desnaturação (NaOH 0,5 mol/L, NaCl 1,5 mol/L) por duas vezes de 30 minutos. O gel foi então transferido para a solução de neutralização (Tris-HCl 0,5 mol/L, pH 7,0, NaCl 3 mol/L) e o DNA foi transferido por pressão para uma membrana de náilon em SSC 2X (NaCl 1,5 mol/L, citrato de sódio 0,15 mol/L, pH 7,0) por 1 hora (STRATAGENE). A membrana foi incubada em 30 mL de solução de pré-hibridização [(SSC 6X, Reagente de Denhardt 10X, SDS 1% (p/v), NaPPi 0,2% (p/v), 1,2 mg de DNA de esperma de salmão] (SAMBROOK et al., 1989), a 65 °C, por no mínimo 2 horas. A reação de hibridização foi conduzida a 60 °C por no mínimo 12 horas, com 20 mL de tampão de hibridização (SSC 3X, Reagente de Denhardt 5X, SDS 1% (p/v), NaPPi 0,2% (p/v), EDTA 0,002 mol/L, Tris-HCl 0,02 mol/L, pH 7,5, 0,8 mg de DNA de esperma de salmão), contendo aproximadamente 50 ng/mL de sonda, previamente desnaturada a 100 °C por 5 minutos. Após o período de incubação, a membrana foi lavada 2 vezes com SSC 1X contendo SDS 0,1% (p/v) e NaPPi 0,2% (p/v), repetido por 2 vezes com SSC 0,1X contendo SDS 0,1% (p/v) e pirofosfato de sódio NaPPi 0,2% (p/v), e visualizada por autoradiografia.

### **3.8. Obtenção de células competentes de *E. coli***

As células competentes de *E. coli* JM109 foram preparadas de acordo com SAMBROOK et al. (1989). Células de *E. coli* JM109 foram crescidas em meio LB até atingir uma  $DO_{600}$  de 0,5, incubadas a 0 °C por 10 minutos e concentradas duas vezes por centrifugação a 5.000 x *g*, a 4 °C por 10 minutos, em  $MgCl_2$  100 mmol/L. Após incubação a 0 °C por 10 minutos, as células foram coletadas por centrifugação a 5.000 x *g* a 4 °C por 5 minutos, concentradas 10 vezes pela ressuspensão em  $CaCl_2$  100 mmol/L e glicerol 15% (v/v), alíquotadas e estocadas a -80 °C até o uso.

### **3.9. Obtenção dos sub-clones dos clones genômicos**

O DNA, proveniente dos clones genômicos, foi submetido à hidrólise com várias enzimas de restrição. Após separação eletroforética, os fragmentos de interesse foram detectados via “Southern blot” e foram purificados, conforme descrito no item 4.2, para posterior clonagem. O vetor de expressão pUC118 e PBSIIKS<sup>+</sup> foram digeridos separadamente com a(s) enzima(s) de restrição utilizada(s) para liberar o(s) fragmento(s) de interesse. Em seguida, o vetor foi defosforilado com 1U da enzima fosfatase alcalina de intestino de bezerro, no tampão Tris-HCl 0,05 mmol/L, pH 9,0,  $MgCl_2$  1 mmol/L e  $ZnCl_2$  0,1 mmol/L, a 37 °C por 1 hora.

A reação de ligação dos fragmentos de DNA aos vetores foi conduzida de acordo com técnicas padrão de clonagem em plasmídeos (SAMBROOK et al., 1989). O fragmento de DNA e o vetor foram utilizados na relação molar 3:1, respectivamente, em um volume final de 15 µl, em presença da enzima T4 DNA ligase (GIBCO/BRL) em Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,5,  $MgCl_2$  7 mmol/L, DTT (ditiotreitól) 1 mmol/L. As reações foram incubadas a 14 °C por 24 horas.

Para transformação de *E. coli*, foram adicionados 7µL da reação de ligase a 200 µL de células competentes JM109, e a suspensão foi mantida a 0 °C por 30 minutos. Após um choque térmico de 2 minutos a 42 °C, foi adicionado 1mL de meio LB sem ampicilina, seguido por incubação a 37 °C por 1 hora. As células foram concentradas por centrifugação, ressuspendidas em 100 µL de

meio LB e espalhadas em placas contendo meio LB (sólido) e ampicilina 100 µg/mL, para seleção das colônias transformantes. O DNA plasmidial, isolado de bactérias transformadas, foi digerido com as enzimas de restrição apropriadas e separado por eletroforese em géis de agarose 1% (p/v) para diagnóstico dos clones. As colônias recombinantes foram estocadas em 50% de glicerol a - 80°C. Os sub- clones obtidos são descritos na Tabela 1 (itens de 1 – 8).

Tabela 1: Descrição dos clones e sub- clones derivados de gsBiP9e gsBiP6

Os clones e sub- clones utilizados nas reações de sequenciamento e na obtenção das deleções dos promotores gsBiP6 e gsBiP9 são apresentados abaixo.

	Clone	Descrição	Tamanho (pb)	Vetor	Hosp.	Clone Genômico	Iniciador	Sítio gerado
1	pUFV183	Fragmento <i>EcoRI</i>	5146	PBSIIKS+	JM-109	gsBiP9	_____	---
2	pUFV212	Fragmento <i>HindIII</i>	1750	pUC118	JM-109	gsBiP9	_____	---
3	pUFV191	Fragmento <i>HindIII</i>	1553	pUC118	JM-109	gsBiP9	_____	---
4	pUFV211	Fragmento <i>HindIII/PstI</i>	1150	pUC118	JM-109	gsBiP9	_____	---
5	pUFV236	Fragmento <i>Eco0109I/PstI</i>	450	PBSIIKS+	JM-109	gsBiP9	_____	---
6	pUFV210	Fragmento <i>HindIII/PstI</i>	495	pUC118	JM-109	gsBiP9	_____	---
7	pUFV235	Fragmento <i>XhoI/Eco0109I</i>	427	PBSIIKS+	JM-109	gsBiP9	_____	---
8	pUFV234	Fragmento <i>EcoRV/XhoI</i>	283	PBSIIKS+	JM-109	gsBiP9	_____	---
9	pUFV321	Fragmento <i>PstI/EcoRI</i>	2209	PCAMBIA1381Z	JM-109	gsBiP9	BiP9Ps9PR/ T3	<i>PstI</i>
10	pUFV329	Fragmento <i>PstI/EcoRI</i>	2209	PCAMBIA1381Z	LBA-4404	gsBiP9	_____	---
11	pUFV228	Fragmento <i>EcoRI/SalI</i>	390	PCAMBIA1381Z	JM-109	gsBiP6	6BiPS60PR/ M13F	<i>SalI</i>
12	pUFV287	Fragmento <i>EcoRI/SalI</i>	390	PCAMBIA1381Z	LBA-4404	gsBiP6	_____	---
13	pUFV301	Fragmento <i>EcoRI/SalI</i>	260	PCAMBIA1381Z	JM-109	gsBiP6	_____	---
14	pUFV306	Fragmento <i>EcoRI/SalI</i>	260	PCAMBIA1381Z	LBA-4404	gsBiP6	_____	---

15	pUFV302	Fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> II	170	pUC118	JM-109	gsBiP6	6BiPB120P9 9F/M13R	<i>Bam</i> HI
16	pUFV305	Fragmento <i>Eco</i> RI/ <i>Sa</i> II	170	PCAMBIA1381Z	JM-109	gsBiP6	————	—
17	pUFV307	Fragmento <i>Eco</i> RI/ <i>Sa</i> II	170	PCAMBIA1381Z	LBA-4404	gsBiP6	————	—
18	pUFV330	————	—	PCAMBIA1381Z	LBA-4404	————	————	—

### 3.10. Confecção do mapa de restrição

O DNA do clone genômico de gsBiP6 ou gsBiP9 foi digerido com uma série de enzimas de restrição que compõem a região do sítio múltiplo de clonagem do vetor pBSIIKS<sup>+</sup>. Os produtos da hidrólise foram analisados individualmente por eletroforese em agarose e seus tamanhos em pares de bases foram estimados em relação a padrões de DNA. A ordem dos fragmentos e a respectiva localização dos sítios de restrição foram confirmados por meio de hidrólise duplas do DNA, “Southern Blot” e sequenciamento.

### 3.11. Reações de sequenciamento dos sub-clones

As reações de sequenciamento do DNA foram realizadas de acordo com a metodologia de SANGER et al. (1977), utilizando o “kit Big Dye” (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante. Aproximadamente 1 µg de DNA dos sub-clones foi adicionado a uma solução contendo 8 µL do reagente de sequenciamento e 1 µL de oligonucleotídeo, em um volume final de 20 µL. A reação de sequenciamento consistiu de 30 ciclos nas seguintes condições: 96 °C por 30 segundos, 45 °C por 15 minutos e 60 °C por 4 minutos. Para precipitação dos fragmentos foram adicionados 7 µL de acetato de amônio 7,5 mol/L e 68 µL de etanol 100% (v/v) e as amostras foram mantidas em gelo por 15 minutos. Após centrifugação a 14.000 x *g* por 15 minutos, o precipitado foi lavado com etanol 70% (v/v) e seco à temperatura ambiente. Finalmente, o precipitado foi ressuscitado em 4 µL do tampão de corrida, e antes da aplicação das amostras no sequenciador automático (ABI 377,

Applied Biosystems), as amostras foram aquecidas a 70 °C, por 5 minutos. Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de sequenciamento estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2: Iniciadores utilizados para obtenção dos sub- clones e para conclusão do sequenciamento.**

	Iniciador	Orientação	Posição de Anelamento	Seqüência
1	M13	5'-3'	PUC-118	5' CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC 3'
2	M13	3'-5'	PUC-118	5' TCACACAGGAAACAGCTATGAC 3'
3	T3	5'-3'	PBSIIKS+	5' AATTAACCCTCACTAAAGGG 3'
4	T7	3'-5'	PBSIIKS+	5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'
5	911soyBiPdR	3'-5'	+2175 a +2199(gsBiP9)	5' GCACGCTCAGCCTCTCTCCTCAGC 3'
6	456soyBiPdR	3'-5'	+1498 a +1523(gsBiP9)	5' CCTCAGGGCTGAACACCTTGGTCTC 3'
7	BiPC99R	3'-5'	+1142 a +1168(gsBiP9)	5' CAACATGGCCATTCTTGTAACACCG 3'
8	33soyBiPdR	3'-5'	+48 a +71(gsBiP9)	5' CGGCGTGCCACGAGCCAGCCAT 3'
9	33soyBiPdF	5'-3'	+48 a +71 (gsBiP9)	5' ATGGCTGGCTCGTGGGCACGCCG 3'
10	BiP9Ps9PR	3'-5'	+15 a +40(gsBiP9)	5' CTCTCACAC <u>CTGCAG</u> ACACACTTTG 3'
11	-279BiP9F	5'-3'	-253 a -231 (gsBiP9)	5' GGACGGCACAGGTGTTCCCA AC 3'
12	-577BiPP9R	3'-5'	-552 a 529(gsBiP9)	5' GGTGGACTCCTATGTGGCAGTGG 3'
13	-1750BiP9F	5'-3'	-1406 a -1383(gsBiP9)	5' CGCGGACTCCTTTTCTAGATTGC 3'
14	6BiPS60PR	3'-5'	-55 a -31(gsBiP6)	5' TTCTCG <u>GTGCAG</u> CATGAATTGTAGG 3'
15	6BiPB120P99F	5'-3'	-196 a -170(gsBiP6)	5' CCAGCAAAA <u>GGATCC</u> AGTTTTATTGG 3'

\* Seqüências sublinhadas, em azul, indicam os sítios degenerados para geração de sítios de clonagem.

### 3.12. Análises de comparação de seqüências dos sub- clones

As análises de comparação de seqüências do DNA, presença de regiões conservadas e elementos estruturais, foram realizadas com o auxílio dos programas computacionais encontrados no endereço eletrônico <http://www.genome.ad.jp/SIT/SIT.html> (“Sequence Interpretation Tools”), onde estão disponíveis os endereços dos seguintes programas: <http://blast.genome.ad.jp/> (“Blast”), <http://clustalw.genome.ad.jp/> (“Clustalw”), <http://motif.genome.ad.jp/> (“Sequence Motif Search”), <http://pdap1.trc.rwcp.or.jp/research/db/TFSEARCH.html> (“Transcription Factor

Binding Site Search”). Um mapa saturado de enzimas de restrição que clivam a seqüência dos clones que foram isolados foi obtido, utilizando o programa <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/> (“Web Cutter”). A tradução de seqüências de DNA foi feita utilizando o programa <http://bio.lundberg.gu.se/edu/translat.html> (“DNA to protein translation”). As sobreposições das seqüências dos sub-clones foram feitas utilizando o programa [http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/cap\\_in.pl](http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/cap_in.pl) (CAP).

### **3.13. Determinação do sítio de início da transcrição**

#### **3.13.1. Reação de sequenciamento**

A reação de sequenciamento foi feita de acordo com o “<sup>32</sup>P sequencing Kit” (Pharmacia Biotech), onde o primeiro passo consistiu na desnaturação do DNA e posterior anelamento do oligonucleotídeo. Aproximadamente 2 µg de DNA foi desnaturado, por meio de incubação em solução 0,4 mol/L de NaOH durante 10 minutos. Em seguida, foi adicionado acetato de sódio 0,3 mol/L, pH 4,8 e o DNA foi precipitado com álcool etílico 70% (v/v) por 15 minutos a -20 °C. Logo após, o DNA foi sedimentado por centrifugação a 16.000 x *g* por 5 minutos, lavado com etanol 70% (v/v), seco a vácuo e ressuspendido em 10,0 µL de água. Após desnaturação do DNA, a reação de anelamento foi conduzida, utilizando o oligonucleotídeo 33soyBiPdR (Tabela 2) que anela na posição específica, adjacente ao códon de iniciação da tradução (coordenadas +48 a +71, relativo ao sítio +1 de transcrição). Ao volume de 10 µL de solução contendo DNA desnaturado foram adicionados 2,0 µL do oligonucleotídeo (5 µmol/L) e 2,0 µL do tampão de anelamento (Tris-HCl 1 mol/L, pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 100 mmol/L, DTT 160 mmol/L). Essa reação foi incubada a 65 °C por 5 minutos, seguido por 10 minutos a 37 °C e 5 minutos à temperatura ambiente. A segunda etapa consistiu na extensão da cadeia pela DNA polimerase, pela adição de 1,375 µmol/L de dATP, dGTP, dTTP, NaCl 333,5 mmol/L, [α-<sup>32</sup>P]dCTP 10 µCi/uL e T7 DNA polimerase, incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Concomitantemente, foi utilizado, para leitura de

pequenos fragmentos (até 500 nucleotídeos), o “Mix-short” (Pharmacia Biotech). Em quatro tubos, previamente identificados, foram adicionados separadamente 2,5 µL do “Mix-short” A, C, G ou T. Enquanto o progresso da reação acima estava ocorrendo, os tubos, contendo “Mix-short” A, C, G ou T, foram incubados a 37 °C por pelo menos 1 minuto. Decorridos os 5 minutos da reação de marcação, a reação foi terminada pela adição de uma alíquota de 4,5 µL da reação de marcação para os tubos que continham o Mix-short A, C, G e T, seguido por uma incubação a 37 °C por 5 minutos e pela adição de 5,0 µL de tampão da amostra [bromofenol 0,3 % (p/v), xilenocianol 0,05% (p/v) , EDTA 10 mmol/L, pH 7,5, formamida 97,5% (p/v)]. As amostras foram aquecidas a 80 °C, durante 2 minutos, antes de serem aplicadas no gel de sequenciamento.

### **3.13.2. Reação de extensão de “primer”**

A reação de anelamento do oligonucleotídeo 33soyBiPdR (Tabela 2) foi realizada utilizando 0,45 µg/µL de RNA poly A<sup>+</sup>, KCl 0,15 mol/L, Tris-HCl 0,01 mol/L, pH 8,3, EDTA 1,0 mmol/L e 0,66 µmol/L do oligonucleotídeo, em volume final de 15 µL sendo incubada a 65 °C por 90 minutos, e em seguida, mantida à temperatura ambiente. A reação de anelamento foram adicionados 30 µL da mistura da reação de extensão do oligonucleotídeo (0,9 µL Tris-HCl 1 mol/L, pH 8,3, 0,9 µL MgCl<sub>2</sub> 0,5 mol/L, 0,25 µL DTT 1 mol/L, 6,75 µL actinomicina D 1mg/mL, 1,33 µL 5 µmol/L dATP, dGTP, dTTP, 2,0 µL [α-<sup>32</sup>P]dCTP 10 µCi/µL, 18 µL água, 0,2 µL AMV transcriptase reversa 25 U/µL) e incubados por 1 hora a 42 °C. Para a interrupção da reação, foram adicionados 105 µL de RNase 20 µg/mL, previamente diluída no tampão TEN 100 (NaCl 100 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L pH 7,5, EDTA 1 mmol/L), contendo esperma de salmão 100 µg/mL e a mistura foi incubada por 15 minutos a 37 °C. O DNA foi extraído com a mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), e precipitado com etanol 70% (v/v) e acetato de sódio 0,3 mol/L, pH 4,8. Em seguida, o DNA foi sedimentado por centrifugação a 16.000 x g por 15 minutos, lavado com etanol 70% (v/v), seco a vácuo e ressuspenso em 5,0 µL bromofenol 0,05% (p/v),

xilenocianol 0,05% (p/v), EDTA 20 mmol/L em formamida deionizada. Após incubação por 5 minutos a 65 °C, as amostras foram separadas por eletroforese em gel de sequenciamento.

### **3.13.3. Gel de sequenciamento**

As reações de sequenciamento e de extensão de “primer” foram separadas por eletroforese, utilizando gel desnaturante de sequenciamento 6% (p/v) e uréia 8 mol/L, conforme descrito por SAMBROOK et al. (1989). A eletroforese foi conduzida no aparato de sequenciamento vertical (BaseAce<sup>R</sup> Jr. Vertical Sequencing Apparatus, Stratagene), conforme recomendações do fabricante. Após a polimerização do gel de poliacrilamida em Tris-HCl 89 mmol/L, ácido bórico 89 mmol/L, EDTA 0,2 mmol/L pH 8,0, uréia 8 mol/L, acrilamida 6 % (p/v), 333,5 µL de persulfato de amônio 10% (p/v), 25 µL de TEMED, foi realizada uma pré-eletroforese, em TBE (Tris-HCl 89 mmol/L, ácido bórico 89 mmol/L, EDTA 0,2 mmol/L pH 8,0), durante 1 hora a 1.000 V. Simultaneamente, as amostras foram desnaturadas a 100 °C por 5 minutos e, submetidas à eletroforese, durante 4 horas a 2.000 V. Após a corrida, o gel foi incubado por 30 minutos em solução fixadora [(metanol 10% (v/v), ácido acético 10% (v/v)], transferido para uma folha de papel Whatman 3 mm, previamente umedecida com água milli-Q e seco utilizando o aparelho Gel Dryer (Modelo 583, BIO-RAD). Após a secagem, o gel foi exposto ao filme a -80 °C, por aproximadamente 30 minutos utilizando-se uma tela intensificadora (Lightning-Plus, Sigma), e revelado conforme as recomendações do fabricante.

