

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

mestrado

BC/47607

IB/ 81724

INSTITUTO DE BIOLOGIA

UNICAMP

2001

Universidade Estadual de Campinas
 Instituto de Biologia
 Departamento de Genética e Evolução



2002065119

Análise do promotor do gene *Opaco2* de *Coix* e estudos de dimerização da região bZIP

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Rodrigo Marins Peixoto Siloto</u>	e aprovada pela Comissão Julgadora. <u>Leite</u>
--	---

Tese apresentada à banca examinadora no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de mestre em Genética e Biologia Molecular, área de concentração Genética Vegetal e melhoramento.

Aluno: Rodrigo Marins Peixoto Siloto
 Orientador: Adilson Leite

Campinas/SP
 2001

UNIDADE	IB/85724
N.º CHAMADA:	1/UNICAMP
	Si36a
V	47607
	837/02
	☒ X
PREC.º	R\$ 11,00
DATA	06-02-02
N.º CPD	

CM00163096-0

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Si36a **Siloto, Rodrigo Marins Peixoto**
Análise do promotor do gene Opaco2 de Coix e estudos de
Dimerização da região bZIP/Rodrigo Marins Peixoto Siloto. --
Campinas, SP:[s.n.], 2001

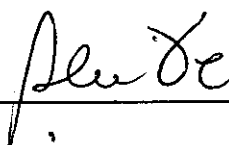
Orientador: Adilson Leite
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Coix. 2. Gene Opaco2. 3. Proteínas recombinantes. I. Leite,
Adilson. I. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Campinas, 13 de novembro de 2001

BANCA EXAMINADORA:

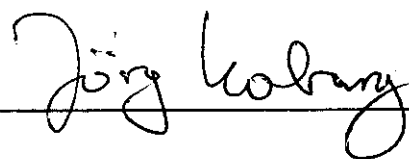
PROF. DR. ADILSON LEITE



PROF. DR. IVAN DE GODOY MAIA



PROF. DR. JÖRG KOBARG



PROF. DR. CELSO EDUARDO BENEDETI

Índice Geral

	página
Capítulo 1 - Introdução.....	01
<i>Coix lacryma-jobi</i> L.....	01
Regulação da expressão gênica em eucariotos.....	02
A RNA polimerase II e os promotores.....	03
A iniciação da transcrição e os fatores basais.....	04
Os reguladores de transcrição.....	05
Os reguladores do tipo bZIP.....	07
O regulador de transcrição <i>Opaco2</i>	10
A proteína <i>Opaco2</i>	11
As funções da proteína <i>Opaco2</i>	12
Capítulo 2 - Apresentação da tese e objetivos.....	17
Capítulo 3 - Resultados.....	19
Produção e purificação das proteínas recombinantes O2Cx-ABL e O2Cx-L.....	19
Análise funcional da proteína O2Cx-ABL purificada.....	23
Determinação da estrutura secundária da proteína O2CxABL recombinante.....	24
Ensaio de dimerização das proteínas recombinantes.....	25
Estudo dos mecanismos de dimerização do ativador <i>Opaco2</i>	27
Interação de proteínas nucleares com o promotor do gene <i>Opaco2</i>	34
Especificidade dos complexos.....	36
Interação de proteínas nucleares com o promotor durante o ciclo circadiano.....	37
Caracterização das proteínas que interagem com o promotor de <i>Opaco2</i>	39
Capítulo 4 - Discussão.....	43
Produção e purificação das proteínas O2CxABL e O2Cx-L.....	43
Estudos de dimerização da proteína <i>Opaco2</i> de <i>Coix</i>	44
A regulação do gene <i>Opaco2</i>	48
A região promotora do gene <i>Opaco2</i>	49
Início de transcrição dos genes <i>Opaco2</i>	50
Elementos reguladores <i>cis</i> presentes nos promotores dos genes <i>Opaco2</i>	50
Análise do promotor do gene <i>Opaco2</i> de <i>Coix</i>	52
Isolamento e identificação das proteínas que interagem com o promotor <i>Opaco2</i>	56
Capítulo 5 - Materiais e Métodos.....	60
Material vegetal.....	60
Oligonucleotídeos sintéticos.....	60
Construção do vetor de expressão pETO2Cx-ABL e pETO2Cx-L.....	60
Produção e purificação das proteínas O2Cx-ABL e O2Cx-L recombinantes produzida em bactéria.....	60
Etapas cromatográficas da purificação da proteína O2Cx-ABL recombinante.....	62
Ensaio de dicroísmo circular.....	63

Ensaio de dimerização.....	64
Produção das proteínas O2Cx-ABL e O2Cx-L com substituições pontuais.....	64
Avaliação da influência das mutações pontuais na dimerização.....	66
Obtenção dos extratos nucleares de endospermas <i>Coix</i>	66
Obtenção de fragmentos de DNA para produção de sondas.....	68
Marcação das sondas para <i>EMSA</i> e <i>Southwestern blot</i>	68
Ensaio de <i>EMSA</i> com a proteína O2Cx-ABL purificada.....	69
Ensaio de <i>EMSA</i> com extratos nucleares.....	70
Ensaio de <i>Southwestern Blot</i> com extratos nucleares.....	70
Conjugação de fragmentos de DNA em partículas paramagnéticas.....	70
Cromatografia de afinidade a DNA com a proteína O2Cx-ABL purificada.....	71
Análise da cromatografia de afinidade com O2Cx-ABL purificada.....	71
Cromatografia de afinidade a DNA com extratos nucleares.....	72
Análise da cromatografia de afinidade com extratos nucleares.....	72
Capítulo 6 - Conclusão.....	74
Capítulo 7 - Referências Bibliográficas.....	76

Índice de Figuras

Figura 1.1: A. Esquema mostrando um ramo de <i>Coix lacryma-jobi</i>	02
Figura 1.2: Estrutura do dímero de GCN4 ligado ao DNA.....	09
Figura 1.3: Representação esquemática das α -hélices referentes ao zíper de leucinas do regulador GCN4.....	09
Figura 1.4: Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas Opaco2.....	14
Figura 3.1: Representação esquemática das proteínas Opaco2, O2Cx-ABL e O2Cx-L.....	21
Figura 3.2: Análise eletroforética das etapas de produção e purificação da proteína recombinante O2Cx-ABL e O2Cx-L produzidas em <i>E. coli</i>	21
Figura 3.3: Cromatograma do ensaio de CLAE utilizando resina de troca iônica.....	22
Figura 3.4: Cromatograma do ensaio de CLAE em fase reversa.....	22
Figura 3.5: Fragmentos de DNA utilizados nos ensaios de <i>EMSA</i> com a proteína O2Cx-ABL purificada.....	23
Figura 3.6: Ensaio de <i>EMSA</i> com a proteína O2Cx-ABL recombinante purificada.....	24
Figura 3.7: Análises de dicroísmo circular com a proteína O2CxABL.....	25
Figura 3.8: Análise da dimerização das proteínas O2CxABL e O2CxL.....	26
Figura 3.9: Comparação da sequência de aminoácidos das bZIPs vegetais pertencentes à Família VIII	29
Figura 3.10: Proteínas O2Cx-ABL e O2Cx-L normais e mutantes.....	31
Figura 3.11: Comparação das propriedades de dimerização das proteínas mutantes.....	32
Figura 3.12: Análise da dimerização das proteínas mutantes.....	33
Figura 3.13: Análise de deleção do promotor de <i>opaco2</i> de <i>Coix</i>	35
Figura 3.14 - <i>EMSA</i> : Formação dos complexos DNA-Proteína durante o desenvolvimento do endosperma de <i>Coix</i>	36
Figura 3.15 - Determinação da especificidade da ligação de proteínas nucleares nas sondas PO2CxRI, PO2CxRII e PO2CxGbox através de <i>EMSA</i>	37
Figura 3.16 - Análise da variação da interação de proteínas nucleares com promotor do gene	

<i>Opaco2</i> durante o ciclo diurnico através de EMSA.....	38
Figura 3.17 – Ensaio de <i>Southwestern Blot</i> : Determinação do peso molecular aproximado das proteínas que se ligam na sonda PO2Cx-Gbox.....	39
Figura 3.18: Análise do experimento de cromatografia de afinidade com a proteína O2Cx-ABL recombinante purificada.....	40
Figura 3.19 - Análise do experimento de cromatografia de afinidade com fragmentos do promotor do gene <i>Opaco2</i>	42
Figura 4.1: Análise computacional da formação de estrutura tipo <i>coiled-coil</i>	47
Figura 4.2: Padrão de hidrofobicidade de aminoácidos.....	48
Figura 4.3: Alinhamento das regiões flanqueadoras 5' dos genes <i>opaco2</i> de <i>Coix</i> , sorgo e milho.....	53
Figura 4.4: Alinhamento das seqüências nucleotídicas correspondentes aos fragmentos PO2Cx-RI, PO2CX-RII e POCX-Gbox do promotor do gene <i>Opaco2</i> de <i>Coix</i> , milho e sorgo.....	59
Figura 5.1: Esquema do plasmídeo pETO2Cx-ABL.....	61
Figura 5.2: Representação da produção dos fragmentos O2Cx-ABL e O2Cx-L contendo mutações sítio-dirigidas.....	65
Figura 5.3: Obtenção dos fragmentos PO2Cx-RII, CxPCxN, CxPCxN-glm e CxPCxN-palind.....	69

Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Fatores de transcrição basal de células humanas e suas funções.....	06
Tabela 1.2: Alinhamento dos diferentes grupos alvo reconhecidos por <i>Opaco2</i> e seqüências flanqueadoras.....	15
Tabela 5.1: Descrição dos peptídios contendo substituições no Zíper de Leucinas.....	67
Tabela 5.2: Seqüência dos oligonucleotídeos sintéticos utilizados.....	73

Agradecimentos

Aos meus pais, Carmem e Octávio que sempre me apoiaram de maneira incondicional.

A minha esposa Marleny, pelo amor, pelo incentivo e pelo exemplo.

A minha irmã Angelita, pelo carinho.

Ao meu orientador, Dr. Adilson Leite

Aos que muito me ensinaram no laboratório Dr. André Luiz Vettore, Dra. Alba Chiesse da Silva.

Ao Dr. Jorg Kobarg, Dr. Michel Vincentz, Dr. Marcelo Menossi, Dr. Ivan de Godoy Maia, pela correção do trabalho

Ao Dr. Carlos Ramos (LNLS) e Dr. Fabio C. L. Almeida (UFRJ) pela colaboração nas pesquisas.

A equipe técnica do laboratório: Daniela, Eduardo, Luiz, Fabiana...

Aos companheiros de bancada: DeLucca (Dhi), Letícia, Tiago (Ipatinga), Branda, Camila, Pim, Eneida, Mário, Sylvia, Felipe, Paulino (Gauchão), Fabinho, Karen, Adriana, Andrés, Germano, Dante...

Capítulo

1

Introdução

Características de *Coix lacryma-jobi* L.

