

MURILO SIQUEIRA ALVES

**IDENTIFICAÇÃO DE *GmERD 15*, UM NOVO FATOR DE TRANSCRIÇÃO QUE
CONTROLA A EXPRESSÃO DO GENE *GmNRP-B* EM SOJA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MURILO SIQUEIRA ALVES

**IDENTIFICAÇÃO DE *GmERD 15*, UM NOVO FATOR DE TRANSCRIÇÃO QUE
CONTROLA A EXPRESSÃO DO GENE *GmNRP-B* EM SOJA**

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

APROVADA: 12 de Fevereiro de 2010.

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro

Prof. Francisco Murilo Zerbini

Prof^a Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Co-orientadora)

Prof^a Claudine Márcia Carvalho
(Co-orientadora)

Prof. Luciano Gomes Fietto
(Orientador)

Ao meu querido pai Odilon Soares Alves, exemplo para minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter abençoado e iluminado meu caminho por toda minha vida.

À minha mãe Sônia, que por toda minha vida sempre foi exemplo de força e fonte de motivação, e que sem ela com certeza não chegaria até aqui.

Às minhas irmãs, Ju e Carol, pela cumplicidade e amizade aliadas à força da nossa família.

Às minhas sobrinhas queridas, Maria Eduarda, Ana Júlia e Antonella, e meu cunhado Antônio, que sempre foram motivo de orgulho para mim e fonte de carinho nas horas de necessidade.

À Universidade Federal de Viçosa, pelas grandes oportunidades de estudo oferecidas durante toda minha vida acadêmica.

Ao Programa de Apoio ao Plano de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, professores e funcionários pela boa convivência e ensinamentos.

Ao Professor Luciano Gomes Fietto, pela excelente orientação, confiança, oportunidade de enriquecimento profissional, pela ajuda valiosa durante a realização dos experimentos, e principalmente pela amizade.

À Professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes (DBB), pela co-orientação do meu trabalho, pelos auxílios valiosos durante os experimentos realizados, e confiança.

À Professora Claudine Márcia Carvalho (DFP), pela co-orientação e dedicada e valiosa ajuda nos experimentos de confocal.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e do Laboratório de Proteômica, pela agradável convivência, além dos auxílios e dicas durante os experimentos.

Às estudantes Silvana, Daiane e Fabiana, pela boa convivência e ajuda na condução de experimentos.

Aos amigos de Viçosa, dentre eles Pedro, João Paulo, Jerusa, aos amigos da república e meus fiéis amigos de alojamento, pela amizade e momentos de felicidade compartilhados ao longo de todos estes anos de UFV.

A todos que de alguma forma contribuíram para meu engrandecimento profissional e pessoal. A todos que eu não possa não ter citado, mas que contribuíram muito para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
Introdução	1
I - Revisão de Literatura.....	4
1 - Integração entre as respostas aos estresses no retículo e osmótico em plantas.....	4
2- As respostas aos estresses no retículo endoplasmático e osmótico em plantas	5
3- Integração entre os estresses osmótico e no retículo.....	10
4- Proteínas ricas em asparagina estão envolvidas na morte celular programada (PCD) e são co-reguladas durante a via integrativa	12
II - Objetivo.....	15
III - Metas Específicas	15
IV – Materiais e métodos.....	16
1 - Oligonucleotídeos específicos para amplificação e clonagem de diferentes fragmentos de DNA em vetores específicos.....	16
2.- Oligonucleotídeos específicos para qRT-PCR	16
3 - Identificação e caracterização da região promotora do gene <i>GmNRP-B</i>	17
4 - Construções de DNA.....	17
5 - Transformação de leveduras	18
6 - Construção da biblioteca de cDNA de soja submetida a tratamentos de estresse no RE e estresse osmótico, em vetores de expressão de leveduras	19
7 - Triagens de possíveis cDNAs que codifiquem fatores de transcrição que se liguem a região promotora de <i>GmNRP-B</i> a partir do sistema de mono-híbrido de leveduras	20
8 - Células de soja em suspensão e tratamentos.....	22
9 - Material vegetal e tratamentos	22
10 - Extração de RNA e síntese de cDNA	22
11 - PCR em Tempo Real (qRT-PCR).....	23
12 - Expressão transiente em protoplastos de soja.....	23

13 - Transformação transiente de plantas de tabaco.....	24
14 - Localização subcelular	25
15 - Análise de transativação em leveduras	25
16 - Agrupamentos e análises <i>in silico</i>	26
17 - Técnicas de Biologia Molecular	27
V - Resultados e Discussão	28
1 - Análise da sequência e clonagem da região promotora de <i>GmNRP-B</i> ...	28
2 - Construção das leveduras expressando os genes repórteres <i>LacZ</i> e <i>HIS3</i> sob o controle do promotor pNRPB e a varredura da biblioteca pelo sistema do mono-hídrido.....	31
3 - Sequenciamento e Identificação do clone positivo	35
4 - Deleções do promotor de <i>GmNRP-B</i> afetam a interação de GmERD15. 42	42
5 - GmERD 15 possui atividade de transativação	45
6 - A proteína GmERD15 possui localização nuclear e citosólica	47
7 - A expressão transiente de GmERD 15 em protoplastos induz a expressão de GmNRP-B.....	49
8 - Padrão de expressão de GmERD 15 e GmNRP-B em células de soja sob diferentes tratamentos abióticos	51
9 - Padrão de expressão de GmERD 15 e GmNRP-B em plantas de soja sob estresse biótico	53
VI - Conclusões	55
VII - Referências bibliográficas.....	57
ANEXO 1: Vetores utilizados.....	62

RESUMO

ALVES, Murilo Siqueira M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2010. **Identificação de *GmERD 15*, um novo fator de transcrição que controla a expressão do gene *GmNRP-B* em soja.** Orientador: Luciano Gomes Fietto. Co-orientadores: Elizabeth Pacheco Batista Fontes, Claudine Márcia Carvalho e Juliana Lopes Rangel Fietto.

Recentemente foi demonstrado através de experimentos de microarranjos de DNA que as vias de resposta aos estresses no retículo endoplasmático e osmótico convergem aumentando a expressão de um conjunto de genes coordenadamente regulados, dentre eles o gene *GmNRP-B* codifica uma proteína rica em asparagina e que está envolvida com eventos de morte celular programada em plantas. Este trabalho teve como objetivo principal a identificação e caracterização de fatores de transcrição que controlam a expressão de *GmNRP-B*, e que portanto constitui um importante componente da via integrativa dos estresses do retículo e osmótico. Para tanto a região promotora de *GmNRP-B* foi identificada em banco de dados e a partir dela foram construídas fusões de transcrição com os genes repórteres *HIS3* e *LacZ*. Estas construções foram integradas no genoma de leveduras W303, resultando nos transformantes W303-pNRP-His/LacZ, que foram utilizadas como hospedeiras para transformação com uma biblioteca de cDNA de soja construída no vetor pEXP-AD502. Após a varredura da biblioteca, foram selecionados 9 clones, destes 9 apenas um manteve-se positivo após um novo evento de transformação. O sequenciamento do DNA do clone positivo e a comparação de sua seqüência com o banco de dados do Phytozome identificou um gene que codifica uma proteína similar a ERD15 de Arabidopsis. O gene de soja identificado foi denominado *GmERD15* e a seqüência de aminoácidos deduzida mostrou que a proteína possui um domínio conservado de interação com proteínas que se ligam à cauda poli A de mRNAs (PABP). A busca por seqüências similares no banco de dados do Phytozome mostrou que o gene encontra-se duplicado no genoma da soja e que além dos dois genes outros 4 constituem esta família gênica em soja. A comparação da seqüência de aminoácidos deduzida com ortólogos ERD15 de diversos organismos mostrou que *GmERD15* possui o domínio de interação com PABP conservado

em sua porção amino-terminal e uma porção carboxi terminal divergente. A análise do agrupamento destas proteínas mostrou que podemos dividir esta família de proteínas em pelo menos 3 subfamílias sendo que GmERD15 encontra-se em uma subfamília separada da proteína de Arabidopsis. Para confirmar a interação da proteína GmERD15 com a região promotora de *GmNRP-B* foram realizadas deleções a partir do nucleotídeo -1000 do início de tradução originando fragmentos com 700 e 350 pares de bases. A análise destes promotores por monohíbrido em leveduras mostrou que esta proteína ativa fortemente a expressão de *LacZ* sob controle do promotor de *GmNRP-B* de 1000 e 700 pares de bases, porém esta ativação decai consideravelmente quando o promotor é deletado até aproximadamente 350 pares de bases, indicando uma grande perda de cis-elementos. Foi constatado também que GmERD 15 possui atividade de transativação em leveduras. Além disto a análise da sequência de aminoácidos mostrou a presença de um domínio de ativação transcricional na porção carboxi-terminal, e a expressão transiente de *GmERD 15* em protoplastos de soja levou a um aumento da expressão de *GmNRP-B*. Quimeras de GmERD 15 com a proteína YFP expressas transientemente em folhas de tabaco localizam-se no citosol e no núcleo. Coletivamente, estes resultados indicam que GmERD 15 atua no controle da expressão do gene *GmNRP-B* revelando uma nova família de transfatores, que atuam no controle da expressão de genes em plantas.

ABSTRACT

ALVES, Murilo Siqueira M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2010. **Identification of the GmERD 15, a new transcription factor that controls the GmNRP-B expression in soybean.** Advisor: Luciano Gomes Fietto. Co-advisors: Elizabeth Pacheco Batista Fontes, Claudine Márcia Carvalho e Juliana Lopes Rangel Fietto.

Recently it was demonstrated through experiments using DNA microarrays that response pathways to endoplasmic reticulum and osmotic stresses converge with an increase in the expression of a group of coordinately regulated genes. Among these is GmNRP-B encodes an asparagine rich protein involved with events of programmed cell death. The main objectives of this work are the identification and characterization of transcription factors that control the expression of GmNRP-B. For these purposes the predict promoter of GmNRP-B was identified with bioinformatics tools and transcription fusions were built with the reporters genes HIS3 and LacZ. These constructs were integrated in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* (strain W303), resulting in the transformants W303-pNRP-His/LacZ, that were used as hosts for transformation with a cDNA soybean library built in the vector pEXP-AD502. After library screenings 9 clones were selected and just one proved to be positive after a new transformation event. The isolated cDNA was found be highly similar to ERD15 from *Arabidopsis* and was named GmERD15. The deduced amino acid sequence showed that the protein possesses a conserved interaction domain with proteins that binds to poly A mRNA tails (PABP). The search for similar sequences in the Phytozome database showed that the gene is duplicated in the soybean genome and belongs to a gene family represented by four additional copies in the soybean genome. Sequence comparison analyses of GmERD15 with plant orthologs showed that GmERD15 possesses a conserved PABP interaction domain in the amino-terminal portion and one divergent carboxi-terminal region. Based on clustering analysis of these proteins, they can be divided in at least 3 subfamilies and GmERD15 was grouped in a separated subfamily in relation to *Arabidopsis* protein. To confirm the interaction of GmERD15 with the predicted GmNRP-B promoter region we made deletions using the nucleotides -1000 upstream to the translation start codon leading to fragments with 700 and 350 bp. One-hybrid analysis in yeasts

showed that this protein activated the expression of LacZ when this is under the control of GmNRP-B promoter with 700 and 1000 base pairs. However this activation decreased when the promoter was deleted to approximately 350 bp, indicating a possible loss of cis-elements. It was also verified that GmERD 15 possesses transactivation activity in yeasts. Furthermore, sequence analysis of GmERD15 showed the presence of a transcriptional activation domain in the carboxi-terminal portion and the transient expression of GmERD 15 in soybean protoplasts led to an increase in GmNRP-B expression. GmERD 15 YFP protein fusions when expressed transiently in tobacco leaves were located in the cytosol and in the nucleus. Collectively, these results indicate that GmERD 15 acts in the control of GmNRP-B gene expression revealing a new transfactor family in soybean.

Introdução

Plantas são constantemente expostas à diversas condições ambientais adversas, tais como variações de temperatura, seca e alta salinidade. Esses fatores restringem significativamente o crescimento da planta e a produtividade agrícola, limitando a disponibilidade geográfica de áreas cultiváveis viáveis. Estresses do tipo abióticos constituem a principal causa de prejuízos na agricultura em todo o mundo, diminuindo a média de lucros para os principais cultivares em mais da metade, acarretando numa perda de milhões de dólares a cada ano (Bray *et al.*, 2000). Esses estresses ambientais desencadeiam rápidas vias de transdução de sinais em resposta à estes estímulos na planta, visando aumentar a tolerância da planta aos respectivos estresses (Mahajan & Tuteja., 2005). Dentre estas vias de sinalização da planta encontra-se a via em resposta ao acúmulo de proteínas mal-dobradas no interior do retículo endoplasmático – UPR – a qual estão envolvidos uma série de fatores que desempenham o papel de manutenção da homeostase do lúmen do RE, tais como calnexinas e chaperones moleculares (Urade 2009). Assim, UPR é uma via de transdução de sinais que ativa a transcrição coordenada de um conjunto de genes envolvidos no restabelecimento da homeostasia no retículo, pela ação conjunta no aumento da capacidade de dobramento de proteínas no retículo como pelo decréscimo da demanda destes dobramentos (Urade 2009). Estudos anteriores avaliaram que a superexpressão de uma isoforma de BiP de soja, em plantas de tabaco, determinou um aumento na tolerância de plantas à estresse hídrico, durante condições de seca (Alvim *et al.*, 2001), e que plantas contendo a construção com o cDNA antisenso desta chaperone exibiam diminuição da tolerância basal (Alvim *et al.*, 2001).

Recentemente foi verificado que a expressão constitutiva desta chaperone molecular também determinou um aumento significativo na tolerância a estresse hídrico em plantas de soja (Valente *et al.*, 2009), evidenciando assim uma conexão entre a via de resposta a estresse no retículo e ao estresse hídrico. Um estudo posterior, utilizando microarranjos de DNA de plantas soja submetidas a ambos os estresses (Irsigler *et al.*, 2007), mostrou que há um grupo de dez genes que apresentam um aumento de expressão de

seus transcritos quando ambos os estresses eram aplicados em conjunto, indicando assim a presença de uma via de sinalização que integra os dois sinais de resposta, tanto ao estresse no retículo quanto ao estresse osmótico (Irsigler *et al.*, 2007). Dentre este grupo de genes verificados, dois correspondiam a genes que codificavam proteínas ricas em asparagina (NRP-A e NRP-B), e que posteriormente foi visto estarem envolvidos com o desencadeamento do processo de morte celular programada em plantas (Costa *et al.*, 2008). A expressão dos genes NRP-A e NRP-B de soja é induzida tanto por estresse no RE quanto por estresse osmótico. Sendo que a expressão possui um aumento sinérgico quando a planta é tratada com os dois estresses simultaneamente, reforçando com isso a hipótese da existência de uma conexão entre as vias de resposta a estresse do retículo e osmótico (Irsigler *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2008). A proteína NRP-A de soja foi descrita primeiramente como uma proteína que é induzida durante a resposta hipersensível servindo como um marcador para morte celular programada que ocorre durante uma interação não compatível (Ludwig e Tenhaken, 2001). O gene NRP-A codifica uma proteína que consiste de dois domínios. O domínio N-terminal que é extremamente rico no aminoácido asparagina (25%) e por isto a proteína foi chamada de N-rich protein (NRP) (Ludwig e Tenhaken, 2001). A região C-terminal apresenta um domínio conservado em outras proteínas de plantas e que foi relacionado com o desenvolvimento e morte celular, denominado DCD (development and cell death) (Tenhaken *et al.*; 2005). Recentemente foi verificado que a Proteína NRP-B causa morte celular (Costa *et al.*, 2008). Devido a forte indução do gene NRP-B por estresse osmótico e do retículo, há um forte indício de que esta proteína seja fundamental na sinalização de morte celular programada desencadeada por estresses diversos.

Pouco porém era ainda conhecido sobre possíveis fatores que controlem a ativação da expressão de proteínas envolvidas nesta via integrativa. Sabe-se que fatores de transcrição controlam a expressão de vários genes ao mesmo tempo e podem ser o ponto de integração entre vias de sinalização que levam ao controle da resposta comum a diferentes estresses. Portanto, a busca por um fator transcricional que controle a expressão de um destes genes envolvidos nesta nova via de resposta é de fundamental importância para

auxiliar no conhecimento do mecanismo de funcionamento da via, bem como das vias de resposta a estresses em plantas em geral. Neste trabalho, apresentamos a proteína GmERD15 como um novo fator de transcrição que está envolvido no controle da expressão de um dos genes induzidos durante a via integrativa, GmNRPB, a partir da caracterização bioquímica e funcional da interação de GmERD15 com a região promotora de *GmNRPB*.

I - Revisão de Literatura

1 - Integração entre as respostas aos estresses no retículo e osmótico em plantas.

As condições edafoclimáticas presentes no ambiente, tais como seca, excesso de umidade, concentrações elevadas de metais pesados, alta salinidade, e variações bruscas de temperatura são fatores determinantes que afetam o crescimento, produtividade e sobrevivência dos vegetais. Por conseguinte, tem sido um grande desafio para o ramo agrícola encontrar novas alternativas para aumentar a tolerância de plantas a estas condições adversas. Para isso, tem se procurado entender bioquimicamente como funcionam vias importantes de transdução de sinais ocorrentes nestes organismos que culminam em uma resposta de tolerância a um determinado estresse ambiental (www.fao.org).

O estresse abiótico ocasionado por déficit hídrico é uma das condições ambientais mais enfrentadas por cultivares no cenário nacional e internacional, com crescente aumento de áreas em todo o planeta que tem enfrentado condições de seca e alta salinidade, restringindo com isso sua produtividade (www.fao.org). Vários estudos têm demonstrado que a ativação de vias de sinalização em resposta ao estresse hídrico leva a um aumento na expressão de chaperones moleculares relacionadas à manutenção da homeostase do retículo endoplasmático (RE) (Gupta et al., 1993; Wehmeyer e Vierling, 2000; Rodrigues et al., 2006; Ashraf e Foolad, 2007). Dentre os estudos sobre o papel destas proteínas durante a resposta ao estresse hídrico, foi verificado que a chaperone molecular BiP (binding protein), residente no retículo endoplasmático, determina uma maior tolerância à seca quando expressa constitutivamente em *Nicotiana tabacum* (Alvim et al., 2001). Recentemente, Valente *et al.*, (2009) descobriram que a superexpressão de BiP em soja (*Glycine max*), assim como em tabaco, também determina uma maior tolerância ao estresse causado por déficit hídrico. Os autores sugeriram que possivelmente BiP atuaria atrasando o processo de senescência foliar causada

por este estresse. Apesar destes importantes achados, pouco ainda é conhecido sobre os mecanismos pelos quais a superexpressão de BiP confere maior tolerância a este estresse. No entanto, a atuação de BiP, uma chaperone molecular relacionada a homeostase do retículo, durante condições de estresse hídrico tem apontado uma possível integração entre as respostas aos estresses no RE e o déficit hídrico em plantas (Irsigler *et al.*, 2007).

2- As respostas aos estresses no retículo endoplasmático e osmótico em plantas

Estudos sobre o papel da proteína BiP mostram que esta possui um grande número de funções nos diferentes tipos de organismos, funções estas que normalmente estão relacionadas com a manutenção da homeostase do RE durante a via secretória de proteínas (Malhotra and Kaufman, 2007).