### **3.14. Clonagem do promotor**

O DNA dos clones genômicos gsBiP6 e gsBiP9, provenientes dos fagos λEMBL3 e λZAP II, respectivamente, foram digeridos com várias enzimas para a obtenção dos padrões de restrição. Os fragmentos reconhecidos pela sonda foram sub-clonados e sequenciados. Dentre os quais, um fragmento de 2,1 kbp de gsBiP6 originado de uma hidrólise com *SacI*, apresentou homologia com a

seqüência que codifica o N-terminal de BiP. Esse clone, identificado como pUFV139, foi sequenciado apresentando 397 pb da região promotora. Um fragmento correspondente ao promotor, incluindo o possível TATA, foi amplificado a partir de pUFV139 utilizando os oligonucleotídeos M13 5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3' (gerando um sítio de *EcoRI* a partir do *polylinker* do vetor pUC118) e o oligonucleotídeo 6BiPS60PR 5'-TTCTCGGTCGACGATGAATTGTAGG -3' (gerando um sítio de clonagem de *SalI* sublinhado) (Tabela 2). Esse fragmento foi clonado em pUC118 (*EcoRI/SalI*) e, transferido para o vetor pCAMBIA1381Z (*EcoRI/SalI*) (pCAMBIA VECTORS, Canberra, Australia), originando o clone pUFV228 em *E. coli* JM-109 (Tabela 1). A construção pUFV228 foi transferida para *Agrobacterium tumefaciens* LBA-4404, originando o clone pUFV287 (Tabela 1), também designado -358pbip6-gus. O DNA do clone pUFV228 foi digerido com a enzima *NdeI*, que cliva em duas posições na região interna do promotor, e em seguida, religado originando o clone pUFV301 em *E. coli* JM-109 (Tabela 1). A construção pUFV301 foi transferida para *Agrobacterium tumefaciens* LBA-4404, originando o clone pUFV306 (Tabela 1), também designado  $\Delta(-226/-82)$ pbip6-gus. O clone pUFV228 foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos 6BiPB120P99F 5'-CCAGCAAAAGGATCCAGTTTTATTGG-3', gerando um sítio de *BamHI* (sublinhado) e o oligonucleotídeo 6BiPS60PR 5'-TTCTCGGTCGACGATGAATTGTAGG-3', gerando um sítio de *SalI* (sublinhado) (Tabela 2). O produto amplificado digerido com *BamHI* e *SalI* foi clonado em pUC118 (*BamHI/SalI*) originando o clone pUFV302 (Tabela 1), que por sua vez foi transferido para o vetor pCAMBIA1381Z (*BamHI/SalI*), originando o clone pUFV305 em *E. coli* JM-109. A construção pUFV305 foi transferida para *Agrobacterium tumefaciens* LBA-4404, originando o clone pUFV307 (Tabela 1), também designado -138pbip6-gus.

O clone pUFV183 (gsBiP9), obtido por meio da técnica de excisão de fagos  $\lambda$ ZAP II, foi sequenciado e apresentou 5.146 pb. A região correspondente ao promotor apresentou 2209 pb, incluindo vários elementos conservados. O clone pUFV183 foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos T3 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3' (gerando um sítio de *EcoRI* a partir do *polylinker* do pBSIIKS<sup>+</sup>) e o oligonucleotídeo BiP9Ps9PR 5'-CTCTCACACCTGCAGACACTTTG-3', (gerando um sítio de *PstI*,

sublinhado) (Tabela 2) e foi clonado no vetor pCAMBIA 1381Z (*EcoRI/PstI*) em *E. coli* JM-109, gerando o clone pUFV321 e, posteriormente, foi transferido para *Agrobacterium tumefaciens* LBA-4404, originando o clone pUFV329 (Tabela 1), também designado -2200pbip9-gus.

### **3.15. Obtenção de células competentes de *Agrobacterium* sp**

A estirpe de agrobactéria 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 amônia 0,2% (p/v), cloreto de sódio 0,5% (p/v), pH 6,6)], contendo estreptomicina 100 µg/L e crescida a 28 °C por 12 a 16 horas. Uma colônia isolada foi utilizada para a incubação de 50 mL de meio Rhizo seletivo, a 28 °C, sob agitação durante 12 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas a 16.000 x g por 10 minutos a 4 °C. As células precipitadas foram lavadas 4 vezes em igual volume com água destilada estéril e ressuspensas em 2 mL de meio GYT [glicerol 10% (v/v), extrato de levedura 0,125% (p/v), triptona 0,25% (p/v)] e mantidas a -80 °C.

### **3.16. Eletroporação de *Agrobacterium* sp**

Aproximadamente 100 ng de DNA plasmídial e 40 µL de células competentes de *Agrobacterium* foram eletroporadas a 2.500 V durante 4 a 5 milissegundos, utilizando o eletroporador "Gene Pulser II" (BIO-RAD). Após eletroporação, 1 mL de meio Rhizo [(extrato de levedura 0,5% (p/v), caseína 0,05% (p/v), manitol 0,8% (p/v), sulfato de amônia 0,2% (p/v), cloreto de sódio 0,5% (p/v), pH 6,6)] foi adicionado e a mistura incubada por 2 horas à temperatura de 28 °C. Após esse período, a mistura foi centrifugada durante 1 minuto e concentrada para 100 µL. A solução foi plaqueada em meio Rhizo sólido com estreptomicina 100 µg/L e canamicina 75 µg/L. As células cresceram durante 3 dias ininterruptos a 28

°C. Entre as colônias que se desenvolveram na placa, na presença de agentes seletivos, uma colônia isolada foi selecionada para preparar o estoque de glicerol dos clones em *Agrobacterium* (Tabela 1). Estes clones foram utilizados para transformar tabaco, cujo diagnóstico da transformação foi feito por PCR.

### **3.17. Obtenção e cultivo de *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana *in vitro***

Após a desinfestação de sementes de *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana por meio de imersão em solução de hipoclorito de sódio 2,5% durante 15 minutos, as sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri contendo o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) sólido [sais de MS 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 Chem. CA., EUA) contendo meio de cultura MS, acrescido de sacarose 3% (p/v). Discos foliares foram retirados de folhas totalmente expandidas, e utilizadas para a obtenção de plantas transgênicas.

### **3.18. Transformação de *Nicotiana tabacum* mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

Aproximadamente 2 mL de meio Rhizo, contendo canamicina 100 mg/L e estreptomicina 100 mg/L, foram inoculados com o clone de interesse por um período de 12 a 16 horas. Em seguida, as células de *Agrobacterium* foram precipitadas por centrifugação a 8.000 x g por 5 minutos a 14 °C, ressuspensas em meio Rhizo, e utilizadas para inocular 50 mL de meio Rhizo contendo os agentes seletivos descritos acima. Após um período de 12 a 16 horas de crescimento, as bactérias transformadas foram ressuspensas em meio líquido MS, acrescido de sacarose 3% (p/v), até a obtenção de DO<sub>600</sub>=0,6. Os discos foliares de *N. tabacum* L. cv. Havana foram incubados

sob agitação com as agrobactérias transformadas por 15 minutos. Após este período, os explantes foram lavados com água e secos com o auxílio de papel de filtro. Os discos foram distribuídos, com a parte adaxial voltada para cima, em placas de Petri contendo o meio MS sólido, onde foram co-cultivados por 2 dias. Em seguida, foram transferidos para placas de Petri contendo meio MS acrescido de sacarose 3% (p/v), suplementado com timentim (300 mg/L), higromocina (50 mg/L) e benzilaminopurina (0,5 mg/L). Os regenerantes foram transferidos para recipientes tipo “magenta” contendo o meio MS sólido, acrescido de sacarose 3% (p/v), suplementado com timentim (300 mg/L) e higromocina (50 mg/L). Após o desenvolvimento do sistema radicular dos regenerantes, as plantas foram seccionadas e transferidas para recipientes tipo “magenta” contendo o meio MS sólido, acrescido de sacarose 3% (p/v) e timentim (300 mg/L). As plantas transgênicas foram mantidas *in vitro* em câmaras de crescimento. O subcultivo dos explantes foi feito em intervalos de 20 dias, possibilitando as análises histoquímicas e fluorimétricas de GUS.

### **3.19. Análises histoquímicas e microscópicas**

As análises histoquímicas e microscópicas foram feitas em tecidos de caules, folhas e raízes. Material vegetal dos diferentes órgãos das plantas de tabaco foram colhidos e seccionados utilizando um micrótomo manual. Posteriormente, os cortes foram incubados no tampão de ensaio de GUS [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 100 mmol/L pH 7,0, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>.3H<sub>2</sub>O 0,5 mmol/L, Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O 10 mmol/L, Triton X-100 (0,1%) (v/v) e X-Gluc 1 mmol/L] (McCABE et al., 1988), por um período de 2 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 metanol:acetona (1:3). Após sucessivas lavagens, os tecidos clarificados foram mantidos em uma solução de água:glicerol (1:1), e as lâminas montadas foram fotografadas no microscópio Olympus AR 70 utilizando a câmera Olympus (PM-C35DX).

### **3.20. Análise da expressão do promotor de BiP sob diferentes condições de estresses**

Discos foliares de folhas de tabaco foram retirados de plantas não transformadas e transformadas. Em seguida, foram incubados em meio MS líquido sem reguladores, na presença ou ausência do inibidor de glicosilação tunicamicina (5 µg/mL) ou PEG 10% (p/v), sob leve agitação a 28 °C. Após 48 horas, os discos foram coletados, secos em papel de filtro e metade foi utilizada para ensaios histoquímicos de GUS e a outra metade foi imediatamente congelada em N<sub>2</sub> líquido e utilizados para extração de proteínas. Os discos foliares foram macerados e ressuspensos em 750 µL 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] e em seguida, centrifugado a 14.000 x g. O extrato protéico foi utilizado para análise fluorimétrica e detecção de BiP endógeno.

### **3.21. Avaliação da atividade de GUS em discos foliares de tabaco**

Para a determinação da atividade de GUS, 50 µL do extrato protéico, proveniente dos discos foliares foram misturados a 50 µL do tampão de ensaio de GUS contendo 1,7 mmol/L do substrato fluorescente “4-methylumbelliferyl β-D-glucuronide”. A mistura foi incubada a 37 °C no escuro. Após 45 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 900 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2 mol/L. A atividade enzimática foi determinada com o uso do Fluorômetro DyNA Quant (Hoefer).

### **3.22. Eletroforese em gel de acrilamida e “immunoblotting”**

Os extratos de proteína total (15 µg) foram analisados por SDS-PAGE 10% (p/v), seguido de “immunoblotting”. A eletroforese em géis de poliacrilamida contendo SDS foi realizada como descrito por LAEMMLI (1970),

à exceção da concentração do gel de empilhamento, que foi de 5%. O extrato de proteína foi incubado por três minutos, a 100 °C, em tampão da amostra [glicerol 10% (v/v), SDS 2,3 % (p/v), azul-de-bromofenol 0,25% (p/v), 2-mercaptoetanol 5% (v/v) e Tris-HCl 62,5 mmol/L, pH 6,8], antes de ser aplicado no gel. A eletroforese foi conduzida por 14 horas, aproximadamente, a 48 V, no tampão de corrida (Tris-HCl 25 mmol/L, glicina 200 mmol/L, EDTA 1 mmol/L e SDS 3,5 mmol/L). Após a eletroforese, os géis foram corados em solução corante [metanol 25 % (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v) e “coomassie brilliant blue R250” 0,25 % (p/v)] por duas a três horas, e, em seguida, descorados em solução descorante [metanol 20% (v/v) e ácido acético glacial 7% (v/v)]. Alternativamente, após a eletroforese as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, usando-se o sistema de transferência da BIORAD, de acordo com as instruções do fabricante. Após a transferência (em aproximadamente 1 hora, a 700 mA), as membranas de nitrocelulose foram incubadas com o reagente de bloqueio “Blotting Grade Blocker, Non-Fat Dry Milk” (BIORAD), por uma hora, à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas com TBS-T [Tris-HCl 10 mmol/L, pH 7,6, NaCl 0,14 mmol/L, Tween-20 0,1% (v/v)] três vezes, por 15 minutos cada lavagem, e incubadas com o anticorpo preparado contra uma versão truncada da região carboxi-terminal de BiP a uma diluição de 1:1.000 (FIGUEIREDO et al., 1997) por quatro horas, sob agitação. Em seguida, foram feitas três lavagens de 15 minutos com TBS-T, e a membrana foi incubada com o anticorpo contra IgG conjugada com a fosfatase alcalina (SIGMA), numa diluição de 1:5.000, por duas horas. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada, usando-se o sistema de detecção NBT/BCIP (azul-de-nitrotetrazólio/5-bromo-4-cloro-indolilfosfato), conforme orientação do fornecedor (GIBCO/BRL).

### **3.23. Clonagem do cDNA de BiP no vetor de expressão de bactéria pET 16b.**

Com o objetivo de expressar em bactéria a proteína BiP sem o peptídeo sinal e fundida a uma cauda de histidina (vetor de expressão em bactéria pET-16B), na região amino-terminal, foram sintetizados dois oligonucleotídeos específicos. O primeiro, BiP103Xh (5'-TTCCATTGCTCTCGAGGAAGCC-3'),

coordenadas 103 a 124 do cDNA de BiP, gera um sítio para a enzima de restrição *Xho*I e o segundo oligonucleotídeo, BiP 2094Xh (5'-CAGACTCGAGCTAATCTAGAGCTC-3') posicionado entre as coordenadas 2094 e 2117, gera um sítio para a enzima de restrição *Xho*I, foram utilizados para amplificar o cDNA de BiP por meio de PCR.

Na reação de PCR, foram utilizados 30 ng de DNA plasmidial de pUFV42, 80 pmol de cada oligonucleotídeo supracitado, dNTP's 0,25 mmol/L cada, 20 unidades de *Pfu* polimerase (STRATAGENE), Tris -HCl 20 mmol/L, pH 8,2, KCl 10 mmol/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6 mmol/L, triton X100 0,1% (v/v) e de albumina soro bovino (BSA) 10 µg/mL, para um volume final de 100 µL. As condições de reação adotadas foram de 2 minutos a 94 °C, seguido de 40 ciclos (45 segundos a 94 °C, 1 minuto a 50 °C e 2 minutos e 30 segundos a 72 °C) e 10 minutos a 72 °C, sendo realizada em um termociclador modelo PLTC-200 (MJ RESEARCH). O fragmento amplificado de aproximadamente 2.000 pb foi purificado, em seguida, digerido com *Xho*I e, posteriormente, inserido no sítio *Xho*I de pET16b. Como diagnóstico para a orientação senso, foi utilizado a enzima *Hind*III e para a confirmação do tamanho esperado do fragmento foi utilizado a enzima de restrição *Xho*I. A verificação da fase de leitura foi feita por meio de sequenciamento do clone obtido, utilizando o oligonucleotídeo BiPC99R, que anela na região do cDNA delimitada pelas coordenadas 179 a 204.

### **3.24. Expressão da proteína BiP em *E. coli* e purificação da proteína recombinante**

A expressão da proteína quimérica foi conduzida em *E. coli* BL21(DE<sub>3</sub>), que contém um gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor *lac* (NOVAGEN). A indução da síntese da proteína recombinante foi feita mediante adição de IPTG, em 100 mL de meio de cultura, e foi conduzida conforme as recomendações do fabricante (NOVAGEN). Células de *E. coli* foram transformadas e crescidas a 37 °C, em meio LB contendo ampicilina 50 µg/L, até atingirem A<sub>600nm</sub> 0,7 - 0,8. Em seguida,

foram submetidas à indução com IPTG 2 mmol/L, por oito horas. Como controle, foi utilizada a estirpe de *E. coli* BL21(DE<sub>3</sub>) não transformada. Após indução, as células foram mantidas no gelo por cinco minutos. Proteínas extraídas de uma alíquota de 50 mL de meio de cultura foram separadas em SDS-PAGE, para confirmar a indução da síntese da proteína recombinante. A purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade foi realizada em condições desnaturantes, seguindo-se basicamente as recomendações do fabricante (NOVAGEN). As células induzidas com IPTG foram coletadas por centrifugação a 5.000 x g, por cinco minutos, em seguida, ressuspensas em tampão de ligação 1X (Tris-HCl 40 mmol/L, pH 7,9, Imidazol 10 mmol/L, NaCl 1 mol/L e uréia 6 mol/L), rompidas mecanicamente por ultra-sonicação em “Ultrasonic Homogenizer 4710 Series” (COLE PARMER), incubadas no gelo por uma hora e centrifugadas a 39.000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 µm e aplicado em coluna de cromatografia contendo a resina “Chelating Sepharose” (Pharmacia) ativada com Ni<sup>++</sup>.

Para empacotamento da coluna cromatográfica, a resina “Chelating Sepharose” (Pharmacia), quelante de metais, foi homogeneizada por inversão e, em seguida, empacotada por gravidade em uma coluna de polipropileno (10 x 0,5 cm). Após a drenagem do etanol 20% (p/v), a resina foi lavada com 7,5 mL (3 volumes) de H<sub>2</sub>O deionizada e equilibrada com 12,5 mL (5 volumes) de tampão de troca 1 X (NiSO<sub>4</sub> 50 mmol/L e uréia 6 mol/L), seguido de 7,5 mL (3 volumes) de tampão de ligação 1 X (Tris-HCl 40 mmol/L, pH 7,9, Imidazol 10 mmol/L, NaCl 1 mol/L e uréia 6 mol/L). O extrato bruto de proteínas foi aplicado à coluna de “Chelating Sepharose”, equilibrada com o tampão de ligação 1 X. A coluna foi lavada com 25 mL (10 volumes) de tampão de ligação 1 X e 15 mL (6 volumes) de tampão de lavagem 1 X (Tris-HCl 40 mmol/L, pH 7,9, Imidazol 60

mmol/L, NaCl 1 mol/L e uréia 6 mol/L), antes da eluição da proteína com 15 mL (6 volumes) de tampão de eluição 1 X (Tris-HCl 20 mmol/L, pH 7,9, Imidazol 1 mol/L, NaCl 0,25 mol/L e uréia 6 mol/L), em frações de 1,0 mL. As frações foram analisadas por SDS-PAGE, usando-se gel de acrilamida 10% (p/v), conforme descrito por LAEMMLI (1970). As frações enriquecidas para a proteína recombinante foram reunidas e mantidas a -20 °C e utilizadas na imunização de coelhos, para produção de anticorpos.

### **3.25. Produção de anticorpos policlonais contra BiP**

A proteína recombinante purificada por cromatografia de afinidade foi utilizada para imunizar os coelhos. Foram feitas cinco imunizações, com aproximadamente 1,0 µg de proteína, a intervalos de sete dias. Para a primeira imunização, a solução de proteína foi homogeneizada com igual volume de adjuvante “Freund’s” completo (GIBCO/BRL) e para as imunizações posteriores, foi utilizado o adjuvante “Freund’s” incompleto (GIBCO/BRL). As imunizações foram feitas por meio de injeções intramusculares aplicadas semanalmente, nos músculos posteriores das patas traseiras do animal. O soro normal (controle) foi coletado antes da primeira imunização, e as frações de anti-soro foram coletadas a cada sete dias, a partir da terceira imunização. As coletas foram feitas por pequenas incisões em vasos sanguíneos marginais da orelha do coelho. O sangue coletado foi incubado por 1 hora a 37 °C, seguido por 12 horas a 4 °C. O coágulo foi removido e o anti-soro foi centrifugado, aliquoteado e armazenado a -20 °C. As frações de anti-soro foram testadas por meio de “immunoblottings”. Os anticorpos que apresentarem melhor título foram utilizados na detecção de BiP em extratos protéicos extraídos de discos foliares de tabaco submetidas a diferentes estresses.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Isolamento dos clones genômicos gsBiP6 e gsBiP9

O cDNA de soyBiPD foi utilizado como sonda para a varredura das bibliotecas genômicas de soja, propagadas nos fagos  $\lambda$ ZAP II e  $\lambda$ EMBL3. Dois clones genômicos foram isolados das bibliotecas  $\lambda$ EMBL3 e  $\lambda$ ZAP II, denominados gsBiP6 (CASCARDO, 1999) e gsBiP9, respectivamente. Após a obtenção de inóculos homogêneos, os dois clones genômicos foram usados nas caracterizações subsequentes.

### 4.2. Mapa de restrição dos clones genômicos gsBiP6 e gsBiP9

Em uma etapa inicial para caracterização molecular dos clones isolados, os mapas de restrição de gsBiP6 e gsBiP9 foram obtidos, sendo o padrão eletroforético dos fragmentos de restrição do clone gsBiP9, apresentado na Figura 1.