Coix lacryma-jobi, juntamente com milho e *Tripsacum*, pertence à tribo Maydeae da subfamília Panicoideae da família Gramineae. Este cereal é nativo do sudeste asiático, onde foi utilizado, durante muito tempo, como fonte de alimento, na produção de bebidas alcoólicas, como tônico e diurético (Arora, 1977).

O gênero *Coix* foi introduzido na Europa pelos árabes durante as cruzadas. Os primeiros registros escritos da comestibilidade das sementes de *Coix* datam do início do século XVIII. Atualmente o *Coix* é encontrado em todas as regiões tropicais do mundo. No Brasil, por volta de 1938, foi introduzida a variedade Adlay com sementes trazidas das Filipinas (Torres e Bergamin, 1951; Shaaffhausen, 1952).

O Gênero *Coix* consiste de plantas monóicas, anuais ou perenes, com polinização efetuada pelo vento. As espiguetas carpeladas são em trios; sendo uma fértil e duas estéreis. Cada um destes grupos encontra-se encerrado dentro de uma estrutura denominada invólucro. Esse invólucro é formado por uma bainha modificada e endurecida, que apresenta, quando madura, coloração variável. Por um orifício no ápice deste invólucro, emerge uma haste

que sustenta a inflorescência masculina. As espiguetas masculinas são imbricadas em pares ou trios e uma delas, a central, é pedunculada. Cada espiguetas apresenta duas floretas, ambas estaminadas, sendo a superior, às vezes, estéril (Figura 1.1) (Venkateswarlu e Chaganti, 1973; Jain e Benerjee, 1974). *Coix lacryma-jobi* apresenta uma taxa média de fecundação cruzada de aproximadamente 40% (Mello, 1989).

Nas sementes de *Coix* assim como em outros cereais, é encontrada uma classe de proteínas de reserva caracterizada pela solubilidade em soluções alcoólicas. Essas proteínas, denominadas prolaminas, podem chegar a constituir 50% das proteínas totais nas sementes deste cereal. Baseando-se na similaridade de massa molecular, solubilidade e estrutura das prolaminas, Leite *et al*, (1990) classificaram as prolaminas de *Coix* (coixinas) em α -, β - e γ -coixinas de acordo com a nomenclatura estabelecida por Esen (1987) para as prolaminas de milho (zeínas).

Apesar das sementes de *Coix* apresentarem um maior conteúdo de proteínas do que as sementes de milho, este cereal é considerado de pouca importância econômica devido às suas propriedades agrônômicas

desfavoráveis. Dentre essas propriedades, destaca-se a maturação não sincronizada das sementes que impede a mecanização da colheita desse cereal.

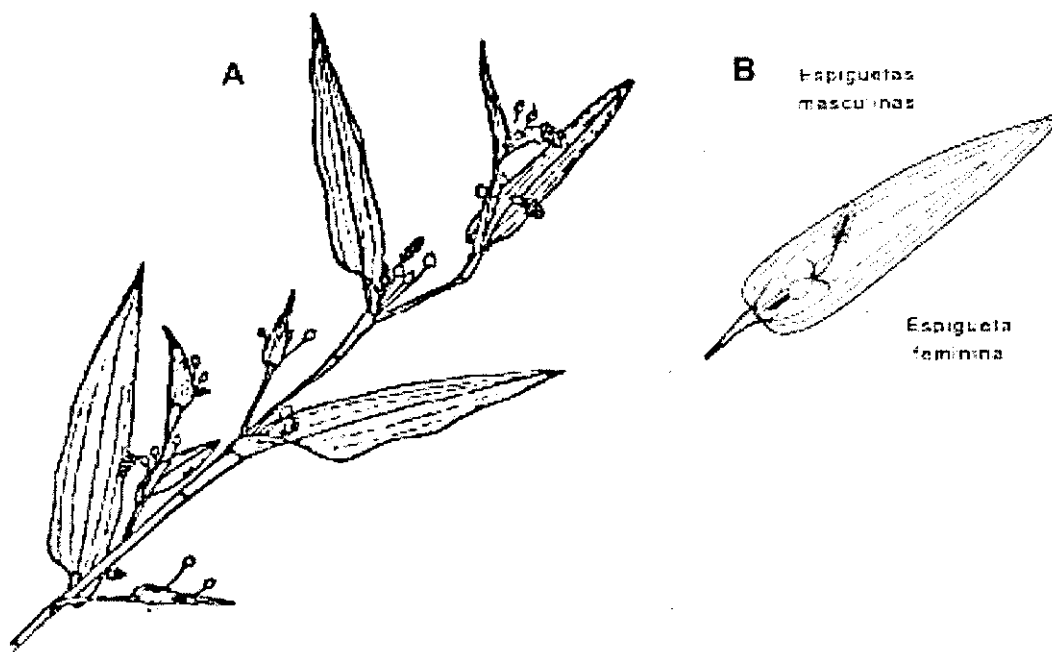


Figura 1.1: A. Esquema mostrando um ramo de *Coix lacryma-jobi*. B. Detalhe de um fascículo indicando as espiguetas masculina e feminina de uma inflorescência.

Regulação da expressão gênica em eucariotos

O controle da expressão gênica é essencial para a maioria dos fenômenos biológicos, tais como a diferenciação celular, o desenvolvimento e as respostas aos estímulos ambientais.

O controle da expressão gênica acontece basicamente em três níveis distintos:

I - Regulação da transcrição, que compreende principalmente a regulação da taxa de iniciação da transcrição;

II - Regulação pós transcricional, que regula a edição, degradação e tradução do RNA mensageiro já formado;

III - Regulação pós-traducional, que abrange as modificações nas proteínas sintetizadas, como por exemplo, fosforilação, glicosilação e acilação.

Dentre esses três níveis, o mecanismo predominante no controle da atividade de um gene é a regulação da transcrição ou síntese do RNA mensageiro (RNAm) (Kuhlemeier, 1992).

A RNA polimerase II e os promotores.

Organismos eucariontes possuem três enzimas responsáveis pela síntese de moléculas de RNA: as RNA polimerases I, II e III. A RNA polimerase I está envolvida com a transcrição dos genes de RNA ribossomal (RNAr) enquanto que a RNA polimerase III atua na transcrição de RNAs transportadores (RNAt), subunidade 5S do RNA ribossomal e alguns outros pequenos RNAs nucleares.

A RNA polimerase II é responsável pela transcrição de genes que codificam proteínas, sintetizando assim os denominados RNAs mensageiros (RNAm). Esta enzima é essencial para o processo de transcrição, mas não é capaz de atuar sozinha. Ela depende de outras proteínas que interagem com o DNA e entre si. Alguns dessas proteínas, denominadas fatores basais são necessárias para a transcrição de quaisquer genes. Outras, denominadas reguladores, modulam a taxa de transcrição de grupos de genes ou até mesmo de um único gene.

A síntese dos RNAm inicia-se em regiões específicas do genoma, mais precisamente nos promotores..

Promotores podem ser definidos como seqüências de DNA capazes de causar transcrição em um sistema *in vitro* ou *in vivo*.

Os genes transcritos pela RNA polimerase II contêm seqüências alvo comuns, reconhecidas pelos fatores basais e seqüências promotor-específicas, reconhecidas por reguladores de transcrição. As seqüências alvo comuns de DNA são necessárias e suficientes para iniciação da transcrição mediada pela RNA polimerase II (Roeder, 1996).

Na maioria dos promotores foi identificada uma seqüência conservada, localizada a 25-30 pares de base (pb) do local do início da transcrição. Esta seqüência, formada pelo consenso TATAa/tAa/t, foi chamada TATA box. Além desta outra seqüência, rica em pirimidinas e de consenso YYANt/aYY foi localizada próxima à maioria dos locais início da transcrição, sendo chamada de INR (revisado em Smale, 1994).

Apesar de vários genes apresentarem claramente o elemento TATA-box, a maioria não o possui. Alguns destes genes possuem sucessões A+T-ricas que parecem funcionar como TATA-box.

Conforme revisado por Maldonado e Reinberg (1995), o processo de transcrição pode ser dividido em cinco fases:

- i) formação do complexo pré-iniciação, onde os fatores basais reconhecem suas seqüências alvo;
- ii) iniciação, onde os reguladores modulam a atividade do complexo formado anteriormente;
- iii) escape do promotor, que é a saída da RNA polimerase II do promotor iniciando a transcrição;
- iv) alongamento, que é a transcrição propriamente dita;
- v) terminação, que corresponde ao final da transcrição e escape da RNA polimerase II.

A iniciação da transcrição e os fatores basais

A regulação da transcrição ocorre, na grande maioria das vezes ao nível da iniciação, envolvendo os diversos elementos necessários para este processo. De acordo com várias revisões (Serizawa et al., 1994; Burley e Roeder, 1996, Roeder 1996) a formação do complexo de pré-iniciação inclui as seguintes etapas:

O primeiro passo para a formação do complexo de pré-iniciação é a interação de um pequeno fator basal denominado TBP (*TATA binding protein*) com o elemento TATA-box. A proteína TBP, necessária para a transcrição mediada por qualquer uma das RNA polimerases (I, II ou III) (Goodrich e

Tjian, 1994), é uma das proteínas mais conservadas durante a evolução dos eucariotos.

Quando essa proteína interage com o promotor ocorre um dobramento significativo no DNA de aproximadamente 80°. Então, uma variedade de outros fatores basais denominados TAFs (*TBP-associated factors*) associam-se à TBP, formando o complexo conhecido como TFIID. A massa total deste complexo pode chegar a mais de 800 kDa com até 12 TAFs associados (Tjian, 1995). Já foi demonstrado que TFIID é capaz de reconhecer diferentes promotores de acordo com o tipo de TAF associado (Goodrich e Tjian, 1994).

A próxima etapa de formação do complexo pré-iniciação é a associação de TFIIA, um fator adicional que interage de maneira estável com o complexo, através de contatos diretos com TBP e com a seqüência de DNA na região 5' do promotor. A presença de TFIIA é importante para o processo de transcrição basal quando é necessário estabilizar a interação de TBP com o DNA.

Então, o fator TFIIB, interage com o complexo através de interações diretas com TBP e com a seqüência de DNA na região 3' do promotor. Assim como TFIIA, TFIIB ajuda a estabilizar as interações de TBP-TATA.

TFIIB é também capaz de recrutar o complexo TFIIF-RNA polimerase pré-formado. A RNA polimerase IIA, é a forma que não contém o domínio carboxi-terminal (CTD) fosforilado. Esta forma é preferencialmente recrutada ao complexo de pré-iniciação em relação à forma fosforilada (RNA polimerase IIO).

A próxima etapa inclui a interação de TFIIE com a RNA polimerase II e provavelmente interações com TFIIF e TBP.

A formação do complexo de pré-iniciação é completada pela interação de TFIH através de contatos diretos com TFIIE.