Proteínas secretadas e de membranas enovelam-se e se organizam no RE, sob auxílio de chaperones moleculares que também atuam retendo os polipeptídeos recém sintetizados neste compartimento. Apenas sob completa maturação estrutural estas proteínas são então permitidas prosseguir na via secretória aos seus respectivos destinos (Vitale 2009). Polipeptídeos estruturalmente defeituosos que falham no correto enovelamento interagem mais extensivamente com proteínas auxiliaadoras, e são mantidos no RE até o completo dobramento, ou são encaminhados para degradação. Coletivamente, estes eventos fazem parte do processo denominado de controle de qualidade do RE (Vitale 2009). Como função principal em animais, BiP auxilia no processo de dobramento correto de proteínas recém sintetizadas e na manutenção da homeostase do RE, atuando durante o controle de qualidade do RE (Malhotra and Kaufman, 2007). Quando ocorre um excesso de proteínas mal-enoveladas no RE, devido a demanda ser maior que a capacidade de processamento do lúmen da organela, ocorre a ativação de uma cascata de sinalização denominada via UPR (unfolded protein response), um processo altamente conservado em organismos eucariotos que visa restabelecer a homeostase do RE nestas condições (Urade 2009).

Em leveduras, este processo resulta na ativação da expressão de mais de 300 genes codificantes de chaperones residentes do RE (como BiP, calreticulinas e calnexinas) (Chawla e Niwa 2005), enzimas relacionadas ao enovelamento de proteínas (PDI, FKB2), reguladores do metabolismo de fosfolipídeos, e proteínas envolvidas na degradação permanente de proteínas mal-enoveladas. Em leveduras, o único sensor da via conhecido é IRE1, uma proteína cinase/endoribonuclease receptora transmembrana. IRE 1 reconhece a necessidade de enovelamento no RE através de seu domínio luminal (Chawla e Niwa 2005). Prioritária para a ativação da via UPR, IRE1 é unida a uma conformação monomérica com BiP, ligada a esta através de seu domínio luminal durante condições de homeostase do RE. Níveis crescentes de proteínas mal-enoveladas causam dissociação de BiP, determinando a oligomerização de IRE1 e ativação de sua atividade cinase. A proteína ativada então possui a função de endoribonuclease, responsável pela clivagem de um íntron único do mRNA de *HAC1* (o mRNA de *XBP1* em mamíferos). A proteína codificada por este mRNA que sofreu *splicing* é um potente fator transcricional específico para a ativação de genes importantes da via UPR (Chawla e Niwa 2005).

Além de IRE1, em mamíferos, ocorrem mais duas proteínas sensoras para a via UPR, a cinase transmembrana PERK e o fator de transcrição transmembrana ATF6, ambos residentes no RE. Ambas as proteínas são ativadas de forma similar a IRE1 seguindo a dissociação de BiP ligada a seus domínios luminiais do RE. No caso de PERK, a dissociação de BiP promove a fosforilação de seu substrato, o fator de iniciação da tradução eIF2. No caso de ATF6, a liberação de BiP promove a translocação de ATF6 para o Golgi onde um novo fator de transcrição é gerado por proteólise e translocado para o núcleo (Chawla e Niwa 2005).

Nota-se então o papel decisivo de BiP, uma chaperone do retículo, como ponto chave para a regulação da ativação dos três transdutores da resposta a estresse no RE: IRE1, PERK e ATF6, em mamíferos. Todos esses transdutores contêm um domínio luminal para a interação de BiP, sendo que, sob condições normais, BiP atua como um regulador negativo para ativação de IRE1, PERK e ATF6. Durante o estresse no RE, BiP passa a se ligar às proteínas mal-enoveladas, permitindo assim a liberação dos transdutores. Esta

ativação regulada por BiP provê um mecanismo direto de sinalização para a capacidade de enovelamento do RE e sua homeostase (Chawla e Niwa 2005).

O mecanismo molecular da resposta ao estresse no RE é muito menos conhecido em plantas do que em leveduras e mamíferos (Urade 2009). Alguns aspectos desta resposta são ainda controversos em plantas. Sabe-se que tunicamicina, um potente inibidor da N-glicosilação comumente utilizado para a indução de estresse no RE em leveduras e mamíferos, também é capaz de induzir estresse no RE em plantas (Urade 2007). Porém, apesar de homólogos de IRE1 terem sido identificados em *Arabidopsis thaliana* e arroz (Koizumi et al., 2001; Okushima et al., 2002), seus envolvimento na resposta ao estresse no RE ainda não foram totalmente confirmados (Urade 2009). A expressão de IRE1 de *Arabidopsis* e arroz em células de levedura com seu gene endógeno nocauteado, quando tratadas com tunicamicina levaram a ativação de genes da via UPR (Urade 2009). Estes ensaios de complementação indicam que o homólogo de plantas possui uma função similar ao da proteína IRE 1 de leveduras, porém sua função como regulador da ativação de genes da via em plantas continua incerto (Urade 2009). Foi identificado que o gene *bZIP60* de *Arabidopsis* tem sua transcrição aumentada na presença de tunicamicina (Iwata e Koizumi, 2005), e que uma forma truncada desta proteína, a qual não possuía seu domínio transmembrana, ativava os promotores de BiP e calnexina, de uma maneira homóloga a ATF6 durante a resposta ao estresse, indicando assim seu papel análogo nesta função. Um outro fator transcricional *bZIP28*, também foi determinado estar envolvido na resposta ao estresse no RE (Tajima et al., 2008), por meio da ativação da expressão de genes BiP em resposta ao estresse no RE através de cis-elementos responsivos a UPR (UPRE) e ao estresse no retículo (ERSE). Foi demonstrado que dois transfatores, *bZIP60* e *bZIP28* são ativados após sofrerem clivagem proteolítica no Golgi, de forma semelhante a ATF6 em mamíferos, e assim sendo são exportados para o núcleo para ligação aos elementos ERSE e ativarem a expressão de genes da via UPR (Urade 2009). Portanto, foi verificado que a UPR em plantas é mediada através de pelo menos duas vias de sinalização distintas, mediadas por estes dois fatores de transcrição, *bZIP60* e *bZIP28*, sendo estas vias mais bem elucidadas no sistema modelo *Arabidopsis*, porém

permanecendo alguns pontos não esclarecidos em outras plantas estudadas (Urade 2009).

O estresse devido à seca induz uma variedade de respostas fisiológicas e bioquímicas em plantas. Estas respostas incluem o fechamento de estômatos, repressão do crescimento celular e fotossíntese, e ativação da respiração. Plantas também respondem e adaptam-se à falta de água através da acumulação de osmólitos e proteínas especificamente envolvidas na tolerância ao estresse (Shinozaki, 2005).

Os genes identificados recentemente em *Arabidopsis* que participam da resposta a estresses podem ser classificados em dois grupos principais (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2007). O primeiro é constituído de proteínas que atuam diretamente durante a tolerância aos estresses abióticos, tais como chaperones moleculares, proteínas abundantes na embriogênese tardia, osmotinas, proteínas anti-congelamento, proteínas formadoras de canais de água, etc, enquanto que o segundo grupo é composto principalmente por proteínas regulatórias, que atuam na regulação da transdução de sinais e expressão de genes relacionados à tolerância ao estresse, como fatores de transcrição, cinases, fosfatases e proteínas sinalizadoras diversas. Vários fatores de transcrição podem, de forma isolada ou cooperativa, controlar a expressão de genes relacionados ao estresse, e podem constituir redes genéticas durante um determinado estresse abiótico, como frio, calor, seca ou alta salinidade. Muitos destes fatores podem ser utilizados para aumentar a tolerância ao estresse em plantas transgênicas através da ativação de uma variedade de genes regulados por este (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Boa parte dos genes induzidos por estresses abióticos possui sua expressão regulada pelo hormônio vegetal ácido abscísico (ABA), e são controlados pelos cis-elementos responsivos a este hormônio, denominados ABRE (elementos responsivos a ABA), enquanto outros possuem sua expressão controlada por cis-elementos responsivos à seca, denominados DRE (elementos responsivos a seca), como o do gene RD29A/COR78/LTI78, de *Arabidopsis*, que possui os dois tipos de cis-elementos em seu promotor. Estes dois tipos de cis-elementos, ABRE e DRE, são dependentes e não dependentes de ABA, respectivamente, e são exemplos de regiões específicas

do genoma do organismo ao qual transfatores relacionados se ligam em resposta aos estresses abióticos (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Fatores de transcrição pertencentes a família ERF/AP2 que se ligam a estes elementos DRE foram isolados e denominados CBF/DREB1 e DREB2 (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2005). Os genes DREB1 são rapidamente e transientemente induzidos por estresse por frio, que formam produtos que ativam a expressão de genes induzidos por estresse (Kasuga et al., 1999). A superexpressão de genes DREB1 em plantas transgênicas causou aumento na tolerância a estresse causado por congelamento, seca, e salinidade, sugerindo que proteínas DREB1 possuem função no desenvolvimento da tolerância ao estresse causado por frio (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2007). Os genes DREB2 são induzidos por desidratação e podem ativar outros genes envolvidos na tolerância à seca (Liu et al., 1998). Entretanto, a superexpressão de genes DREB2 em plantas transgênicas não aumenta a tolerância ao estresse, sugerindo o envolvimento na ativação pós-traducional de proteínas DREB2 (Liu et al., 1998). As proteínas DREB2 são expressas sob condições normais de crescimento e ativados por estresses osmóticos através de modificação pós-traducional nos estágios iniciais da resposta a estresse osmótico (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2007).

ABRE são os principais cis-elementos na expressão responsiva a ABA (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2007). As proteínas AREB requerem um sinal mediado por ABA para sua ativação, como indicado por sua reduzida atividade em mutantes deficientes de ABA (*aba2*) e insensíveis a ABA (*abi1*), e suas atividades aumentadas nos mutantes hipersensíveis a ABA (*era1*) de *Arabidopsis* (Uno et al., 2000). Este fenômeno foi documentado como uma provável fosforilação dependente de ABA de proteínas AREB (Uno et al., 2000).

Evidências substanciais suportam que níveis de ABA limitam a perda de água através de transpiração por redução da abertura dos estômatos (Leung 1998). ABA está também envolvido em outros aspectos da adaptação ao estresse. Por exemplo, mutantes de *Arabidopsis* deficientes em ABA não se adaptam ao frio, e não elicitam resposta morfogênética à seca em raízes (seca rizogênica). O papel de ABA na sinalização em condições de estresse tem sido extensivamente documentado por estudos moleculares, mostrando que

mutantes deficientes em ABA são afetados na regulação de numerosos genes por seca, salinidade e frio. Entretanto, a adaptação a estas condições ambientais adversas também envolve vias independentes de ABA (Leung 1998).

Um grande número de genes são induzidos por estresses abióticos e muitos dos produtos destes genes podem funcionar como resposta em outras vias, aumentando a tolerância em nível celular e sistêmico (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2007). A ocorrência de uma rede interligada de vias de sinalização distintas pode resultar no aumento e melhora da tolerância da planta ao estresse imposto (Umezawa et al.,2006). Recentemente, vários genes induzíveis por estresse foram identificados usando análises de microarranjo em várias espécies de plantas, tais como *Arabidopsis*, arroz e soja (Kamaushi *et al* 2005; Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Irsigler *et al* 2007).

3- Integração entre os estresses osmótico e no retículo

Qual seria a conexão entre a sinalização para resposta ao estresse no RE e a resposta ao estresse hídrico? Conexão esta que foi evidenciada pela participação de uma chaperone molecular BiP, residente no retículo, na tolerância ao estresse hídrico em plantas.

Visando entender a possível conexão entre as vias de resposta aos estresses no RE e osmótico em soja, Irsigler e colaboradores (2007) fizeram um estudo dos genes expressos sob condições que causassem estresse no RE e estresse osmótico simultaneamente. Para isto plantas de soja foram tratadas com compostos que induzissem estes estresses, no caso PEG para a indução de estresse osmótico, e Tunicamicina ou AZC, para a indução do estresse no RE. A partir deste estudo, foi verificado que genes que codificavam chaperones do RE e proteínas catalizadoras do processo de enovelamento, tais como BiP, calnexina e PDI, foram antagonicamente afetados pelas respostas ao PEG e a UPR. Enquanto ocorre uma ativação da expressão de chaperones do RE mediada pela UPR, sendo este processo conservado em

eucariotos (URADE 2009), a regulação por inibição da expressão destas proteínas por desidratação com PEG foi descrita pela primeira vez por Irsigler e colaboradores em 2007. Em condições de déficit hídrico por exemplo, já foi demonstrado em espinafre, que o estresse por seca causou uma diminuição dos níveis de mRNA de BiP, porém em soja e tabaco, transcritos de BiP foram induzidos por estresse osmótico causado por PEG, déficit hídrico e tratamento com ABA (Anderson *et al.*, 1994 ;Alvim *et al.*, 2001).

No trabalho de Irsigler e colaboradores (2007) foram identificados em soja um conjunto de 10 genes que possuíam sua expressão aumentada pelos dois tipos de estresses, sendo que neste grupo haviam dois genes que codificavam fatores de transcrição pertencentes a família NAC (ortólogos de NAM e ATAF2), dois que codificavam glutionas-S-transferase, um gene *UBA*, um que codificava um fator de iniciação da tradução eucariótico 5 (*eIF5*), dois de função desconhecida e dois que codificavam proteínas que continham um domínio de desenvolvimento e morte celular (DCD) e que eram ricas em asparagina (N rich proteins). Uma análise posterior realizada por qRT-PCR demonstrou a expressão sinérgica destes genes quando tratados com PEG, tunicamicina e AZC, exceto para a glutionas-S-transferase (GST), o qual não mostrou indução por tunicamicina (Irsigler *et al.*, 2007). Estes dados mostraram que este conjunto de genes, que eram induzidos pelos dois estresses, e quando estimulados em conjunto tinham sua expressão aumentada de forma sinérgica, pareciam responder a um novo ramo de sinalização que integra as respostas aos estresses no RE e osmótico. Os ortólogos dos genes cuja expressão respondia de maneira sinérgica aos estresses, tais como *ATAF2* e *Nrich*, possuíam suas funções relacionadas com a resposta a patógenos e a morte celular programada (PCD) (Delessert *et al.*, 2005; Tenhaken *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2008). Estudos sobre superexpressão de *ATAF2* em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* determinaram que esta condição causava a repressão de uma variedade de genes relacionados à patogênese, e que estes níveis eram aumentados em linhagens *knockout* (Delessert *et al.*, 2005). Muitos genes NAC de soja foram recentemente caracterizados e pertencem a uma família de fatores de transcrição que medeiam processos de senescência em folhas de plantas como *N. tabacum* (Pinheiro *et al.*, 2009). Os genes que codificam as proteínas ricas em asparagina (N rich) demonstraram estar

envolvidos na resposta hipersensível mediada por ácido salicílico e no processo de morte celular programada, sendo que estudos mais recentes comprovaram a atuação destas proteínas neste processo em *N. tabacum* e em células de soja (Costa *et al.*, 2008).

4- Proteínas ricas em asparagina estão envolvidas na morte celular programada (PCD) e são co-reguladas durante a via integrativa

Dentre o grupo de genes que possuíram uma forte indução sinérgica da expressão quando plantas de soja foram tratadas com agentes estimuladores de estresses no RE e osmótico simultaneamente, se encontravam 2 denominados N rich 1 e 2 que codificavam para proteínas ricas em asparagina (Isgler *et al.*, 2007). Posteriormente verificou-se que ambos codificavam um único gene que foi denominado *NRP-B* (Costa *et al.*, 2008). *NRP-B* codifica uma proteína similar a uma anteriormente descrita (Ludwig *et al.*, 2001) que passou a ser denominada *NRP-A*. Tanto *NRP-B* quanto *NRP-A* são induzidas de maneira sinérgica pelos dois estresses, e portanto são alvos desta nova via integrativa. Nos estudos subseqüentes, foram verificadas três características para a confirmação da hipótese de que tanto *NRP-A* como *NRP-B* atuavam no processo de morte celular programada. Primeiro, estas proteínas apresentaram uma expressão aumentada quando plantas de soja foram tratadas com cicloheximida, um indutor de morte celular, e uma expressão diminuída quando as plantas foram tratadas com inibidores de senescência como zeatina. Segundo, protoplastos de soja superexpressando as NRPs induziram atividade de caspase-3 e fragmentação do DNA nuclear. Terceiro, a expressão transiente de NRPs em folhas de *N. tabacum* causou um processo acelerado de senescência, demonstrado pelos níveis crescentes de marcadores de senescência, e diminuição dos níveis de clorofila (Costa *et al.*, 2008).

A indução de senescência foliar a partir de déficit hídrico, que compartilha componentes do estresse osmótico, é um fenômeno bem documentado em plantas (Gan *et al.*, 1997). Uma ligação direta entre um estímulo de estresse prolongado no RE e a senescência foliar, porém, ainda

não tinha sido descrita, apesar de estudos em mamíferos mostrarem que estresse no RE induz morte celular através de vias apoptóticas (Watanabe *et al.*, 2008).

Apesar dos mecanismos pelos quais o estresse no retículo determina processos específicos de morte celular em plantas continuarem desconhecidos, evidências indiretas indicam que a PCD induzida por estresse no RE pode ocorrer através de vias induzidas por chaperones moleculares na UPR (Urade 2009). *AtBI1*, é um gene relacionado a PCD, sendo relacionado a estresse no retículo e foi identificado estar envolvido neste processo e na UPR (Iwata e Koizumi, 2005). *AtBI1* apresenta na região de seu promotor cis-elementos regulatórios ERSE-like, indicando assim que a regulação positiva do gene de *BI* por estresse no RE pode ocorrer através de uma via de transdução mediada por chaperones na UPR de plantas (Kamaushe *et al.*, 2005).

Diferentemente do processo de senescência causado por estresse no RE mediado pela UPR, o processo de senescência e morte celular mediado pelas proteínas NRPs parece ser ativado por vias de sinalização diferentes, estimulado tanto pelo estresse no RE como pelo estresse osmótico. Há varias evidências que mostram que o processo de senescência causado pelas NRPs ocorre por uma via de sinalização distinta do ramo da UPR que inclui chaperones moleculares. Processos de senescência baseados nas proteínas NRPs não são ativados exclusivamente no RE, pois estas proteínas são induzidas por outros processos ambientais diversos de estresse, como na resposta hipersensível. Para que ocorra a máxima ativação da expressão das proteínas NRPs é necessária a presença do estímulo osmótico, o que por sua vez causa a diminuição da expressão de chaperones moleculares, como BiP, que medeiam a regulação da resposta ao estresse no RE durante a UPR. Finalmente, enquanto em plantas de soja superexpressando Bip ocorre uma diminuição da expressão de genes relacionados a UPR, a expressão das proteínas NRPs mantém-se similar a de plantas normais (Costa *et al.*, 2008).

Diante dos fatos sobre a atuação das proteínas NRPs no desencadeamento do processo de morte celular em resposta a ativação da via que integra os estresses osmótico e do RE, faz-se necessário determinar as proteínas responsáveis diretamente pelo controle da expressão destes genes. A identificação de um transfator auxiliaria na elucidação do sistema de controle

transcricional de genes envolvidos nesta via integrativa, aumentando assim o conhecimento sobre o funcionamento deste novo ramo de transdução de sinais durante os estresses ambientais.

II - Objetivo

O objetivo principal deste trabalho foi identificar e caracterizar fatores de transcrição que controlam a transcrição do gene *GmNRP-B*.

III - Metas Específicas

- Identificar e caracterizar a região promotora do gene *GmNRP-B*;
- Clonar a região promotora de *GmNRP-B* em vetores para expressão em leveduras;
- Realizar triagens de possíveis cDNAs que codifiquem fatores de transcrição que se liguem a região promotora de *GmNRP-B* a partir do sistema de mono-híbrido de leveduras;
- Clonar o cDNA completo que codifica a proteína candidata em diferentes vetores de expressão;
- Caracterizar bioquímica e funcionalmente a interação da proteína candidata com a região promotora de *NRP-B*.