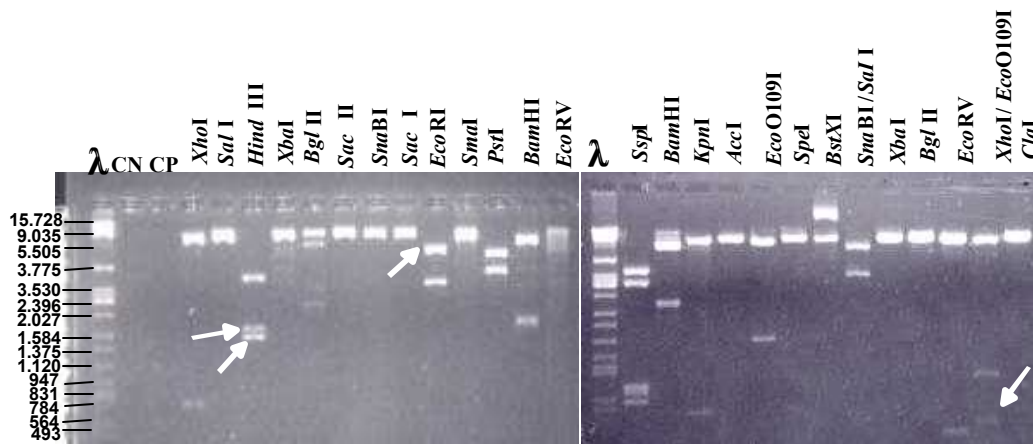
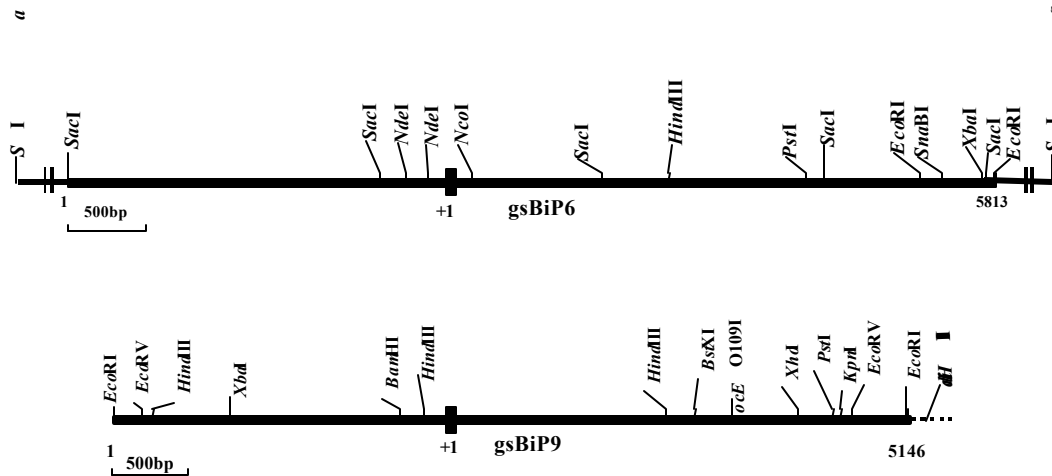


Figura 1: Padrão de restrição do clone genômico gsBiP9

Aproximadamente 500 ng do DNA do clone genômico gsBiP9 foi digerido com diferentes enzimas de restrição, e os fragmentos foram resolvidos em gel de agarose 1%.  $\lambda$  (DNA de bacteriófago lambda digerido com as enzimas de restrição *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII*), CN e CP indicam, respectivamente, marcador de peso molecular, pUC118 e cDNA de soyBiPD. As setas indicam fragmentos que foram sub-clonados em pUC118 ou pBSIIKS<sup>+</sup>, para posterior sequenciamento.

As posições relativas dos sítios de restrição no inserto foram identificados pela estimativa do tamanho dos fragmentos obtidos, utilizando enzimas do sítio múltiplo de clonagem do vetor (Figura 2). O clone gsBiP9 possui um inserto com tamanho estimado de 5,2 kb (Figura 1, linha *EcoRI*), enquanto que o inserto de gsBiP6 possui o tamanho estimado de 10,5 kb (dado não mostrado).

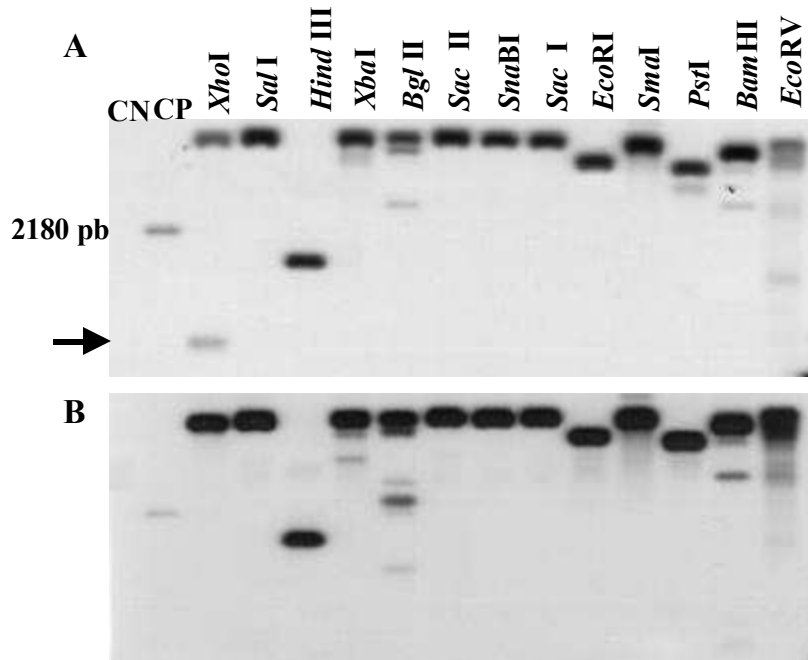


**Figura 2: Mapa de restrição de gsBiP6 e gsBiP9**

Os clones gsBiP6 e gsBiP9 apresentam aproximadamente 10,5 kb e 5,2 kb, respectivamente. Ambos os clones estão apresentados em escala proporcional na figura. Os sítios de restrição de algumas enzimas estão indicados na figura acima. O clone gsBiP6 está completo, enquanto que o clone gsBiP9, está incompleto, não possuindo a região carboxi-terminal. +1 indica o sítio de início da transcrição em gsBiP9 e o provável sítio de início da transcrição em gsBiP6. Os fragmentos Sal I a SacI e EcoRI a Sal I, indicados por dois traços verticais nas extremidades do clone gsBiP6, não estão em escala.

Os fragmentos do clone genômico contendo regiões do cDNA de BiP da soja foram identificados por meio de “Southern Blot”, usando como sonda o cDNA completo de soyBiPD (Figura 3A) e seqüências 5’ de soyBiPD que codificam o amino-terminal da proteína (Figura 3B). Esta estratégia, somada a

análise do padrão de restrição, possibilitou identificar a presença da região promotora no referido clone genômico.



**Figura 3: “Southern blot” do clone gsBiP9**

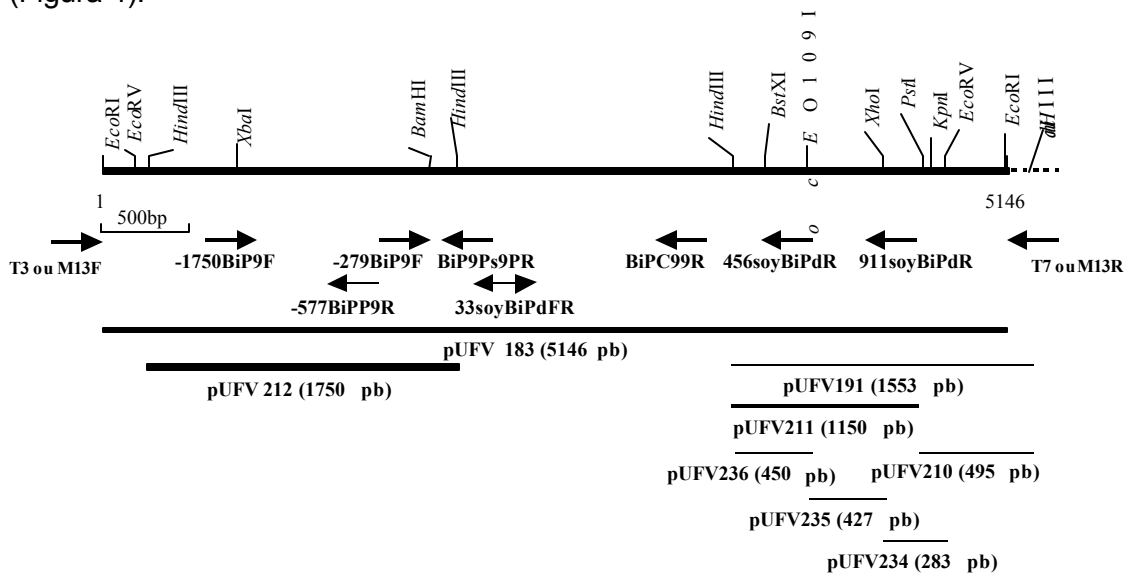
O DNA do clone gsBiP9 foi extraído e digerido com diferentes enzimas de restrição, indicadas na figura acima. Os fragmentos foram resolvidos em gel de agarose 1%, transferidos e imobilizados em membrana de nylon, que foi hibridizada com o cDNA completo de soyBiPD (A). Após remoção do cDNA completo de soyBiPD, a mesma membrana foi hibridizada com a extremidade 5' (400 pb) do cDNA (B). Ambos previamente marcados com  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ . CN e CP indicam respectivamente, pUC118 e cDNA de soyBiPD. A seta indica o fragmento *XhoI*.

O fragmento *XhoI*, indicado pela seta, foi reconhecido pela sonda que corresponde ao cDNA completo de soyBiPD (Figura 3A, linha *XhoI*) e não foi reconhecido pela sonda que corresponde a seqüência codificadora da região amino-terminal (Figura 3B, linha *XhoI*). Em contraste, o fragmento *HindIII* de 1,8 kb foi reconhecido por ambas as sondas. De acordo com o mapa de restrição (Figura 2), o fragmento *XhoI* encontra-se no final da extremidade 3' do clone, enquanto que o fragmento *HindIII* que contém seqüências homólogas à extremidade 5' de soyBiPD, está localizado na região interna do clone gsBiP9, flanqueado por uma região adjacente de 2.000 pb na extremidade 5' que não

hibridiza com as sondas. Estes resultados permitiram localizar a região promotora do gene BiP isolado na extremidade 5' de gsBiP9.

### 4.3. Caracterização molecular do clone gsBiP9

De acordo com o mapa de restrição, diversos fragmentos de gsBiP9 foram sub-clonados, com a finalidade de obter o sequenciamento do gene BiP (Figura 4). Além disso, foram sintetizados oligonucleotídeos em posições estratégicas, possibilitando o sequenciamento completo do clone gsBiP9 (Figura 4).



**Figura 4: Estratégia de sequenciamento de gsBiP9**

O clone gsBiP9 tem tamanho de 5146 bases e está apresentado em escala proporcional na figura, com alguns sítios de restrição. As setas indicadas na figura representam a localização e a orientação dos oligonucleotídeos usados no sequenciamento. As linhas contínuas representam os sub-clones obtidos a partir das enzimas de restrição, utilizados na estratégia de sequenciamento do gsBiP9. A linha tracejada, contendo o sítio para a enzima *HindIII*, indica seqüências do vetor.

A análise de seqüência do clone gsBiP9 no banco de dados de seqüências (GeneBank) confirmou a identidade do clone (Figura 5), que apresenta 5.146 pares de bases, sendo que a região promotora possui 2209 pb e a região codificadora com 2.937 pb está incompleta. Comparação de seqüências com o cDNA de soyBiPD indica que o clone gsBiP9 consiste de sete exons interrompidos por seis introns de tamanhos variados (Figura 5). As

seqüências 5' e 3' dos introns correspondem às seqüências conservadas *gt e ag*, respectivamente, que possibilitam o processamento correto dos introns.

-2161 **Gaattc**ggtaatatatatatatatatatatatatatatatatatatatanatatatatat  
-2091 atatanagtgttntatagtatataataatgagaataaataatnactttttattattaacanatttata  
-2021 naattttgnggataaaaaaatttttttaaaaatatttatatagnagatcatntnttttagtntcanc  
-1951 tcaaanatantnntaataaaaananatanantatcgatatagatacngaagtta **aagctt**aattacttt  
-1881 ttttaattctttaaatttagttaatgattttttgtccctaaaaaaatattgtttttattagtctctogaa  
-1811 tttttgaaaaatataattttaattttctattttttgttaataatgtcacaatttataagggtttaaatt  
-1741 atcataaattttttaaataattttttaaaaaatgggatgaaaaccaccagtaagtgtaaaactat  
-1671 taatacaacgactaaattaaaagcagtttttaaaaatcggagagattaataaaaatataattttaatt  
-1601 aatatatgataataataaatatggatagacactggtaagatatataatgaaatttaatatacaata  
-1531 caataattttctatatttgatatttaataaattatttattactttttgaaatcatttagtacttaagataa  
-1461 tataaattaaaaacatttttttaattttttatcataattttgaaataaaaaaaa **cgcggaactccttttc**  
-1391 **tagattgc**atcctcttcaattgataaattatagatatagagaattgtaaaaatgattcttttaaaaa  
-1321 atcaacatcctgataaaggacaaccaaatatttatngtaattcaattacatttgaacantattttatt  
-1251 tatgaaaataaactcttattgcattagttggttataaattttaaatataaaataaaatccattttata  
-1181 atgctattattgtcctaaataatttaattacgagaattaaataaaaataaagtgttttttttaaatata  
-1111 aatagtcataatgagaattttggtaagaaaaatcacataatgggaataaataatgatttttttatataata  
-1041 attaatagcattttgatagaaaaatataatttttaaatattttatataataaataaaaaatataat  
-971 ttcagttcaaatataaataatgataaaaaataaaatagatttaatacaatgttgatagaaattttta  
-901 taaataataataattttttattttgtcaaatgtaatacaattaaattttactttttgataaattagtact  
-831 taaagataatattaataaaaaacattatcttttttaatgcaatataatgatatataacattattaaggt  
-761 taaattgtcattttgggtttccataatttttttaatttatgattttaattttctggattttaaataa  
-691 catttgatttttctaaattttataaatggataaatattggctctcttattagtttaattataaatacaaa  
-621 aatttattaattataaaaaatataaataatcaatattttctccataatattgattttttcact **c**  
-551 **cactgccacataggagtcacc**aatagtaacaatataataggatataaattttttattaatattttaat  
-481 tattaataaatttttatttaacttataatataataatcttttaataatcataattattaataaatt  
-411 tactgag **gatc**aaaaatctcaatttataaaactaaaaataaaaaatttaaaaaatttagaagcaacaagat  
-341 tataatttag **catatg**ataaaaataaataatgatgataagaag **ggatcct**agatgat **gccttgata**  
-271 **agttgaggtc**gtaaaag **ggcggcagaggtttcccaac**actagaacgaat **gccattggtggaacaag**  
-201 caaaaggc **gcatttccattggt** **CCACGTCATCATTAGT**Gacatggtcagagcgtca **aagctt**caaatcag  
-131 gaattgaccaggtttgggcaactacataaaaagcctctcgcctcctcgt **gcaatttcaaaatt**acattacac  
-61 cctctcgaactcgcacgcacctcaact **ttaacctatt**ccacttgtaatcgtaaacgctt **TGCTAGAAG**  
79 AAGAGA **CAGAGTGTCTGTGTGTGTGAGAG**AGAGAGCA **ATGGCTGGCTCGTGGGCACGCCG**TTCTCTGA  
149 TTGTTCTAGCCATCATTTCCCTTCG **gtaatttcaacctcctaata** **gatc**tggttcactgcttttcttttagctt  
219 **tttgct**taaatgcgcaagtgaaaaaatgtaacc **gatc**cgctttggttgaaccttttt **gatc**gtttt  
289 **gtttgatt**cggttcggttacgtagcggta **gatc**agtgactga **gatc**tttagaagtaattggttaggatt  
359 **tcgtaaat**cggtcgtggtttggttcttcaattcagtgaaagtctttcgaactcgttagttctag **gatc**  
429 **tacatg**tttgtaataacgctttctcgcactcgaacattttcgtcaacagt **gatc**agttctagtcggtta  
499 **ttccgatt**tcgagggagcgttttggtggtttggttttgaaaaatgtaattggttgcaaaaactttcttcg  
569 **taacca**acacacgctgctctgattttctggttaa atcagtttttatagtatttcgttaaccaacacacgtag  
639 **taccatt**gatttctgttaaatcagtttttttaataatattttaaatttttgaaatcaatggttcggtgaa  
709 **aatatg**tttctaataactagctgcattctcgtttggtttttggttttttaagtgttgataaagattttca  
779 **ctgtaag**ccgagtgattgatttag **ccatgg**aaataagttttggtccggtggttggcttaagattttg  
849 **ttttcatt**gcatgctttttcaaggatggcgtttcgtatttgcgatttgaatagacacgagaagt  
919 **tttctt**ccggtgataaattgaatacctatagaaaaagataaaagtaagtgcttctcatgttaattttg  
989 **taacg**tattcatatcatttatcatttgtcagcaacaattatggtgcaaatgcagaaat **taactc**gcttt  
1059 **cgatgag**tttaagtgttgtaaaaaatttaactatgtaactaacattgagaaattttctccatag **GATGTCTA**  
1129 **TTTG**CATTCCATTGCTAAGGAGGAAGCCACCAAGTTAGGGACGGTCATCGGCATT **GATC**TTGGAACAA  
1199 CCTATTTCATGTGT **CGGTGTTTACAAGAAATGGCCATGTTG**AAATCATAGCCAACGACCAAGGTAACCGTAT  
1269 CACCCCATCGTGGGTTGCTTTACCCGACAGTGAGAGACTCATGGGGAGGCTGCCAAGAAATCAGGCAGCT  
1339 GTCAACCCAGAAAGACCATCTTTGATGTC AAGAGACTTATCGGAAGAAA **gtaagact**tgctcaagt **tgt**  
1409 **tgatttt**tgaccatttgatttgggtgg **gatc**aatttgttactgacttgcacttttttgca **GTT**CGAAGATA  
1479 AGGAAGTTCAAAAAGACAT **GAGCTT**GTTCCCTTATAAGATTGTCAACAAGGATGGAAAACCTTACATTCA  
1549 GGTGAAAAAATAAGGATGGT **GAGACCAAGGTGTT**CAGCCCTGAGGAAAATCAGT **CCATGGT**TTCT **GATC**AAG  
1619 ATGAAGGAAACTGCGGAAGCATTCTCGGGAAGAAAATAATGATGCTGTGGTCACTGT **CCAGt**aaact  
1689 **ggaagt**ctgaaacaatttcgacttatttctccactcaatttgattggttttctcctcgtctttgctttt  
1759 **attcca**attttctcacattttggttcaaatgcaacagCTTACTTCAATGATGCTCAGAGGCAGGCCACCAA  
1829 GGATGCTGGTGCATTGCTGGTCTCAATGTTGCTAGAAATATCAACGAACCCACTGCGCGTGCCTATGCCC  
1899 TATGGATTGGACAAGAAAGGTGGCGAGAAGAACATTCTAGTCTTT **GATC**TTGGTGGTGGGACCTTTGATG  
1969 TCAGTATCTTGACAATTGATAACGGTGTTTTGAAGTTCTTGCTACAAATGGAGATACTCATCTTGGAGG  
2039 TGAG **gtact**tttatacacatcacacagagaatgaaatgaaatatatat **ctttccata**aaaaattttcttt  
2109 **cttgat**gctaagtgtctgctatatctggtttcccttactaggtgagGATTTT **GATC**AAAGAATAATGGAGTA  
2179 **CTT**CATTAATAAT **GATC**AAGAAAAAGCATGGAAGGATATTAGCAAGGACAACAGAGCACTTGGAAAG **CTG**  
2249 **AGGAGAGAGGCTGAGCGTGC**AAAAGAGGGCTCTCAGCAGCCAGCACCAGGTCCGCGTGGAAATGGAATCAC  
2319 TTTTGTGATGGTGTGATTTTTCTGAGCCACTCA **CTCGAG**CTAGGTTTGAGGAGTTGAACAATGACTTGT

2389 CCGGAAGACCATGGTCCAGTGAAGAAGGCTATGGAAGATGCTGGATTACAGAAGAGTCAGATTGATGAG  
 2459 ATTGTTCTTGTGGTGGAAAGCACAAGGATTCCAAAGGTACAACAGCTTTGAAGGACTACTTTGATGGAA  
 2529 AGGAGCCAAACAAGGGGGTCAACCCCTGATGAAGCAGTTGCCTATGGTGCTGCAGTGCAAGGAAGCATT  
 2599 GAGTGGAGAGGGTGGTGAAGAAACCAAA Ggtaccatagtctgtataatattttatggaagtagattgct  
 2669 aagcattacacttttctaattgttgtgtggcaatctctatcca gATATCCTTCTCCTGGATGTGGCTCCCC  
 2739 TCACTCTCGGAATTGAAACTGTTGGTGGAGTCATGACAAAGTTGATTCCCAGAAACACTGTTATCCCAGAC  
 2809 CAAGAAATCTCAAGTGTTCACCACCTACCAGGACCAGCAGACTACCGTCTCCATTTCAGgtacggtgccat  
 2879 taaagggcatgatgcgtgtttttcttctaaatccaaaatgcaccactatctgggaactatgatgggatt  
 2949 gacttgagacaattcactgcttttttcttaatacagGTTTTCGAAGGTGAGAGGAGTCTCACAAGGATT  
 2985 GTCGCTTCTTGGGAAATTTGATCTGTCTGGAATTC

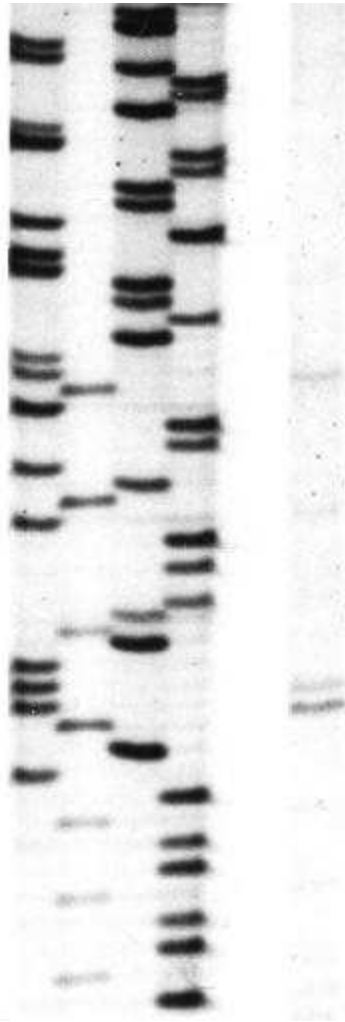
### Figura 5: Seqüência de nucleotídeos do clone gsBiP9.