A conclusão da formação do complexo de pré-iniciação, na presença de ATP e outros ribonucleosídeo-trifosfatos, é seguida rapidamente pela separação das fitas de DNA por uma extensão de 10pb na região 3'. Esta separação é mediada pela atividade de helicase do fator TFIIF e requer hidrólise de ATP. A região de separação das fitas de DNA é então estendida por mais alguns pares de base, quando se inicia a transcrição com a formação da primeira ligação fosfo-diester. Durante a fase de alongamento dos transcritos, a região contendo as fitas de DNA separadas (bolha de transcrição) desloca-se na direção terminal 5', ocorrendo simultaneamente a renaturação da região anterior.

A fosforilação da região carboxi-terminal da RNA polimerase II está associada com a transição da fase de iniciação do alongamento e liberação de promotor. Esta fosforilação é mediada pelo fator TFIH e estimulada por TFIIE resulta em alterações conformacionais que permitem esta enzima deixar o complexo de pré-iniciação. Uma fosfatase específica regenera a RNA polimerase na forma IIA não fosforilada, necessária ao recrutamento durante a formação do complexo de pré-iniciação.

A Tabela 1.1 descreve os fatores basais humanos, destacando suas composições e funções durante o processo de transcrição.

Os reguladores de transcrição.

Um regulador de transcrição típico é constituído por três módulos: um domínio de multimerização, um domínio de ligação ao DNA e um domínio de ativação. Isto permite que o conjunto de relativamente pequeno de módulos gere reguladores de transcrição altamente especializados (Tjian e Maniatis, 1994).

O domínio de multimerização é responsável pela formação de dímeros, tetrâmeros ou outros multímeros. Muitos reguladores são ativos somente na forma multimérica, como, por exemplo, alguns tipos de bZIP, como AP-1, c-Jun e c-Fos (Wagner e Green, 1994).

Tabela 1.1: Fatores de transcrição basal de células humanas e suas funções (Roeder, 1996).

Fator	Número de subunidades totais encontradas	Massa molecular (kDa)	Função
TBP	1	38	Reconhecimento do TATA-box, recrutamento de TFIIB
TAFs	12	15-250	Reconhecimento da região promotora, regulação positiva ou negativa
TFIIA	3	12,19,35	Estabilização da ligação de TBP-DNA, estabilização das interações TAFs-DNA, funções anti-repressoras
TFIIB	1	35	Recrutamento do complexo RNA polimerase-TFIIF, seleção do sítio de iniciação pela RNA polimerase II
TFIIF	2	30-74	Condução da RNA polimerase II ao promotor, desestabilização de interações não específicas da RNA polimerase II com o DNA
RNA Pol II	12	10-220	Síntese de RNAm, recrutamento de TFIIIE
TFIIIE	2	34-57	Recrutamento de TFIIH, modulação da atividade de helicase de TFIIH, atividade de quinase e ATPase
TFIIH	9	35-89	Separação das fitas de DNA pela atividade de helicase, promoção do escape da RNA polimerase II do promotor pela atividade de quinase da região carboxi-terminal da enzima.

Os domínios de interação com DNA e de ativação permitem aos reguladores de transcrição reconhecer seqüências alvo no DNA e interagir com os fatores basais do complexo de pré-iniciação, respectivamente.

A interação dos reguladores com fatores basais de transcrição pode

resultar na estabilização ou desestabilização do complexo de pré-iniciação ou ainda alterar sua taxa de formação (revisado por Latchman, 1997).

Diferentes condições, tais como o tipo celular, o meio ambiente e a fase do desenvolvimento, podem levar

à síntese de um regulador ou gerar modificações em um regulador pré-existente de modo a alterar sua atividade. Desta maneira, os reguladores coordenam a expressão de diferentes genes em resposta aos diversos estímulos impostos (Gilmartin *et al.*, 1990).

A fosforilação é uma das principais formas de modificação de um regulador de transcrição (Hunter e Karin, 1992; Hill e Treisman, 1995; Hunter, 1995). Ela pode modular a atividade de um regulador, alterando sua capacidade de interagir com o sítio alvo no DNA ou com o complexo de pré-iniciação, ou ainda regular sua localização nos diferentes compartimentos celulares (Gille *et al.*, 1992; Gonzales e Montminy, 1989; Shua *et al.*, 1993).

Um regulador de transcrição específico pode apresentar afinidades diferentes para diversos sítios no DNA, interagir com o DNA de maneira cooperativa com outros fatores ou ainda competir com outros fatores pelo sítio de ligação. Esta competição ocorre quando diferentes reguladores reconhecem o mesmo sítio, ou porque seus sítios se sobrepõem ou estão suficientemente próximos, impedindo a interação simultânea dos fatores com o DNA.

Os reguladores de transcrição podem ser agrupados em diferentes classes ou famílias cujos membros apresentam domínios de interação com o DNA relacionados. A existência dessa diversidade demonstra a existência de

várias soluções para o reconhecimento do DNA por proteínas.

As classes estruturais de reguladores de transcrição melhor caracterizadas em plantas são: bZIP (*basic-leucine zipper*), bHLH (*basic helix-loop-helix*), Myb, proteínas contendo homeodomínio (HDs), MADS box e *Zinc Finger* (Kerstetter *et al.*, 1994; Ramachandran *et al.*, 1994; Takatsuji *et al.*, 1994; Meshi e Iwabushi, 1995; Purugganan *et al.*, 1995).

Os reguladores do tipo bZIP

Os reguladores do tipo bZIP são caracterizados pela presença da região bZIP. Tal região apresenta usualmente 60 a 80 resíduos, sendo subdividida em dois domínios. O primeiro, denominado zíper de Leucinas, é caracterizado por repetições de resíduos de leucina a cada sete aminoácidos numa extensão de 30 a 40 resíduos, sendo responsável por interações com outras bZIPs, promovendo dimerizações. O segundo, adjacente ao zíper de Leucinas é denominado domínio Básico, sendo constituído por aproximadamente 30 resíduos dos quais a maioria deles apresenta caráter básico. Tal domínio é responsável pela interação com o sítio-alvo do DNA (Figura 1.2).

As propriedades estruturais das proteínas do tipo bZIP foram

verificadas através estudos cristalográficos realizados inicialmente com GCN4 (um ativador transcricional de fungos pertencente a essa classe de proteínas) (O'Shea *et al.*, 1991; Ellemberger *et al.*, 1992; Keller *et al.*, 1995). Esses estudos demonstraram que os monômeros protéicos formam α -hélices contínuas (Figura 1.2). No domínio zíper de leucinas, essas hélices são torcidas, produzindo uma estrutura denominada *coiled-coil*.

As estruturas primárias das regiões protéicas que formam *coiled-coil* são caracterizadas pela repetição de seqüências de sete resíduos de aminoácidos correspondendo a duas voltas na α -hélice. Tais resíduos são classificados de "a" a "g" de acordo com sua posição na hélice (Figura 1.3).

Os resíduos presentes nas posições "e" e "g" são geralmente formados por aminoácidos eletricamente carregados capazes de formar interações do tipo ponte salina entre duas subunidades de α -hélice. Os resíduos das posições "a" e "d" por sua vez são quase sempre aminoácidos apolares que formam interações hidrofóbicas entre as α -hélices. (Sodek *et al.*, 1972; McLachlan e Stewart, 1975).

As interações do tipo ponte salina entre os resíduos "e" e "g" possuem grande raio de ação, porém não promovem o correto direcionamento das moléculas. As interações hidrofóbicas entre os resíduos "a" e "d" possuem raio de ação bem menor que as pontes salinas, porém são capazes de orientar

corretamente as α -hélices, determinando também a especificidade da associação das subunidades (revisado em Chen e Parry, 1990; Lupas, 1996).

Assim, a dimerização entre bZIPs pode ocorrer entre subunidades idênticas, formando homodímeros, ou subunidades diferentes, formando heterodímeros (O'Shea *et al.*, 1992). Algumas b-ZIPs podem formar apenas homodímeros (GCN4), enquanto outras formam apenas heterodímeros (Fos). Existem, porém b-ZIPs que apresentam capacidade de formar tanto homodímeros quanto heterodímeros (Jun) (Smeal *et al.*, 1989; Kouzarides & Ziff, 1989).

A formação de homo ou heterodímeros pode constituir-se em um mecanismo de controle da expressão gênica, modulando a interação do regulador com o DNA ou modulando a formação do complexo de pré-iniciação (Chiu *et al.*, 1989; Schutte *et al.*, 1989).

Apesar dos reguladores do tipo bZIP apresentarem um domínio relativamente simples de interação com o DNA, eles são capazes de reconhecer um grande número de seqüências de DNA discriminando-as suficientemente a fim de regular a transcrição de diversos genes com diferentes promotores.

O regulador de transcrição Opaco2

A proteína Opaco2 foi um dos primeiros reguladores transcricionais de plantas a ser estudado. A origem desses estudos teve início na década de 1980, quando Schmidt *et al.* (1987) e Motto *et al.* (1988) buscavam o gene responsável pela mutação *opaco2* em milho.

A mutação *opaco2* é recessiva e confere um aspecto opaco à semente madura de milho, normalmente translúcida. Ela foi originalmente identificada por Singleton e Jones durante a década de 1930 (Emerson *et al.*, 1935) e caracterizada como deficiente na produção de uma classe de prolaminas: as α -zeínas (Jones, *et al.*, 1977). Posteriormente foi constatado também redução nos níveis de β -zeínas (Cord Neto, *et al.*, 1995).

Além destes efeitos, vários outros aspectos do metabolismo da semente de milho também estão modificados. A atividade de RNase no endosperma mutante é maior do que a encontrada em sementes normais (Wilson e Alexander, 1967). Foram descritas alterações nos níveis de carboidratos (Murphy e Dalby, 1971) e aumento na concentração de amônia (Misra *et al.*, 1975). Os mutantes *opaco2* apresentam uma maior susceptibilidade a patógenos (Loesch *et al.*, 1976) e a atividade de fotossíntese das plântulas encontra-se alterada (Morot-Gaudry *et al.*, 1979). A baixa resistência ao ataque de insetos e patógenos pode estar associada, nas sementes *opaco2*, a um decréscimo

significativo nos níveis da albumina B-32, uma proteína do tipo *RIP* (*Ribosome-Inactivating Protein*) de 32 kDa, que possui atividade de inativação de ribossomos e atua como agente de defesa (Bass *et al.*, 1992). A mutação *opaco2* afeta ainda os níveis da proteína B-70, análoga à HSP-70 (*Heat Shock Protein-70*), que se acumula na superfície do corpúsculo protéico e pode atuar como chaperonina durante a formação deste corpúsculo (Marocco *et al.*, 1991).

Os níveis de várias proteínas e enzimas relacionadas com o metabolismo de aminoácidos, principalmente a via do aspartato, encontram-se alterados em mutantes *opaco2* (Yunes *et al.*, 1994b). Ocorrem ainda alterações na expressão dos genes envolvidos na biossíntese de amido (Giroux *et al.*, 1994).