IV – Materiais e métodos

1 - Oligonucleotídeos específicos para amplificação e clonagem de diferentes fragmentos de DNA em vetores específicos

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Vetor de Entrada
Fw-GmERD 15 like	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGAAGTCATTTCTGC	pDONR201
GmERD 15 likeSt-Rv	AGAAAGCTGGGTCCTACCTGGGCTGGTGAATAGC	pDONR201
Fw-PNRP-B1000	GAATTCTTAATTGTCTGGTTAATATC	pCR4
Fw-PNRP-B700	GAATTCTGCACACACTCACTGCCTCC	pCR4
Fw-PNRP-B350	GAATTCTTCACGTGTACGCGTTTTGG	pCR4
PNRP-B-SacI-Rv	GAGCTCGTAGCTTAGTGTTTT	pCR4
PNRP-B-SalI-Rv	GTCGACGTAGCTTAGTGTTTT	pCR4
PEXAD FW	CGGTCCGAACCTCATAACAACCTC	
PEXAD RV	GTAATTTCTGGCAAGGTAGAC	

A utilização dos diferentes oligonucleotídeos está descrita no item resultados e discussão.

2.- Oligonucleotídeos específicos para qRT-PCR

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Gene Alvo
GmERD 15 likeFw	CCCTGGTTCCGCGACTACT	GmERD 15 like
GmERD 15 likeRv	GGTCAAAGTCGAAGTCGAAAGC	
NRP-BFw	CAAGGCTGCTGGCGACAAGATA	NRP-B
NRP-BRv	CGTGGAGGCAGACCGAAGAG	
BiPDFw	CTTGAAGAAGTTTCGTGGTAAAACCTA	BiPD
BiPDRv	ATCTGGAGGAGCCCCAGGCGGTGG	
HelicaseFw	TAACCCTAGCCCCTTCGCCT	Helicase
HelicaseRv	GCCTTGTCGTCTTCCTCCTCG	

3 - Identificação e caracterização da região promotora do gene *GmNRP-B*

O gene NRP-B de soja foi identificado no banco de dados do Phytozome (<http://www.phytozome.net>) utilizando a seqüência do cDNA obtida por Costa e colaboradores (2008) como protótipo para busca do gene. Após a identificação uma região correspondente a aproximadamente 1000 de bases à montante do códon de iniciação da tradução do gene permitiu a construção de oligonucleotídeos para a amplificação dos fragmentos de interesse (Fw-PNRP-B1000, Fw-PNRP-B700, Fw-PNRP-B350, PNRP-B-SacI-Rv, PNRP-B-Sall-Rv) e posterior clonagem em vetores de entrada. Análises de bioinformática, com o programa PlantPlan (<http://PlantPAN.mbc.nctu.edu.tw>), foram realizadas para identificar *in silico* possíveis cis-elementos conhecidos presentes no promotor.

4 - Construções de DNA

Os fragmentos amplificados da região promotora do gene NRP-B de soja foram clonados primeiramente em vetor de entrada comercial pCR4, utilizando-se o kit TOPO TA Cloning For Sequencing da Invitrogen, obtendo-se os clones pCR4-PNRPB1000 (pUFV 1457), pCR4-PNRPB700 (pUFV 1458) e pCR4-PNRPB350 (pUFV 1459). Após confirmação da clonagem por amplificação com os oligonucleotídeos específicos (Fw-PNRP-B1000, Fw-PNRP-B700, Fw-PNRP-B350, PNRP-B-SacI-Rv, PNRP-B-Sall-Rv), e verificação em gel de agarose 1% (p/v), os fragmentos foram recuperados por digestão com as endonucleases específicas para cada primer utilizado, e posteriormente purificados, utilizando-se o kit GelExtraction Kit, da Qiagen. Os fragmentos purificados foram então clonados em vetores de expressão em leveduras, contendo genes repórteres específicos para o sistema de mono-híbrido (o vetor de integração genômica pLACZi, contendo o gene repórter da *LacZ*, e o vetor pHIS2.1, contendo o gene repórter *HIS3*, da Clontech, ambos os genes tendo sua expressão controlada pela região promotora inserida), obtendo-se os

clones pLACZi-PNRPB1000 (pUFV 1463), pHIS2.1-PNRPB1000 (pUFV 1466), pLACZi-PNRPB700 (pUFV 1464), pHIS2.1-PNRPB700 (pUFV 1467), pLACZi-PNRPB350 (pUFV 1465) e pHIS2.1-PNRPB350 (pUFV 1468).

Para clonagem do cDNA completo de GmERD 15 em diferentes vetores de expressão, este foi amplificado com oligonucleotídeos específicos (Fw-GmERD 15 like e GmERD 15 likeSt-Rv), e o produto resultante verificado em gel de agarose 1%, purificado utilizando-se o kit GelExtraction Kit, da Qiagen, e inserido por recombinação no vetor de entrada pDONR201, utilizando-se a enzima BP clonase (Invitrogen). O clone obtido, pDONR201-GmERD 15 (pUFV 1358.1), contém códon de terminação e foi utilizado para transferência do respectivo cDNA para diferentes vetores de expressão (mapas dos respectivos vetores no ANEXO 1), por recombinação, utilizando-se a enzima LR clonase (Invitrogen). Estas transferências resultaram nos clones pDEST32-GmERD 15 (pUFV1379) e pDEST22-GmERD 15 (pUFV1425), de expressão em leveduras; pDEST15-GmERD 15 (pUFV1380), de expressão em bactérias; pK7WG2-GmERD 15 (pUFV 1469) e pYFP-GmERD 15 (pUFV 1470), de expressão em plantas.

Os clones obtidos foram utilizados na transformação de células competentes de *Escherichia coli* da estirpe DH5 α , pelo método do choque térmico e de eletroporação (Sambrook *et al.*, 1989), selecionados com o antibiótico apropriado e diagnosticados por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos.

5 - Transformação de leveduras

Células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram crescidas em meio YPD-A por 16 horas, sendo então submetidas à centrifugação de 13000 g por 30 segundos, e ressuspensas com 1 mL de água deionizada. Após recentrifugação a 13000 g por 30 segundos, foram obtidas as células pré-lavadas para transformação com DNA plasmidial, utilizando-se o método de transformação com acetato de lítio/polietilenoglicol (PEG).

Células de *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem AH109 (*MATa*, *Trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *LYS2::GAL1UAS-GAL1TATAHIS3*, *MEL1 GAL2UAS-GALTATA::MELUAS-MEL1TATA-lacZ*), que é deficiente na produção de leucina, triptofano e uracila (Trp-, Leu-, Ura-); e contém os genes repórteres *LacZ* e *HIS3* foram transformadas com as construções pDEST32-GmERD15 pDEST32 vazio, juntamente com 100 µg de DNA carreador de esperma de salmão (ssDNA), pelo método de acetato de lítio/polietilenoglicol (PEG). Os transformantes foram plaqueados em meio seletivo com deficiência em leucina (SD, *Synthetic Dropout*, -Leu) e crescidos por três dias a 28°C.

Células de *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem W303 (*MATa/MATα leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 [phi⁺]*), que é deficiente na produção de leucina, triptofano, uracila e histidina (Trp-, Leu-, Ura-, His-) foram transformadas com as construções pDEST22-GmERD15, pDEST22 vazio, pLACZi-PNRPB1000, pLACZi-PNRPB700, pLACZi-PNRPB350, pHIS2.1-PNRPB1000, pHIS2.1-PNRPB700, pHIS2.1-PNRPB350, e pLACZi-PBiP350, juntamente com 100 µg de DNA carreador de esperma de salmão (ssDNA), pelo método de acetato de lítio/polietilenoglicol (PEG). Os transformantes foram plaqueados em meio seletivo com deficiência em uracila, triptofano e histidina (SD, *Synthetic Dropout*, -URA -Trp -His), e crescidos de três a quatro dias a 28°C.

A estirpe de levedura W303 PNRPB-HIS/LACZ contém cópias de *HIS3* e *LacZ* sob controle de PNRPB que servem como gene repórter duplo.

6 - Construção da biblioteca de cDNA de soja submetida a tratamentos de estresse no RE e estresse osmótico, em vetores de expressão de leveduras

O mRNA foi extraído de plantas de soja submetidas a estresses com tunicamicina e polietileno glicol (PEG), tratamentos que induzem condições de estresse no RE e osmótico, respectivamente. As plantas foram inicialmente germinadas em terra e aclimatadas em casa de vegetação e após uma semana foram transplantadas para a solução contendo Tunicamicina (Sigma) 10µg/mL

e polietilenoglicol 10% (p/v) (PEG; Peso molecular 8000). O material vegetal foi coletado após 2 horas de tratamento e imediatamente congelado em nitrogênio líquido sendo armazenado em *freezer* a -80°C até o processamento das amostras. O material congelado foi utilizado para extração de mRNA utilizando o kit Fast Track, da Invitrogen, para extração específica de mRNA. A qualidade do mRNA extraído foi monitorada em gel de agarose 1% em tampão NBC contendo formaldeído, e então o cDNA foi sintetizado e utilizado para a confecção da biblioteca utilizando o kit Superscript Plasmid System with GATEWAY Technology for cDNA Synthesis and Cloning, da Invitrogen. O processo de síntese se baseou na formação de uma biblioteca unidirecional pela utilização de adaptadores com sítios de restrição das enzimas *Sal* I e *Not* I. Os cDNAs utilizados para a clonagem foram separados por fracionamento por passagem em coluna cromatográfica específica e selecionados por PCR, utilizando-se como gene indicador o gene de NRP-B, sendo que as frações do fracionamento escolhidas foram aquelas que possuíam maior intensidade de bandas de amplificação. Os cDNAs selecionados foram então clonados no vetor pEXP-AD502, da Invitrogen, seguido de transformação de *E. coli* linhagem DH5 α , para amplificação dos plasmídeos contendo os cDNAs. Após crescimento das bactérias, os plasmídeos foram extraídos e purificados. Esta biblioteca foi construída em conjunto com o estudante de mestrado Pedro Augusto Braga dos Reis, no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas. A biblioteca de cDNA foi então utilizada para a co-transformação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* linhagem W 303 previamente transformada com o vetor de integração pLACzi e o vetor pHIS2.1, contendo o promotor do gene alvo, NRP-B, com aproximadamente 1kb.

7 - Triagens de possíveis cDNAs que codifiquem fatores de transcrição que se liguem a região promotora de *GmNRP-B* a partir do sistema de mono-híbrido de leveduras

As triagens de possíveis fatores de transcrição que se liguem a região promotora do gene de NRP-B foram conduzidas pelo sistema de mono-híbrido de leveduras. Para isto células de levedura W303 pré-transformadas com os plasmídeos pLACZi-pNRP-1000 e pHIS 2.1-pNRP-1000 foram crescidas em meio líquido seletivo com deficiência em uracila e triptofano (SD, *Synthetic Dropout*, -URA -Trp) por 36 horas, e transformadas com a biblioteca de cDNA de soja, sendo estas transformações crescidas em meio seletivo com deficiência em uracila, triptofano e histidina (SD, *Synthetic Dropout*, -URA -Trp -His) com concentração de 10 mM de 3AT. Foram feitas 30 transformações, utilizando 25 µL contendo 12 µg de plasmídeos da biblioteca, sendo triados cerca de 4000 clones.

A interação dos possíveis transfatores com a região promotora do gene foi monitorada pela ativação dos genes repórteres *LacZ* e *HIS3*. Análise qualitativa da ativação do gene repórter *LacZ* foi concluída mediando-se a atividade da enzima β -galactosidase, segundo protocolo descrito por Amberg *et al* (2005), e a prototrofia a HIS foi monitorada por crescimento na ausência de histidina, segundo protocolo da Clontech.

Após realizada a seleção das colônias candidatas a possuírem o clone contendo cDNA de transfatores, foi feito a extração e purificação dos plasmídeos em levedura pelo kit Qiaprep, da Qiagen, utilizando-se pérolas de vidro, seguido de transformação de *E. coli* linhagem DH5 α , para amplificação dos plasmídeos. Os plasmídeos foram isolados de *E. coli*, usados para re-transformação de leveduras, e repetição dos ensaios de medida da ativação dos genes repórteres. Os plasmídeos re-transformados que mantiveram a ativação dos genes repórteres em levedura, foram extraídos das leveduras utilizando-se o kit Qiaprep (Qiagen), e pérolas de vidro para facilitar a lise das células de leveduras, seguido de transformação de *E. coli* linhagem DH5 α e posterior diagnóstico por PCR e visualização em gel de agarose 1% (p/v). Os clones positivos foram então sequenciados. Análises de comparação de seqüências dos cDNAs seqüenciados foram realizadas nos bancos de dados do Phytozome (<http://www.phytozome.net>) e do NCBI

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificação de sequências incompletas e identificação de possíveis genes ortólogos.

8 - Células de soja em suspensão e tratamentos

Cultura de células de soja em suspensão anteriormente preparadas (Cascardo *et al.*, 2001) foram cultivadas em 40 mL de meio MS Soja (Finer & Nagasawa, 1988) mantendo-se o procedimento de subcultivos sucessivos semanais, repicando-se 10 mL de cada cultivo de células para um meio novo. Os tratamentos foram realizados em culturas de células cinco dias após repicagem.

As células foram tratadas com ABA 100 μ M (ácido abscísico), JA 100 μ M (ácido jasmônico), SA 100 μ M (ácido salicílico), pelo período de tempo indicado nas respectivas figuras. O material vegetal foi coletado após os tratamentos e imediatamente congelado em nitrogênio líquido, sendo armazenado em *freezer* a -80 °C até o processamento das amostras.

9 - Material vegetal e tratamentos

Foram utilizadas plantas de soja do cultivar Conquista. As plantas foram inicialmente germinadas em terra na casa de vegetação e após uma semana (ou estágio VC), foram tratadas com a bactéria fitopatogênica *Pseudomonas syringae pv Tomato*, incompatível para soja, para infecção sistêmica da planta, pelo período de tempo indicado nas respectivas figuras. O material vegetal foi coletado após os tratamentos e imediatamente congelado em nitrogênio líquido, sendo armazenado em *freezer* a -80 °C até o processamento das amostras

10 - Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante. Para eliminação do DNA contaminante, o RNA total foi tratado com três unidades de DNase livre de RNase (Invitrogen). Após a extração e purificação, o RNA foi quantificado (Thermo Fisher Scientific EVO 60) e analisado em gel de agarose desnaturante 1,5 % (p/v), corado com brometo de etídeo 0,1µg/mL. A síntese de cDNA foi realizada utilizando 4 µg de RNA total, oligo-dT(18) e Transcriptase Reversa M-MLV (Invitrogen), segundo especificações do fabricante.

11 - PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

O procedimento de PCR em Tempo Real, bem como testes, validações e experimentos foram conduzidos seguindo manuais da *Applied Biosystems*. As reações de PCR em tempo real foram conduzidas utilizando o aparelho 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), oligonucleotídeos específicos (item 2.2), cDNAs dos tratamentos e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram: 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. Para a quantificação da expressão gênica, foram utilizados os métodos comparativos de Ct: $2^{-\Delta Ct}$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como controle endógeno para normalização dos dados do qRT-PCR, foi utilizado o *primer* específico para RNA helicase de soja, que apresentou baixa variação de expressão entre os tratamentos.

12 - Expressão transiente em protoplastos de soja

Protoplastos foram preparados em ambiente estéril a partir de células de soja como descrito recentemente (Costa *et al.*, 2008; Pinheiro *et al.*, 2009). Cinco dias após a repicagem, as células foram lavadas duas vezes em tampão de lavagem (manitol 0,6 M; MES 20mM; pH 5,5), centrifugadas a 500 rpm por 2 minutos, ressuspendidas em igual volume de solução enzimática [celulase 0,5% (p/v), macerozima R-10 0,5% (p/v), pectoliase Y23 0,1% (p/v), manitol

0,6M; MES 20 mM; pH 5,5] e incubadas por 3 horas sob agitação de 40 rpm. A digestão foi acompanhada a cada 30 minutos por microscopia. Em seguida, os protoplastos foram filtrados em peneira de 65 µm e coletados por centrifugação a 500 rpm por 2 minutos, sendo lavados 2 vezes com tampão de lavagem. Os protoplastos foram então novamente coletados por centrifugação por 2 minutos a 500 rpm, ressuspensos em 2 mL de tampão de lavagem e transferidos para um outro tubo contendo tampão gradiente [sacarose 20% (p/v), manitol 0,6M, MES 20 mM, pH 5,5]. O material foi centrifugado por 5 minutos a 500 rpm, sendo coletada a banda na interface, que corresponde aos protoplastos viáveis. Estes foram lavados 2 vezes com tampão de eletroporação (Hepes-KOH 25mM pH 7,2, KCl 10 mM, MgCl₂ 15 mM, manitol 0,6M) e ressuspensos em 2 mL do mesmo tampão. Os protoplastos foram contados em microscópio usando uma câmara de Neubauer.

Os ensaios de expressão transiente foram conduzidos por meio de eletroporação de 2×10^5 – 5×10^6 protoplastos com 10 µg de DNA (cassete de expressão) e 30 µg de DNA carreador de esperma de salmão (ssDNA), em um volume final de 0.8 mL, a 25 µF de capacitância e 250 volts (Gene Pulser – BIORAD). Os protoplastos recém eletroporados foram mantidos no gelo por 15 minutos e transferidos para 8 mL de meio MS Soja +0,6 M de manitol pH 5,5. Para a expressão transiente, os protoplastos foram incubados por 36 horas no escuro. Após esse período, as amostras foram lavadas 2 vezes com tampão de lavagem, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a extração de RNA.

13 - Transformação transiente de plantas de tabaco

A transformação transiente de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. havana) foi realizada como descrito anteriormente, por meio de agroinoculação (Carvalho *et al.*, 2008). As culturas de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com os vetores de interesse foram crescidas em 5 mL de meio Rhizo, com antibióticos adequados, a 28°C por 16 horas, e centrifugadas a 5000 RPM por 5 min. O pellet foi lavado 2 vezes com tampão de infiltração (MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM

pH 5,6 e acetosiringona 10 μ M) e ressuspendido em 1 mL do mesmo tampão. Utilizando seringas estéreis sem agulha, folhas jovens de tabaco foram infiltradas com *A. tumefaciens* em uma D.O. de 0,2, por meio de uma gentil pressão através dos estômatos da epiderme inferior. A expressão das proteínas foi confirmada por microscopia confocal, três dias após a agroinoculação.

14 - Localização subcelular

Para a expressão transiente da proteína fusionada a YFP, folhas de tabaco foram agroinoculadas com a construção pYFP-GmERD15 segundo item 2.11. Três dias após a inoculação, as folhas transformadas foram observadas no microscópio LSM 510 META invertido (ZEISS), utilizando a objetiva de imersão de óleo de 40x1,4 e o laser de argônio. A análise foi realizada nas folhas, com explantes montados em água utilizando-se lâminas e lamínulas de vidro. Para a obtenção de imagens de expressão, YFP foi excitada a 514 nm, e sua emissão coletada a 535-590 nm. A fenda do microscópio foi fixada, fornecendo uma faixa óptica de 1,5 a 2,0 μ m. As imagens foram processadas com auxílio do software “LSM Image Browser ” (ZEISS) e do programa Adobe Photoshop.