A região promotora está representada com letras minúsculas de cor lilás, os introns estão representados com letras minúsculas de cor rosa, os exons estão representados com letras maiúsculas de cor preta e o sítio +1 da transcrição está localizado a 48 bases do códon de iniciação, sendo representado pela base Timina em lilás. Em azul, estão os sítios das enzimas de restrição que foram utilizadas na estratégia de clonagem e, em verde, as prováveis seqüências consenso (CAAT e TATA). Os elementos que respondem a proteínas mal dobradas estão em azul escuro e as seqüências conservadas de genes BiP em letras maiúsculas. As seqüências de cor marrom e sublinhadas representam os oligonucleotídeos usados para completar o sequenciamento. A seqüência de gsBiP9 foi depositada no GeneBank com o número de acesso AF 335282.

A região promotora contém prováveis seqüências conservadas, características de promotores gerais de genes de plantas, como as seqüências CAAT e TATA, além de seqüências consenso específicas de genes hsp70, como as seqüências conservadas de BiP e o elemento de resposta a proteínas mal-dobradas (Figura 5). A seqüência consenso conhecida como TATA-box, geralmente localizada a -30 nucleotídeos do sítio de início de transcrição, difere da seqüência presente no promotor e está localizada a -32 nucleotídeos do sítio de início da transcrição (em verde). Um provável elemento envolvido na regulação de genes transcritos pela RNA polimerase II, foi localizado na posição -70, e corresponde ao CAAT-box (em verde). Enquanto o TATA-box tem a função de garantir a precisão do início da transcrição, o CAAT-box aumenta a taxa de transcrição. Uma seqüência com certa homologia a um elemento conservado que responde às proteínas mal-dobradas (ERSE), identificados em genes BiP de mamíferos, cuja seqüência consenso é CCAAT<sub>6</sub>CCACG (YOSHIDA et al., 1998), foi encontrado no promotor de gsBiP9 (Figura 5, em azul escuro). Em alguns organismos, este elemento apresenta-se repetido na região promotora do gene BiP, podendo apresentar

até três cópias. Entretanto, somente uma cópia é suficiente para ativar a resposta às proteínas mal-dobradas quando ligado a um promotor constitutivo (YOSHIDA et al., 1998).

A fim de determinar o sítio +1 de início de transcrição o oligonucleotídeo 33soyBiPdR, apresentado na Tabela 2, que anela entre as coordenadas 1 e 23 a partir do códon de início de tradução do clone gsBiP9, foi usado para transcrição reversa do mRNA total. Conforme indicado na Figura 6, linha PE, três produtos estendidos foram detectados. A banda predominante, destacada pela seta, indica a presença de um mRNA de BiP, contendo uma extremidade 5' que se estende 48 nucleotídeos aquém do códon de iniciação de tradução. A comparação do produto da reação de extensão do oligonucleotídeo, com a reação de sequenciamento em paralelo revelou que o nucleotídeo que inicia a transcrição é uma adenina (3'-5') (Figura 6), sendo representado pela base timina (5'-3') no gene, a 48 bases do códon de início da tradução (Figura 5). A extensão do oligonucleotídeo também revelou dois outros produtos estendidos muito menos abundantes, indicando a possibilidade da existência de outros sítios de início transcricional de menor eficiência. Alternativamente, estes produtos estendidos podem representar o anelamento do oligonucleotídeo com o mRNA de outros genes BiP de soja.



**Figura 6: Gel de Sequenciamento e reação de extensão de “primer” do clone gsBiP9.**

A determinação do sítio de início de transcrição do promotor do clone gsBiP9 foi feita por meio da reação de extensão de oligonucleotídeo (PE) e reação de sequenciamento (ACGT). Em ambas reações foram utilizados o mesmo oligonucleotídeo (33soyBiPDR). Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de acrilamida 6%, contendo 7 M de uréia. A seta indica o produto estendido. O sítio +1 da transcrição está representado pela base adenina (A).

A proteína traduzida a partir da seqüência contínua dos exons, possui 495 resíduos de aminoácidos (Figura 7), faltando a região carboxi-terminal de BiP.

1  
atggctggctcgtgggacgcccgttctctgattggttctagccatc  
M A G S W A R R S L I V L A  
I

46  
atctccttcggatgtctatcttgcgatttccattgctaaggaggaa  
I S F G C L F A I S I A K E  
E

91  
gccaccaagttagggacgggtcatcggcattgatcttggacaacc  
A T K L G T V I G I D L G T  
T

136  
tattcatgtgtcgggtgtttacaagaatggccatggtgaaatcata  
Y S C V G V Y K N G H V E I  
I

181  
gccaacgaccaaggtaacgtatcaccccatcgtgggttgctttc  
A N D Q G N R I T P S W V A  
F

226  
accgacagtgagagactcattggggaggctgccagaatcaggca  
T D S E R L I G E A A K N Q  
A

271  
gctgtcaaccagaaaggaccatctttgatgtcaagagacttadc  
A V N P E R T I F D V K R L  
I

316  
ggaagaaagttcgaagataaggaagttcaaaaagacatgaagctt  
G R K F E D K E V Q K D M K  
L

361  
gttccttataagattgtcaacaaggatggaaaaccttacattcag  
V P Y K I V N K D G K P Y I  
Q

406  
gtgaaaattaaggatggtgagaccaaggtgttcagccctgaggaa  
V K I K D G E T K V F S P E  
E

451  
atcagtgccatgggttctgatcaagatgaaggaaactgcggaagca  
I S A M V L I K M K E T A E  
A

496  
ttcctcgggaagaaaattaatgatgctgtgggtcactgtcccagct  
F L G K K I N D A V V T V P  
A

541  
tacttcaatgatgctcagagggcaggccaccaaggatgctggtgct  
Y F N D A Q R Q A T K D A G  
V

586  
attgctgggtctcaatggtgctagaattatcaacgaacccactgcc  
I A G L N V A R I I N E P T  
A

631  
gctgccattgcctatggattggacaagaaaggtggcgagaagaac  
A A I A Y G L D K K G G E K  
N

676  
attctagtctttgatcttgggtggggacctttgatgtcagtatc  
I L V F D L G G G T F D V S  
I

721  
ttgacaattgataacggtggtttttgaagttcttgctacaaatgga  
L T I D N G V F E V L A T N  
G

766  
gatactcatcttggagggtgaggatcttggatcaaagaataatggag  
D T H L G G E D F D Q R I M  
E

811  
tacttcattaaattgatcaagaaaaagcatggaaaggatattagc  
Y F I K L I K K K H G K D I  
S

856  
aaggacaacagagcacttggaaagctgaggagagaggctgagcgt  
K D N R A L G K L R R E A E  
R

901  
gcaaagagggctctcagcagccagcaccaggtccgcgtggaaatt  
A K R A L S S Q H Q V R V E  
I

946  
gaatcactttttgatggtggttatttttctgagccactcactcga  
E S L F D G V D F S E P L T  
R

991  
gctagggtttgaggagttgaacaatgacttgttccggaagaccatg  
A R F E E L N N D L F R K T  
M

1036  
ggtccagtgaagaaggctatggaagatgctggattacagaagagt  
G P V K K A M E D A G L Q K  
S

1081  
cagattgatgagattggttcttgggtggaagcacaaggattcca

P                    Q I D E I V L V G G S T R I  
 1126  
 aaggtacaacagcttttgaaggactactttgatggaaaggagcca  
                   K V Q Q L L K D Y F D G K E  
 P  
                   1171  
 aacaaggggtcaaccctgatgaagcagttgcctatgggtgctgca  
                   N K G V N P D E A V A Y G A  
 A  
                   1216  
 gtgcaaggaagcattttgagtggagaggggtggtgaagaaaccaa  
                   V Q G S I L S G E G G E E T  
 K  
                   1261  
 gatatccttctcctggatgtggctcccctcactctcggaattgaa  
                   D I L L L D V A P L T L G I  
E  
                   1306  
 actgttggtggagtcatgacaaagttgattcccagaaacactggt  
                   T V G G V M T K L I P R N T  
 V  
                   1351  
 atccccaccaagaaatctcaagtgttcaccacctaccaggaccag  
                   I P T K K S Q V F T T Y Q D  
 Q  
                   1396  
 cagactaccgtctccattcaggttttcgaaggtgagaggagtctc  
                   Q T T V S I Q V F E G E R S  
 L  
                   1441  
 acaaaggattgtcgccttcttgggaaatttgatctgtctggaatt  
                   T K D C R L L G K F D L S G  
 I

**Figura 7: Organização da sequência de aminoácidos e nucleotídeos dos exons do clone gsBiP9**

A seqüência possui 1485 nucleotídeos, em letras minúsculas e 495 aminoácidos, em letras maiúsculas. Na seqüência de nucleotídeos, o códon de iniciação é destacado em verde. Na seqüência de aminoácidos, estão destacados: peptídeo-sinal (sublinhado em preto), sítio de ligação de  $\beta$ - fosfato (sublinhado em vermelho),  $\gamma$  fosfato (sublinhado em azul) e sítio potencial de ligação de ATP (sublinhado em marrom). A seqüência consenso de glicosilação (TGTGTATCA) e o sinal de retenção no RE (HDEL) não foram apresentados, uma vez que o clone está incompleto, e que estas seqüências se localizam no C-terminal.

Análise comparativa de seqüência com outros BiP de soja previamente sequenciados [GeneBank, números de acesso: U08384 (soyBiPA), GMU08383 (soyBiPB), GMU08382 (soyBiPC), AF031241 (soyBiPD)], revelou que gsBiP9 possui maior conservação de seqüência com a isoforma soyBiPD, ou seja, 98,7% de identidade de seqüência (Figura 8). Provavelmente o clone gsBiP9 corresponde a uma forma alélica do gene *soyBiPD*. Consistente com esta interpretação, a extremidade 5' transcrita e não traduzida de gsBiP9 é idêntica à região correspondente de soyBiPD (dados não mostrados).

```

soyBiPD 1  MAGSWARRSLIVLAIISFGCLFAISIAKEEATKLGTVIGIDLGTTYSCVGVYKNGHVEII
gsBiP9  1  MAGSWARRSLIVLAIISFGCLFAISIAKEEATKLGTVIGIDLGTTYSCVGVYKNGHVEII
*****

soyBiPD 61 ANNQGNRITPSWVAFTDSERLIGEAANKLAAVNPERTIFDVKRLIGRKFEDKEVQRDMKL
gsBiP9  61 ANDQGNRITPSWVAFTDSERLIGEAANKQAAVNPERTIFDVKRLIGRKFEDKEVQKDMKL
**:*:*****

soyBiPD 121 VPKYIVNKDGPYIQVKIKDGETKVFSPPEEISAMILTKMKETAEAFLGKKINDAVVTVPA
gsBiP9  121 VPKYIVNKDGPYIQVKIKDGETKVFSPPEEISAMVLIKMKETAEAFLGKKINDAVVTVPA
*****:*

soyBiPD 181 YFNDAQRQATKDAGVIAGLNVARINEPTAAAIAYGLDKKGGEKNILVFDLGGGTFDVSII
gsBiP9  181 YFNDAQRQATKDAGVIAGLNVARINEPTAAAIAYGLDKKGGEKNILVFDLGGGTFDVSII
*****

soyBiPD 241 LTIDNGVFEVLATNGDTHLGGEDFGQRIMEYFIKLIKKKHGKDISKDNRALGKLRREAER
gsBiP9  241 LTIDNGVFEVLATNGDTHLGGEDFDQRIMEYFIKLIKKKHGKDISKDNRALGKLRREAER
*****

soyBiPD 301 AKRALSSQHQRVEIESLFDGVDFSEPLTRARFEELNNDLFRKTMGPVKKAMEDAGLQKS
gsBiP9  301 AKRALSSQHQRVEIESLFDGVDFSEPLTRARFEELNNDLFRKTMGPVKKAMEDAGLQKS
*****

soyBiPD 361 QIDEIVLVGGSTRIPKVQQLLKDYFDGKEPNKGVNPDEAVAYGAAVQEGILSGEGGEETK
gsBiP9  361 QIDEIVLVGGSTRIPKVQQLLKDYFDGKEPNKGVNPDEAVAYGAAVQGSILSGEGGEETK
*****

soyBiPD 421 DILLLDVAPLTLGIETVGGVMTKLIIPRNTVIPTKKSQVFTTYQDQQTTSIQVFEGERSL
gsBiP9  421 DILLLDVAPLTLGIETVGGVMTKLIIPRNTVIPTKKSQVFTTYQDQQTTSIQVFEGERSL
*****

soyBiPD 481 TKDCRLLGKFDLSGIPPAPRGTAQIEVTFEVDANGILNVKAEDKGTGKSEKITITNEKGR
gsBiP9  481 TKDCRLLGKFDLSGI-----
*****

soyBiPD 541 LSQEEIERMVREKDFAEKEKVKERIDARNSLETYVYVMKNQVSDKDKLADKLESEKE
gsBiP9  -----

soyBiPD 601 KIETAVKEALEWLDNQSMEKEDYEELKKEVEAVCNPIISAVYQRSGGAPGGGGASGEED
gsBiP9  -----

soyBiPD 661 EDDSHDEL
gsBiP9  -----

```

**Figura 8: Comparação de seqüências entre soyBiPD e gsBiP9**

A primeira linha representa a seqüência de aminoácidos deduzida do cDNA soyBiPD, enquanto que a linha abaixo representa a seqüência da proteína deduzida de gsBiP9. Asteriscos indicam aminoácidos idênticos. O sinal de retenção no retículo endoplasmático HDEL está destacado em negrito na seqüência soyBiPD.

#### 4.4. Análise de seqüência de promotores de BiP

Dois promotores de genes BiP foram identificados nos clones gsBiP6 (CASCARDO, 1999) e gsBiP9. O primeiro isolado de gsBiP6 possui 397 nucleotídeos (Figura 9B), enquanto que o segundo proveniente de gsBiP9 possui 2.209 nucleotídeos (Figura 9A).

A

```

-2161 Gaattcgggtaatatatatatatatatatatatatatatatatatatatanatatatatat
-2091 atatanatgttntatagtatatatataatgagaataaatatnactttttattttaacananatttata
-2021 naattttganggataaaaataattttttaaaataatttatatagnagatcatntnttttagtntcanc
-1951 tcaantananatnntaataaaaananatanantatcgatatagatacngaagtta aagcttaactacttt
-1881 ttttaattctttaaatttagttaaagattttttgtccctaaaaaaatatgtttttatttagtctctcgaa
-1811 tttttgaaaaattaattttaattttctattttttgttaataatgtcacaatttataaggtttaaaatt
-1741 atcataaattatttttaaataattttttaaaaaatgggtgattgaaaaccaccagtaagtgtaaaactat
-1671 taatacaacgaactaaattaaaagcagtttttaaaatcgagagattataaaaaatatatttaatt
-1601 aatatatgatataataataatggatagacactggtaagatatttaatatgaaatttaaatatacaata
-1531 caataatttctatattgatatttaataaatttttattactttttgaaatcatttagtacttaagataa
-1431 tataaattaaaaacattttttaattttttatcataattttgaaattaaaaaaacgcggactccttttc
-1391 tagattgcatcctctttcaattgataaattatagatatagagaattgtaaaaaatgattcttttaaaaaa
-1321 atcaacatcctgataaaggaacaaccaaatatttatngtaattcaattacattgaaacantattttatt
-1251 tatgaaaaataacttctattgcatattagtttggtttaaaatttaaatataaaataaaatccattttata
-1181 atgtcattatgtcctaataattttaatttacgagaattaaataaaataaagtgttttttttaaaataa
-1111 aatagtcataatgagaatttggtaagaaaaatacataatgggaataaataatgatttttttataataaa
-1041 attaatagcattttgatagaaaaataatatttttaaaatatttatataaaataataaaatatttaaa
-971 tatcagttcaaattaaaataatgataaaaaataaaatagatttaaatcaatggtgatagaaattttaa
-901 taaataataataattatttttatttgcataatgtaatacaattaaattttactttttgataaattagtact
-831 taaagataatattaattaaaaacattatcttttttaagtcaatatatgatataaacattattaaagtt
-761 taaattgtcaatttggttttccataatttttaaaattatgattttaattttctggatttttaattataa
-691 catttgatttttctaatttataaatggataaatttggctctcttattaagttaattataaaatacaaa
-621 aaattattaattattaaaaaataataaataatcaatatttctccataatattgtattttggttccacttc
-551 cactgccacataggagtcaccaatagtaacaataatattaggatataaattttttattaatattttaat
-481 tattaataaatttttaacttataaataataataatctttaataatcataattattaataaataatt
-411 tactgaggatcaaaaatctcaatttataaaactaaaaataaaaaatttaaaaatttagaagcaacaagat
-341 tataatttagcatalgataaaatataatataatgat gataagaagaggatccttagatgattg cccttgata
-271 agttgaggtcgtaaatgacqca cagggtgttcccaacactagaacgaatgccattggttggacaag
-201 caaaaggc gcatttccattggt CCACGTCATCATTAGTGacatggt cgagcgtcaagcgttcaaatcag
-131 gaattgaccaggtttgggcaactacataaaagcctctcgctccctcgt gcaatttcaaaattacattacac
-61 tctctcgacctcgcatcgcaacttcaac ttaacctattccacttgtaatcgtaaacgctt TGCTAGAAG
71 AAGAGACAAAGTGTGTCTGTGTGTGTGAGAGAGAGAGCAATGGCTGGCTCGTGGGCACGCCG

```

B

```

-349 Tagagtacattttaaagattatcagtggtttaaataaatttatattataatttaaattttttataataa
-279 aatttaattgtaatttgatttatattattattattataataaatttcatttgattataaattaaacaca
-209 atgtttgactaaaatcctagttttgaataaatgaagcaagaatgAGACGTGAGGTGTCCCCaagcaa
-140 aaggaccagttttattggccaaacaatgctttctcaaccttagattggtccacatcagcacatatgaca
-71 tgctcgacttgcaagtgagcacttataaatggcgaagtccccgcggtgaaactcaatgaaacctacaa
-1 tTCATCGTCCATCGAGAAAAGGAAGAAAAGAAAACAAGGTGACATCATCATGGCTTGCTCGTTTTCTCGC
71 GG

```

C

			Localização	-----ERSE-----
	CCAAT CCACG			
Dm	CRT	ERSE1		CCAATGAAAACGTTCCAGC
		ERSE2		CCAATCAGGGATGTCTACG
Ce	GRP78	ERSE1		CCAATCGGCGACGGCCGTG
	GRP78	ERSE2		CCTATCGTCCTAGGCCACG
At	GRP78	ERSE1		CCAATCAGGTTTTAACTCG
	CRT	ERSE1		CCAATAGGTAACCGACACG
	CRT	ERSE2		CCAATACTATAACGCCATG
So	GRP78	ERSE1		GGAATATCATTGGTCCACG
Gm	GsBiP9	ERSE1	-193	GCATTTCCATTGGTCCACG
	GsBiP9	ERSE2	-219	GCCATTGGTTGGAACAAGC
	GsBiP9	ERSE3	-280	CCCTTGATAAGTTGAGGTC
	GsBiP9	ERSE4	-552	CCACTGCCACATAGGAGTC
Rc	CRT	ERSE1	-185	CCAATCGTATTATGCCATG
	CRT	ERSE2	-243	CAAA TACGATATTACCACG
	CRT	ERSE3	-314	CCCCTCATAGCACGCCACG
	CRT	ERSE4	-1695	CCAT TCTTTGCTGCTCACG
Na	GRP78	ERSE1		CCAATTGAGCAGCTCGTCCG
Gm	GsBiP6	ERSE1	-135	CCAGTTTTTATTGGCCAAAC
	GsBiP6	ERSE2	-162	GACGTGAGGTGTCCCCAAG
Hs	PDI	ERSE1	-502	CCAGTCAGAATGCAACACG
	PDI	ERSE2	-512	CCAAC TGGCACGCCCCCG
Hs	GRP58	ERSE1	-90	CCAATCAGCGGCTCCCACA
Hs	CRT	ERSE1	-92	CCAATGACAAAGTGGCAGG
	CRT	ERSE2	-191	CCAATAGAAATCGGCCATC
	CRT	ERSE3	-204	CCAATGATGGTGCACCACG
Um	Erp72	ERSE1	-281	CCAATCAGAAGGGCGCACC
	Erp72	ERSE2	-296	CCAATCACGGGCTGCCACT

**Figura 9: Seqüência dos promotores de BiP de soja e comparação de elementos que respondem a estresse no retículo endoplasmático de vários organismos**

**A e B.** Seqüência de nucleotídeos dos promotores de gsBiP9 e gsBiP6, respectivamente. A região promotora está representada com letras minúsculas de cor lilás, os exons estão representados com letras maiúsculas de cor preta, o sítio +1 da transcrição está localizado a 48 bases do códon de iniciação, sendo representado pela base Timina em lilás, em ambos promotores. Em azul, estão os sítios das enzimas de restrição que foram utilizadas na estratégia de clonagem e, em azul sublinhado, estão os sítios de restrição criados por mutação dirigida *in situ*. Em verde e amarelo escuro, estão as seqüências consenso CAAT e TATA, respectivamente. Os elementos que respondem a proteínas mal dobradas estão representados em azul escuro em gsBiP9 e dentro de caixas em gsBiP6. As seqüências conservadas de genes BiP estão representadas em letras maiúsculas. Em cinza, está representado o elemento que responde a auxina (AuxRE) em gsBiP6. Elementos conservados que respondem ao ácido abscísico (ABRE) estão representados em azul escuro sublinhado e o elemento que regula a ativação da transcrição desses genes (CE) está representado em rosa sublinhado. Em preto e cinza, sublinhado estão representados os elementos de genes que são induzidos por

luz e elementos que regulam a ativação da transcrição desses genes (CE), respectivamente.