Damerval e Guilloux (1998) compararam proteínas de endosperma de linhagens de milho *opaco2* e selvagem através de 2D-PAGE (*two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*). De fato, esses autores relataram alterações na produção de dezenas de proteínas decorrentes desta mutação.

O gene *Opaco2* de milho, localizado no cromossomo 7, foi identificado e isolado utilizando-se a estratégia de *transposon tagging* com o auxílio dos elementos móveis *Spm* (Schmidt *et al.*, 1987) e *Ac* (Motto *et al.*, 1988). Posteriormente, Pirovano *et*

al. (1994) e Vettore *et al.* (1998) isolaram e caracterizaram prováveis genes ortólogos à *Opaco2* em sorgo e Coix, respectivamente.

Os primeiros transcritos do gene *Opaco2* de milho surgem especificamente no endosperma em aproximadamente 11 dias após a polinização (DAP), sendo detectados até 36 DAP (Galusci *et al.*, 1994). Em endospermas de *Coix*, a expressão de *Opaco2* apresenta comportamento similar ao descrito para milho (Vettore *et al.*, 1998).

O alto grau de conservação da estrutura das prolaminas e dos reguladores *Opaco2*, bem como a conservação do padrão de expressão dos respectivos genes sugere a existência de um mecanismo comum de regulação de expressão destes genes no endosperma de milho, sorgo e *Coix*.

A proteína Opaco2

A dedução da sequência de aminoácidos a partir de cDNAs isolados revelou que a proteína *Opaco2* contém uma região similar à encontrada em membros da família das bZIPs.

Essa região, localizada na porção carboxi-terminal, entre os aminoácidos 227 e 296, apresenta um domínio Básico (entre os aminoácidos 227 e 247) em um zíper de Leucinas (entre os aminoácidos 251 e 296) com sete repetições de leucinas.

Vettore *et al.* (1998) classificaram as proteínas bZIP de plantas em cinco

famílias distintas. De acordo com esta classificação, as proteínas *Opaco2* de milho, *Coix* e sorgo foram indexadas na Família III. Vincentz *et al.* (publicação em preparo) propuseram porém uma nova classificação destas proteínas de origem vegetal, indexando agora as proteínas *Opaco2* na família VIII. A proteína de milho OHP, identificada por Pysh *et al.*, (1993) como capaz de formar heterodímeros com *Opaco2*, foi indexada na mesma família.

Esta família de bZIPs de plantas é caracterizada por apresentar sete repetições de leucinas.

Além da região bZIP outros domínios funcionais foram identificados na proteína *Opaco2* de milho. Schmitz *et al.* (1997) identificaram quatro prováveis domínios de ativação, uma sequência rica em Prolinas localizada na região N-terminal, entre os aminoácidos 13 e 31. Nesta mesma região encontram-se os domínios Ácidos S1 (aminoácidos 42 e 71) e S2 (aminoácidos 102-122). Um terceiro domínio Ácido, SIII, localiza-se próximo ao domínio bZIP, entre os aminoácidos 204 e 227. Segundo estes autores, o domínio S1 sozinho responde por cerca de 48% da atividade de regulação da transcrição da proteína *Opaco2*. Dois domínios relacionados com o transporte da proteína *Opaco2* para o interior do núcleo celular (NLS – Nuclear Localization Sequence) foram identificados entre os aminoácidos

101-135 e 223-254 (Varagona *et al.*, 1992). No alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas Opaco2 de milho, sorgo e *Coix* mostrado na Figura 1.4 encontram-se indicados os diversos domínios acima descritos.

As funções da proteína Opaco2

A proteína Opaco2 foi a primeira proteína regulatória de plantas para qual foi demonstrado uma função direta no controle de expressão gênica. No promotor do gene da α -zeína de 22 kDa, a proteína Opaco2 liga-se à seqüência 5'-TCCACGTAGA-3' (Schmidt *et al.*, 1992). Ensaios de expressão transitória realizada por Ueda *et al.*, (1992) mostraram que uma única substituição na região central 5'-ACGT-3' era suficiente para impedir a ligação da proteína Opaco2 (Ueda *et al.*, 1992).

Como os primeiros fatores do tipo bZIP descritos em plantas apresentavam alta afinidade de ligação a seqüências contendo o motivo alvo 5'-ACGT-3', conseqüentemente acreditou-se que este motivo era imprescindível para a interação de qualquer membro desta família com o sítio alvo no DNA. De fato, em ensaios de EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*), a proteína Opaco2 mostrou alta afinidade por uma ampla coleção de seqüências contendo o motivo central 5'-ACGT-3' (Schmidt *et al.*, 1992). Entretanto, entre os cinco sítios alvo descritos no promotor do gene *b-32*, somente um deles, o sítio B5 apresentava o motivo 5'-ACGT-3' (Izawa *et al.*, 1993). Inicialmente, concluiu-se

que somente este sítio apresentava capacidade de ligação com Opaco2, enquanto que os demais resultavam de artefatos das técnicas utilizadas nos estudos de interação DNA-proteína.

Embora exista uma grande semelhança entre os genes de α -zeína de 22 kDa e a α -coixina de 25 kDa, o motivo ACGT não foi encontrado nos promotores destes genes. Yunes *et al.* (1994b) demonstraram que a proteína Opaco2 de milho interage com o promotor do gene da α -coixina de 25 kDa através da seqüência 5'-GACATGTC-3'. Esta seqüência apresenta maior similaridade com os sítios encontrados no promotor do gene *b-32* do que com aquele descrito no promotor do gene da α -zeína de 22 kDa.

Yunes *et al.* (1998) mostraram que o mecanismo de interação de Opaco2 ao DNA pode ser ainda mais complexo. Esses autores demonstraram que essa proteína reconhece dois sítios adjacentes distintos no promotor de α -coixina de 22 kDa. Além do motivo 5'-CATG-3' mostrado na Tabela 1.2, a seqüência 5'-TGACTA-3' também age como alvo de Opaco2, sendo que o motivo 5'-TGAC-3' é também reconhecido por outras bZIPs, como GCN4 (Arndt e Fink, 1986; Hill *et al.*, 1986).

Cord Neto *et al.* (1995) agruparam as seqüências reconhecidas por Opaco2 em duas classes: uma com o elemento central

5'-ACGT-3' e outra com o elemento CATG (Tabela 1.2).

Yunes *et al.* (1998) demonstraram através de ensaios quantitativos que a ligação simultânea de dois dímeros de Opaco2 ocorre de forma cooperativa nos sítios alvos adjacentes do promotor de α -coixina. Análises de expressão transitória realizadas por estes autores demonstraram ainda a ação sinérgica dos dois sítios na regulação da expressão do gene de α -coixina.

No promotor de α -zeína de 22kDa o sítio de ligação da proteína Opaco2 encontra-se localizado a apenas 20 pares de base de um segundo elemento *cis* regulador denominado *prolamin-box* (Forde *et al.*, 1985). A presença deste elemento na maioria dos genes de prolaminas sugere que o *prolamin-box* está envolvido no controle coordenado da expressão destes genes (Maier *et al.*, 1987). Esta hipótese é corroborada pelo fato de que a eliminação ou mutações na sequência do *prolamin-box* promove intensa redução na capacidade de ativação da proteína Opaco2.

Vicente-Carbajosa *et al.* (1997) identificaram uma proteína capaz de interagir com o *prolamin-box* e o ativador Opaco2 também. Este fator, denominado PBF (*Prolamin Binding Factor*) pertence à classe dos reguladores de transcrição do tipo *Zinc-finger*. Esse fator, além de interagir com Opaco2 apresenta um padrão de acúmulo similar ao da proteína Opaco2 durante o desenvolvimento do endosperma.

Souza Filho *et al.* (1998) também relataram em endosperma de Coix a presença de um fator protéico capaz de interagir *in vitro* simultaneamente com o sítio alvo do promotor de α -coixina e com a proteína Opaco2. Este fator foi denominado CBF1 (*Coix Binding Factor 1*). Pouco se sabe sobre a natureza e função do fator CBF1, entretanto estes autores sugerem que esta proteína deve estar envolvida no mecanismo de regulação da expressão dos genes de α -coixina. Diversos estudos têm relatado a presença de genes *Opaco2* em outros cereais além daqueles pertencentes à subfamília Panicoideae, sugerindo a existência de um mecanismo comum de regulação da expressão dos genes de proteínas de reserva. Estudos realizados com o promotor do gene *LMWG1D1* de uma proteína de reserva de trigo, a glutenina 1D1 de baixo peso molecular (*Low-Molecular-Weight Glutenin 1D1*), comprovaram que a proteína Opaco2 é capaz de ativar a expressão deste gene ao ligar-se ao sítio 5'-GTGAGTCATA-3' (GLM) (Holdsworth *et al.*, 1995). Outro ativador transcricional similar a Opaco2, denominado RITA-1, foi identificado em arroz. A similaridade entre o padrão espacial e temporal de expressão dos genes *RITA-1* e *Opaco2* sugere que a proteína bZIP de arroz também deve estar envolvida na regulação coordenada da expressão de genes durante o