15 - Análise de transativação em leveduras

A verificação da interação da proteína GmERD15 com a região promotora de *GmNRP-B*, bem como análise da existência de domínios de transativação na proteína foram conduzidas segundo manual da Clontech. Para análise da interação da proteína GmERD 15 com a região promotora de *GmNRP-B* foram utilizados transformantes de levedura contendo as construções de *GmERD15* no vetor pDEST22 (Anexo 1) e as construções pLACZi-pNRP-B 1000, pLACZi-pNRP-B 700, pLACZi-pNRP-B 350, pHIS2.1-pNRP-B 1000, pHIS2.1-pNRP-B 700, pHIS2.1-pNRP-B 350, enquanto que a

análise da atividade de transativação foi realizada utilizando-se transformantes de levedura contendo a construção de *GmERD15* no vetor pDEST32 (Anexo 1).

Os transformantes de levedura obtidos pela utilização das construções em vetores de expressão foram crescidos em meio seletivo específico para a marca auxotrófica de cada respectivo vetor por 48 horas, e a ativação do gene repórter *LacZ* foi avaliada por revelação em membrana de nylon, embebida em solução reveladora específica para atividade da enzima β -galactosidase, segundo manual da Clontech, de 4 a 8 horas. A verificação de prototrofia em meio de cultura sem histidina, para avaliação da ativação do gene *HIS3*, foi feita repicando os transformantes de levedura em meio sem histidina com concentrações crescentes do inibidor competitivo 3-amino-triazole (3AT).

Análises quantitativas da ativação do gene repórter *LacZ* foi realizada, pela medida da atividade da enzima β -galactosidase, segundo protocolo descrito por Amberg *et al* (2005).

16 - Agrupamentos e análises *in silico*

Onze proteínas com similaridade de sequência à *GmERD15* (Glyma04g28560.1, Glyma11g20940.1, ACJ84081.1_M_truncatula, AAM10198.1_A._thaliana, ABV89651.1_B._rapa, Glyma03g28760.1, Glyma19g31500.1, AF261139_L._esculentum, Glyma14g05980.1, ACA51033.1O._sativa_Japonic, ACG28352.1_Z._mays) depositadas em bancos de dados foram utilizadas na construção do agrupamento hierárquico de seqüências. O alinhamento múltiplo foi realizado pelo programa ClustalW (<http://clustalw.genome.ad.jp/>) e o agrupamento foi construído utilizando-se o programa MEGA3 (Kumar *et al.*, 1994), pelo método UPGMA. Os números de acesso das seqüências utilizadas são fornecidos na figura correspondente. A sequência de *GmERD15* foi analisada pelo programa BLOCKS (<http://blocks.fhcrc.org>) para análise de possíveis domínios de transativação *in silico*.

17 - Técnicas de Biologia Molecular

Todas as técnicas de Biologia Molecular que não estão descritas detalhadamente na dissertação, como preparação de géis de agarose, preparação de plasmídeos, transformação de bactérias, digestão de DNA por enzimas de restrição, síntese de cDNA, preparação de tampões e soluções estoques foram conduzidas exatamente segundo protocolos contidos em Sambrook et al.(1989).

V - Resultados e Discussão

1 - Análise da sequência e clonagem da região promotora de *GmNRP-B*

A partir da sequência do cDNA de *GmNRP-B* (Costa *et al.*, 2008), foi possível prever o provável sítio de início da transcrição do gene (Figura 1). Definindo a região onde se inicia a transcrição, foi possível determinar a região considerada como região promotora, a qual utilizamos como isca para o estudo de identificação de fatores de transcrição que se liguem a ela. Para obtermos a região do genoma de soja correspondente ao promotor do gene *GmNRP-B*, utilizamos o banco de dados do Phytozome (<http://www.phytozome.net>) que reúne todas as sequências do genoma da soja. Utilizando a sequência do cDNA de *GmNRP-B* (Costa *et al.* 2008) para a busca da região genômica de soja onde se encontra o gene *GmNRP-B*, verificamos e tomamos a região correspondente a aproximadamente 1000 pares de bases à montante do códon de iniciação do gene. A região promotora (1000 bp) foi amplificada a partir de DNA genômico de soja, utilizando primers específicos (materiais e métodos item 1) e clonado no vetor pCR4 e posteriormente em pLACZi e pHIS2.1 para o ensaio de mono-híbrido.

TTAATTGTCTGGTTAATA **TTCTTAAAGAAA** TTTATTAATTTTTTATAATTGAGATTTATAATGGGAAAAAG
 GAATGGAGAGAGGAGGCTGAAATGGTAATTAGAAGCTTCAAAAAAGAAGAAGAAGAAGTGGTAATTAGA
 AAGGGGGCACTACCAAACACAGACACAGGTGT **CAATAAAGATC** CATTGAACATGGCATAAACACCGACGT
 GCCCGTTTGTACGGACCACAAAATCATGCACACACTCACTGCCTCCACACTGTTTTCTATTCTAGACTA
 CACTTCCATTCCATGTCTTAGCAGCTAAGGAAGTTCATCCATCCACTTTATC **AAATAAAGAAG** ACGACA
 AAACAAAAACATAACTTAATGGAAGCCATATTTTTTTATTTAATTATCCTATTAGATAACGTAATTTAAT
 TTATCTAGCATCAGTGCTTGGTCTTATACTTTTTTCTACAGAGTAGTAAACAA **AAACAACAATT** TTGG
 TCTGAACTCAAACTA **AAGTAAAGACG** ATTCTATCAGCTTCTAGAACGTAGTATAGTATACCAAATCAAAA
 CCCAAATGCCACCTTCCACTCCACCTTTTACGTGTACGCGTTTTGGCATCATCATCACTCATCACTCAC
 TAAGGAGCACCCACCTAATTTAAATTAATGAAAAAAAA **TGACAACACCAC** CGAAAACAAATTTTCAT
 TTCACATTTGACAATTACATACGCAACCCGTAAGTAACCTTCCACGAAGTTACATTTTCATCTCATCTCAT
 TTTTCCCATC **TTT** TATATACCAACACTAGTGATTTCTTATCAAATTTTCTCATTCCAACCTGAACCTG
 CTCTGAATCCAATTCTTCTTCTTCTGTTCTCTGTTAAGGCAATACAACATTTACTACTCATACTCAA
 GTAGCTTAGTGTGTTTTGTTTAGCATATC **ATG**

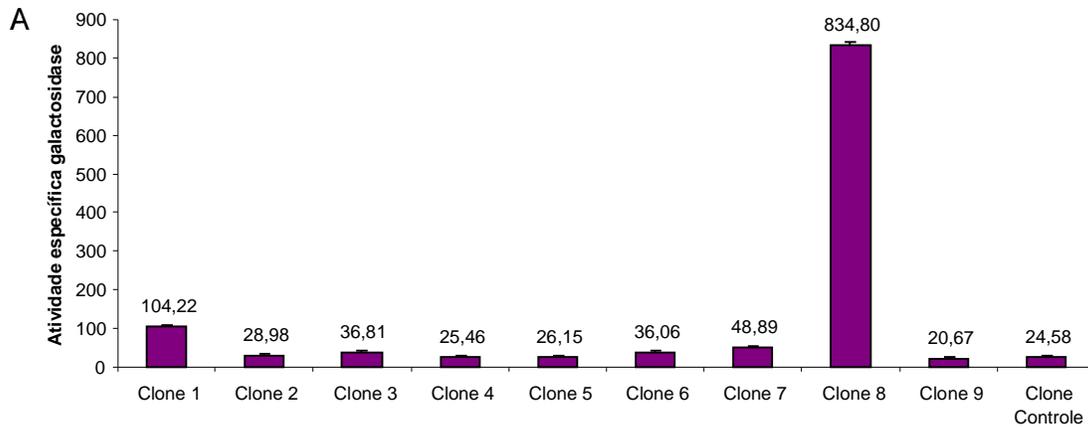
Figura 1 – Sequência do promotor de *GmNRP-B*: As sequências dos oligonucleotídeos para a clonagem dos fragmentos de 1000 pares de bases da região promotora de *GmNRP-B* estão mostradas em letras vermelhas e azuis, respectivamente. Sítios de interação de transfatores Dof1 estão mostrados em quadros cinzas, enquanto que os sítios de interação de transfatores RAV1 estão mostrados em quadros azuis. O possível sítio de iniciação da transcrição do gene *GmNRP-B*, obtido por RACE, está mostrado em vermelho, e o possível sítio de início da tradução do gene está mostrado em amarelo.

A sequência do promotor está mostrada na Figura 1. Para verificar se a região promotora continha cis-elementos conhecidos para ligação de transfatores de plantas, submetemos a seqüência da região clonada ao programa PlantPlan (<http://PlantPAN.mbc.nctu.edu.tw>). Este programa traz uma interface que mostra regiões na seqüência submetida de sítios de ligação de famílias de transfatores conhecidos de diferentes organismos vegetais, como Arabidopsis, milho, arroz, Medicago e soja. Foi encontrado uma maior abundância de sítios de ligação na região submetida para duas famílias de transfatores conhecidos em Arabidopsis, Dof1 e RAV1, sendo 4 sítios verificados para transfatores da família Dof1 (quadros cinza) e 2 para a família RAV1 (quadros azuis), como está mostrado na Figura 1.

A família Dof (Ligadoras ao DNA com um dedo de zinco), é uma classe particular de fatores de transcrição com domínios de dedo de zinco caracterizado por uma região conservada de 50 aminoácidos com uma estrutura C2-C2, associada a uma região básica, que se liga especificamente a seqüências de DNA com núcleo 5'-T/AAAAG-3'. Estas proteínas participam da regulação da expressão gênica em processos tais como mecanismos de defesa da planta, germinação de sementes, respostas a giberelinas e a auxinas e regulação de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos (Lijavetzky *et al.*, 2003). A família Rav consiste de uma classe de proteínas que possuem dois motivos de ligação ao DNA: um único motivo AP2 e um domínio B3 like. Proteínas que possuem este domínio AP2 único geralmente fazem parte de um grupo de fatores responsivos a etileno (EREBs) e responsivos a desidratação (DREBs) (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

2 - Construção das leveduras expressando os genes repórteres *LacZ* e *HIS3* sob o controle do promotor pNRPB e a varredura da biblioteca pelo sistema do mono-híbrido

Utilizando a construção da região promotora do gene NRP-B de 1 kb controlando a expressão dos genes repórteres *LacZ*, que codifica a enzima β -galactosidase, e *HIS3*, que codifica a enzima Imidazolglicerol-fosfato desidratase, triagens de cDNAs foram realizadas a partir da utilização do método do mono-híbrido de leveduras. Para isto foi utilizada uma biblioteca de cDNA de soja, construída a partir de mRNA extraído de plantas de soja tratadas com tunicamicina, um potente ativador da via UPR, e PEG, um agente causador de estresse osmótico, visando assim ativar a expressão de genes relacionados à via integrativa, sendo que esta biblioteca foi construída no vetor pEXP AD 502 (Anexo 1). Leveduras da linhagem W303 *LACZ* e *HIS3*, contendo os genes quiméricos PNRPB-*HIS3* e PNRPB-*LACZ*, foram então co-transformadas com a biblioteca de cDNA de soja. Após a varredura de aproximadamente 4000 clones, foram selecionados nove clones positivos pela capacidade de ativar o promotor de NRP-B. Estes clones foram avaliados com relação à atividade de β -galactosidase, e foi realizado PCR de colônia (Figura 2A e B). Entre os nove clones, três com maiores valores de atividade tiveram seus DNAs extraídos (Clone 1, Clone 7 e Clone 8) e uma segunda transformação foi realizada para eliminar falsos positivos. Neste processo, foi identificado apenas um transformante (Clone 1) que ativava fortemente a expressão de *LacZ*, além de apresentar crescimento em meio mínimo sem histidina com altas concentrações de inibidor competitivo 3-amino-triazole (3AT) (Figura 3 A).



B

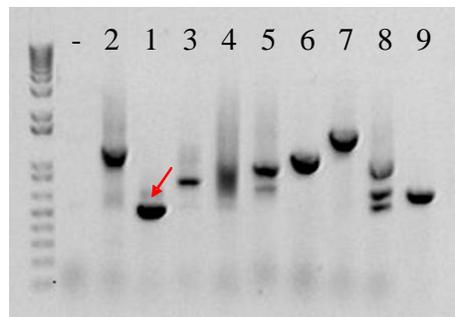


Figura 2- Varredura da biblioteca de cDNA de soja: A) Medida da atividade específica de β -galactosidase dos 9 clones selecionados. Os valores de atividade correspondentes de cada clone são mostrados no gráfico. A atividade específica do extrato é expressa em nmol/min/mg de proteína do extrato. B) Gel de agarose 1% do PCR dos clones selecionados utilizando os primers PEXAD-Fw e Rv, específicos para anelamento nas regiões que flanqueiam a região de inserção dos cDNAs da biblioteca. A banda do PCR do clone 1 é mostrado pela seta vermelha.

O DNA deste clone foi extraído e transformado em leveduras contendo a construção PNRPB-HIS3 e PNRPB-LACZ (W303/Clone 1/ PNRPB-HIS3/ PNRPB-LACZ), e como controles foram transformadas leveduras com o plasmídeo vazio (W303/pEXP AD 502/ PNRPB-HIS3/ PNRPB-LACZ). Além disto, foram transformadas leveduras com o DNA do clone positivo e a construção PBiPD-LACZ, para verificarmos a especificidade desta interação. O transformante W303/Clone 1/ PNRPB-HIS3/ PNRPB-LACZ apresentou alta expressão de *LacZ*, bem como apresentou prototrofia em meio seletivo contendo concentração de 100 mM do inibidor 3AT (Figura 3A e B).

A ativação do gene repórter foi específica, não sendo afetada pelo vetor utilizado ou por ligação inespecífica ao DNA como mostrado pela ausência de interação com o promotor de *BiPD* (Figura 3B). Uma análise quantitativa da atividade do gene *LacZ* foi realizada para cada um destes transformantes (Figura 3C). Um alto valor de atividade foi verificado ($0,5 \pm 0,01$), em relação ao controle utilizando o vetor vazio ($0,035 \pm 0,01$), enquanto a atividade obtida para o transformante contendo o promotor de *BiPD* foi também baixa ($0,083 \pm 0,0365$) (Figura 3C). Após estas considerações, este clone foi considerado um candidato a codificar uma proteína que se ligaria efetivamente ao promotor de *GmNRP-B* controlando sua expressão, sendo que os trabalhos posteriores se concentraram na sua identificação.

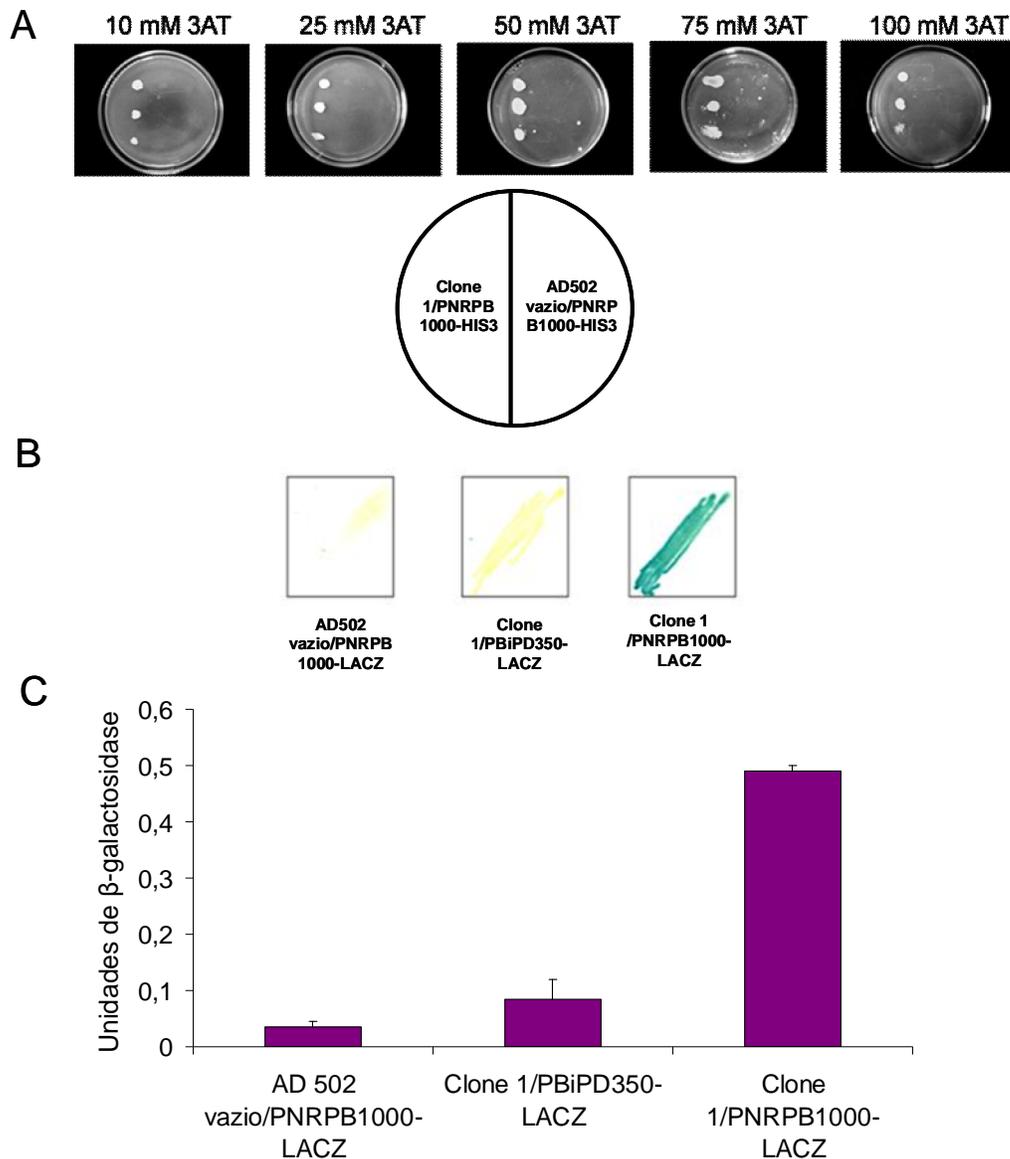


Figura 3 – Interação do clone positivo com a região promotora de *GmNRP-B*, no ensaio de mono-híbrido de leveduras: A) Verificação da prototrofia à histidina da levedura W303/Clone 1/pNRPB-HIS3, em concentrações crescentes do inibidor 3 amino-triazole (3AT), em comparação com W303/EXP-AD-502/pNRPB-HIS3; B) Ensaio de ativação da expressão do gene *LacZ* em membrana de nylon dos transformantes W303/Clone 1/pNRPB-LacZ,, W303/EXP-AD-502/pNRPB-LacZ, e W303/Clone 1/pBiPD-LacZ; C) Ensaio de ativação da expressão do gene *LacZ* por medida da atividade da enzima β -galactosidase. A atividade da enzima β -galactosidase foi expressa em unidades de β -galactosidase, em $\text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, sendo que Clone 1/pNRPB-LacZ apresentou uma atividade cerca de 10 vezes maior que a verificada por EXP-AD-502/pNRPB-LacZ.

3 - Sequenciamento e Identificação do clone positivo

Após o sequenciamento do DNA extraído do clone positivo e análise de sua seqüência através do programa BLAST, verificou-se que este apresentava grande similaridade com a proteína ERD15 de *Arabidopsis* (número de acesso NP_181674.1, com um e-value de 1e-91 e um score 338 bits). A seqüência de DNA extraído do clone e a seqüência de aminoácidos deduzida estão mostradas na Figura 4.