**C.** Identificação e comparação de elementos que respondem a estresse no retículo endoplasmático (ERSE). Em azul, estão representados os nucleotídeos altamente conservados em vários organismos. Os números negativos indicam a localização do primeiro nucleotídeo (C ou G) da seqüência conservada CCAATN9CCACG e de suas variáveis a partir do sítio de início da transcrição. ERSE1, ERSE2, ERSE3 e ERSE4 indicam que no mesmo promotor a seqüência conservada pode estar presente mais de uma vez.

*Drosophila melanogaster (Dm)*, *Caenorhabditis elegans (Ce)*, *Arabidopsis thaliana (At)*, *Spinacia oleracea (So)*, *Ricinus communis (Rc)*, *Aspergillus niger (An)*, *Glycine max (Gm)*, *Homo sapiens (Hs)* e *Murine (Mu)*. Calreticulina (CRT), proteínas relacionadas a glicose (GRP), gsBiP6 e gsBiP9 (BiP), proteínas do retículo endoplasmático (ERp72) e proteínas disulfeto isomerase (PDI).

Em gsBiP6, a seqüência TATA, 100% conservada com outros genes de plantas, está localizada a 47 nucleotídeos do possível sítio de início de transcrição (Figura 9B, em amarelo escuro). Em gsBiP6, a seqüência CAATT, apresenta-se duplicada e na orientação invertida (ATTGG), estando localizadas a -95 e -128 nucleotídeos do sítio de início de tradução (Figura 9B, em verde). No promotor do gene gsBiP6, as seqüências CAATT estão localizadas na fita de DNA antisenso (CASCARDO, 1999). A expressão gênica em células com alto grau de proliferação, geralmente encontra-se associada com esta característica (MAITY & CROMBRUGGHE, 1988). O promotor de gsBiP6 apresenta um elemento de resposta à auxina (CASCARDO, 1999)(Figura 9B, em cinza). Este elemento regulatório foi identificado em genes induzidos por auxinas (ULMASOV et al., 1999, GUILFOYLE et al., 1998, ULMASOV et al., 1997) e confere inducibilidade à auxina quando ligado a um promotor mínimo (LI et al., 1994, LIU et al., 1994).

Outros elementos conservados que respondem a fitorreguladores, e a luminosidade foram encontrados nesses promotores. Esses elementos pertencem a classe dos G-box, que são genes induzidos por fatores ambientais. O elemento G-box é requerido para o reconhecimento de inúmeros estímulos ambientais, entre eles, o estresse hídrico. Deleções ou mutações nessa seqüência comprometem a habilidade do promotor responder a um determinado estímulo (INGRAN & BARTELS, 1996). Uma característica marcante desses promotores induzidos é a presença de um elemento acoplador (CE) que juntamente com o elemento G-box é requerido para o controle da ativação da transcrição. O elemento que responde ao ácido

abscísico (ABRE) encontrado em promotores de vários genes é um exemplo de G-box. Mutações em promotores de genes contendo os elementos G-box:ABRE mostra que o elemento G-box é necessário mas não suficiente para conferir inducibilidade a ABA. Assim, Gbox:ABRE atua recrutando fatores de transcrição mais gerais que funcionam em conjunto com proteínas regulatórias específicas para ativar a RNA polimerase II em resposta à ABA (BUCHANAN et al., 2000).

Em trigo, o gene *em*, induzido em condições de estresse hídrico, contém o elemento G-box:Em 5' GACACGTGGC 3', coordenadas -152 e -142, que é requerido, juntamente com o elemento CE:Em, 5' CGAGCAGGC 3', coordenadas -126 e -117, para a indução da expressão transiente do gene repórter em protoplasto de arroz transgênico, sob condições de estresse simulada pela adição de ABA (BUCHANAN et al., 2000). Um outro exemplo de uma família de genes que contém os elementos G-boxes incluem os genes que codificam para a subunidade menor da Rubisco (*RBCS*). O gene *rbcS* de *Arabidopsis*, induzido pela luz, contém o elemento G-box:RBCS 5' TCCACGTGGC 3', coordenadas -261 e -255, que é requerido, juntamente com o elemento CE:RBCS, 5' GATAAG 3', coordenadas -239 e -229, para a indução da expressão em condições de luminosidade. Em ambos os genes, *em* e *rbcS*, a distância entre o G-box e o CE são de 16 nucleotídeos (BUCHANAN et al., 2000).

No promotor do gene *gsBiP9* de soja, dois elementos com certo nível de homologia com G-box (CAGGTG), coordenadas -180 e -170 (Figura 9A, em azul escuro sublinhado); -245 e -239 (Figura 9A, em preto), e seus CE, coordenadas -155 e -147; -275 e -270; -306 e -301 (Figura 9A, em rosa e cinza, respectivamente) foram encontrados. O primeiro apresenta homologia com *Em* e o segundo apresenta homologia com *RBCS* (Figura 9A). O promotor do gene *gsBiP9* contém um elemento homólogo a G-box:ABRE:gsBiP9 5' TCCACGTGCAT 3', coordenadas -180 e -170 (Figura 9A, em azul escuro sublinhado), candidato a elemento regulador, que possivelmente atua juntamente com o elemento CE:ABRE:gsBiP9, 5' CGAGCGTCA 3', coordenadas -155 e -146 (Figura 9A, em rosa sublinhado) para ativação do promotor de *gsBiP9* em resposta a estímulos. Interessantemente, a distância

entre o G-box:ABRE:gsBiP9 e o seu CE:ABRE:gsBiP9 são de 16 nucleotídeos, como em genes *em* e *rbcS*.

O elemento G-box:RBCS:gsBiP9 5' CACAGGTGTT 3' encontrado em gsBiP9, coordenadas -245 e -240 (Figura 9A, em preto sublinhado), apresenta seu CE:RBCS:gsBiP9 5' GATAAG 3', coordenadas -275 e -270; -306 e -301 (Figura 9A, em cinza sublinhado), duplicados e idênticos entre si e com o CE do promotor do gene *RBCS*, que é induzido pela luz. A distância entre o primeiro e o segundo CE:RBCS:gsBiP9, em relação ao G-box:RBCS:gsBiP9 são de 22 e 53 nucleotídeos, respectivamente. A presença de dois CE:RBCS:gsBiP9 sugere uma maior eficiência no controle da ativação da transcrição de promotores de genes induzidos por luz. O gene gsBiP6 contém o elemento G-box:Em:gsBiP6 5' GAGACGTGAG 3', coordenadas -164 e -154 (Figura 9B, em azul sublinhado), entretanto não possui o elemento CE:Em:gsBiP6.

Em espinafre, foi descrito que a região promotora contém seqüências consenso específicas de genes *hsp70*, como as seqüências conservadas de BiP. Essa seqüência foi descrita como sendo 5' CCACGTCATCATTAGTG 3', coordenadas -206 e -189, a partir do sítio de início da tradução (ANDERSON et al., 1994). Uma seqüência similar foi encontrada em gsBiP6 e gsBiP9. O promotor de gsBiP9 contém a seqüência 5' CCACGTCATAGTTTCTG 3', coordenadas -227 e -211 (Figura 9A, em letras maiúsculas), enquanto que, no promotor de gsBiP6 esta seqüência, 5' AGACGTGAGGTGTCCCC 3', tem coordenadas -211 e -195 (Figura 9B, em letras maiúsculas).

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' CCAATN<sub>9</sub>CCACG 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). No promotor de gsBiP9, uma seqüência homóloga este elemento se encontra repetido quatro vezes, ERSE1 5' CCACTGCCACATAGGAGTC 3' , coordenadas -552 e -534; ERSE2 5' CCCTTGATAAGTTGAGGTC 3' , coordenadas -280 e -262; ERSE3 5' GCCATTGGTTGGAACAAGC 3' , coordenadas -219 e -201 e ERSE4 5'

GCATTTCCATTGGTCCACG 3' , coordenadas -193 e -175 (Figura 9A, em azul escuro). No entanto, em gsBiP6 somente duas seqüências, com certa homologia, ERSE foram encontradas, sendo a ERSE1 5' CCAGTTTTATTGGCCAAAC 3', coordenadas -135 e -117 e ERSE2 5' GACGTGAGGTGTCCCAAG 3', coordenadas -162 e -144 (Figura 9B, em azul escuro).

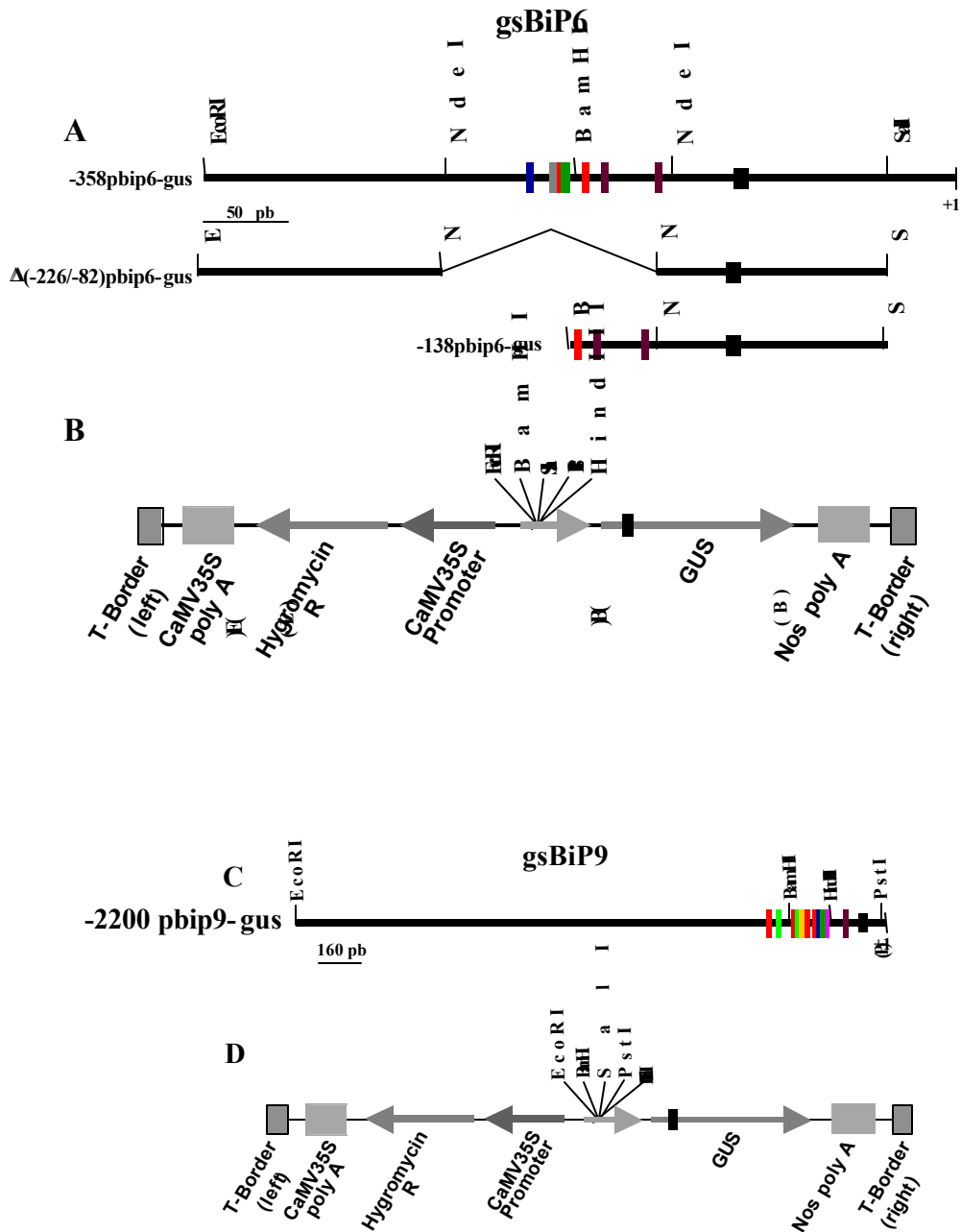
Comparações de ERSE encontrados nos promotores de gsBiP6 e gsBiP9 com outros ERSE presentes em promotores de vários organismos revelam que os elementos encontrados nos promotores de gsBiP6 e gsBiP9 possuem certa homologia com os outros ERSE (Figura 9C) e que aparentemente esses ERSE ativam a resposta a proteínas mal-dobradas (UPR). A seqüência consenso 5' CCAATN<sub>6</sub>CCACG 3' está presente em vários promotores sem nenhuma alteração. No entanto, em alguns promotores ocorrem algumas variações nessa seqüência consenso. Interessantemente, o quinto nucleotídeo, timina e o último nucleotídeo, guanina ou citosina, ambos na orientação 5'-3', presentes nessas seqüências são conservados em quase todos os ERSE, exceto em PDI, ERS2, GRP58, ERSE1 e ERSE2 (Figura 9C). A região variável representada por nove nucleotídeos é caracterizada por ser uma região rica em guanina e citosina em alguns genes.

#### **4.5. Os genes quiméricos gsBiP6:GUS e gsBiP9:GUS exibem regulação similar aos genes BiP de plantas sob condições de estresses**

Para analisar o padrão de expressão dos promotores de gsBiP6 e gsBiP9 e identificar seqüências específicas responsáveis pelo controle da expressão da proteína BiP nos diferentes órgãos sob condições normais e de estresses, vários clones foram obtidos no vetor de expressão em plantas, pCAMBIA1381Z (Figura 10A, B, C e D). Em gsBiP6, as deleções foram conduzidas na orientação 5' - 3' e em regiões internas do promotor. A construção -

358pbip6-gus possui 358 pb (CASCARDO, 1999) e contém todos os elementos conservados citados anteriormente, dentre eles a seqüência UPRE (Figura 10A, em vermelho) e o G-box (Figura 10A, em azul), contudo, o elemento CE, não está presente nesse promotor. As duas seqüências UPRE estão localizados entre os sítios de restrição *NdeI* da construção -358pbip6-gus. A região *NdeI* foi deletada e a seqüência de nucleotídeos foi religada originando a construção  $\Delta(-226/-82)$ pbip6-gus. A construção  $\Delta(-226/-82)$ pbip6-gus não contém as duas seqüências UPRE e o G-box. A construção -138pbip6-gus não contém a região *EcoRI/BamHI*, entretanto contém a região promotora básica, representada pelas seqüências TATA (Figura 10A, em preto) e duas seqüências CAATT invertidas (Figura 10A, em marrom).

A construção -2200pbip9-gus possui 2.189 pb e contém quatro UPRE (Figura 10C, em vermelho), os G-box (Figura 10C, em azul ou amarelo) e seus respectivos CE (Figura 10C, em rosa ou verde claro). Três seqüências UPRE estão localizadas entre os sítios de restrição *BamHI* e *HindIII*. A quarta seqüência UPRE está localizada entre *EcoRI* e *BamHI*. Os G-box e seus respectivos CE estão localizados entre os sítios de restrição *BamHI* e *HindIII*, com exceção de um dos dois CE, que são duplicados nesse promotor, que encontram-se antes do sítio *BamHI*.

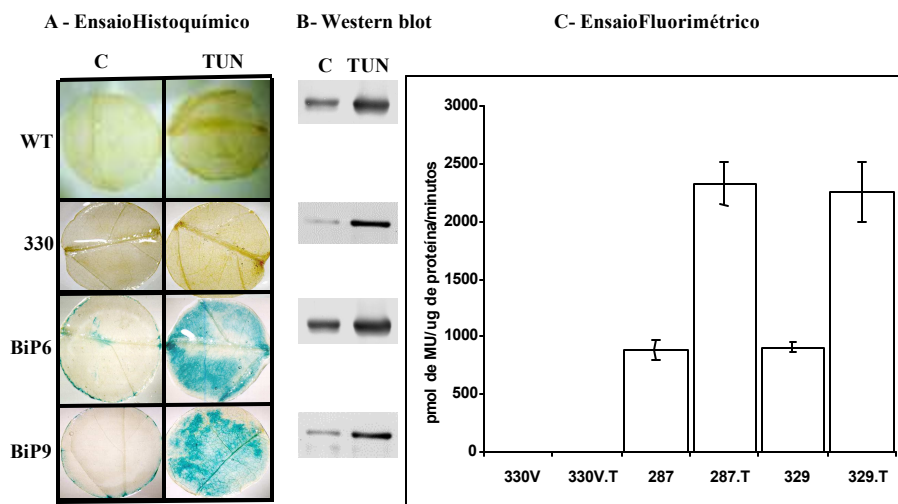


**Figura 10: Construção dos genes quiméricos bip6-gus e bip9-gus em vetor binário de transformação de plantas.**

**A e C.** Os promotores gsBiP6 (A) e gsBiP9 (C) foram digeridos com as enzimas de restrição indicadas e fundidos com o gene repórter GUS em pCAMBIA1381Z, conforme indicado na figura. Os traços coloridos indicam: seqüência TATA (preto), seqüência CAATT (marrom), CE:ABRE (rosa), seqüências conservadas em BiPs (verde escuro), G-Box:ABRE (azul), ERSE (vermelho), G-box:luz (amarelo) e CE:luz (verde claro). As figuras estão representadas em escala.