desenvolvimento das sementes neste cereal (Izawa *et al.*, 1994).

```

                                <Rica em prolinas>                                <- - -
Coix    MEHVISMEEILGPFWDLPSPPLPLPE-QQPLVTDGTSVVIDGVVTQGGGD 51
Milho   MEHVISMEEILGPFWELL-PPPAPEPEREQ-PPV-TGIVVGSVIDVAAAGH 48
Sorgo   MEPVFSMEEILGPFWDL-PSPPP--PE-QQPLVIGTSSVVIDGVVTH-GGN 46
      ** ..*****.*** ..*** ..** ..* ..* ..* ..*
      - - - - - S I - - - - - >
Coix    GEGGDMMDQ--NTTEWTFERLLEEEILINKTTL---VTNSSCS-TLNID-P 95
Milho   GD-GDMMDQ-QHATEWTFERLLEEEALTTSTPPPVVVPNSCCSGALNADRP 98
Sorgo   GEGSNMMDQIQNTTEWTFERLLEEEELLDTTP-----VANSSCPA-LNVDP- 91
      * ..***** ..***** * ..* ..* ..* ..*
      < - - - - S II - - - - >
Coix    VVEVDQGTMASGAVS-AV-GDPMEYNAILKRKLEVDLVAFKMWR-ASS-VVN 143
Milho   PVMEEAVTMAFAAVSSAVVGDPMYNAILRRKLEEDLEAFKMWRAASS-VVT 149
Sorgo   VVEVDQGAMAPEAVS-AV-GDPMEYNAILKRNVEEDLMAFKMWR-ASTSGVN 140
      * ..*** ..** ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..*

Coix    SE-RSQDSNNHNGGS---KNVVQNKL-NGEDPI-NNHAQNVDLRVRLATSSS 189
Milho   S,DQRSQGSNNHTGGSSIRNPNVQNKLMNGEDPINNHAQTAGLGVRATSSS 201
Sorgo   SE----GSNNENG-----DLHVRLTTSSS 161
      * ..*** ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..*
      < - - - - S III - - - - > |<--MOTIVO BÁSICO-->|
Coix    SRDPSPSDEMDGVEVILGFKMPTEERVKRKESNRESARRSRYRKAHLKE 241
Milho   SRDPSPSDEMDGVEVILGFKMPTEERVKRKESNRESARRSRYRKAHLKE 253
Sorgo   SRDPSPSDEMDGVEVILGFKMPTEERVKRKESNRESARRSRYRKAHLKD 213
      *****
      |<----- REPETIÇÕES DE LEUCINA ----->|
      1      2      3      4      5      6      7
Coix    LEDQVEQLKAENSCLLRRLAALNQKYNEANVDNRVLRADMETLRKVKMGED 293
Milho   LEDQVAQLKAENSCLLRRIAALNQKYNDANVDNRVLRADMETLRKVKMGED 305
Sorgo   LEDQVDKLKAENSCLLRRLAALNQKYNHATVDNRVLRADMETLRKVKMGED 265
      ***** ..***** ..***** ..***** ..***** ..***** ..*****

Coix    SLKRVMEMSSLPP-SMPIPALPSSSDASVP---IQDDIINYFSTTPAADEDA 341
Milho   SLKRVIEMSSSVSPSMPISAPTSSDAPVPPPIRDSIVGYFSATAADD-DA 356
Sorgo   SLKRIIEMTSLT--SIPIELPSSSDVPVH---IQDNIVNYFTTTPAG--DA 310
      ***** ..*** ..** ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..*

Coix    PVDNNSFIIMPADP--LQLVQAEDQPTM----- 368
Milho   SVGN-GF-----LRL-QA-HQE--PASMVVGGLSATENMRVAAATH 393
Sorgo   LADN-SF--MPMPDPLPLQL-QAEE-PTI-----NGALNATEMNQI--ATH 347
      * ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..*

Coix    ---GA---MELIQKTMGAMP-TSP-GSAL--QESQLLGL-GPDETINMDMY 408
Milho   CA-GA---MELIQTAMGSMPPTSASGSTPPPDYELLGPNG---AIHMDMY 437
Sorgo   CAAGSQPSMQLIQETMGAMMPTS-SGSTL--QESSELLGPN---ETINMHMY 394
      * ..*** ..*** ..** ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..*

```

Figura 1.4: Alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas Opaco2. As seqüências de aminoácidos foram deduzidas das seqüências de nucleotídeos dos genes *opaco2* de Coix, milho e sorgo, respectivamente a partir dos clones gCXO2-1, o2 cDNA 1-4 (Schmidt *et al.*, 1990) e da seqüência de nucleotídeos do clone genômico de sorgo depositada nos bancos de dados do EMBL, GenBank, DDBJ Nucleotide Sequence Databases, com o número de acesso X71636. Os resíduos idênticos e as substituições conservativas são indicadas por asteriscos e pontos, respectivamente. Estão indicadas as posições dos domínios Básico em azul, Zíper" de Leucinas em verde, região rica em prolinas em roxo e regiões ácidas SI, SII e SIII em vermelho. Os espaços para maximizar o alinhamento estão representados por hífen. O alinhamento foi realizado utilizando-se o programa CLUSTAL X (Higgins and Sharp, 1989).

Tabela 1.2: Alinhamento das diferentes sequências alvo reconhecidas por Opaco2 (Cord Neto, *et al.*, 1995)

Box	Gene	Seqüência de DNA	Referência
Grupo I			
		ACGT	
O2	α -zeína	GTCATTCCACGTAGATGAAAA	Schmidt, et al. (1992)
O2b	β -zeína	ATGTTTCCACGTCATGCAACG	Pedersen, et al. (1986)
O2b	β -coixina	GTATTTCCACGTCATGCAGTG	Cord Neto, et al. (1995)
Grupo II			
		CATG	
O2c	α -coixina	TGACTAGGAGACATGTCATCT	Yunes, et al (1994b)
O2c	α -coixina	CGACTAGGAGCCATGTCATCT	Yunes, et al (1994b)
B1*	b-32	TCTATATTAGCCATGTCATCA	Steitz, et al. (1990)
B4*	b-32	CTACTAATAGTCATGTCATCC	Steitz, et al. (1990)

Diversos estudos têm sugerido o envolvimento de proteínas relacionadas com Opaco2 no controle da expressão de outros genes além daqueles que codificam prolaminas em cereais.

Existem indícios de que o regulador Opaco2 também controla, no endosperma de milho, a expressão da forma citosólica da enzima piruvato ortofosfato diquinase-1 (cyPPDK-1) através da interação com dois sítios de ligação muito semelhantes aos do promotor do gene *b-32* (Maddaloni *et al.*, 1996). Há também indicações de seu envolvimento nos mecanismos que controlam os níveis das enzimas lisina-cetoglutarato redutase (LKR) (Sodek e Wilson, 1970; Brochetto-Braga *et al.*, 1992) e aspartato kinase 1 (ASK-1) nas células do endosperma de milho (Azevedo *et al.*, 1995; Kemper *et al.*, 2000).

Proteínas similares a Opaco2 provavelmente atuam também na regulação da expressão gênica em sementes de plantas dicotiledôneas.

Estudando a interação da proteína Opaco2 com o promotor do gene *psl*, que codifica uma lecitina da semente de ervilha, de Pater *et al.* (1994) demonstraram que a proteína Opaco2 reconhece um sítio que apresenta similaridade com a seqüência consenso descrita para os sítios presentes no gene *b-32*.

Sementes de *Bertholletia excelsa* (castanheiro do Pará) acumulam como reserva uma albumina rica em metionina denominada 2S. Assim como as prolaminas dos cereais, esta proteína também é codificada por uma família multigênica e tem sua síntese correlacionada com o acúmulo dos RNAsm correspondentes. No promotor

do gene desta albumina 2S foram encontrados três elementos ACGT que interagem, *in vitro*, com a proteína Opaco2 de milho (Vincentz *et al.*, 1997).

Mauri *et al.* (1993) demonstraram que a proteína Opaco2 é capaz de complementar a mutação *gcn4* (mutante nulo) em células de *Saccharomyces cerevisiae*. Este fato evidencia a correspondência funcional existente entre estas proteínas, que apresentam 50% de similaridade e 40% de identidade na sequência de aminoácidos de seus Domínios Básicos. A proteína GCN4 é um dos fatores de regulação de transcrição de eucariotos melhor caracterizado. Homodímeros desta proteína interagem com o DNA através de seu domínio bZIP e sua capacidade de ativar a transcrição é mediada por uma pequena região rica em resíduos ácidos. Quando células de leveduras são submetidas a uma dieta pobre em aminoácidos, a proteína GCN4 ativa a transcrição de um grande número de genes relacionados a vias biossintéticas de aminoácidos. O envolvimento da proteína Opaco2 na regulação da expressão de enzimas da via biossintética de aminoácidos aliado a sua similaridade estrutural e funcional com a proteína GCN4 de leveduras, sugere que a Opaco2 possa estar envolvida com o controle do balanço geral de aminoácidos no endosperma de milho. Além disto, o grande número de efeitos pleiotrópicos provocados pela mutação *opaco2* indica que a proteína Opaco2 deve desempenhar um importante papel na coordenação da

expressão de vários genes de diversas vias metabólicas durante o desenvolvimento do endosperma de milho, sorgo e *Coix*.

Capítulo

2

Apresentação da Tese e Objetivos

Apesar da grande importância e dos extensivos estudos realizados com o regulador de transcrição *Opaco2*, pouco se sabe sobre os mecanismos que regulam sua própria expressão. Pouco também se conhece sobre o processo de dimerização deste ativador transcricional.

Esta tese descreve os esforços iniciais realizados com o objetivo de identificar elementos reguladores *cis* e *trans* envolvidos no controle da expressão do gene *Opaco2*.

Também é descrita uma metodologia para avaliar as propriedades de dimerização do ativador *Opaco2* de *Coix*. Tal metodologia foi usada para identificar a influência da quinta repetição do zíper de leucinas na taxa de dimerização do ativador transcricional *Opaco2*.

Os objetivos específicos principais foram:

1. Produzir peptídeos recombinantes, correspondentes à região bZIP da proteína *Opaco2* de *Coix*, contendo substituições de aminoácidos;

2. Estabelecer um método de purificação para os peptídeos recombinantes;
3. Estabelecer uma metodologia para verificar as propriedades de dimerização dos peptídeos recombinantes;
4. Avaliar a influência da quinta repetição do zíper de leucinas nas propriedades de dimerização dos peptídeos recombinantes;
5. Investigar a presença de fatores protéicos em extratos nucleares de endosperma de *Coix* capazes de interagir com possíveis elementos *cis* presentes no promotor do gene *Opaco2* de *Coix*;
6. Avaliar as interações entre os elementos reguladores quanto à especificidade de ligação durante o desenvolvimento da semente;

Durante a realização deste trabalho foram efetuados diversos ensaios na área de biologia molecular. O conhecimento de tais práticas permitiu realizar colaborações com grupos de pesquisa de diversas áreas. Apesar de ainda não ter sido possível redigir artigos científicos com os resultados presentes nesta tese, a

colaboração com um grupo de pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp permitiu realizar uma publicação científica na área de transdução de sinal em animais:

Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus.

José B.C. Carnevali, Rodrigo M. P. Siloto, Inara Ignacchitti, Sigisfredo L. Brenelli, Carla R.O. Carnevali, Adilson Leite, Lício A. Velloso, José A. R. Gontijo, Mário J. A. Saad. (2001). **FEBS Letters** 500: 119-124.

A colaboração do nosso grupo de pesquisa constituiu na análise da interação do regulador transcricional STAT3 em seu sítio alvo de DNA durante a indução por insulina e leptina.

Capítulo

3

Resultados

Produção e purificação das proteínas recombinantes O2Cx-ABL e O2Cx-L

O peptídeo O2Cx-ABL inclui a região ácida SIII, o domínio Básico e o Zíper de Leucinas da proteína Opaco2 de *Coix*, enquanto que o peptídeo O2Cx-L corresponde apenas ao domínio zíper de leucinas desta proteína (Figuras 1.4 e 3.1). Estas proteínas foram produzidas utilizando-se um sistema de expressão de proteínas bacteriano.

Com esta finalidade foram construídos os plasmídeos pETO2Cx-ABL e pETO2Cx-L através da inserção do fragmento *O2Cx-ABL* e *O2Cx-L* no vetor pET3C (Figura 5.1). Os fragmentos foram inseridos na região de policlonagem entre os sítios das enzimas NdeI e BamHI. Neste vetor a expressão do fragmento *O2Cx-ABL* é controlada pelo promotor de bacteriófago T7. Os plasmídeos pETO2Cx-ABL e pETO2Cx-L apresentam o gene de resistência a ampicilina (*bla*) e origem de replicação, ambos originários do pBR322.