O gene *ERD15* foi primeiramente descrito em *Arabidopsis* (Kiyosue *et al.*, 1994), como sendo membro de um conjunto de cDNAs induzidos por desidratação. Os níveis de transcritos de seu mRNA acumulam-se em nível máximo após uma hora de tratamento por desidratação, permanecendo estes níveis elevados até vinte e quatro horas após (Kiyosue *et al.*, 1994), daí então a sigla ERD para o nome em inglês Early Response to Dehydration. Trata-se de uma proteína pequena, com aproximadamente 163 resíduos de aminoácidos, sendo 49 resíduos carregados, constituindo uma proteína hidrofílica, ácida, e sem função ainda descrita (Kiyosue *et al.*, 1994; Kariola *et al.*, 2006).

Recentemente, foi identificado que ERD15 pertence a uma família de proteínas que possui um motivo PAM2 bem conservado, que permite a interação com a porção carboxi-terminal de proteínas ligantes a cauda poli(A) (PABP), (Albrecht and Lengauer, 2004; Kozlov *et al.*, 2004), interação esta que foi demonstrada em ensaios de duplo-híbrido de leveduras por Wang e Grumet (2004). PABPs são importantes na regulação da tradução e estabilidade de mRNAs quando estas se ligam a caudas poli(A) de mRNAs antes destes serem tomados pela maquinaria traducional (Albrecht and Lengauer, 2004).

Trabalhos mais recentes sobre ERD 15 mostraram que a alteração da modulação da expressão desta proteína em *Arabidopsis* alterou a resposta da planta ao fito hormônio ABA (Kariola *et al.*, 2006). Plantas superexpressando ERD 15 mostraram uma menor sensibilidade a ABA, enquanto que plantas que possuíam ERD 15 endógena silenciada por RNAi tiveram uma hipersensibilidade a este hormônio. Os autores avaliaram características observadas em eventos com conhecida modulação por ABA, como a germinação de sementes (acelerada em plantas superexpressando ERD 15 e

retardada em plantas silenciadas) e a tolerância à seca e congelamento (diminuída em plantas superexpressando ERD 15 e aumentada ou inalterada em plantas silenciadas) (Kariola *et al.*,2006). A alteração da expressão de ERD 15 também confirmou modulação da resposta a ABA pela alteração da expressão de conhecidos genes marcadores responsivos a ABA, como *RAB18* e *LT178*, que apresentaram expressão diminuída em plantas superexpressando ERD 15 e expressão aumentada ou inalterada em plantas silenciadas, ambos mostrados por Kariola e colaboradores (2006).

Os autores também demonstraram a participação de ERD 15 nas respostas a estresses bióticos. Não apenas ERD 15 afeta a tolerância a estresses abióticos, como também foi demonstrado que plantas de *Arabidopsis* superexpressando esta proteína tiveram uma maior resistência ao patógeno *E. carotovora* (Kariola *et al.*, 2006).

Dados como o aumento da expressão de genes marcadores de resposta a patógeno, como *PR1* e *PR2*, também relacionados a via de resposta mediada por SA, em plantas superexpressando ERD 15, suportam a hipótese de que uma redução da sensibilidade a ABA nestas plantas causou um aumento na resistência ao patógeno (Kariola *et al.*,2006). Estes dados suportaram então duas fortes evidências: Primeiro, ERD 15 mediando a resposta a ABA, faz uma conexão das respostas a estresse abiótico com as respostas a estresse biótico, com base no aumento da resistência a patógenos em plantas superexpressando ERD 15. Segundo, ABA participa e interfere nas vias de resposta a outros hormônios, como SA e ácido jasmônico (JA), com base em experimentos com mutantes de *Arabidopsis* deficientes de proteínas relacionadas ao metabolismo de ABA, *abi1-1* e *abi2-1*, que apresentavam uma maior expressão de genes marcadores de resposta a patógeno, como *PR1* (Kariola *et al.*,2006).

A sensibilidade a ABA de muitos genes induzidos por estresse abiótico é conferida por seus cis-elementos regulatórios conservados ABRE, sítios de ligação para domínios como o zíper de leucina de fatores de transcrição AREBs (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2007) . Processos de fosforilação dependentes de ABA são requeridos para ativar estes fatores de transcrição e conseqüentemente a expressão destes genes ABRE (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Até recentemente, o principal foco de pesquisa sobre ABA tem sido seu papel em respostas a estresses abióticos e, portanto, o papel deste hormônio na interação planta-patógeno ainda possui várias questões não respondidas. Thaler e Bostock (2004) mostraram que a depleção de ABA aumentou as respostas dependentes de SA e sugeriram então um efeito antagonista de ABA na resposta mediada por SA. A SAR foi aumentada em plantas de *Arabidopsis* superexpressando ERD 15, evidenciada pelo aumento na indução de genes marcadores da SAR adicionalmente pelo aumento da resistência a *E. carotovora*, o que fortaleceu ainda mais esta idéia. Alterações nos níveis destes hormônios não pareceram causar estas diferenças, pois os níveis basais de SA, ABA e JA não foram alterados nas plantas transgênicas (Kariola *et al.*,2006).

Um antagonismo também foi verificado entre a sinalização por ABA e JA. Anderson e colaboradores (2004) mostraram que ABA exógeno regulava negativamente a expressão de genes de defesa dependentes de JA ou etileno. Este fato pode ser explicado pela melhora nas defesas dependentes de SA, pois é bem sabido o antagonismo mútuo entre as respostas de defesa por SA e JA e etileno (Li *et al.*, 2006). Este antagonismo foi também mostrado e verificado pela regulação negativa do gene marcador dependente de JA e etileno *PDF1-2* durante a resposta aumentada de SAR em plantas de *Arabidopsis* superexpressando ERD 15 (Kariola *et al.*,2006).

A proteína de soja identificada neste trabalho, GmERD 15, foi isolada como um provável fator de transcrição, uma função que ainda não foi atribuída a proteínas desta família na literatura. No intuito de verificar a relação e a similaridade desta proteína encontrada na nossa triagem em soja com ERD 15 de *Arabidopsis*, bem como com proteínas homólogas de outros organismos relevantes, foi realizado um alinhamento de suas seqüências de aminoácidos (Figura 5), bem como um agrupamento hierárquico das mesmas (Figura 6).

```

3   gatggtaataattcaaaacctgtcacctggttggacggaccaaactgCGTATAACGCG 62
63   tttggaatcactacagggatgtttaaactactacaatggatgatgtatataactatcta 122
123  ttcgatgatgaagataccccaccaaaccacaaaaaaagagggtgggtcgatcacaagtttg 182
    M E
183  tacaataaagcaggcttgTCGACccacgcgtccgctccttatcctgtttctttcaatggaa 242
    V I S A S S L N P N A P M F V P L A Y R
243  gtcatttctgcttctagcttgaatcccaacgctccgatgttcgtgccactcgctatcgg 302
    T V E D F S D Q W W N L V H S S P W F R
303  acgggtggaggatttctccgaccagtgggtggaacctcgttcactcctccccctgggtccgc 362
    D Y W L R E C F Q D P Q F Q N D D A F D
363  gactactggctccgagtgcttccaagatccccagttccaaaacgacgacgctttcgac 422
    F D F D L D L Q D E D E K E R K E G K E
423  ttcgactttgacctagatctccaagatgaagatgaaaaggaaacgaaaggaagggagag 482
    V V S L G V L K W R S C G G G W A Q A P
483  gtggtgctggtgggggtgctgaaatggcgaagctgtggaggaggatgggcccaggcgccg 542
    R Y V E K A P K F V K P K V S P R A I H
543  aggtatgtggaaaaggcccccaagtttgtgaagccaaggtgagcccacgggctattcac 602
    Q P R *
603  cagcccaggTACgcaaccggcccattccccaccagctatagctgtgtacataagcgc 662
663  aaatgacttcagagctttctttctttacattttccagattttaattttcgtgttgacttg 722
723  ttgctctgatattttccataaagataaagtcagtttctttgttaatgataattgcttggc 782
783  ttgtgtccgtgttacaaaaaaaaaaaaaaaaaaggggcggccgc

```

Figura 4 - Sequência de aminoácidos da proteína GmERD15: o cDNA clonado no vetor pEXP AD 502 foi sequenciado e as sequências de DNA e de aminoácidos deduzida estão representadas na figura. O provável códon de iniciação do gene encontra-se marcado em azul, o de terminação em vermelho, e os sítios de restrição utilizados para clonagem estão destacados em cinza, sendo utilizados os sítios de restrição das enzimas Sall (extremidade 5') e NotI (extremidade 3') para a construção da biblioteca.

Podemos visualizar no agrupamento hierárquico e no alinhamento das sequências, que a proteína identificada possui seu gene duplicado no genoma de soja (Figura 5 e 6), um fenômeno caracterizado como paleopoliploidia, já relatado na literatura para outros genes, como os genes *NAC* e *NRP* de soja (Pinheiro *et al.*, 2009). Entre as proteínas similares analisadas, podemos verificar que existem três grupos distintos de proteínas relacionadas a ERD 15 de *Arabidopsis* (Figura 6), sendo que a proteína encontrada em soja constitui um grupo à parte podendo ter funções distintas da ERD 15 de *Arabidopsis* já caracterizada. O alinhamento das seqüências de aminoácidos revelou a existência de um domínio altamente conservado na região amino terminal, que pode ser também verificado em todas as seqüências analisadas (Figura 5). Este domínio é reportado na literatura ser um domínio de interação com proteínas que se ligam à cauda poli(A) de mRNAs, e apresenta-se altamente conservado nesta família de proteínas (Wang e Grumet, 2004). Estes dados apontam uma possível similaridade de função (interação com proteínas que ligam a cauda poli A de mRNA) entre a proteína encontrada na triagem e a sua proteína homóloga de *Arabidopsis*, dado a grande similaridade entre suas seqüências .

Posteriormente analisando a seqüência protéica de GmERD 15 esta foi submetida à análise *in silico* de possíveis domínios conhecidos de fatores de transcrição, utilizando o programa BLOCKS (<http://blocks.fhcrc.org>) sendo o resultado mostrado na Figura 5. Uma seqüência de 13 aminoácidos na posição 71 a 83 da seqüência de aminoácidos, DEDEKERKEGKEV, foi identificada como um provável domínio de ativação transcricional, devido ao alto valor de score (1064) como um domínio de ligação a DNA fita simples (ssDNA-binding transcriptional regulator), que exibe ativação transcricional (Desveaux *et al.*, 2000), indicando assim uma possível atuação como fator transcricional da proteína encontrada. A mesma análise foi realizada sobre a seqüência de ERD 15 de *Arabidopsis*, não sendo porém, encontrado nenhum domínio de transativação conhecido.

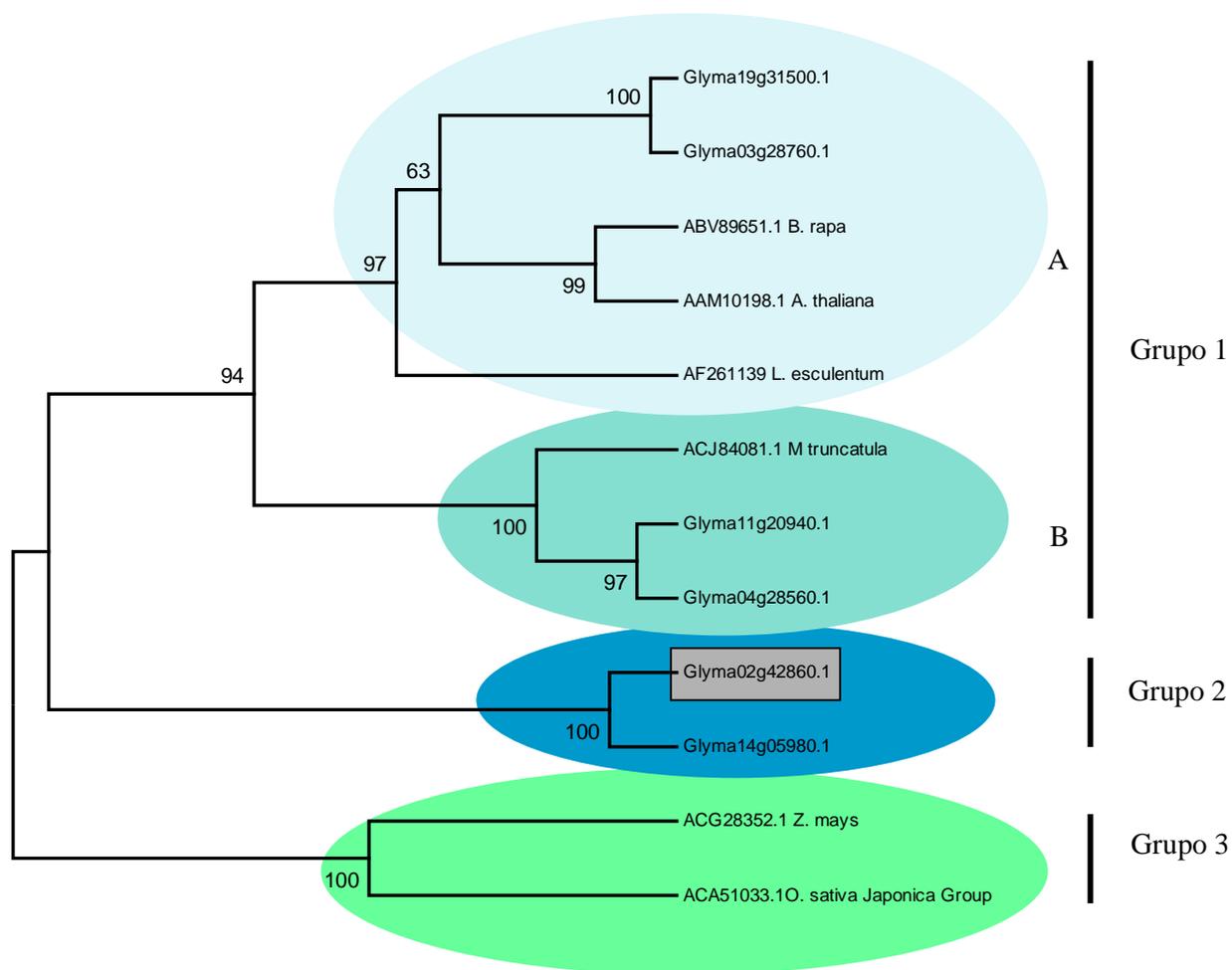


Figura 6 – Agrupamento hierárquico de proteínas ERD15 de soja e de outros organismos vegetais: Agrupamento hierárquico de GmERD15 com outras proteínas ERD15 de soja e de outros organismos de diferentes espécies. Grupos de maior similaridade no agrupamento são mostrados em balões coloridos, sendo que o grupo 1 pode ser subdividido em 1A e 1B. O gene GmERD15 descrito neste trabalho está demarcado por retângulo cinza. O alinhamento múltiplo foi realizado pelo programa ClustalW e o agrupamento foi construído utilizando-se o programa MEGA3, utilizando o método UPGMA. Os números nos nós da árvore representam valores de *bootstrap*. Os números de acesso das sequências estão mostrados na árvore.

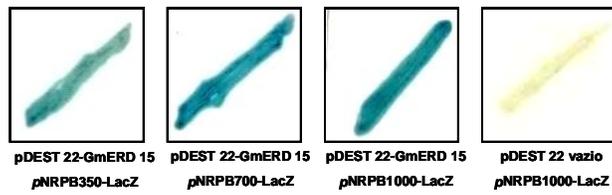
4 - Deleções do promotor de *GmNRP-B* afetam a interação de GmERD15

A fim de delimitar regiões do promotor de GmNRP-B relevantes para a ligação de GmERD15, regiões truncadas do promotor foram amplificadas e inseridas no genoma da estirpe W303 controlando os genes repórteres HIS3 e LACZ.

Visando verificar se GmERD15 de fato atuava como fator transcricional, primeiramente a região codificadora do gene foi clonada em um vetor de expressão de leveduras, pDEST22, que possibilita uma fusão da porção 5' do cDNA ao domínio de ativação transcricional do fator de transcrição de leveduras GAL4 (GAL4-AD), pDEST22 (Anexo 1) (Invitrogen). Buscando avaliar se o padrão de expressão dos genes repórteres se mantinha semelhante ao verificado com o plasmídeo recuperado da biblioteca, além de verificar a influência de deleções na região promotora de *GmNRP-B* sobre esta ativação, as construções com a região codificadora de *GmERD15* foram então utilizadas para transformar leveduras da linhagem W303 pré-transformadas com as regiões promotoras de *GmNRP-B* de 1000, 700 e 350 pares de bases de extensão, controlando os genes repórteres *LacZ* e *HIS3*. A avaliação da ativação dos genes repórteres está mostrada na Figura 6. Semelhante como foi mostrado no experimento utilizando o plasmídeo recuperado da biblioteca de cDNA de soja (Figura 3), as leveduras transformantes contendo os fragmentos de 1000 e 700 pares de bases (W303/pDEST22-GmERD15/pNRPB1000-*LacZ* e W303/pDEST22-GmERD15/pNRPB700-*LacZ*, respectivamente) apresentaram alta expressão do gene *LacZ*, sendo que podemos visualizar uma menor expressão nos transformantes contendo o fragmento de 350 pares de bases da região promotora (W303/pDEST22-GmERD15/pNRPB350-*LacZ*). Nestes experimentos o controle utilizado foi uma levedura transformante contendo o vetor de clonagem vazio, pDEST22 (Figura 7A). Os valores de atividade dos transformantes contendo os fragmentos maiores também se apresentaram elevados ($0,7074 \pm 0,08$) para o clone contendo o fragmento de 1000 pares de bases e ($0,5864 \pm 0,217$) para o clone contendo o fragmento de 700 pares de bases (Figura 7B). Estes dados indicam a possibilidade de não

haver um número relevante de sítios para a interação de GmERD15 na região deletada entre 1000 e 700 pares de bases do promotor, porém devido a drástica queda de atividade de β -galactosidase verificada para o clone contendo a deleção do promotor de 350 pares de bases ($0,1171 \pm 0,03$), pode-se inferir que esta diferença tenha sido causada pela perda de importantes sítios de interação de GmERD 15, e que provavelmente a maior parte destes sítios no promotor de *GmNRP-B* encontram-se na região entre 350 e 700 pares de bases. Estes dados fortaleceram ainda mais a idéia de que GmERD15 poderia desempenhar um papel importante no controle da expressão de GmNRP-B.

A



B

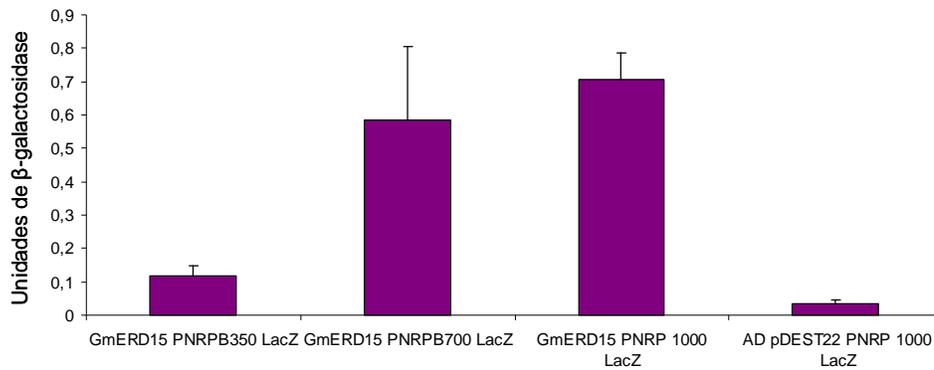


Figura 7 – Análise do efeito de deleções do promotor de *GmNRP-B* na interação com GmERD 15: A) Atividade de β-galactosidase em membranas de nylon dos transformantes W303/pDEST22-GmERD15/pNRPB1000-LacZ e W303/pDEST22-GmERD15/pNRPB700-LacZ, W303/pDEST22-GmERD15/pNRPB350-LacZ e W303/pDEST22 vazio/pNRPB1000-LacZ; B) Atividade de β-galactosidase em meio líquido dos mesmos clones descritos anteriormente. A atividade da enzima β-galactosidase foi expressa em unidades de β-galactosidase, em $\text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

5 - GmERD 15 possui atividade de transativação

Ainda com a finalidade de determinar se GmERD15 exibe atividade de transativação, o cDNA completo de GmERD15 foi fusionado ao domínio de ligação ao DNA de GAL4 (GAL4-BD) no vetor pDEST32 (Invitrogen) (Anexo 1) e os plasmídeos resultantes foram transformados em leveduras da estirpe AH109, que possui os genes repórteres *LacZ* e *HIS3* sob controle do promotor GAL 1. O resultado deste ensaio pode ser visualizado na Figura 8. Utilizando-se um transformante contendo uma proteína de conhecida atividade de transativação, NIG de *Arabidopsis* (Carvalho *et al.*, 2008), como controle positivo, e um contendo o vetor pDEST32 vazio como controle negativo, pôde-se demonstrar a atividade de transativação de GmERD15. Esta atividade, evidenciada pela forte ativação do gene *LacZ*, durante o ensaio utilizando-se membrana de nylon, e pela medida da atividade de β -galactosidase ($0,817 \pm 0,013$) do clone AH109/pDEST32-GmERD 15, indica a possibilidade de GmERD15 desempenhar, sob determinadas condições fisiológicas, o papel de transfator do gene *GmNRP-B*.