**B e D.** Organização do T-DNA do pCAMBIA1381Z, indicando o gene de resistência à higromicina, o *polylinker* e GUS.

Os genes BiP da soja são induzidos por agentes que promovem o acúmulo de proteínas anormais no retículo endoplasmático (CASCARDO et al., 2000). Consistente com esta observação, as regiões 5' de gsBiP6 e gsBiP9 contêm dois ou mais *cis*-elementos conservados UPRE que regulam a expressão de BiP por meio da rota UPR (Figura 9C). Assim sendo, com a finalidade de examinar se os genes quiméricos bip6-gus (CASCARDO, 1999) e bip9-gus estavam sendo corretamente regulados em tabacos transgênicos, discos foliares, transformados com os referidos genes quiméricos, foram incubados com tunicamicina, um potente ativador da via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR), e a atividade de GUS foi determinada (Figura 11). A expressão de GUS nos discos foliares, contendo tanto a construção -358bip6-gus (BiP6) quanto -2200bip9-gus (BiP9), determinada por ensaio histoquímico, foi induzida por tunicamicina, indicando que ambos promotores de BiP são corretamente ativados pela rota UPR (Figura 11A). A indução dos BiP endógenos por tunicamicina (Figura 11B) confirmou que o tratamento foi eficiente em induzir a UPR. A atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase foi também determinada por meio de ensaio fluorimétrico, indicando que o tratamento com tunicamicina promoveu um aumento de três vezes na atividade de GUS nos discos foliares transgênicos (Figura 11C). Estes resultados confirmaram que os elementos que respondem às proteínas mal dobradas (UPRE) presentes nos promotores isolados de BiP são ativos, e que a expressão GUS sob controle dos promotores de BiP é similar à expressão de BiP endógeno.



### **Figura 11: Indução dos promotores de BiP por tunicamicina.**

**A)** Os discos foliares de tabaco não transformados (WT), transformados sem o promotor (330), transformados com a construção -358pbip6-gus (BiP6) e transformados com a construção -2200pbip9-gus (BiP9) foram incubados na ausência (C) ou presença de tunicamicina (TUN), sendo a atividade de GUS, determinada por meio de ensaio histoquímico. Linha WT, C e TUN (CASCARDO, 1999).

**B)** As proteínas totais foram extraídas dos discos foliares tratados (TUN) ou não com tunicamicina (C). Em seguida, 15 µg de proteínas totais foram separadas em SDS-PAGE, transferidas para nitrocelulose e hibridizadas com o anticorpo de BiP.

**C)** A atividade da enzima β-glucuronidase foi determinada por meio de ensaio fluorimétrico, em extratos de proteína total obtidos de discos foliares de plantas transformadas sem o promotor (330), e transformadas com a construção -358pbip6-gus (BiP6) e -2200pbip9-gus (BiP9). A atividade do promotor foi induzida com tunicamicina (T) na concentração de 5,0 µg/ml.

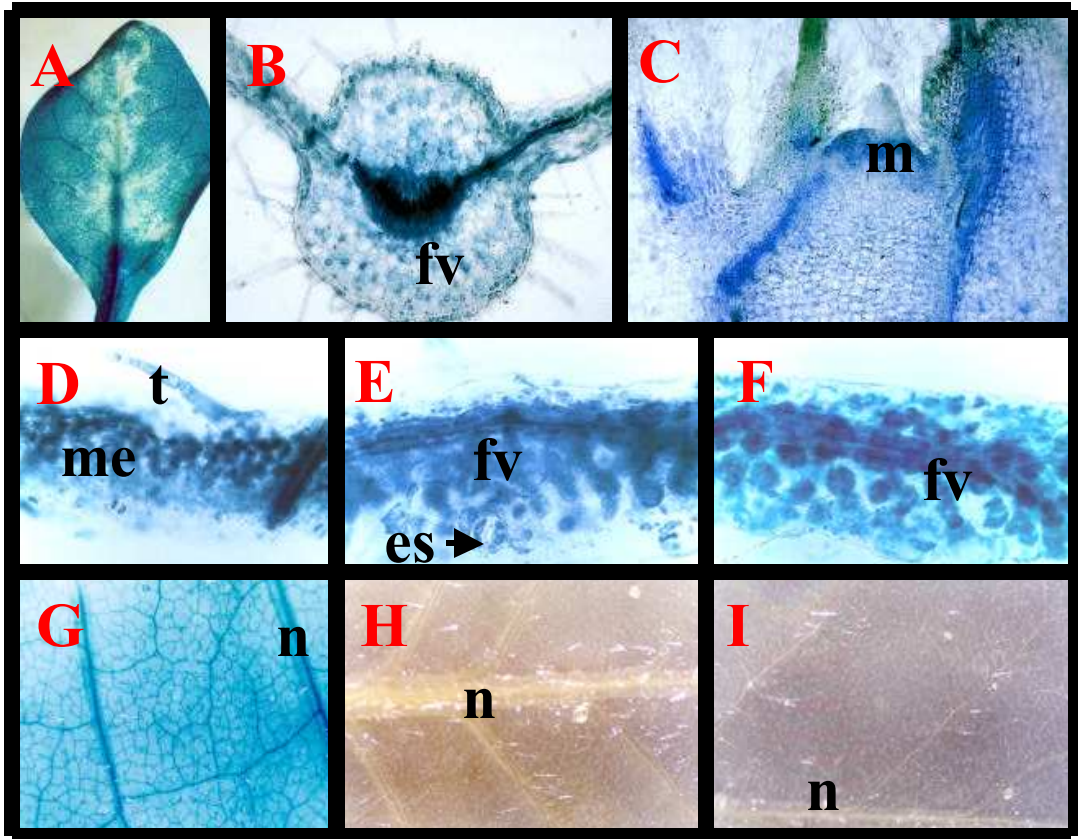
### **4.6. Distribuição espacial da atividade de GUS em folhas, caules e raízes transgênicos**

A família gênica de BiP exibe uma expressão órgão-específica (CASCARDO et al., 2001). Análises histoquímicas da expressão de GUS foram feitas em folhas, caules e raízes (Figuras 12, 13 e 14, respectivamente) de plantas transformadas com genes quiméricos BiP6:gus ou BiP9:gus (Figuras 10A e 10C), com objetivo de determinar se o promotor de BiP poderia conferir um padrão de expressão órgão-específico e/ou tecido-específico. Análises histoquímicas das plantas transgênicas demonstraram que o padrão de expressão do gene quimérico -357pbip6:gus foi idêntico àquele do gene quimérico -2200pbip9:gus e os resultados apresentado referem-se apenas a uma linhagem transformada representativa.

A Figura 12 mostra um exemplo típico do padrão predominante da atividade histoquímica de GUS observada em folhas de linhagens transformadas independentes. O promotor de BiP produziu um padrão uniforme de expressão de GUS em folhas (Figura 12A). Entretanto, em cortes longitudinais (Figura 12D, 12E e 12 F) de folhas, uma intensa atividade

histoquímica de GUS foi observada nos feixes vasculares e mesofilo. Assim também, no meristema apical, foi observada intensa atividade de GUS (Figura 12C). A Figura 12B mostra um corte transversal de pecíolo, no qual foi detectado uma atividade de GUS predominantemente na região vascular. A ausência total de coloração em folhas de plantas -controle transformadas com o gene gus sem o promotor (Figuras 12H e 12I) 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. Intensa atividade de GUS foi também detectada nos feixes vasculares de caule (Figura 13D e 13G) e em regiões de traço foliar (Figuras 13E, 13F e 13H). 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. Coerente com esta observação, a atividade histoquímica de GUS é muito menos intensa no parênquima xilemático (Figura 13I). Em raízes transformadas com os genes quiméricos, a única região que não apresentou atividade de GUS foi a coifa radicular (Figura 14B). Alta expressão de GUS foi detectada na região procambial (Figuras 14C, 14E e 14G) e nas regiões meristemáticas dando origem a raízes laterais (Figuras 14D e 14F).

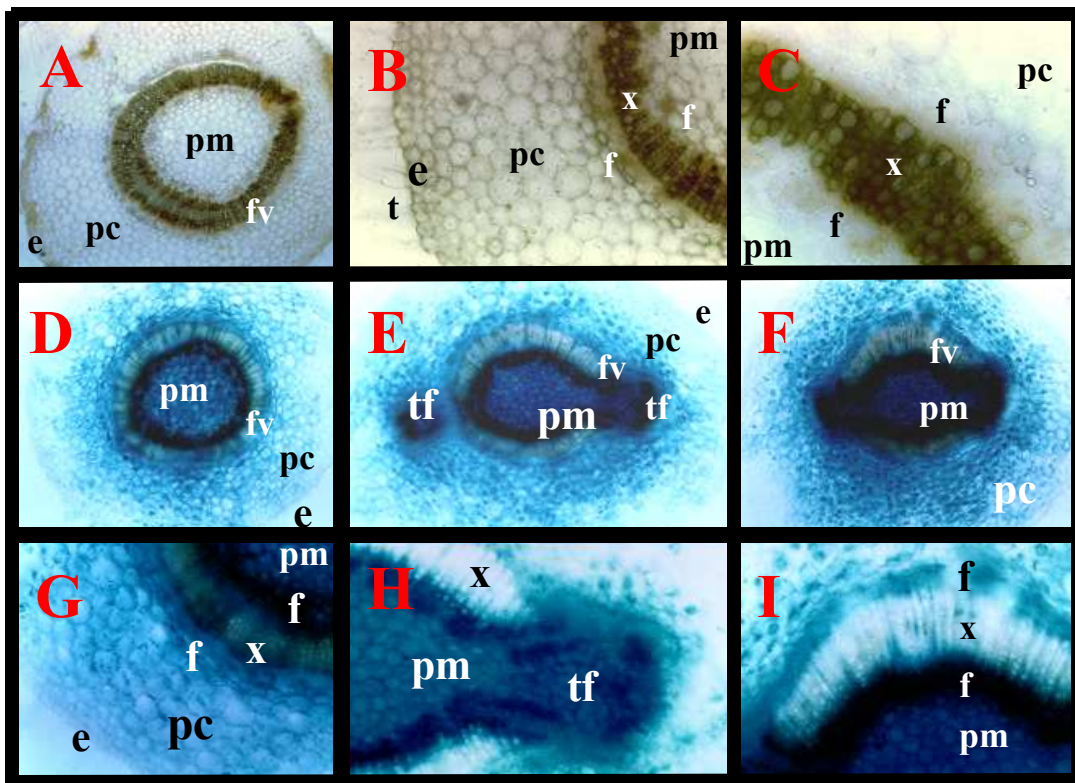
De um modo geral, as análises histoquímicas das plantas transformadas mostraram uma alta atividade de GUS em regiões meristemáticas, tricomas foliares e região vascular de vários órgãos. Alta atividade foi também detectada nas raízes, especialmente em tecidos associados com às regiões vasculares e pêlos radiculares. Assim sendo, a atividade dos promotores gsBiP6 e gsBiP9 está associada com divisão celular e alta atividade secretora. Em plantas, tem sido demonstrada que a expressão de BiP está sob regulação tecido-específica e temporal. O mRNA de BiP de tabaco acumulou predominantemente em tecidos associados com alta atividade secretora e em tecidos com alta proporção de células em ativo processo de divisão celular (DENECKE et al., 1991). Assim também, tem sido demonstrada que a expressão de BiP de soja é regulada por eventos de desenvolvimento que são associados à intensa atividade secretora (FONTES et al., 1996; KALLINSKI et al., 1994). Estes estudos de promotores de BiP em plantas transgênicas demonstraram que a expressão dos genes BiP de plantas em condições normais de crescimento é regulado, pelo menos em parte, em nível transcricional.



**Figura 12: Padrão de expressão do promotor de BiP em folhas de tabaco**

A expressão de GUS foi analisada em folhas de plantas transformadas sem o promotor (Figuras H e I) e plantas transformadas com as construções -358pbip6-gus ou -2200pbip9-gus (Figuras A, B, C, D, E, F e G). As figuras A e G mostram a expressão de GUS em folha. A expressão de GUS também é mostrada em corte transversal de pecíolo (Figura B), meristema apical (Figura C) e cortes longitudinais de folhas (Figuras D, E e F). Figuras A, B e C (CASCARDO,1999).

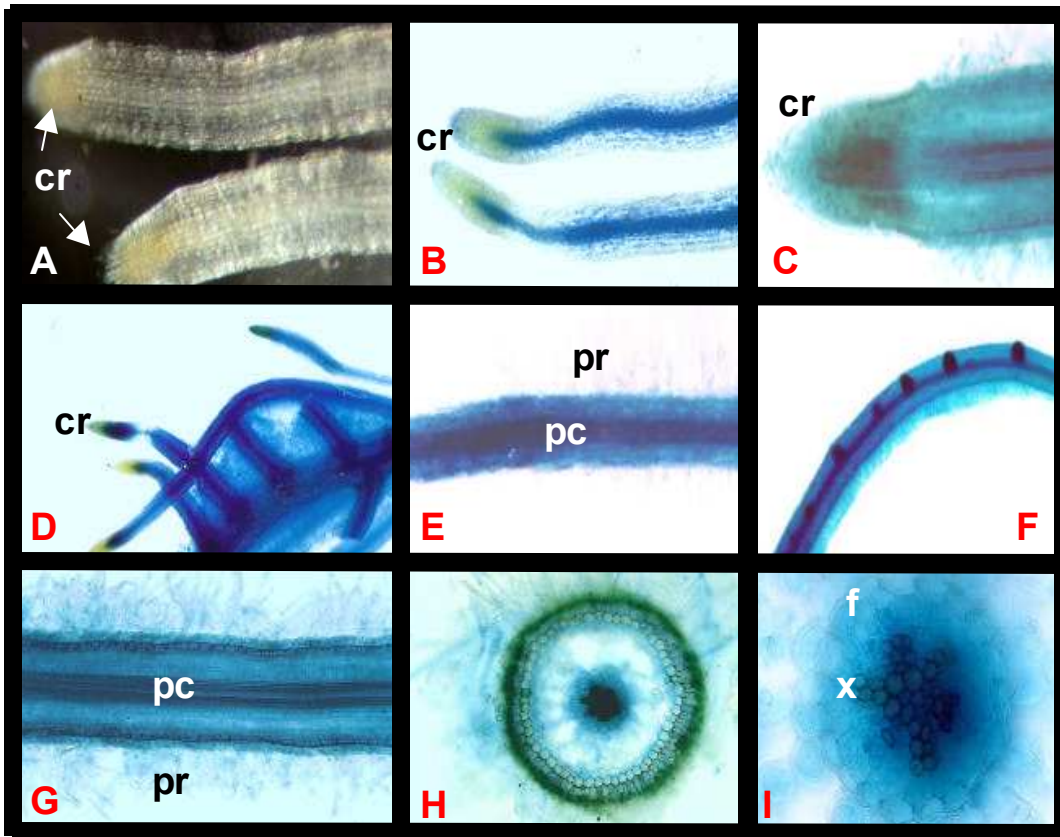
**fv:** feixe vascular; **m:** meristema apical; **me:** mesofilo; **n:** nervura; **es:** estômato e **t:** tricoma.



**Figura 13: Padrão de expressão do promotor de BiP em caule de tabaco**

A expressão de GUS foi analisada em caules de plantas transformadas sem o promotor (Figuras A, B e C) e plantas transformadas com as construções -358pbip6-gus ou -2200pbip9-gus (Figuras D, E, F, G, H e I). As figuras D, E, F, G, H e I mostram a expressão de GUS em cortes transversais de caules.

**fv:** feixe vascular; **t:** tricoma; **pm:** parênquima medular; **pc:** parênquima cortical; **e:** epiderme; **t:** tricoma; **f:** floema; **x:** xilema e **tf:** traço foliar



**Figura 14: Padrão de expressão do promotor de BiP em raiz de tabaco**

A expressão de GUS foi analisada em raiz de plantas transformadas sem o promotor (Figura A) e plantas transformadas com as construções -358pbip6-

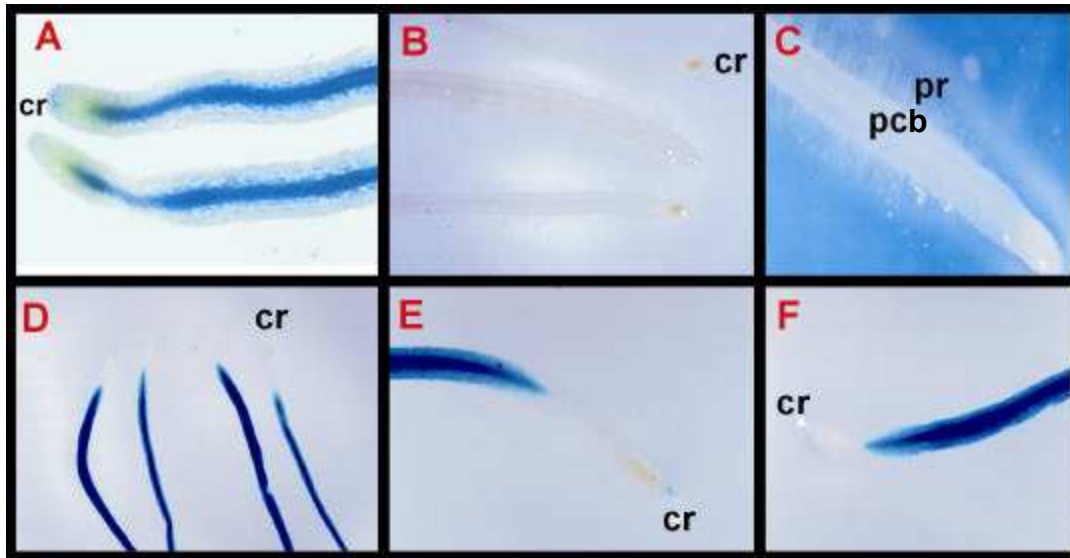
gus ou -2200pbip9-gus (Figuras B, C, D, E, F, G, H e I). A expressão de GUS é mostrada em raízes (Figuras B, D, E e F), cortes longitudinais de raízes (Figuras C e G) e cortes transversais de raízes (Figuras H e I). Figuras C, D, F, G, H e I (CASCARDO, 1999).

**f:** floema; **x:** xilema; **cr:** coifa radicular; **pc:** procâmbio e **pr:** pêlos radiculares.

#### **4.7. Um domínio *cis*-regulador é requerido para a expressão de BiP em meristemas**

O promotor de gsBiP6 foi deletado na extremidade 5' ( $\Delta$ 180BiP6:gus) e internamente ( $\Delta$ BiP6:gus), e as seqüências resultantes foram fusionadas ao gene repórter gus. As deleções de seqüências do promotor BiP6 até a posição -138 (Figura 10A) causou a completa perda da expressão de GUS em raízes (Figuras 15B e 15C), caule (Figuras 16D, 16E e 16F), folhas (Figura 17A) e no meristema apical (Figura 18C). Aparentemente a região remanescente que contém a seqüência conservada TATA (-40) e duas seqüências CCAAT invertidas (posições -97 e -127) 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' na posição -82 do promotor de BiP6 que engloba a seqüência TATA (-40) do promotor de gsBiP6, resultando na construção  $\Delta(-226/-82)$ pbip6-gus (Figuras 15D, 16A, 17B e 17C). Assim sendo, a seqüência de gsBiP6 delimitada pelas posições -358 e -226 deve possuir um "enhancer" típico, sendo caracterizada por uma seqüência rica em resíduos de adenina e timina e foi designada domínio regulatório *cis*-atuante 1 (CRD1). Entretanto, a região CRD1 não restaura completamente a regulação tecido-específica do gene repórter gus, uma vez que a expressão em regiões meristemáticas de raízes e no meristema apical requer seqüências adicionais entre os nucleotídeos -226 e -82, e esta região foi designada domínio regulatório *cis*-atuante 2 (CRD2). De fato, a deleção da região CRD2 na construção construção  $\Delta(-226/-82)$ pbip6-gus aboliu completamente a atividade de GUS em regiões de crescimento de raízes, na região procambial (Figuras 15E e 15F), no meristema apical (Figura 18B) e no floema do caule (Figuras 16B e 16C). Em contraste, a remoção de CRD2 aparentemente causa um aumento significativo na atividade de GUS no

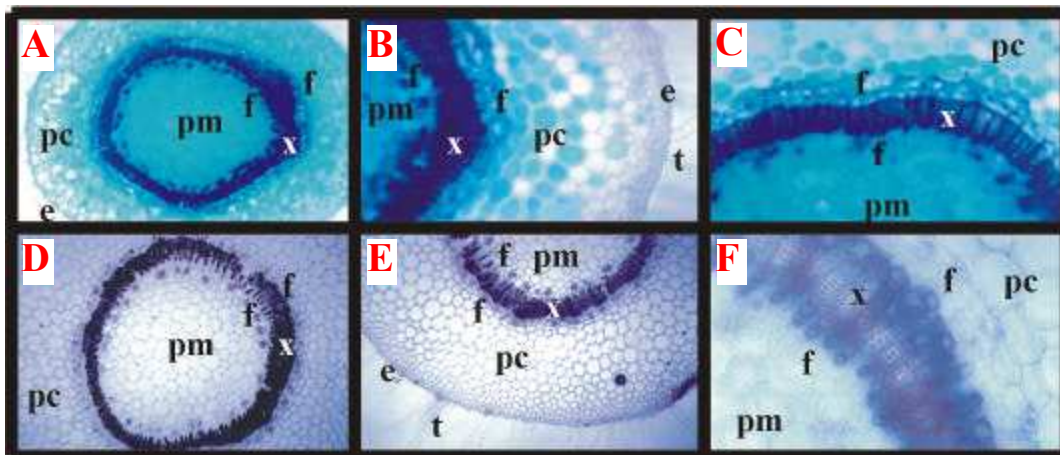
parênquima xilemático (compare as Figuras 16B e 16C com Figura 13I). Coletivamente, estes resultados indicam que a região central do promotor de gsBiP6, delimitada pelas posições -226 e -82 e denominada CRD2, contém tanto *cis*-elementos regulatórios positivos quanto *cis*-elementos negativos que contribuem para o padrão tecido-específico de expressão controlado pelo promotor de gsBiP6.