Tais plasmídeos foram inseridos em bactérias *E coli* BL21 (DE3) *pLys-S*. Esta linhagem foi utilizada por diversas razões. Ela apresenta deleções dos genes *lon* e *ompT* que codificam proteases indesejáveis no processo de produção de proteínas heterólogas (Grodberg e Dunn, 1988).

A marca "DE3" indica a presença de um bacteriófago integrado no genoma bacteriano responsável pela produção da T7 RNA polimerase. Esta enzima é extremamente seletiva para seu promotor (pT7). O gene que codifica esta polimerase, por sua vez está sob o controle do promotor *lacUV5*, cuja atividade pode ser induzida por IPTG.

A linhagem bacteriana usada contém ainda o plasmídeo *pLys-S*. Esse plasmídeo codifica o gene da lisozima T7, que é uma proteína bifuncional capaz de clivar o envoltório de proteoglicano da parede bacteriana, facilitando desta forma o processo lise das células. A lisozima T7 apresenta também capacidade de ligar-se a T7 RNA polimerase, inibindo sua atividade. A completa inibição da T7 RNA polimerase é especialmente interessante na produção de proteínas tóxicas para as bactérias. O plasmídeo apresenta também um gene confere resistência a cloranfenicol, que é utilizado como marca seletiva.

Conforme mostra a Figura 3.2 a indução com IPTG resultou na produção de proteínas de peso molecular de aproximadamente 18 kDa e 9 kDa compatíveis com os valores preditos de 15,8 kDa e 9,7kDa

para as proteínas O2Cx-ABL e O2Cx-L respectivamente.

As células bacterianas foram lisadas por ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento seguido de um ciclo de sonicação. As proteínas recombinantes permaneceram na fração solúvel do lisado (Figura 3.2, colunas 4). Uma vez que as proteínas bZIP de um modo geral são termo-estáveis (Izawa *et al.*, 1993), a primeira etapa de purificação constituiu-se na incubação do extrato bacteriano a 80°C. Este tratamento, conforme mostrado na Figura 3.2 (colunas 5), permitiu a eliminação de um grande número de proteínas bacterianas, praticamente isolando as proteínas de interesse. Como a proteína O2Cx-ABL seria utilizada em ensaios de ligação com DNA, os ácidos nucleicos foram precipitados através da adição de polietilenoimina (PEI). Após esta etapa, as proteínas foram precipitadas com sulfato de amônio a 80% de saturação e lavadas com a mesma solução de sulfato de amônio para completa remoção de resíduos de PEI.

A etapa seguinte de purificação consistiu-se de um processo de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando resina de troca iônica. Devido ao elevado ponto isoelétrico estimado para as proteínas O2Cx-ABL e O2Cx-L ($pI=9,2$ e $pI=8,14$ respectivamente), optou-se pela resina catiônica POROS HS (PerSeptive Biosystems) em um tampão de pH 7,3

para O2Cx-ABL e 6,8 para O2Cx-L com um gradiente salino de 0 a 2M de NaCl. Os cromatogramas que representam esta etapa já mostram um componente protéico majoritário para cada um dos casos (Figura 3.3). De fato a análise, através de SDS-PAGE, do *pool* das frações eluídas demonstra a presença das proteínas de interesse praticamente puras (Figura 3.2, colunas 6).

A última etapa do processo de purificação também foi realizada através de CLAE, utilizando-se a resina de fase reversa POROS R2 (PerSeptive Biosystems) em um gradiente de acetonitrila. Os cromatogramas obtidos (Figura 3.4) mostram um componente majoritário com tempo de retenção entre 25 e 27 minutos para O2Cx-ABL e 24 a 28 minutos para O2Cx-L. A análise em SDS-PAGE das frações eluídas confirmou o elevado grau de pureza das proteínas O2Cx-ABL e O2Cx-L (Figura 3.2, colunas 7).

Devido à natureza volátil do solvente utilizado, as frações contendo as proteínas recombinantes foram reunidas, distribuídas em frações de 0,5ml, liofilizadas e armazenadas a -20°C. A análise espectrofométrica da amostra indicou a recuperação final de 1,8mg para O2Cx-ABL e 2,5mg para O2Cx-L.

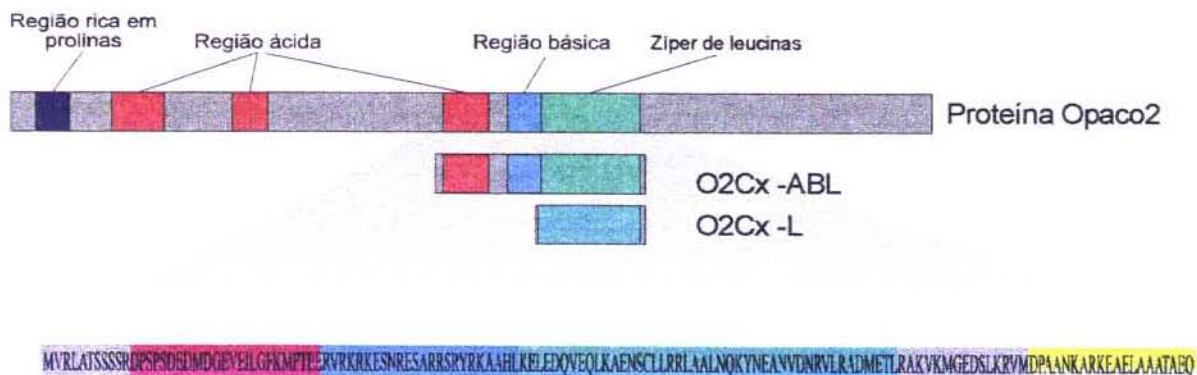


Figura 3.1: Representação esquemática das proteínas Opaco2, O2Cx-ABL e O2Cx-L. Os diferentes domínios da proteína Opaco2 de *Coix* e nas proteínas recombinantes O2CX-ABL e O2Cx-L estão representados em roxo para a região rica em prolina, vermelho para os domínios ácidos, azul para o domínio básico e verde para o Zíper de Leucinas. Abaixo dos esquemas encontra-se representada a sequência da proteína recombinante O2Cx-ABL, a cor amarela indica a sequência de aminoácidos originários plasmídeo pET3C.

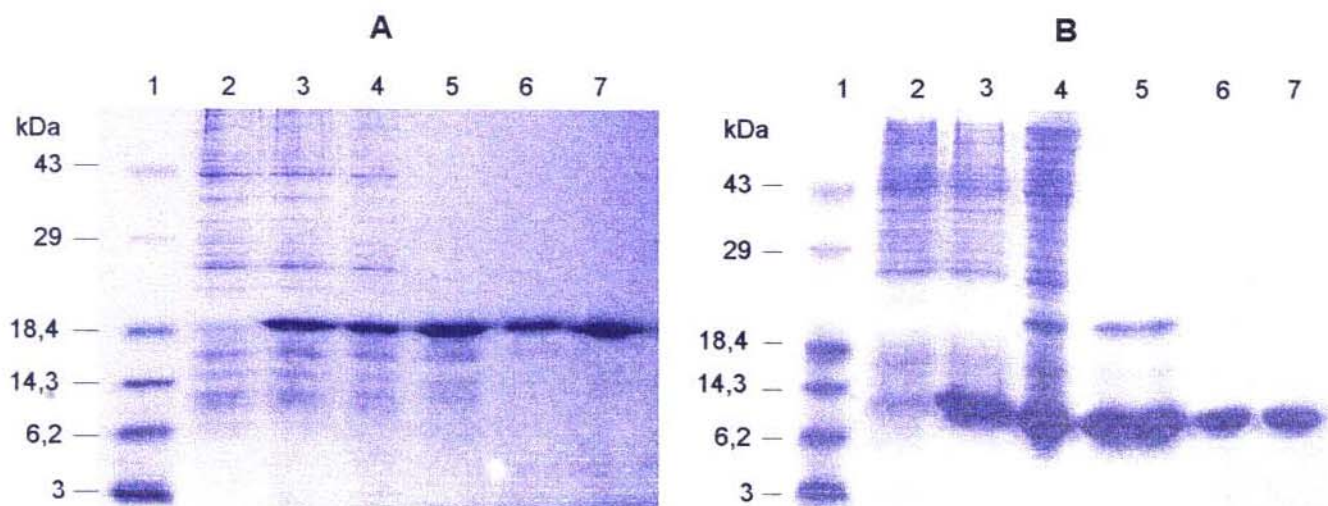


Figura 3.2: Análise eletroforética das etapas de produção e purificação da proteína recombinante O2Cx-ABL e O2Cx-L produzidas em *E. coli*. Em **A** encontra-se: 1. Padrão de pesos moleculares "low" (Gibco BRL). 2. Extrato de bactérias transformadas com o plasmídeo pETO2Cx-ABL antes da indução, 3. Extrato de bactérias transformadas com o vetor pETO2Cx-ABL e induzidas com IPTG, 4. Fração solúvel do extrato bacteriano, 5. Fração solúvel após desnaturação térmica a 80°C por 3 minutos, 6. Após a primeira etapa cromatográfica de purificação em resina de troca iônica POROS HS (PerSeptive Biosystems), 7. Após a segunda etapa cromatográfica de purificação em resina de interação hidrofóbica POROS R2 (PerSeptive Biosystems). Em **B** encontra-se o mesmo que em **A**, porém com o plasmídeo pETO2Cx-L.