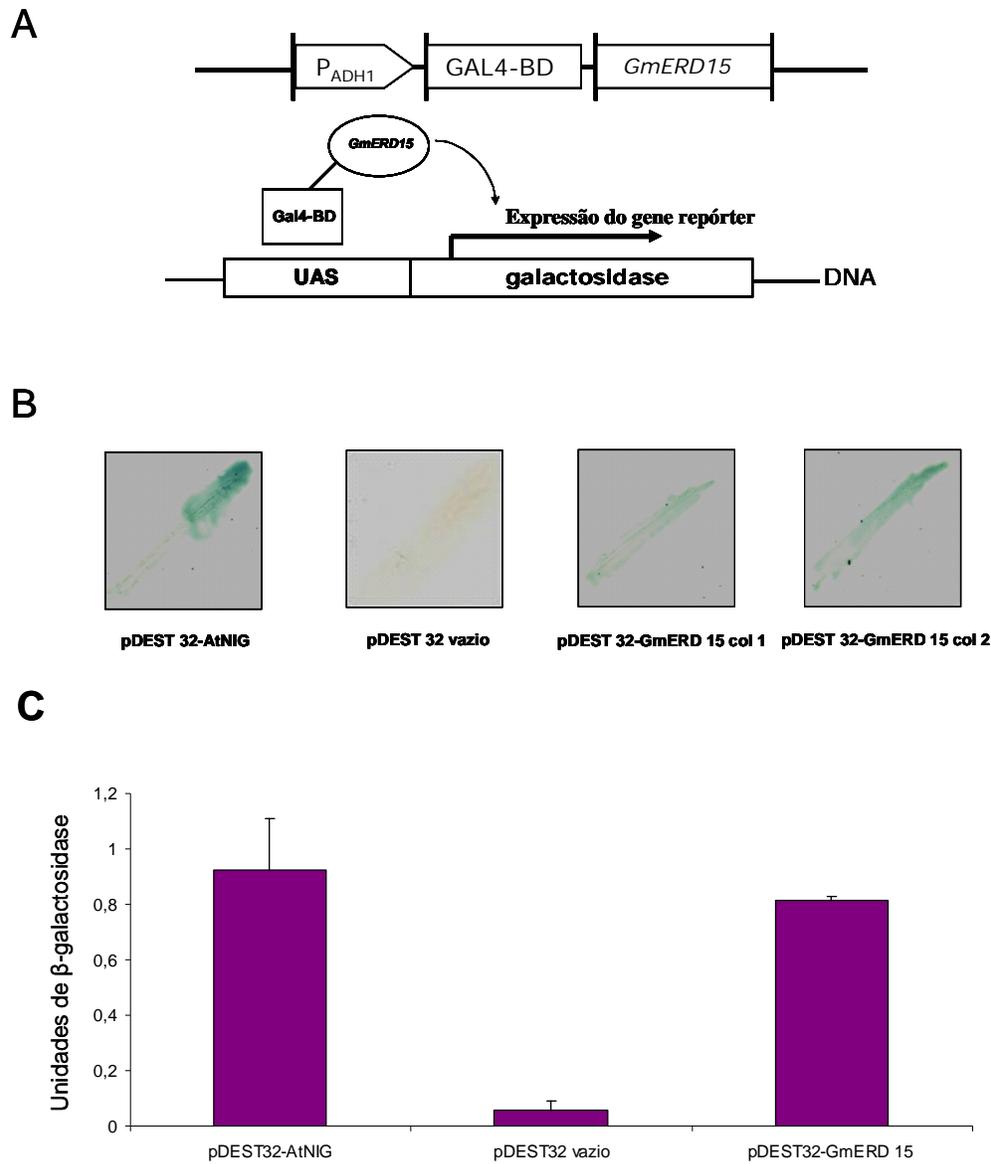


Figura 8 – Atividade de transativação da proteína GmERD 15: A) Esquema da construção utilizada para expressão de GmERD 15 fusionada com o domínio de ligação ao DNA do transfator GAL4 (GAL4-BD), no vetor pDEST32 (Invitrogen). B) Duas colônias do mutante AH109/pDEST32-GmERD 15 foram tomadas separadamente e mostraram ativar a expressão do gene *LacZ* em comparação com AH109/pDEST32-AtNIG, utilizado como controle positivo, e AH109/pDEST32 vazio, utilizado como controle negativo. C) Medida da atividade da enzima β -galactosidase dos mutantes AH109/pDEST32-AtNIG, AH109/pDEST32 vazio e AH109/pDEST32-GmERD 15 colônia 1, em unidades de β -galactosidase, em $\text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

6 - A proteína GmERD15 possui localização nuclear e citosólica

A análise de seqüência de aminoácidos de GmERD 15 não indicou a presença de um domínio conhecido para localização nuclear, e a proteína ERD 15 de *Arabidopsis* descrita anteriormente também não possui sua localização subcelular descrita (Kariola *et al.*, 2006), portanto não havia estudos prévios sobre a possível localização de homólogas desta proteína. Para determinar experimentalmente a localização subcelular dessa proteína, o respectivo gene foi transientemente expresso como uma proteína quimérica fusionada a YFP no N-terminal e a localização subcelular determinada por microscopia confocal em folhas de tabaco (Figura 9). A proteína YFP-GmERD 15 foi detectada no núcleo e no citosol das células. A proteína YFP possui sua localização predominante no citosol, como já foi relatado em estudos anteriores que mostravam a expressão desta proteína isolada em células vegetais (Carvalho *et al.*, 2008). Portanto, a presença de fluorescência no núcleo indica fortemente que ERD 15 se localiza nesta organela. Entretanto, devido à alta eficiência de transfecção de células epidermais de folhas de tabaco, é possível que a alta produção da proteína tenha saturado a maquinaria de importação nuclear. Se este for o caso, o excesso molar de GmERD15 permanece no citoplasma como um artefato da técnica e não como uma possível localização da proteína na planta. Independente dessas considerações, a presença de fluorescência no núcleo indica que GmERD15 fusionada a YFP é localizada no núcleo. A ausência de um domínio conhecido para localização nuclear na seqüência de aminoácidos de GmERD 15 não invalida a possibilidade de que ERD15 possa interagir com alguma proteína para sua importação nuclear. A localização de GmERD 15 no núcleo é mais uma indicação de sua possível atuação como fator transcricional.

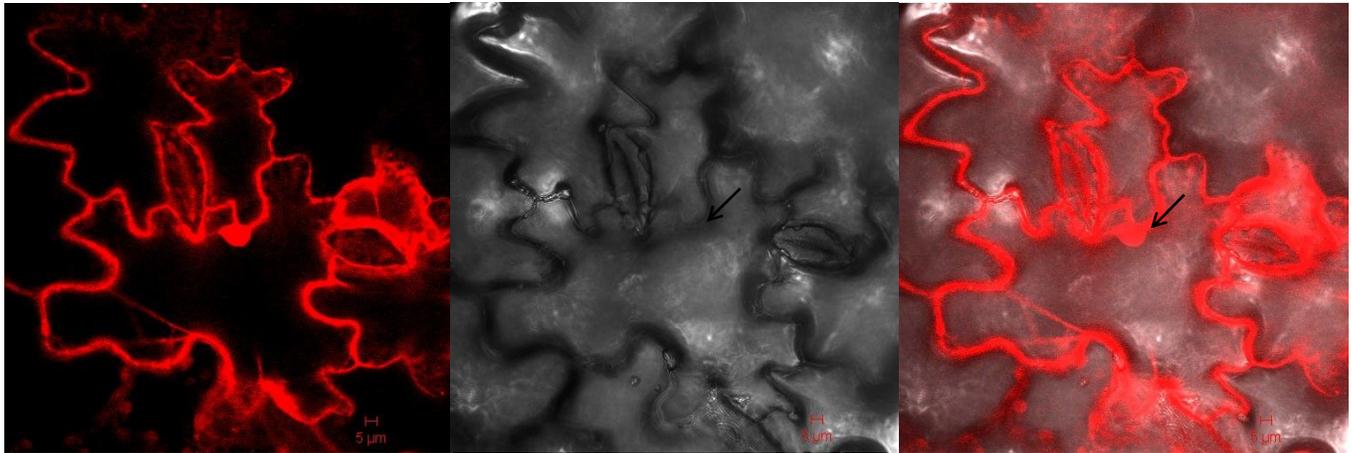


Figura 9 - Localização nuclear e citosólica de GmERD 15: GmERD 15 fusionada a YFP (*yellow fluorescent protein*) foi expressa em folhas de tabaco, por meio de agroinoculação. A expressão da proteína foi monitorada pela fluorescência emitida por YFP, por meio de microscopia confocal, 3 dias após a agroinoculação com os vetores binários. As setas pretas indicam o núcleo das células, visualizados por contraste de fase. Barra = 5 µm.

7 - A expressão transiente de GmERD 15 em protoplastos induz a expressão de GmNRP-B

Com a finalidade de verificar a influência de GmERD15 na expressão de *GmNRP-B*, e conseqüentemente na regulação da via integrativa de resposta aos estresses no RE e osmótico (Irsigler *et al.*, 2007), o cDNA completo de *GmERD15* foi transferido para um plasmídeo de expressão em plantas, onde o gene *GmERD15* foi expresso transientemente sob o controle do promotor 35S em protoplastos de soja (Figura 10). A fim de avaliar o efeito da superexpressão de *GmERD15* na regulação transcricional de *GmNRP-B*, os níveis de expressão deste gene foi avaliado por qRT-PCR (Figura 10). A expressão transiente de *GmERD15* em protoplastos de soja levou a um aumento na expressão de *GmNRP-B*, em relação à expressão em células controle, transformadas com o vetor pK7WG2 vazio (Anexo 1) (Figura 11). Foi avaliado também neste ensaio a transcrição de *GmBiPD*, como controle de especificidade de *GmERD15*, sendo que a expressão transiente de *GmERD15* não alterou a expressão de *GmBiPD*.

O aumento da expressão de *GmNRP-B* devido a superexpressão de *GmERD15* é um indício *in vivo* do papel de *GmERD15* no controle transcricional de *GmNRP-B*, enfatizando sua possível participação como fator de transcrição que controla a expressão desse gene.

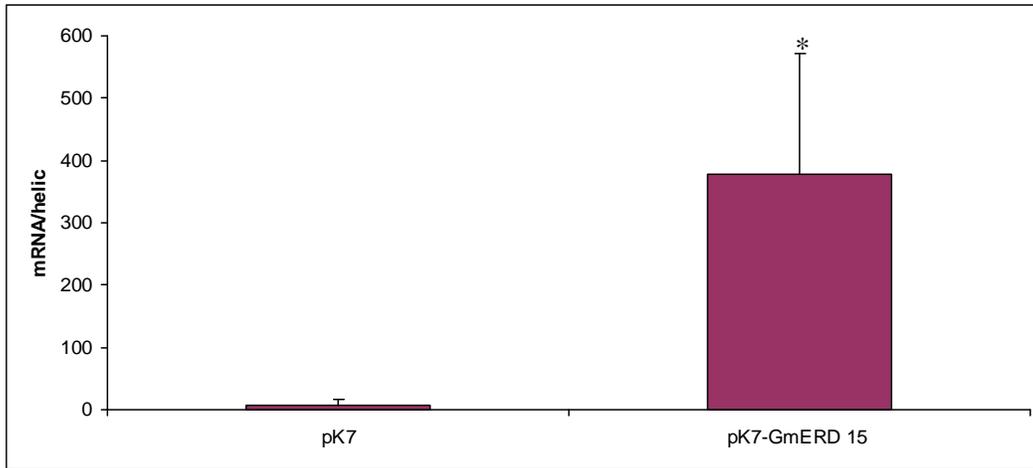


Figura 10 - Expressão transiente de *GmERD 15* em protoplastos: Após expressão transiente por 36 horas, foi verificada por PCR em tempo real a expressão de *GmERD 15* em protoplastos eletroporados com o vetor vazio pK7FWG2 (pK7) e com o cassete de expressão pK7-GmERD 15. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a helicase (as barras finas indicam o Desvio Padrão de um n = 5 réplicas biológicas). A probabilidade associada ao teste t com variância igual de Student, com uma distribuição bicaudal (0,0000527), sendo os tratamentos significativamente diferentes, adotando nível de significância de 5%. O asterisco indica que o tratamento (pK7-GmERD 15) é significativamente diferente do tratamento com pK7.

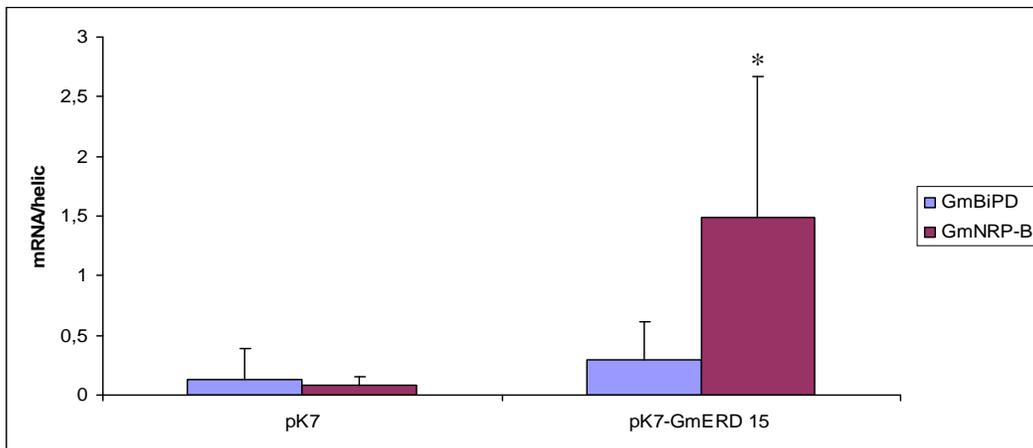


Figura 11 – Ativação da expressão de *GmNRP-B* pela superexpressão de *GmERD 15*: A expressão do gene *GmNRP-B* foi determinada em protoplastos transformados com o vetor vazio pK7FWG2 (pK7) ou com o cassete de expressão de *GmERD 15* (pK7-GmERD 15), por qRT-PCR em tempo real. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a helicase as barras finas indicam o Desvio Padrão de um n = 5 réplicas biológicas). A probabilidade associada ao teste t com variância igual de Student, com uma distribuição bicaudal (0,00563), sendo os tratamentos significativamente diferentes, adotando nível de significância de 5%. O asterisco indica que o tratamento (pK7-GmERD 15) é significativamente diferente do tratamento com pK7.

8 - Padrão de expressão de GmERD 15 e GmNRP-B em células de soja sob diferentes tratamentos abióticos

Neste trabalho, também avaliamos a cinética de expressão de *GmERD 15* e *GmNRP-B*, sob diferentes tratamentos com hormônios relacionados a diferentes vias de transdução de sinais em plantas, relatadas na literatura (Shinozaki e Yamagushi, 2007). Em relação ao tratamento controle, a expressão de *GmERD 15* só foi aumentada no tratamento inicial de 2 horas com ácido salicílico (SA), enquanto que em todos os outros tratamentos sua expressão foi diminuída (Figura 12 A e B). Em contrapartida, *GmNRP-B* teve sua expressão aumentada em todos os tratamentos, com um valor maior de expressão no tempo inicial do tratamento com ABA, e com valores maiores de expressão nos outros tratamentos (JA e SA) em tempos mais tardios (4 horas) (Figura 12 A e B). Uma análise das diferenças de expressão entre *GmERD 15* e *GmNRP-B* nos diferentes tratamentos pode inferir as seguintes suposições: há uma correlação entre a expressão de *GmNRP-B* e *GmERD 15* no tratamento com SA, enquanto que para os outros tratamentos não houve esta correlação, possivelmente devido a perda do tempo de indução de *GmERD 15*, que pode ser induzido rápida e transientemente. Experimentos colhendo amostras em tempos menores serão realizados para confirmar esta hipótese. Caso estes experimentos não confirmem esta hipótese a expressão de *GmNRP-B* possivelmente pode ser controlada por outros fatores de transcrição nestas condições testadas e que aparentemente exista uma correlação direta da expressão de *GmNRP-B* e *GmERD 15* durante apenas a sinalização por ácido salicílico.

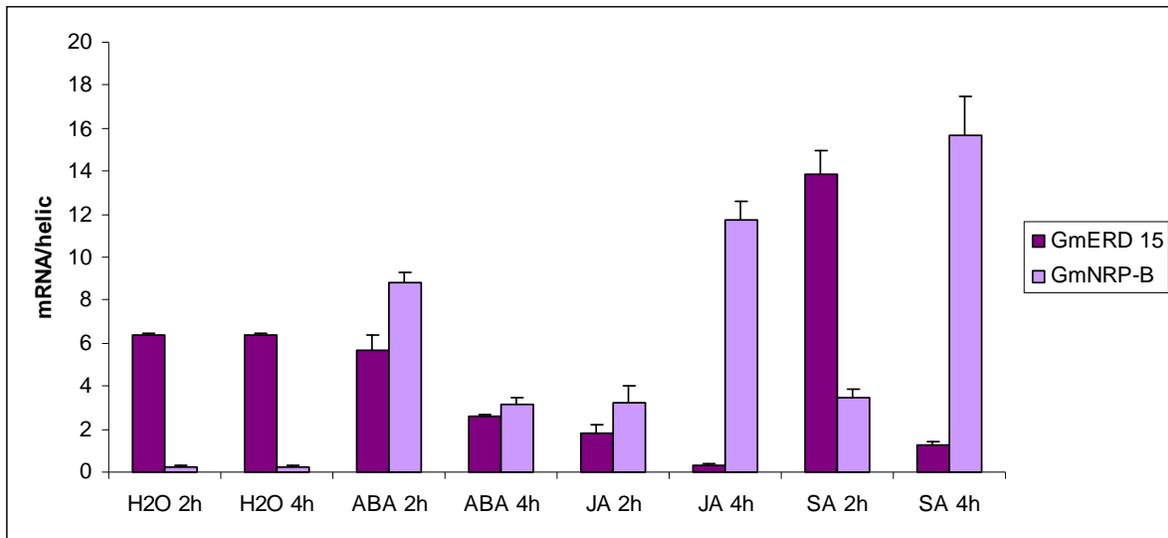


Figura 12 – Expressão de *GmERD 15* e *GmNRP-B* sob diferentes tratamentos: Foi medida a expressão dos genes por RT-PCR em tempo real em células de soja em suspensão tratadas com ABA, JA, e SA, nos tempos indicados na figura. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a helicase. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 3 réplicas biológicas (as barras finas indicam o Desvio Padrão de um n = 3 réplicas manuais).