**Figura 15: Padrão de expressão do promotor de gsBiP6 em raiz de tabaco**

A expressão de GUS foi analisada em raízes de plantas transformadas com as construções -358pbip6-gus (Figura A), -138pbip6-gus (Figuras B e C) e  $\Delta(-226/-82)$ pbip6-gus (Figuras D, E e F). As figuras A, D, E e F mostram a expressão de GUS em raízes.

**cr:** coifa radicular; **pcb:** procâmbio e **pr:** pêlos radiculares.



### Figura 16: Padrão de expressão do promotor de gsBiP6 em caule de tabaco

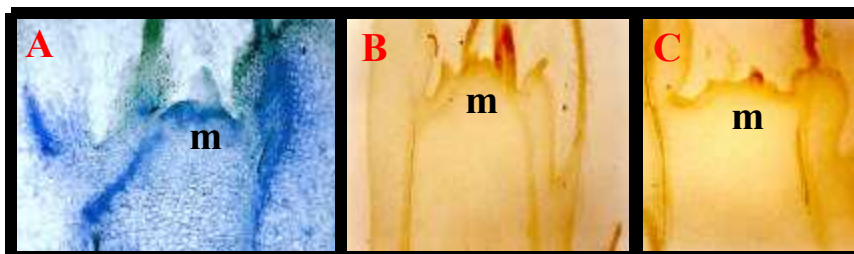
A expressão de GUS foi analisada em caules de plantas transformadas com as construções  $\Delta(-226/-82)$ pbip6-gus (Figuras A, B e C) e -138pbip6-gus (Figuras D, E e F). As figuras A, B e C mostram a expressão de GUS em cortes transversais de caule.

t: tricoma; pm: parênquima medular; pc: parênquima cortical; e: epiderme; t: tricoma; f: floema; x: xilema.



### Figura 17: Padrão de expressão do promotor de gsBiP6 em folhas de tabaco

A expressão de GUS foi analisada em folha de plantas transformadas com as construções  $\Delta(-226/-82)$ pbip6-gus (Figuras B e C) e -138pbip6-gus (Figuras A). As figuras B e C mostram a expressão de GUS em folha e pecíolo. n: nervura; pe: pecíolo; fv: feixe vascular.



### Figura 18: Padrão de expressão do promotor de gsBiP6 em meristemas

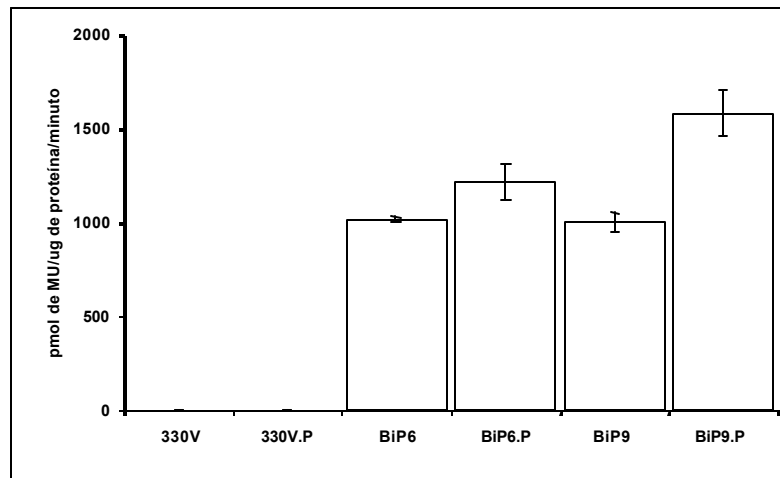
A expressão de GUS foi analisada em meristemas de plantas transformadas com a construção -358pbip6-gus (Figura A) e com as construções  $\Delta(-226/-82)$ pbip6-gus (Figuras B) e -138pbip6-gus (Figuras C). A figura A mostra a expressão de GUS no meristema apical dirigida pelo promotor completo. Figura A (CASCARDO, 1999). m: meristema.

## 4.8. Ativação de promotores de gsBiP6 e gsBip9 por estresse osmótico

A indução de BiP sob condição de estresse osmótico difere da cinética de indução por tunicamicina,

sugerindo uma nova rota de transdução de sinal, distinta da UPR (CASCARDO et al., 2000). Plantas de tabaco transgênicas apresentando expressão aumentada de BiP quando comparadas as plantas controles são tolerantes ao estresse hídrico prolongado (ALVIM et al., 2001). Os promotores de BiP, como descrito anteriormente, apresentam elementos conservados, que estão relacionados com a resposta ao estresse hídrico. Assim sendo, com o objetivo de elucidar os mecanismos de resposta ao estresse osmótico, discos foliares de plantas de tabaco transgênicas, expressando GUS sob a regulação dos promotores gsBiP6 e gsBiP9 foram analisados sob condição de estresse osmótico simulado por PEG 10%, o qual corresponde ao  $\Psi_w = -1,4$  MPa.

Discos foliares foram incubados em meio MS suplementado com PEG durante 48 horas. As proteínas dos discos foliares foram extraídas e a atividade de GUS foi analisada por meio de ensaio fluorimétrico (Figura 19). Foi observado um aumento (1,6x) da expressão de GUS em discos foliares transformados com gsBiP9 (Figura 19), indicando que provavelmente os elementos regulatórios para resposta ao estresse osmótico (G-box:ABRE:gsBiP9 e CE:ABRE:gsBiP9), presentes no promotor de gsBiP9 são funcionais. Um ligeiro acúmulo de expressão foi observada em discos foliares transformados com o gene -358pbip6-gus (Figura 19). Sugere-se que a ausência do elemento CE:ABRE:gsBiP6, que atua juntamente com G-box:ABRE:gsBiP6, seria necessário para uma eficiente resposta ao estresse osmótico.



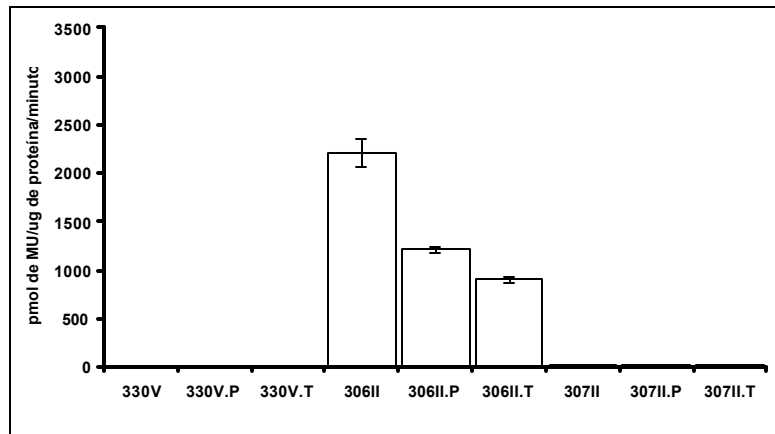
**Figura 19: Indução dos promotores de gsBiP6 e gsBiP9 por PEG.**

A atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase foi determinada por meio de ensaio fluorimétrico, em extratos de proteína total obtidos de discos foliares de plantas transformadas sem o promotor (330), e transformadas com as construções -358pbip6-gus (BiP6) ou -2200pbip9-gus (BiP9). A atividade do promotor foi induzida com PEG (P) na concentração de 10% (p/v).

#### **4.9. O domínio regulatório *cis*-atuante 2 contém seqüências UPRE funcionais e elementos que respondem a estresse osmótico**

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 gsBiP6 foram conduzidas na orientação 5' - 3' (-138pbip6-gus) e no interior do clone  $\Delta(-226/-82)$ pbip6-gus (Figura 10A).

A remoção do domínio *cis*-regulatório 2 [ $\Delta(-226/-82)$ pbip6-gus] causou a inativação do promotor em resposta ao tratamento com PEG ou tunicamicina e promoveu uma diminuição na expressão basal do gene repórter gus. (Figura 20). Consistentemente, os dados sugerem que a região possui os elementos UPRE e o G-box:ABRE:gsBiP6. Remoção da região -357 a -138 na construção -138pbip6-gus foi suficiente para anular completamente a expressão de GUS (Figura 20). Isso poderia ser explicado devido a ausência dos dois elementos CAATT invertidos, que são responsáveis pelo aumento da taxa de transcrição. Coletivamente estes resultados indicam que o domínio CRD2 (-226 a -82) é requerido tanto para expressão basal do promotor BiP6 quanto para sua inducibilidade em resposta a tunicamicina e PEG.



**Figura 20: Análise das deleções do promotor de gsBiP6 sob condições de estresse simuladas por tunicamicina e PEG.**

A atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase foi determinada por meio de ensaio fluorimétrico, em extratos de proteína total obtidos de discos foliares de plantas transformadas sem o promotor (330), e transformadas com as construções  $\Delta(-226/-82)$ pbip6-gus (306) ou -138pbip6-gus (307). A atividade do promotor foi induzida com tunicamicina (T) na concentração de 5,0  $\mu$ g/ml ou polietilenoglicol 10% (P).

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nessa investigação com relação à regulação espacial da expressão de BiP sob condições normais de desenvolvimento da planta demonstraram claramente a existência de controles distintos e complexos para a transcrição de genes BiP em condições normais e de estresses fisiológicos. Análise da atividade do promotor em tabacos transformados com o gene quimérico promotor bip-gus revelou que BiP acumula predominantemente no tecido vascular em vários órgãos, e em regiões meristemáticas de caule, raiz, folha e no mesófilo. Como um padrão predominante de expressão, altos níveis da atividade de gus foram observados nos tecidos vasculares, e em regiões de intensa divisão e secreção celular.

Estes resultados são consistentes com a função biológica de BiP na coordenação da taxa de síntese de proteínas secretoras com a capacidade de processamento do retículo endoplasmático. Contudo, os resultados da análise de atividade do promotor do gene BiP por meio de fusão transcricional com o gene repórter gus não permitem eliminar a possibilidade de que o acúmulo da proteína BiP em diferentes órgãos da planta de soja seja diferente do padrão de expressão do gene repórter, devido à ausência de elementos regulatórios transcricionais ou controle pós-traducional. Entretanto, diversas linhas de evidências indicam que a análise da expressão do gene repórter reproduz

corretamente a expressão tecido-específica de BiP. Primeiro, a regulação espacial dos genes quiméricos -358pbip6-gus e -2200pbip9-gus foi consistente com o padrão de acúmulo do mRNA de BiP em tabaco (DENECKE et al., 1991), em milho (FONTES et al., 1991), e em soja (KALINSKI et al., 1995). Além disso, a proteína BiP de plantas acumula predominantemente em tecidos associados com alta atividade secretora e elevada proporção de células em franca divisão celular (FONTES et al., 1996; FONTES et al., 1991). Finalmente, a expressão dos genes quiméricos -2200pbip9-gus e -358pbip6-gus foi induzida por tunicamicina, conforme previsto pelas análises do acúmulo da proteína e do mRNA de BiP sob condições de estresses que ativam a via UPR (ALVIM et al., 2001; CASCARDO et al., 2000; FIGUEIREDO et al., 1997; FONTES et al., 1991; DENECKE et al., 1991). Poucos estudos têm utilizado promotores de BiP de plantas fusionados a genes repórteres para identificar *cis*-elementos regulatórios responsivos a estresses, bem como para examinar a expressão tecido-específica de BiP durante o desenvolvimento da planta (CASCARDO et al., 2000). Utilizando diferentes construções de seqüências 5' dos genes BiP ligadas transcricionalmente ao gene gus, pelo menos dois domínios funcionais foram identificados no promotor de BiP, o domínio regulatório *cis*-atuante 1 (CRD1) e o domínio regulatório *cis*-atuante 2 (CRD2). A região CRD1 compreende os nucleotídeos -358 a -226, sendo caracterizada pela predominância quase absoluta de adeninas e timinas. Este 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.

O segundo domínio CRD2, delimitado pelos nucleotídeos -226 a -82, contém elementos regulatórios positivos e negativos que coordenam a expressão tecido-específica do promotor de gsBiP6. Enquanto que a atividade do promotor de BiP em regiões meristemáticas de raízes, como a região do procâmbio, no meristema apical e no floema, foi associada à presença do domínio CRD2, a sua deleção, construção  $\Delta(-226/-82)$ pbip6-gus, intensificou a expressão do gene repórter no parênquima xilemático no caule. O domínio CRD2 contém duas seqüências CCAAT na orientação invertida que constitui uma característica funcional de promotores altamente ativos em células de

elevado grau de proliferação (MAITY & CROMBRUGGHE, 1988). Além disso, a presença do elemento responsivo à auxina (TGTCCC) no domínio CRD2 sugere que o gene BiP de plantas seja também regulado pela auxina. Assim sendo, experimentos para determinar se a expressão de BiP é regulada por hormônios constituem uma extensão do presente estudo.

Os experimentos de deleção do promotor de gsBiP6 forneceram evidências de que a intensa atividade do gene repórter gus, 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 CRD2 altera 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 CRD2 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.

Tanto o promotor de gsBiP6 quanto o promotor de gsBiP9 foram induzidos por tunicamicina em níveis equivalentes, enquanto que o nível de indução dos promotores de BiP em resposta a PEG diferiu entre eles. Estes resultados são consistentes com a recente observação de que os genes BiP da soja são diferencialmente regulados em resposta a estresse osmótico (CASCARDO et al., 2000). Além disso o promotor de gsBiP9, que apresentou níveis superiores de indução em resposta a PEG, apresenta múltiplos cis-elementos responsivos a ABA (ABARE, G-box e CE) que são conservados em promotores induzidos por estresse hídrico por uma via dependente de ABA (GUILTINAN et al., 1990). A observação de que a seqüência CRD2 é necessária para indução do promotor de BiP por tunicamicina sugere que CRD2 contém UPRE funcionais. De fato, duas seqüências conservadas, 5'CCAGTTTTATTGGCCAAAC3' (posições -135 a -117) e 5'GACGTGAGGTGTCCCAAG 3'(posições -162 a -144), relacionadas estruturalmente à seqüência consenso UPRE CCAATN<sub>9</sub>CCACG, descrita por YOSHIDA et al. (1998), estão presentes neste domínio funcional. A deleção do domínio CRD2 não somente causou a perda de inducibilidade do promotor por

PEG e tunicamicina, mas também resultou na diminuição da expressão do gene *gus* em discos foliares tratados com PEG e tunicamicina. Provavelmente, o efeito negativo na expressão do gene repórter, sob controle do promotor deletado  $\Delta(-226/-82)$ pbip6, seja devido a uma diminuição generalizada da transcrição basal na célula pelo efeito tóxico do tratamento prolongado dos discos foliares com tunicamicina e PEG.

## 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(4): 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.
- BIENZ, M.; PELHAM, H. R. B. (1986). Heat shock regulatory element function as an inducible enhancer in the *Xenopus* HSP70 gene when linked to a heterologous promoter. **Cell**, 45: 753-760.
- 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. **Journal Cell Biology**, 102: 1558-1566.
- BOLE, D. G.; DOWIN, R.; DORIAUX, M.; JAMIESON, J. D. (1989). Immunocytochemical localization of BiP to the rough endoplasmic reticulum: evidence for protein sorting by selective retention. **Journal Histochemical and Cytochemical**, 37(12): 1817-1823.
- BOSTON, R. S.; FONTES, E. P. B.; SHANK, B. B. (1991). Increased expression of the maize immunoglobulin binding protein homolog  $\beta$ 70 in three zein regulatory mutants. **The Plant Cell**, 3: 497-505.
- BOSTON, R. S.; VIITANEM, P. V.; VIERLING, E. (1996). Molecular chaperones and protein folding in plants. **Plant Molecular Biology**, 32: 191-222.

- 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. **Journal Cell Biology**, 120(1): 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.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; RUSSELL, J. L. (2000). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. American society of plant physiologists Rockville, Maryland. 1367 pgs.
- BUKAU, B.; HESTERKAMP, T; LUIRINK, 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.
- 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(3): 346-353.
- CASCARDO, J. C. M. (1999). **Caracterização molecular da família multigênica de BiP de soja (Glycine max (L.) Merrill): Controle da expressão gênica e fosforilação das isoformas em resposta a estresses abióticos**. Viçosa, MG: UFV, 122p. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa.
- 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(19): 14558-14565.
- 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(2): 273-281.

- CHANG, S. C.; WOODEN, S. K.; NAKAKI, T. (1987). Rat gene encoding the 78-kDa glucose-regulated protein GRP78: its regulatory sequences and the effect of protein glycosylation on its expression. **Proceedings of the National Academy of Science USA** 84: 680-684.
- 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(16): 620-625.
- CHRISPEELS, J. (1991). Sorting of proteins in the secretory system. **Annual Review of the Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 42: 21-53.
- CLARK, M. W.; ABELSON, J. J. (1987). The subnuclear localization of tRNA ligase in yeast. **Cell Biology**, 105: 1515-1526.
- 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 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. **Cell** 53: 197-209.
- COX, J. S.; SHAMU, C. E.; WALTER, P. (1993). Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. **Cell**, 73: 1197-1206.
- COX, J. S.; WALTER, P. (1996). A novel mechanism for regulation activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. **Cell**, 87: 391-404.
- CSERMELY, P. (1997). Proteins, RNAs and chaperones in enzyme evolution: a folding perspective. **Trends in Biological Science**, 22: 147-149.
- D'AMICO, L.; VALSANIA, B.; DAMINATI, M. G.; FABRINI, M. S.; NITTI, G.; BOLLINI, R.; CERIOTTI, A.; VITALE, A. (1992). Bean homologues of the mammalian glucose regulated proteins: induction by tunicamycin and interaction with newly-synthesized storage proteins in the endoplasmic reticulum. **Plant Journal**, 2: 443-445.
- 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 postgolgi compartment in plants. **The Plant Cell**, 9: 571-582.

- 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 endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. **The EMBO Journal** 11(6): 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.
- 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 Cell Biology**, 105(6): 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. **Biochem. Soc. Symp.**, 55: 145-153.
- ELLIS, R. J. (1990). Molecular chaperones: The plant connection. **Science**, 250: 954-959.
- ELLIS, R. J.; VAN DER VIES, S. M. (1991). Molecular chaperones. **Annual Review Biochemistry**, 60: 321-347.
- ELMENDORF, H. G.; 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(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(2): 103-110.
- FLYNN, G. C.; CHAPPELL, T. G.; ROTHMAN, J. E. (1989). Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. **Science**, 245: 385-390.

- 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, E. P. B.; SILVA, C. J.; CAROLINO, S. M. B. (1996). A soybean binding protein (BiP) homolog is temporally regulated in soybean seeds and associates detectably with normal storage proteins *in vitro*. **Brazilian Journal of Genetics**, 19(2): 305-312.
- FOTI, D. M.; WELIHINDA, A.; KAUFMAN, R. J.; LEE, A. S. (1999). Conservation and divergence of the yeast and mammalian unfolded protein response. Activation of specific mammalian endoplasmic reticulum stress element of the *grp78*/BiP promoter by yeast Hac1. **The Journal of Biological Chemistry**, 274(43): 30402-30409.
- FREIDEN, P. J.; GAUT, J. R.; HENDERSHOOT, L. M. (1992). Interconversion of three differentially modified and assembled forms of BiP. **The EMBO Journal**, 11: 63-70.
- GALILI, G.; SENGUPTA-GOPALAM, 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. **Cell** 46: 939-959.
- GETHING, M. J.; SAMBROOK, J. (1992). Protein folding in the cell. **Nature** 335: 33-45.
- GILMORE, R. (1993). Protein translocation across the endoplasmic reticulum: a tunnel with toll booths at entry and exit. **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(11): 3119-3132.
- GUILFOYLE, T.; HAGEN, G.; ULMASOV, T.; MURFETT, J. (1998). How auxin turn on genes? **Plant Physiology**, 118: 341-347.
- GUILTINAN, M. J.; MARCOTTE, W. R.; QUATRANO, R. S. (1990). A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. **Science**, 250: 267-271.