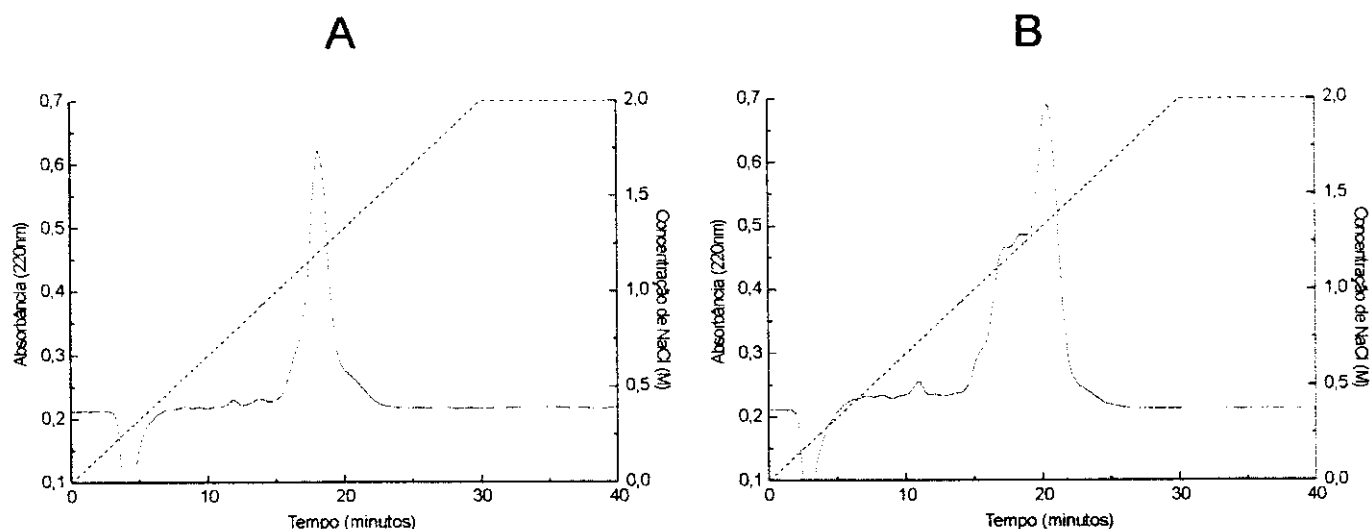


Figura 3.3: Cromatograma do ensaio de CLAE utilizando resina de troca iônica. Foi utilizada coluna AP-1 (Waters) contendo 10x80 mm de resina POROS HS (PerSeptive). Em **A** foi injetada amostra de 10ml da proteína O2Cx-ABL, lavando-se a coluna com 50ml de Tampão Hepes 25mM pH7,3 contendo 1mM de EDTA e 5mM de DTT. A proteína foi eluída com um gradiente salino de 0 a 2M de NaCl no mesmo tampão. Em **B** foi injetada a amostra de 10ml da proteína O2Cx-L, lavando-se a coluna com 50ml de Tampão MES 25mM pH6,8 contendo 1mM de EDTA e 5mM de DTT. O fluxo de 2ml/min foi mantido durante todas as etapas das cromatografias. A linha em azul representa a absorbância à 220nm e a linha pontilhada representa concentração de NaCl (M) injetada na coluna.

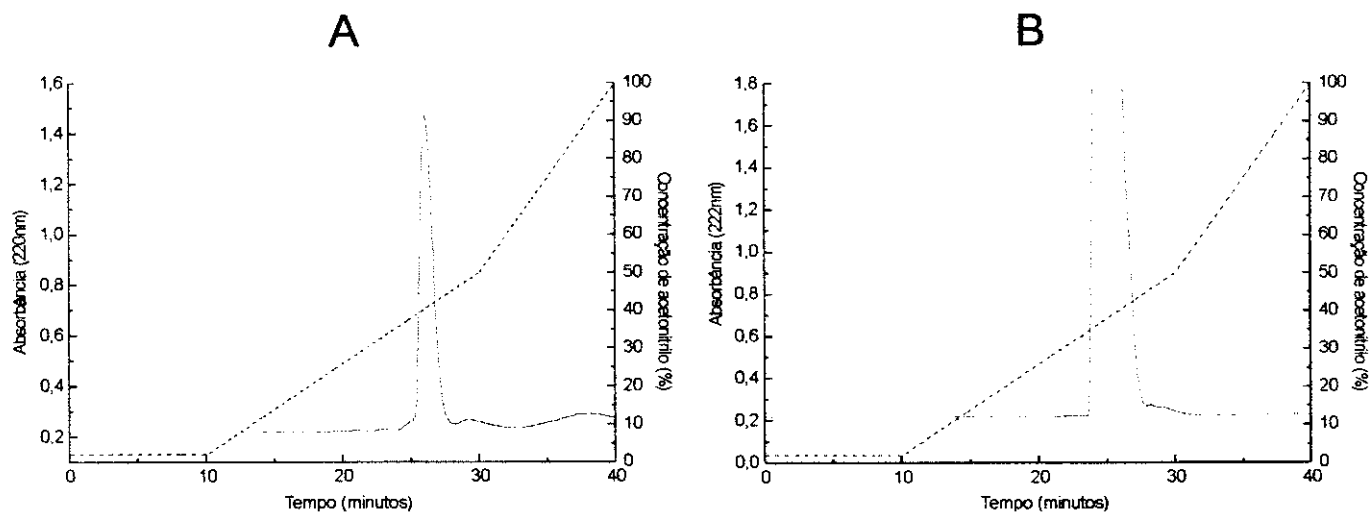


Figura 3.4: Cromatograma do ensaio de CLAE em fase reversa. Foi utilizada coluna AP-1 (Waters) contendo 10x80 mm de resina POROS R2 (PerSeptive). Em **A** foi injetada amostra de 10ml da proteína O2Cx-ABL e em **B** foi injetado o mesmo volume de proteína O2Cx-L. Após lavagem da coluna com 50 ml de solução 2% de acetonitrila contendo 0,065% de TFA. As proteínas foram eluídas com um gradiente de 2 a 50% de acetonitrila em 30min, e 50 a 100% de acetonitrila em 10min. O fluxo de 2ml/min foi mantido durante todas as etapas da cromatografia. A linha em azul representa a absorbância à 220nm e a linha pontilhada representa percentagem de acetonitrila injetada na coluna.

Análise funcional da proteína O2Cx-ABL purificada

A atividade da proteína O2Cx-ABL purificada foi confirmada através da sua capacidade de ligação a sítios alvo no DNA. Com esta finalidade, foram realizados ensaios de retardamento da mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida (EMSA) com fragmentos de DNA do promotor de α -coixina contendo sítios de ligação para a proteína Opaco2: o sítio *GCN4 like motif* (GLM) (5'-TGACTA-3') e o sítio palíndromo 5'-GACATGTC-3' (Yunes, *et al.*, 1994b). Representando os diferentes sítios alvos foram utilizados os fragmentos de DNA CxPCxN, CxPCxN-glm e CxPCxN-palind. De acordo a Figura 3.5 o fragmento CxPCxN,

apresenta os dois sítios alvos intactos. Os fragmentos CxPCxN-glm e CxPCxN-palind apresentam substituições que inativam isoladamente os sítios alvos palíndromo e GLM, respectivamente.

Conforme mostra a Figura 3.6 os ensaios de EMSA com os fragmentos CxPCxN-glm e CxPCxN-palind resultaram na formação de apenas um complexo do DNA:proteína, enquanto que o fragmento CxPCxN resultou na formação de dois complexos de mobilidade eletroforética distinta.

Estes resultados indicam que a proteína O2Cx-ABL recombinante purificada encontra-se ativa, mantendo a capacidade de interagir com as seqüências alvo de DNA.

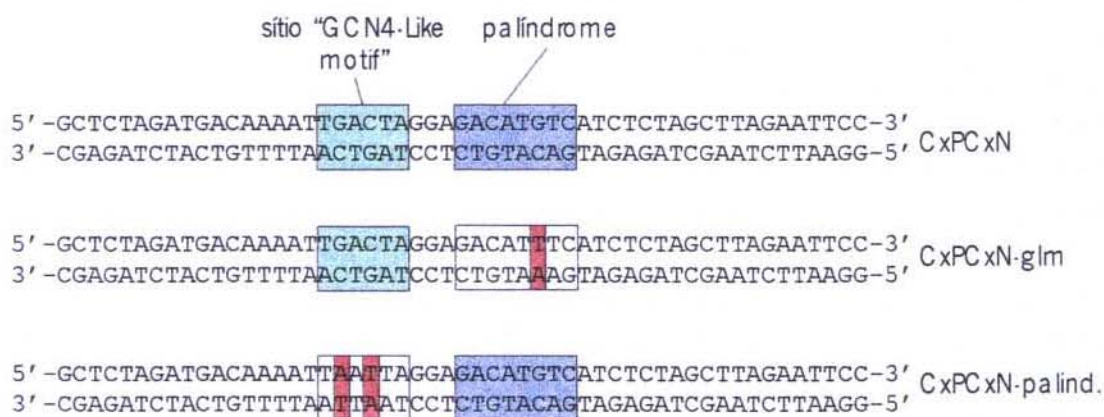


Figura 3.5: Fragmentos de DNA utilizados nos ensaios de EMSA com a proteína O2Cx-ABL purificada. O fragmento de DNA dupla fita CxP-CxN apresenta os sítios de ligação para Opaco2 *GCN4-like-motif* (GLM) (5'-TGACTA-3') em verde e o palíndromo (5'-GACATGTC-3') em azul. O fragmento CxP-CxN glm apresenta apenas o sítio *GCN4-like-motif* (GLM) e o fragmento CxP-CxN palind apresenta apenas o palíndromo. As substituições nos fragmentos CxP-CxN glm e CxP-CxN palind estão assinaladas em vermelho (Vettore 1998, Yunes *et al.*, 1994b).

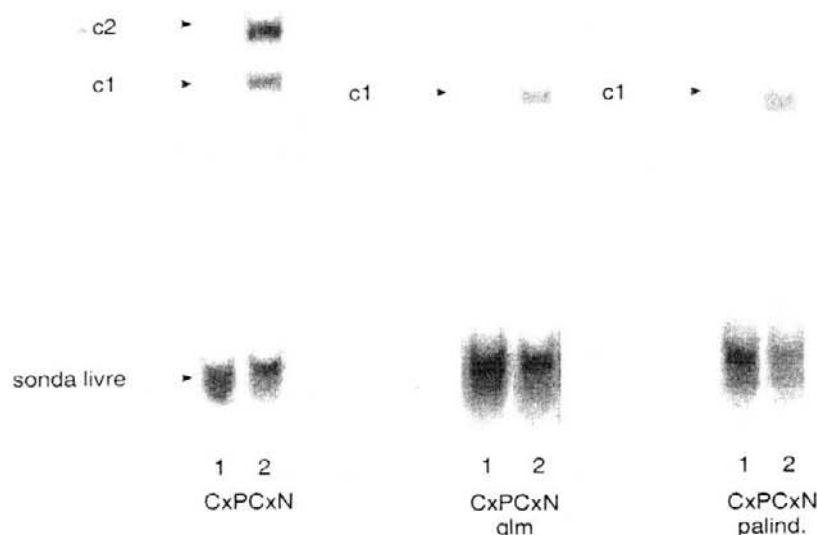


Figura 3.6: Ensaios de EMSA com a proteína O2Cx-ABL recombinante purificada. Nas colunas 1 foram utilizados 200 fmoles de cada sonda. Nas colunas 2 foram utilizados 200 fmoles da sonda acrescidos de 4 ng da proteína O2Cx-ABL recombinante purificada. As posições de migração da sonda livre e dos complexos C1 e C2 encontram-se assinaladas.

Determinação da estrutura secundária da proteína O2CxABL recombinante

A estrutura secundária da região bZIP de Opaco2 de *Coix* foi analisada através de ensaios de dicroísmo circular.

A Figura 3.7A mostra o espectro de dicroísmo circular da proteína O2Cx-ABL. De acordo com Greenfield e Fasman (1969) os valores mínimos de elipticidade encontrados em 222 e 208 nm indicam que a proteína O2Cx-ABL assume uma estrutura secundária do tipo α -hélice.