9 - Padrão de expressão de GmERD 15 e GmNRP-B em plantas de soja sob estresse biótico

Para avaliar a participação de GmERD 15 em condições de estresse biótico, causada pela infecção sistêmica por um fitopatógeno, bem como comparar a expressão de *GmNRP-B*, a expressão destes dois genes foi monitorada em plantas de soja infectadas pela bactéria fitopatogênica *Pseudomonas syringae pv tomato* (Figura 13 A e B). Em relação ao tratamento controle (plantas infiltradas com água), ambos os genes apresentaram expressões aumentadas durante os tempos de tratamento avaliados, ocorrendo um nível maior de expressão para o gene *GmERD 15*, apresentando este um nível elevado de expressão que se mantém até 3 horas de tratamento (Figura 13 A e B). Estes resultados apontam uma possível participação de *GmERD 15* durante a resposta ao patógeno, e em tempos menores de infecção, de *GmNRP-B*, sendo este regulado negativamente durante o curso da infecção. Esta relação da expressão aumentada de *GmERD 15* com o tratamento biológico com o fitopatógeno, que causou uma resposta hipersensível (devido a interação incompatível com *Pseudomonas syringae pv tomato*) pode ser comparada com a verificada na literatura para ERD 15 de *Arabidopsis* (Kariola *et al.*, 2006), que identificou que a infecção por patógeno causava um aumento na expressão desta proteína, sendo que possivelmente os padrões de expressão desta proteína em soja e de sua homóloga em *Arabidopsis* em condições de estresse biótico sejam semelhantes. Sabe-se também que as proteínas NRPs também se encontram envolvidas na resposta hipersensível em plantas (Ludwig *et al.*, 2001), e verificamos que a expressão de *GmNRP-B* é aumentada durante a infecção pelo fitopatógeno, que pela interação incompatível causou esta resposta na planta. A correlação direta entre as expressões de *GmERD 15* e *GmNRP-B* denota a possível conexão entre estas proteínas durante esta via de resposta, com os consecutivos aumentos de suas expressões. Os níveis de *GmNRP-B* abaixam e os de *GmERD 15* permanecem altos em 3 horas de tratamento provavelmente por *GmNRP-B* sofrer uma regulação negativa, o que é de se esperar já que é uma proteína envolvida com processo de morte celular.

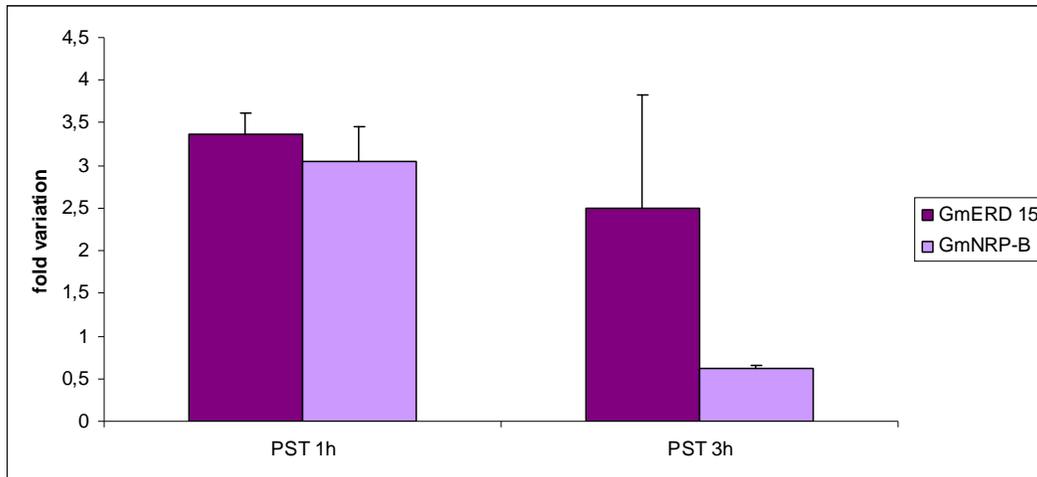


Figura 13 - Expressão de *GmERD 15* e *GmNRP-B* durante infecção sistêmica com *Pseudomonas syringae pv tomato*: Foi medida a expressão dos genes por RT-PCR em tempo real em plantas de soja submetidas à infecção com *Pseudomonas syringae pv tomato*, nos tempos indicados na figura. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a helicase, e normalizando com o tratamento controle (H₂O). Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 3 réplicas biológicas (as barras finas indicam o Desvio Padrão de um n = 3 réplicas manuais).

VI - Conclusões

A primeira parte deste trabalho consistiu na identificação de um fator de transcrição que atuasse na regulação da expressão de *GmNRP-B*, um gene co-regulado pelas respostas aos estresses no retículo e osmótico. Este processo levou à identificação de um clone positivo, que ativava fortemente a expressão dos genes repórteres *LacZ* e *HIS3* em leveduras. O seqüenciamento do clone mostrou que este possuía um cDNA que codificava uma proteína homóloga a ERD15 de *Arabidopsis* que está relacionada à regulação negativa da sinalização por ABA.

A segunda parte deste trabalho consistiu na caracterização da interação entre GmERD15 com a região promotora de *GmNRP-B*, para a confirmação de seu papel como fator de transcrição que controla a expressão do gene *GmNRP-B*. Durante esta análise foi constatado que GmERD15 ativa fortemente a expressão do gene repórter *LacZ* sob controle da região promotora de *GmNRP-B* mesmo quando esta encontra-se deletada até 700 pares de bases, mas que esta ativação decai fortemente quando ocorre uma deleção até 350 pares de bases. GmERD15 apresentou atividade de transativação visível pela expressão do gene repórter *LacZ*, em leveduras transformadas com a construção BD-GmERD15. Estes resultados no sistema de leveduras nos impeliu na pesquisa da atuação de GmERD 15 na modulação da expressão de *GmNRP-B in planta*. Primeiramente verificamos se GmERD15 possuía localização nuclear, o que foi confirmado. Posteriormente verificamos se a expressão transiente de GmERD15 em protoplastos de soja apresentava influência na expressão de *GmNRP-B*, e foi verificado que esta causava um aumento na expressão de *GmNRP-B*, o que fortaleceu ainda mais a hipótese de que GmERD15 atuava no controle da expressão de *GmNRP-B*. Acessando o padrão de expressão de *GmERD15* em relação a expressão de *GmNRP-B*, durante diferentes tratamentos abióticos e bióticos, verificamos que este primeiro possui expressão aumentada durante tratamentos com SA e *Pseudomonas pv tomato*, uma bactéria fitopatogênica, indicando possivelmente a atuação desta proteína durante processos de resposta a estresses bióticos, como a resposta hipersensível, a qual proteínas ricas em asparagina, como GmNRP-B, estão envolvidas. Este raciocínio é coerente com o padrão de

aumento da expressão de *GmNRP-B* em protoplastos de soja expressando transientemente *GmERD15*. Estes resultados apontam consistentemente o papel de *GmERD15* no controle transcricional do gene *GmNRP-B*, indicando a existência de uma nova família de transfatores em plantas de soja, relacionada ao controle de genes induzidos durante a via integrativa, sendo que experimentos futuros de investigação *in vitro* da ligação de *GmERD15* ao promotor de *GmNRP-B*, como o ensaio de EMSA, se fazem necessários para a confirmação completa da função desta proteína e mapeamento dos cis-elementos envolvidos nesta interação. Além disto, plantas de tabaco transgênicas contendo o gene GUS sob controle do promotor de *GmNRPB* estão sendo obtidas e as análises *in vivo* deste promotor poderá fornecer dados mais robustos sobre esta nova família de fatores de transcrição e sobre a ligação entre a resposta a estresse e a morte celular programada em plantas.

VII - Referências bibliográficas

- Albrecht, M, Lengauer, T 2004.** Survey on the PABC recognition motif PAM2. *Biochemical Biophysical Research Communications* 316: 129–138.
- Alvim FC, Carolino SMB, Cascardo JCM, Nunes CC, Martinez CA, Otoni WC, Fontes EPB. 2001.** Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiology* 126, 1042–1054.
- Amberg, D C. Burke, D J. Strathern, J N 2005.** Assay of β -Galactosidase in Yeast: Assay of Crude Extracts. *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Anderson JV, Li QB, Haskell DW, Guy CL 1994.** Structural organization of the spinach endoplasmic reticulum-luminal 70-kilodalton heat-shock cognate gene and expression of 70- kilodalton heat-shock genes during cold-acclimation. *Plant Physiology*, 104:1359-1370.
- Anderson, JP, Badruzsafari, E, Schenk, PM, Manners, JM, Desmond, OJ, Ehlert, C, Maclean, DJ, Ebert, PR, Kazan, K 2004.** Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 3460–3479.
- Ashraf M, Foolad MR 2007.** Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59, 206–216.
- Carvalho, C.M., 2008.** A novel nucleocytoplasmic traffic GTPase identified as a functional target of the bipartite geminivirus nuclear shuttle protein. *Plant Journal*. 55, 869–880.
- Cascardo, JCM, Buzeli, RAA, Almeida, RS, Otoni, WC, Fontes, EPB 2001.** Differential expression of the soybean BiP gene family. *Plant Science*, 160:273-281.
- Chawla, A Niwa, M 2005.** The unfolded protein response. *Current Biology*, 15, 22, 907.
- Costa, MDL, Reis, PAB, Valente, MAS, Irsigler, AST, Carvalho, CM, Loureiro, ME, Aragão, FJL, Boston, RS, Fietto, LG, Fontes, EPB, 2008.** A new branch of endoplasmic reticulum stress signaling and the osmotic signal converge on plant-specific asparagine-rich proteins to promote cell death. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 29, 20209–20219.
- Delessert, C, Kazan, K, Wilson, IW, Van Der Straeten, D, Manners, J, Dennis, ES, Dolferus, R 2005** The transcription factor ATAF2 represses

the expression of pathogenesis-related genes in Arabidopsis. *Plant Journal*, 43:745-757.

Desveaux, D, Després, C, Joyeux, A, Subramaniam, R, Brisson, N 2000. PBF-2 Is a Novel Single-Stranded DNA Binding Factor Implicated in *PR-10* Gene Activation in Potato. *The Plant Cell*, 12, 1477–1489.

Finer, JJ, Nagasawa, A 1988. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill.) *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 15, 125–136.

Gan, S, Amasino, RM 1997. Making sense of senescence. Molecular genetic regulation and isolated chloroplast. *Plant Physiology*. 113, 313–319.

Gupta AS, Heinen JL, Holaday AS, Burke JJ, Allen RD. 1993. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide-dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 1629–1633.

Irsigler, A. S., Costa, M. D., Zhang, P., Reis, P. A. B., Dewey, R. E., Boston, R. S., and Fontes, E. P. B. 2007. Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER and osmotic-stress pathways *BMC Genomics* 8, 431.

Iwata, Y, Fedoroff, NV, Koizumi N 2008. *Arabidopsis* bZIP60 Is a proteolysis-activated transcription factor involved in the Endoplasmic Reticulum stress response. *The Plant Cell* 20:3107-3121.

Kamauchi, S, Nakatani, H, Nakano, C, and Urade, R 2005. Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana* *Febs. J.* 272, 3461–3476.

Kariola, T, Brader, G, Helenius, E, Li, J, Heino, P, Palva, ET 2006. EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15, a Negative Regulator of Abscisic Acid Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 142, pp. 1559–1573.

Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology* 17, 287–291.

Kiyosue, T, Yamaguchi-Shinozaki, K, Shinozaki K 1994. ERD15, a cDNA for a dehydration-induced gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 106: 1707.

Koizumi, N, Martinez, IM, Kimata, Y, Kohno, K, Sano, H, Chrispeels, MJ, 2001. Molecular characterization of two *Arabidopsis* Ire1 homologs, Endoplasmic Reticulum-Located transmembrane protein kinases. *Plant Physiology*,. 127, 949-962.

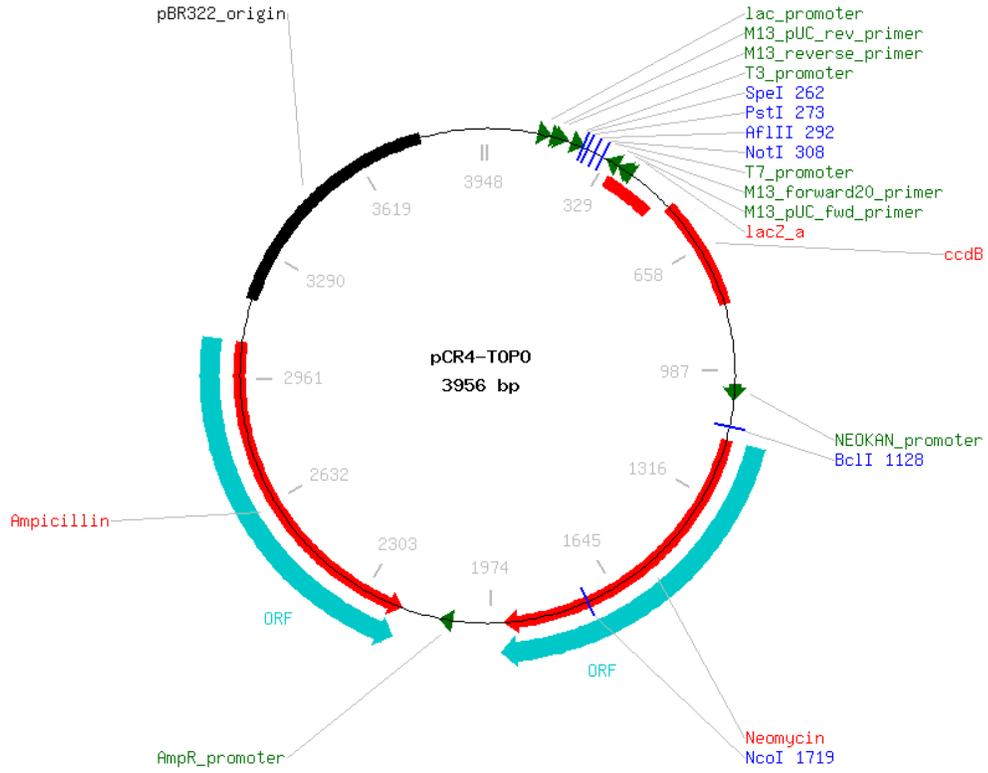
- Kozlov, G, De Crescenzo, G, Lim, NS, Kahvejian, A, Trempe, JF, Elias, D, Ekiel, I, Sonenberg, N, O'Connor-McCourt, M, Gehring, K 2004.** Structural basis of ligand recognition by PABC, a highly specific peptide-binding domain found in poly(A)-binding protein and a HECT ubiquitin ligase. *EMBO J* 23: 272–281.
- Kumar, S, Tamura, K, Nei, M 1994.** MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Computer Applications in Biosciences*. 10, 189-91.
- Leung, J, Giraudat, J 1998.** Abscisic acid signal transduction. *Annual Reviews. Plant Physiology and. Plant Molecular. Biology*. 49:199–222.
- Li, J, Brader, G, Kariola, T, Palva, ET 2006.** WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant Journal* 46: 477–491.
- Lijavetzky D, Carbonero, P, Vicente-Carbajosa, J 2003.** Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the Rice and Arabidopsis Dof gene families. *BMC Evolutionary Biology* 23:3:17.
- Liu Q, Sakuma Y, Abe H, Kasuga M, Miura S, Yamaguchi- Shinozaki K, Shinozaki K. 1998.** Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain, separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *The Plant Cell* 10, 1491–1406.
- Ludwig, A A, Tenhaken, R 2001.** A New Cell Wall Located N-rich Protein is Strongly Induced During the Hypersensitive Response in Glycine Max L. *European Journal of Plant Pathology*. 107, 3.
- Malhotra, JD, Kaufman, RJ 2007.** The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Volume 18, Issue 6, 716-731.
- Okushima, Y, Koizumi, N, Yamaguchi, Y, Kimata, Y, Kohno, K, Sano, H. 2002.** Isolation and characterization of a putative transducer of Endoplasmic Reticulum stress in *Oryza sativa*. *Plant and Cell Physiology*, Vol. 43, 5 532-539.
- Pinheiro, GL, Marques, CS, Costa, MDBL, Reis, PAB, Alves, MS, Carvalho, CM, Fietto, LG, Fontes, EPB 2009.** Complete inventory of soybean NAC transcription factors: Sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response. *Gene*, 444, 10–23.
- Rodrigues SM, Andrade MO, Gomes APS, DaMatta FM, Baracat- Pereira MC, Fontes EPB 2006.** Arabidopsis and tobacco plants ectopically expressing the soybean antiquitin-like ALDH7 gene display enhanced tolerance to drought, salinity, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 57, 1909–1918.

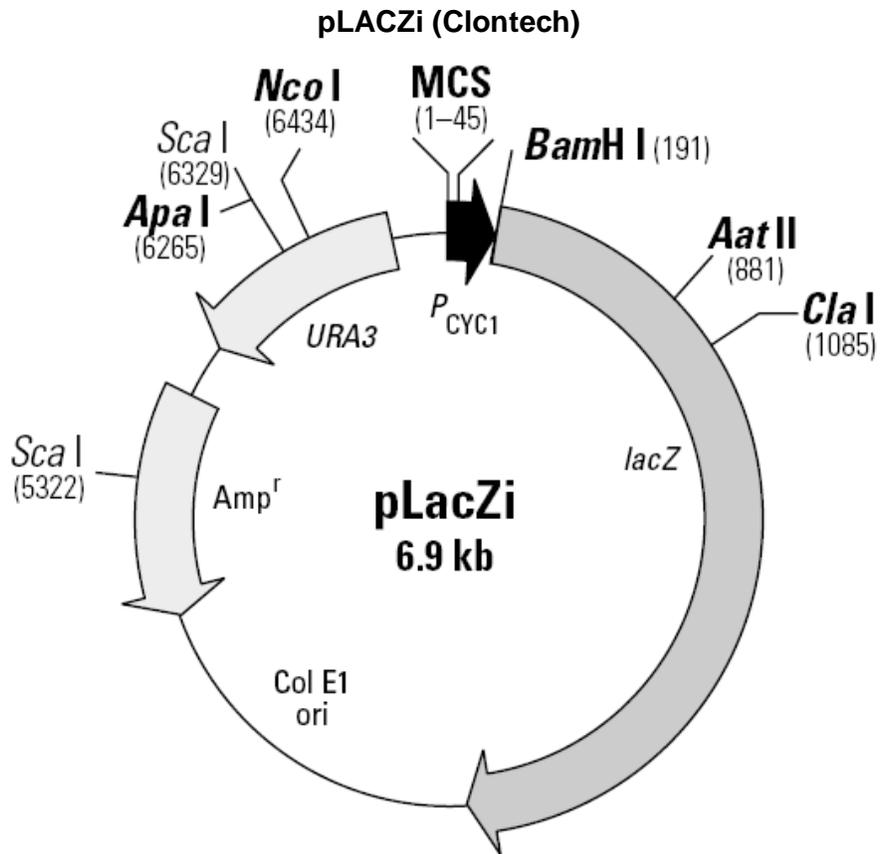
- Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniats, T 1989.** Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. 2003.** Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 410–417.
- Shinozaki, K, Yamaguchi-Shinozaki, K, 2007.** Gene networks involved in drought stress-response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58(2):221-227
- Tajima, H, Iwata, Y, Iwano, M, Takayama, S, and Koizumi, N 2008.** Identification of an Arabidopsis transmembrane bZIP transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 374: 242–247.
- Tenhaken R, Doerks T, Bork P 2005.** DCD – a novel plant specific domain in proteins involved in development and programmed cell death. *BMC Bioinformatics*, 6:169.
- Thaler, SJ, Bostock, RM 2004.** Interactions between abscisic-acid-mediated responses and plant resistance to pathogens and insects. *Ecology* 85: 48–58.
- Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K 2006.** Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes unlock the future. *Current Opinion in Biotechnology* 17, 113–122.
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi- Shinozaki K 2000.** Arabidopsis basic leucine zipper transcriptional transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 97, 11632–11637.
- Urade, R 2007.** Cellular response to unfolded proteins in the endoplasmic reticulum of plants. *FEBS Journal*, 274, 5, 1152-1171.
- Urade, R 2009.** The endoplasmic reticulum stress signaling pathways in plants. *BioFactors*, 35, 4, 326-331.
- Wang, X, Grumet, R 2004.** Identification and characterization of proteins that interact with the carboxy terminus of poly(A)-binding protein and inhibit translation in vitro. *Plant Molecular Biology* 54: 85–98.
- Watanabe, N, Lamb, E 2008.** BAX Inhibitor-1 Modulates Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Programmed Cell Death in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 283 3200–3210.