- HAAS, I. G.; WABL M. (1983). Immunoglobulin heavy chain binding protein. **Nature**, 306: 387-389.
- HAMMAN, B. D.; HENDERSHOT, L. M.; JOHNSON, A. E. (1998). BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. **Cell**, 92: 747-758.
- HARDING, H. P.; ZHANG, Y; RON, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. **Nature**, 397: 271-274.
- HARTL, F. V. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, 381: 571-580.
- HELENIUS, A.; MARQUARDT, T.; BRAAKMAN, I. (1992). The endoplasmatic 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. **Journal Cell Biology**, 104: 761-767.
- HENDERSHOT, L. M. (1990). Immunoglobulin heavy chain binding protein complexes are dissociated *in vitro* by light chain addition. **Journal Cell Biology**, 111: 829-837.
- HENDRICK, J. P.; HARTL, F. U. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. **Annual Review of the Biochemistry**, 62: 349-384.
- 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.
- HORWICH, A. L.; LOW, K. B.; FENTON, W. A.; HIRSHFIELD, I. N.; FURTAK, K.; (1993). Folding in vivo of bacterial cytoplasmic proteins: role of GroEL. **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. **Cell**, 69: 625-653.

- HURTLEY, S. M.; BOLE, D. G.; HOOVER-LITTY, H. (1989). Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein BiP. **Journal Cell Biology**, 108: 2127-2136.
- INGRAN, J.; BARTELS D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of the Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 47: 377 – 403.
- 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 differentiated soybean organs. **Planta**, 195: 611-621.
- KASSENBRÖCK, 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.
- KASSENBRÖCK, C. K.; KELLY, R. B. (1989). Interaction of heavy chain binding protein (BiP/GRP78) with adenine nucleotides. **The EMBO Journal**, 8(5): 1461-1467.
- 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.; CHRISPPEELS, 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.
- KREIS, T.E.; LODISH, H. F. (1986). Oligomerization is essential for transport of vesicular stomatitis viral glycoprotein to the cell surface. **Cell** 46: 929-937.

- LAEMMLI, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685.
- LANDRY, S. J.; GIERASCH, L. M. (1994). Polypeptide interactions with molecular chaperones and their relationship to *in vivo* protein folding. **Annual Review of the Biophysics Biomolecular Structural**, 23: 645-669.
- LEBORGNE-CASTEL, N.; JELITTO 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 arabidopsis ER retention receptor functions in yeast. **Proceedings of the National Academy of Science USA** 90: 11433-11437.
- LEWIS, M. J.; PELHAM, H. R. B. (1990). A human homolog of the yeast HDEL receptor. **Nature**, 348: 162-163.
- LI, Y.; LIU, Z.-B; SHI, X.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. J. (1994). An auxin-inducible element in soybean saur promoters. **Plant Physiology**, 106: 37-43.
- LIN, A. Y.; CHANG, S. C.; LEE, A. S. (1986). A calcium ionophore-inducible cellular promoter is highly active and has enhancer-like properties. **Molecular Cell Biology**, 6: 1235-1243.
- LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; BONIFACINO, J. S.; YUAN, L. C.; KLAUSNER, R. D. (1988). Degradation from the endoplasmic reticulum: disposing of newly synthesized proteins. **Cell** 54: 209-220.
- LIU, Z. B.; ULMASOV, T.; SHI, X.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. J. (1994). Soybean *GH3* promoter contains multiple auxin-inducible elements. **The Plant Cell**, 6: 645-657.
- LODISH, H. F. (1988). Transport of secretory and membrane glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi. **Journal Cell Biology** 263: 2107-2110.
- MAITY, S. N.; de CROMBRUGGHE, B. (1998). Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF-Y in transcription. **Trends in Biochemical Sciences**, 23: 174-178.

- MARTIN, J.; HARTL, F. U. (1993). Protein folding in the cell: molecular chaperones pave the way. **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 Cell Biology**, 18(9): 5091-5098.
- MATLACK, K. E. S.; MISSELWITZ, B.; PLATH, K; RAPAPORT, T. A. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of Prep $\alpha$  factor across the ER membrane. **Cell**, 97: 553-564.
- 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(12): 3251-3257.
- McCABE, D. E.; SWAIN, W. F.; MARTINELL, B. J.; CHRISTOU, P. (1988). Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle bombardment. **Biotechnology**, 6: 923-926.
- McKAY, D. B. (1993). Structure and mechanism of the 70-kDa heat-shock related proteins. **Advance in Protein Chemistry**, 44: 67-98.
- 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. (1974). The endomembrane concept: A functional integration of the endoplasmic reticulum and golgi apparatus. *In: Dynamic Aspects of Plant Ultrastructure*, A. W. Robards, ed (London: McGraw-Hill), p. 84-137.
- 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. **Cell**, 46: 291-300.
- MUNRO, S.; PELHAM, H R. B. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. **Cell**, 48: 899-907.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497.
- NGUYEN, T. H.; LAW, D. T. S.; WILLIAMS, D. B. (1991). Binding protein BiP is required for translocation of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, 88: 1565-1569.
- NICHOLSON, R. C.; WILLIAMS, D. B.; MORAN, L. A. (1990). An essential member of the HSP70 gene family of *Saccharomyces cerevisiae* is homologous to immunoglobulin heavy chain binding protein. **Proceedings of the National Academy of Science USA** 86: 1159-1163.

- 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. **Cell**, 57: 1223-1236.
- PARSELL, D. A.; LINDQUIST, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. **Annual Review of the Genetics**, 27: 437-496.
- PELHAM, H. R. B. (1988). Coming in from the cold. **Nature**, 332(28): 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 Biochemistry Science**, 15: 483-486.
- PIRDOUX, A. L.; ARMSTRONG, J. (1992). Analysis of the BiP gene and identification of an ER retention signal in *Schizosaccharomyces pombe*. **The EMBO Journal**, 11(4): 1583-1591.
- 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. **Journal Cell Biology**, 126(5): 1133-1148.
- ROBINSON, A. S.; BOCKHAUS, J. A.; VOEGLER, A. C.; WITTRUP, K. D. (1996). Reduction of BiP levels decreases heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, 271(17): 10017-10022.
- ROSE, J. K.; DOMS, R. W. (1988). Regulation of protein export from the endoplasmic reticulum. **Annual Review of the Cell Biology**, 4: 257-288.
- ROY, B.; LI, W. W.; LEE, A. S. (1996). Calcium-sensitive transcriptional activation of the proximal CCAAT regulatory element of the *grp78*/BiP promoter by the human nuclear factor CBF/NF-Y. **The Journal of Biological Chemistry**, 271: 28995-29002.
- SALOHEIMO, M.; LUND, M.; PENTTILÄ, M. E. (1999). The protein disulfide isomerase gene of the fungus *Trichoderma reesei* is induced by

endoplasmic reticulum stress and regulated by the carbon source. **Molecular General Genetics**, 262: 35-45.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning- A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York.

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. **Cell**, 69(2): 353-365.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of National Academy of Science USA**, 74(12): 5463-5467.

SANTORO, C.; MERMOD, N.; ANDREWS, P. C.; TIJAN, R. (1988). A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs. **Nature**, 334 (21): 218-224.

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. **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. **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. **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- $\beta$ -glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on ER glucosidases I and II, and the molecular chaperone BiP/Kar2p. **The EMBO Journal**, 17(2): 396-405.

- TANG, B. L.; WONG, S. H.; QI, X. L.; LOW, S. H.; HONG, W. (1993). Molecular cloning, characterization, subcellular localization and dynamics of p23, the mammalian KDEL receptor. **Journal Cell Biology**, 120(2): 325-338.
- TATU, U.; HELENIUS, A. (1997). Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. **Journal Cell Biology**, 136(3): 555-565.
- THULASIRAMAN, V.; MATTS, R. L. (1996). Effect of geldanamycin on the kinetics of chaperone-mediated renaturation of firefly luciferase in rabbit reticulocyte lysate. **Biochemistry**, 35: 13443-13450.
- 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.
- TOWNSLEY, F. M.; FRIGERIO, G.; PELHAM, H. R. B. (1994). Retrieval of HDEL proteins is required for growth of yeast cells. **Journal Cell Biology**, 127(1): 21-28.
- ULMASOV, T.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. (1997). ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. **Science**, 276: 1865-1868.
- ULMASOV, T.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. (1999). Activation and repression of transcription by auxin response factors. **Proceedings of National Academy of Science USA**, 96: 5844-5849.
- 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.
- VIERLING, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. **Annual Review of the Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 42: 579-620.
- 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(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 Cell Biology**, 110: 1885-1895.
- YOSHIDA, H.; HAZE, K.; YANAGI, H.; YURA, T.; MORI, K. (1998). 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(50): 33741-33749.

- 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(19): 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.
- WOODEN, S. K.; KAPUR, R. P.; LEE, A. S. (1988). The organization of the rat GRP78 gene and A23187-induced expression of fusion gene products targeted intracellularly. **Experimental Cellular Resource**, 178: 84-92.
- WOODEN, S. K.; LI, L. J.; NAVARRO, D.; QUADRI, I.; PEREIRA, L.; LEE, A. S. (1991). Transactivation of the grp78 promoter by malformed proteins, glycosylation block, and calcio ionophore is mediated through a proximal region containing a CCAAT motif which interacts with CTF/NF- $\kappa$ B. **Molecular Cell Biology**, 11: 5612-5623.
- WU, B. J.; KINGSTON, R. E.; MORIMOTO, R. I. (1986). Human HSP70 promoter contains at least two distinct regulatory domains. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, 83: 629-633.
- ZHANG, F.; BOSTON, R. S. (1992). Increases in binding protein (BiP) accompany changes in protein body morphology in three high-lysine mutants of maize. **Protoplasma**, 171: 142-152.
- ZHANG, J.; BRAAKMAN, I; MATLACK, K. E. S; HELENIUS, A. (1997). Quality control in the secretory pathway: The role of calreticulin, calnexin and BiP in the retention of glycoproteins with C-terminal truncations. **Molecular Biology of the Cell**, 8: 1943-1954.

## **APÊNDICE I**

# 1. CLONAGEM MOLECULAR, EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA BIP (*Binding Protein*) DE SOJA (*Glycine max*) E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

## 1.1. Clonagem molecular do cDNA de soyBiPD no vetor de expressão em bactérias pET 16b

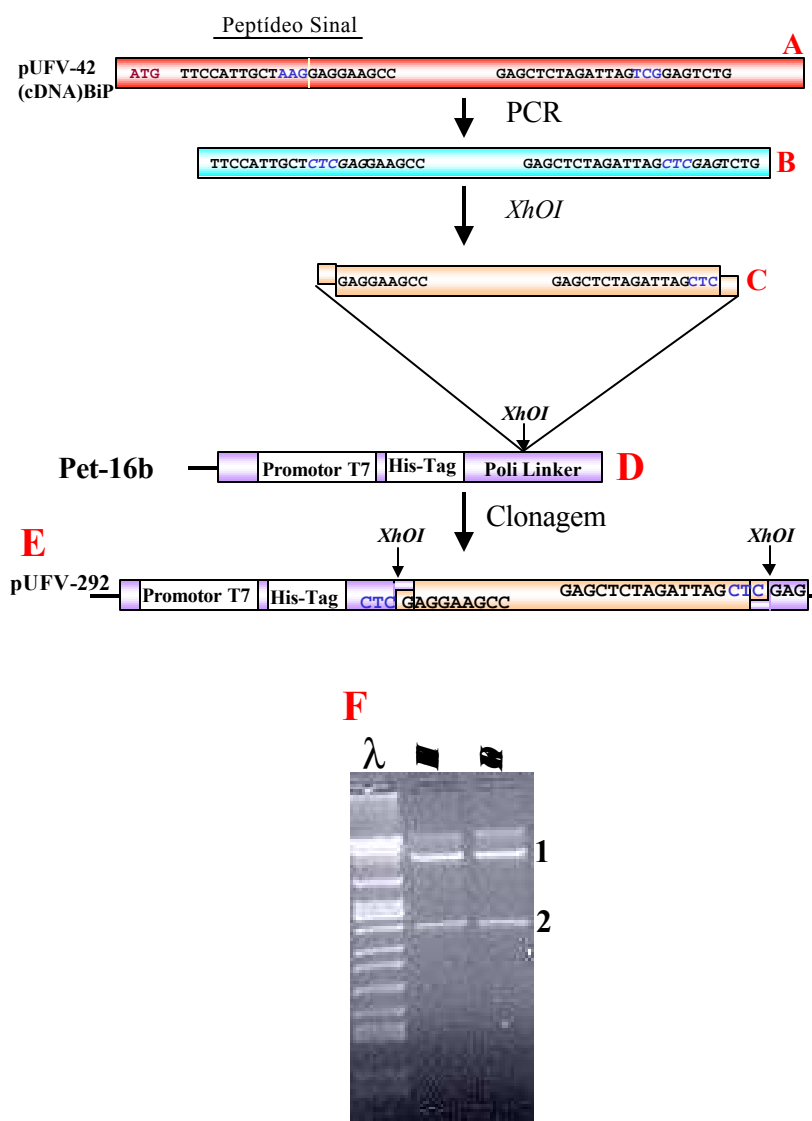
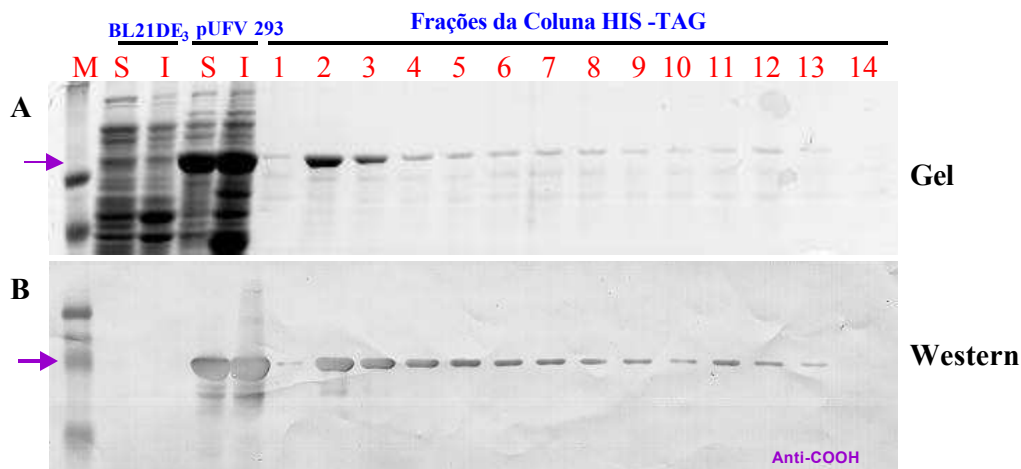


Figura 1: Esquema de clonagem do cDNA de BiP em pET-16b

De posse da seqüência do clone *pUFV42* (A), foram desenhados primers que geraram os sítios *XhoI* (CTCGAG) nas extremidades 5' e 3' da região codificadora do cDNA de BiP de forma a eliminar o peptídeo sinal (B).

O produto do PCR e o vetor de expressão *pET-16b* foram digeridos com a enzima de restrição *XhoI* (C) e (D), respectivamente e procedeu-se a reação de ligação, originando o clone *pUFV-292* (E). O DNA dos transformantes foram digeridos com *XhoI* e *HindIII* e o resultado analisado em gel de agarose (F). A linha vertical amarela, corresponde ao sítio de clivagem.  $\lambda$  corresponde ao marcador de peso molecular. Os números 1 e 2 representam respectivamente *pET-16b/XhoI* e fragmento/*XhoI*.

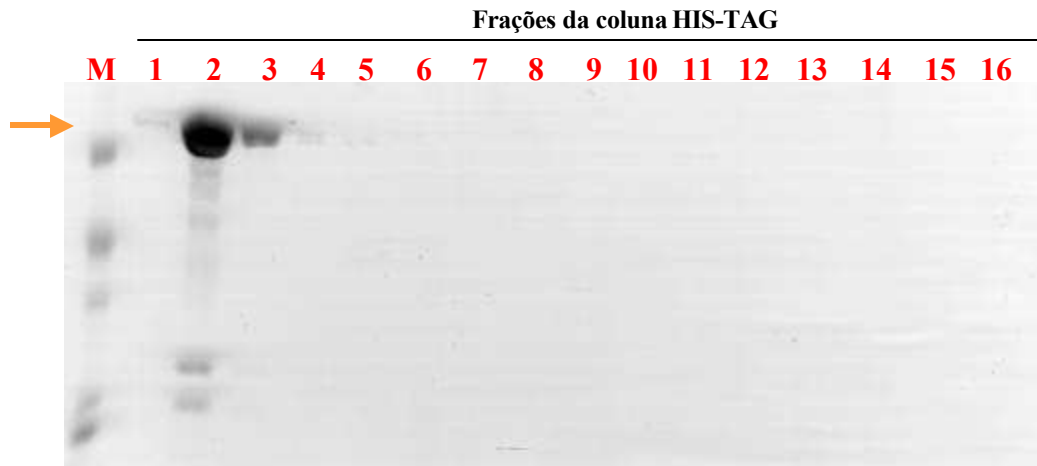
## 1.2. Indução, confirmação da identidade da proteína recombinante por meio de “Western blot” e purificação da proteína BiP



**Figura 2: Indução e purificação da proteína BiP sem peptídeo sinal**

Cerca de 100 mL de meio LB contendo 50 $\mu$ g/ml de ampicilina foram inoculados com o clone *pUFV-293* (*pUFV292* na estirpe *BL21DE<sub>3</sub>*) de *E. coli* e a expressão da proteína induzida por IPTG. A proteína recombinante foi purificada da fração solúvel de extratos protéicos de *E. Coli* (*BL21DE<sub>3</sub>*) por cromatografia de afinidade. As proteínas solúveis e insolúveis e as frações da coluna foram analisadas por *SDS-PAGE* (A) transferidas para uma membrana de nitrocelulose e sondadas com anti-BiP(B). As setas indicam a proteína induzida e purificada. O marcador de peso molecular, as frações solúveis e insolúveis, estão representadas pelas letras M, S e I respectivamente.

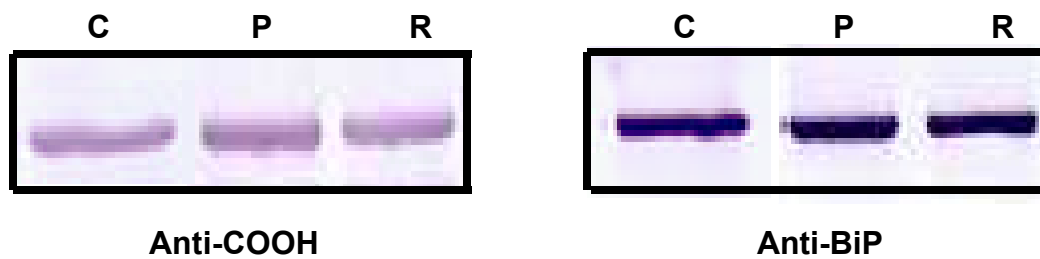
### 1.3. Produção da proteína BiP em alta escala



#### Figura 3: Indução em Alta Escala e Purificação da Proteína BiP

Cerca de 1000 mL de meio LB contendo 50  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina foram inoculados com o clone pUFV-293 e induzido por IPTG. A proteína recombinante foi purificada da fração solúvel de extratos protéicos de *E. Coli* (BL21DE<sub>3</sub>) por cromatografia de afinidade ao níquel. As frações da coluna foram analisadas por SDS-PAGE. A seta indica a proteína induzida e purificada. O marcador de peso molecular está representada pela letra M.

### 1.4. Produção e análise dos anticorpos



#### Figura 4: “Western-blot” comparando o título dos anticorpos.

Extratos de proteínas totais de diferentes órgãos de soja (caule, pecíolo e raiz, respectivamente C, P e R) foram analisadas em SDS-PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose e sondadas com anti-COOH e anti-BiP na diluição de 1/1000 para ambos os anticorpos.