- Wehmeyer N, Vierling E 2000.** The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiology*. 122, 1099–1108.
- Valente, MAS, Faria, JAQA, Ramos, JRLS, Reis, PAB, Pinheiro, GL, Piovesan, ND, Moraes, AT, Menezes, CC, Cano, MAO, Fietto, LG, Loureiro, ME, Aragão, FJL, Fontes, EPB 2009.** The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. *Journal of Experimental Botany* 60:533-546.
- Vitale, A 2009.** Calreticulins are not all the same. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 32, 13151-13152.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K 2005.** Organization of cisacting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science* 10, 88–94.

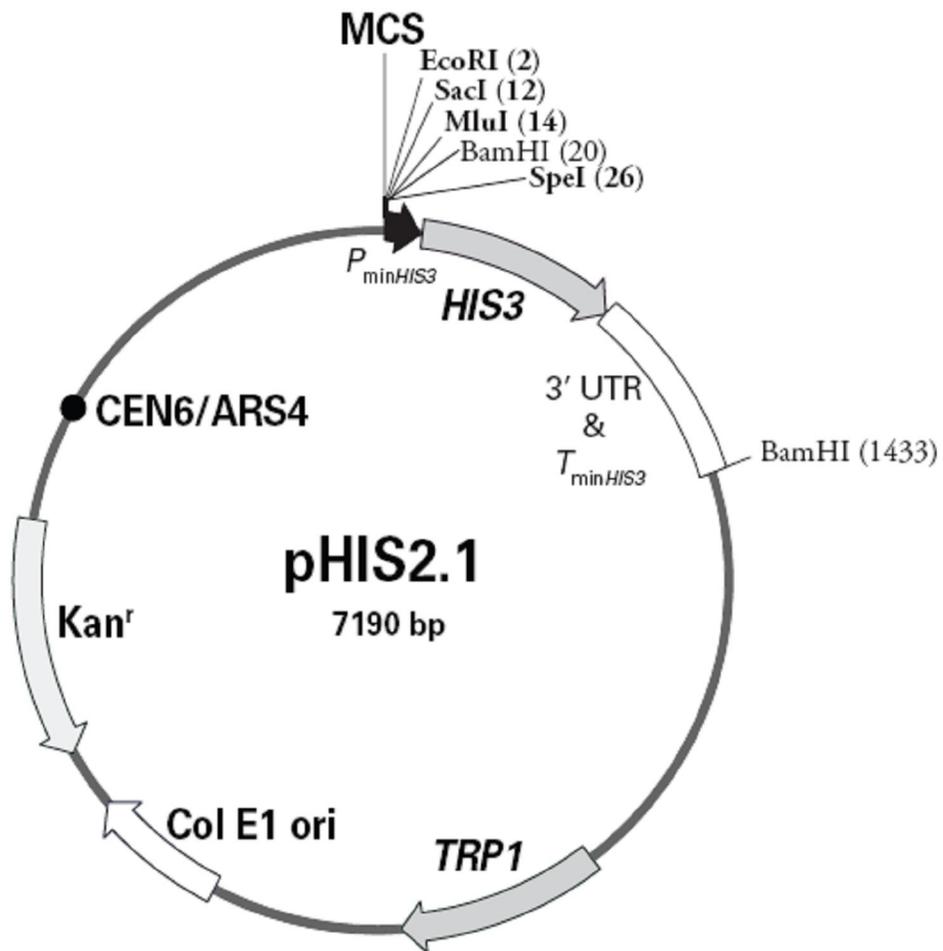
ANEXO 1: Vetores utilizados

TOPO pCR4 (Invitrogen)

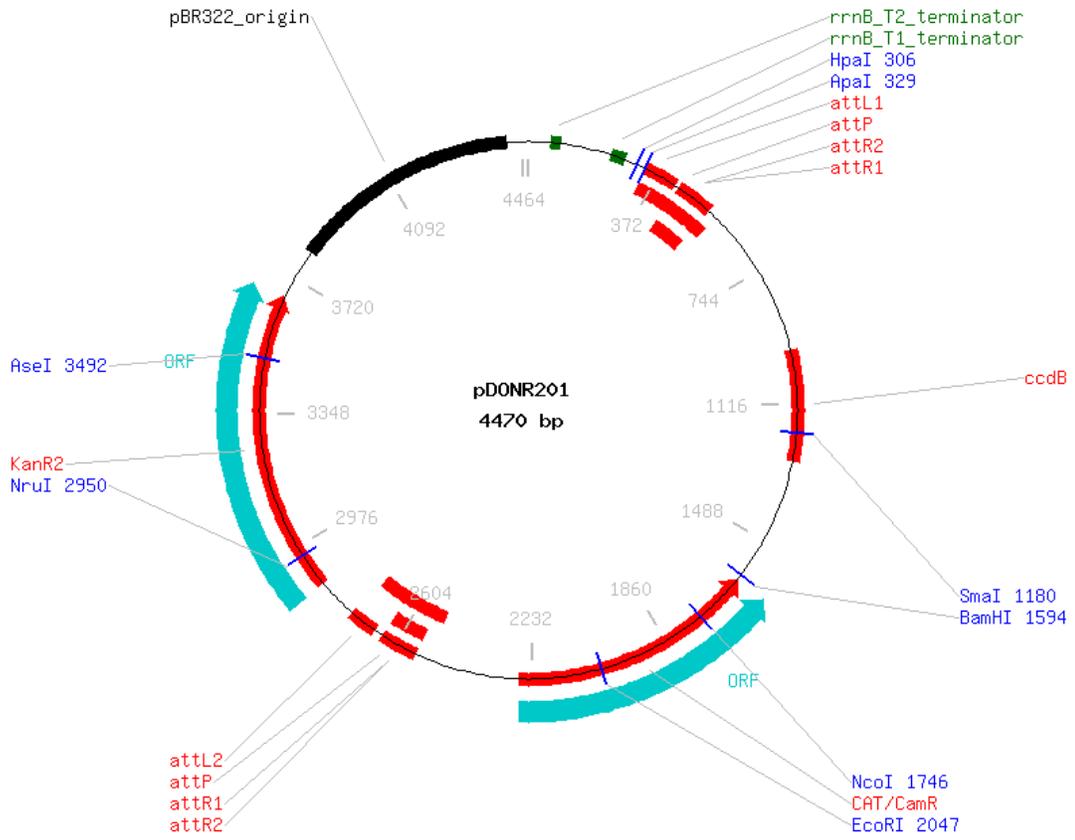


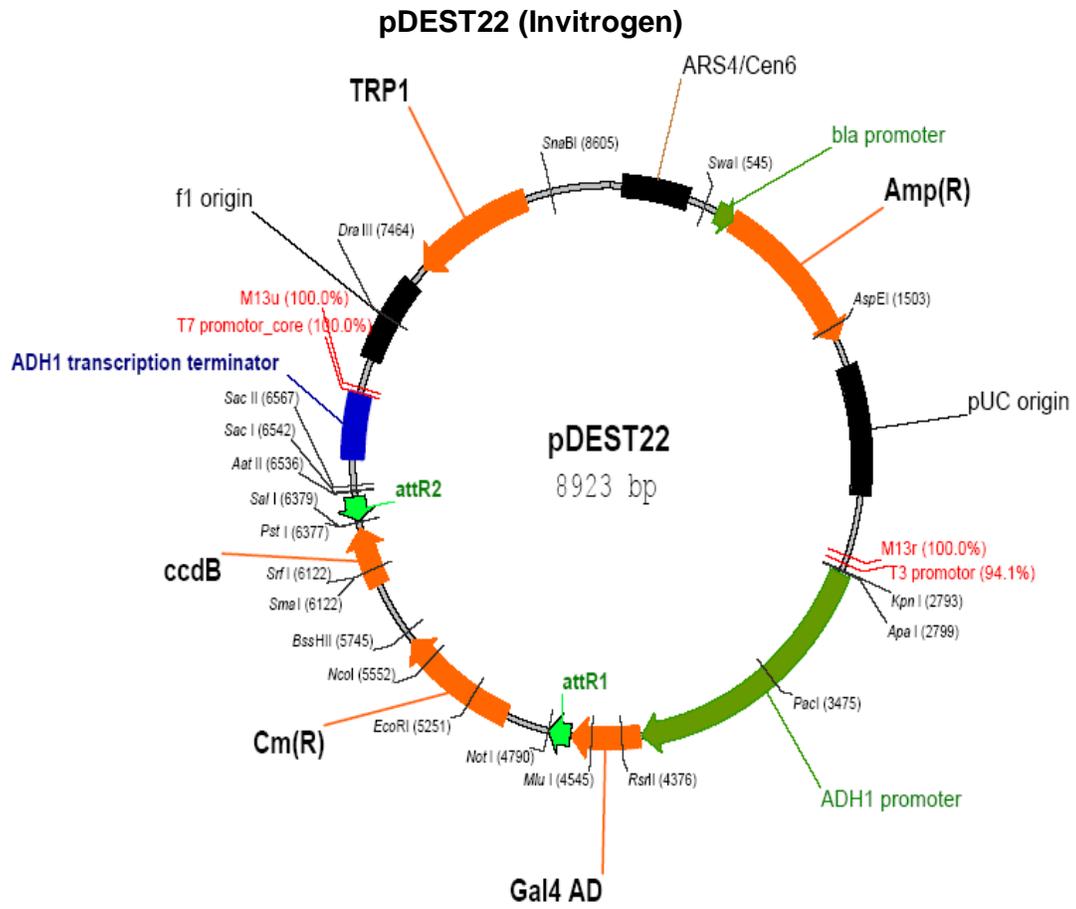


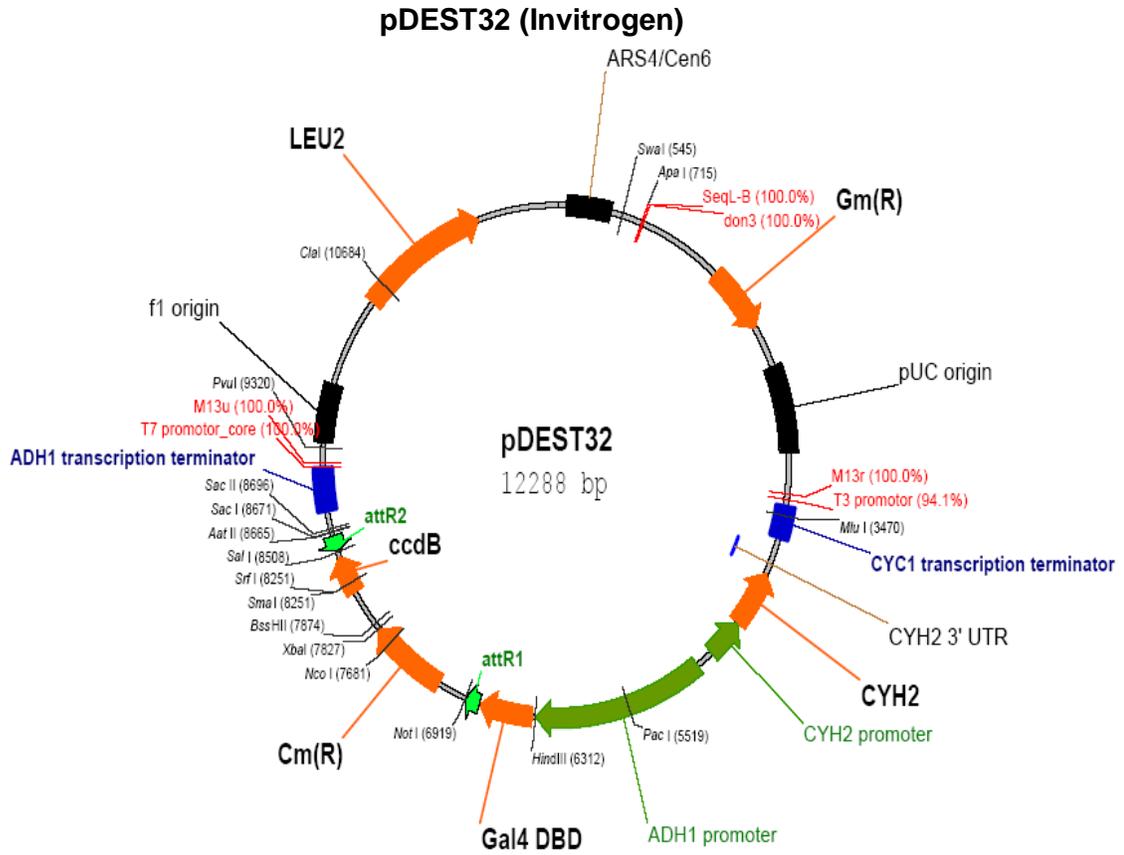
pHIS2.1 (Clontech)



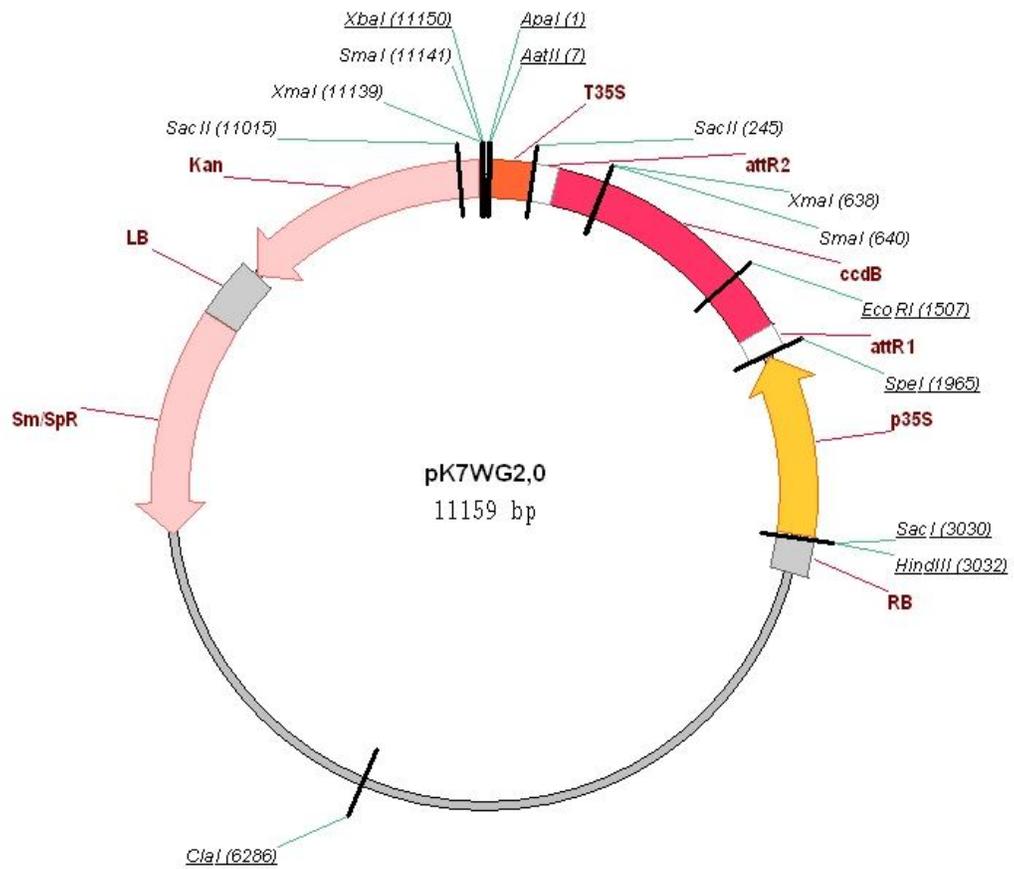
pDONR201 (Invitrogen)



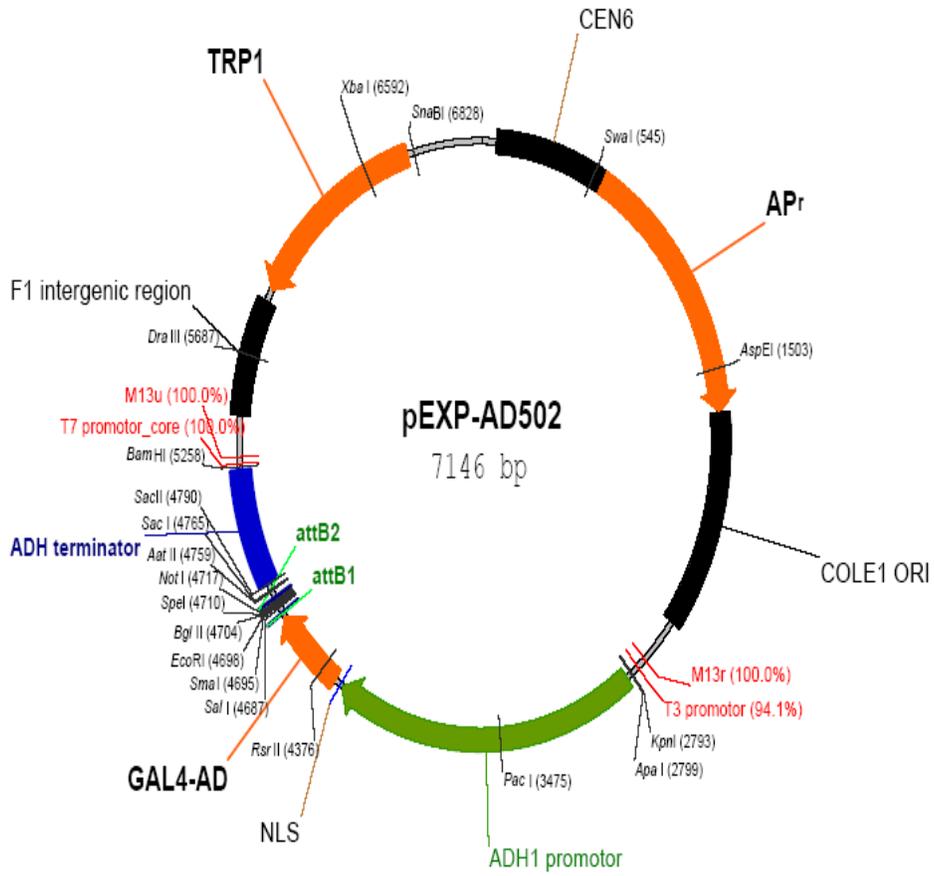




pK7WG2 (Invitrogen)



pEXP-AD502 (Invitrogen)



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)