A adição de fragmentos de DNA correspondentes ao sítio de ligação de Opaco2 (CxPCxN) resultou em redução adicional de elipticidade. Este resultado

indica aumento da extensão da α -hélice na presença de DNA.

Com a finalidade de verificar a mudança do estado de enovelamento da proteína O2Cx-ABL foi realizada uma curva de desnaturação térmica com a proteína O2CxABL (Figura 3.7B). Nesta curva é possível observar a mudança de estado entre proteínas enoveladas e proteínas desenoveladas. A temperatura de desnaturação foi de $37,52^{\circ}\text{C} \pm 0,96$, sendo calculada a partir da regressão sigmoidal. A constante de equilíbrio calculada foi de $3,73 \times 10^{-6}\text{M}$ de acordo com a metodologia descrita por Marky e Breslauer (1987).

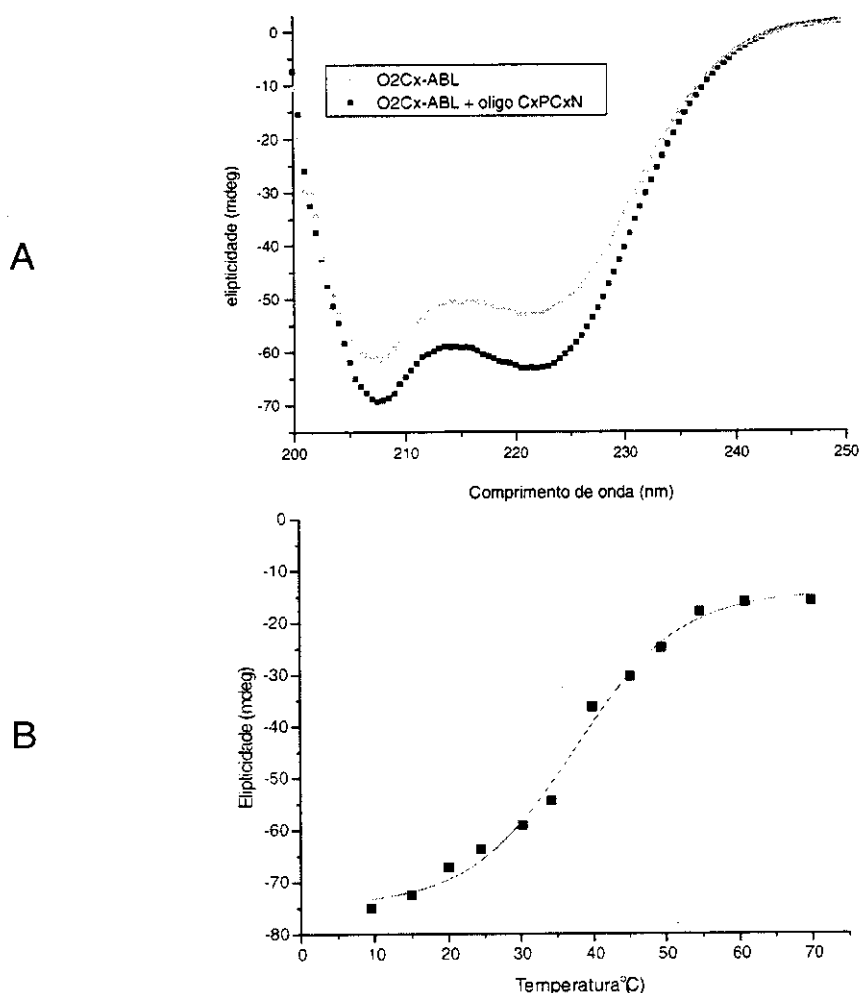


Figura 3.7: Análises de dicroísmo circular com a proteína O2CxABL. Em **A** encontra-se o espectro de dicroísmo circular da proteína O2Cx-ABL (22 μ M) em tampão fosfato (100mM) contendo 5mM de DTT na ausência de DNA (○) e na presença de 11 μ M de DNA específico (■). Em **B** encontra-se a curva de desnaturação térmica da proteína O2Cx-ABL calculada a 222nm. Em vermelho está representada a regressão sigmoidal.

Ensaio de dimerização das proteínas recombinantes

Os experimentos de dimerização foram inicialmente realizados com o objetivo de estabelecer uma metodologia capaz de distinguir a formação de homodímeros e heterodímeros das proteínas O2Cx-ABL e O2Cx-L. Para isto foi escolhida a técnica de SDS-PAGE.

Para manter a estabilidade dos dímeros nas condições desnaturantes do SDS-PAGE, foi usado o *cross-linker* BS³ (Bis-Sulfosuccinimidyl) (Pierce). A

quantificação das proteínas em seus diferentes estados de dimerização foi possibilitada pela incorporação de fósforo radioativo nas proteínas O2Cx-ABL pela enzima Caseino Quinase II (recombinante de milho). O sítio de fosforilação para esta enzima encontra-se no domínio Básico da proteína O2Cx-ABL e por isso não deve alterar as propriedades de dimerização mediada pelo zíper de Leucinas.

Conforme mostra a Figura 3.8A, na ausência de *cross-linker* a proteína

O2Cx-ABL migra predominantemente na posição monômero. A adição de BS³ na solução promove a formação de homodímeros estáveis nas condições desnaturantes de SDS-PAGE (Figura 3.8A segunda coluna). Adicionando-se quantidades crescentes da proteína O2Cx-L (não marcada radioativamente) verifica-se a formação de bandas

intermediárias entre monômeros e homodímeros (colunas 3 a 10). Tais bandas correspondem aos heterodímeros entre O2Cx-ABL e O2Cx-L. A quantificação das bandas correspondentes aos heterodímeros (Figura 3.8B) mostra que a titulação das proteínas O2Cx-L atingiu o ponto de saturação.

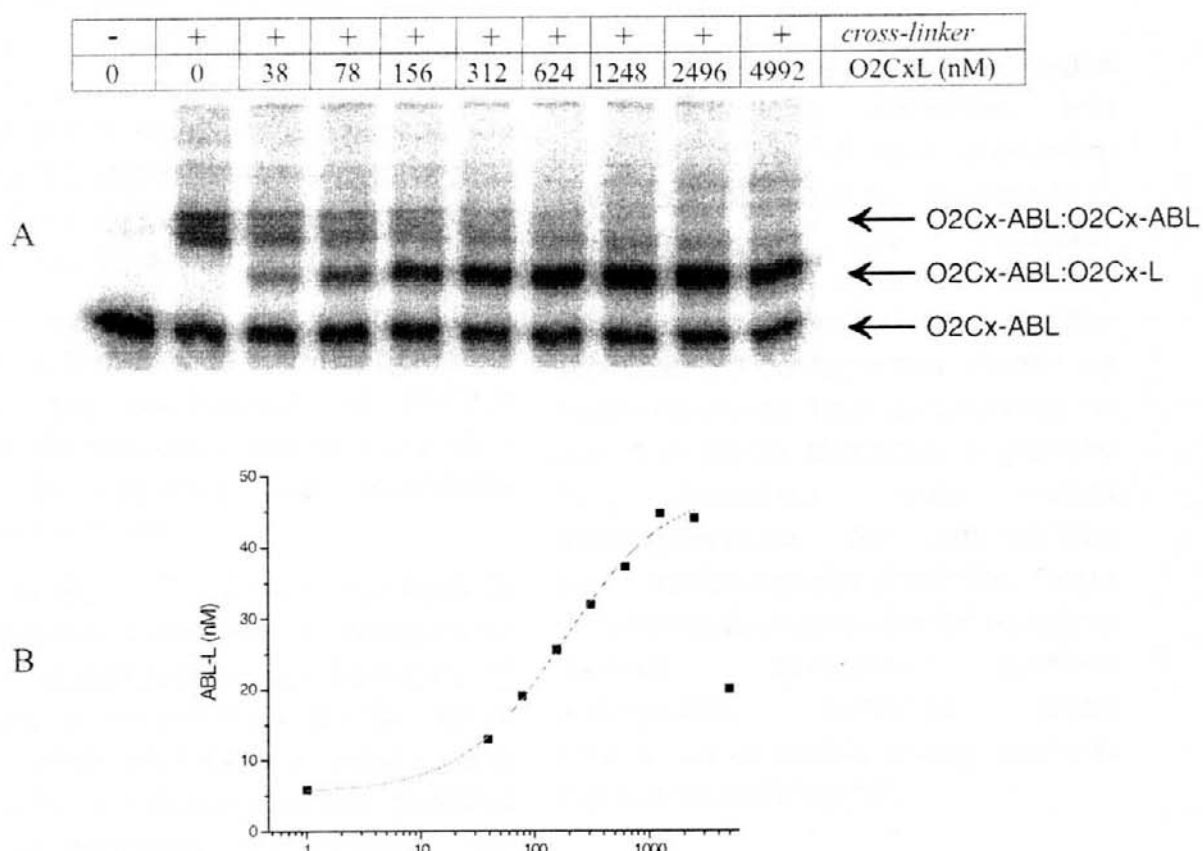


Figura 3.8: Análise da dimerização das proteínas O2CxABL e O2CxL. Foram feitas reações de estabilização dos dímeros com 630nM de O2Cx-ABL, acrescentando-se quantidades crescentes da proteína L. Foi usado 1 mM de BS3 como *cross-linker* e as reações foram incubadas a 15 °C, por 30 minutos. Em **A** está representada a autoradiografia do gel de SDS-PAGE. Em **B** encontra-se a curva de saturação referente à quantificação das bandas correspondentes aos.

Estudo dos mecanismos de dimerização do ativador Opaco2

A eficácia da metodologia de análise de dímeros permitiu a realização de ensaios visando estudar os mecanismos de dimerização da proteína Opaco2 de *Coix*.

Para estudar tais mecanismos foram inicialmente exploradas as diferenças entre as proteínas bZIPs de origem vegetal relacionadas filogeneticamente à Opaco2 de *Coix*. A Figura 3.9 A mostra o alinhamento da Família VIII das bZIPs de origem vegetal segundo a classificação de Vincentz *et al.* (manuscrito em preparação).

O alinhamento da Figura 3.9 A mostra a similaridade entre as bZIPs, na região que corresponde ao domínio básico. Na sequência que corresponde o zíper de Leucinas, são observadas várias diferenças.

Na Figura 3.9 B são mostrados os aminoácidos presentes nas posições "e" e "g" responsáveis pela formação de interações eletrostáticas do tipo ponte salina entre as α -hélices. Assim como esperado, na maioria destas posições são conservados aminoácidos com

cargas positivas (arginina e lisina em azul) ou negativas (ácido aspártico e glutâmico em vermelho), capazes de formar pontes salinas. Também são conservados aminoácidos capazes de formar ponte de hidrogênio (asparagina, glutamina, serina e treonina). Na posição "e" da terceira e quinta repetições são encontrados porém aminoácidos de cadeias laterais hidrofóbicas.

Na Figura 3.9 C são mostrados os aminoácidos presentes nas posições "a" e "d" que promovem interações hidrofóbicas, orientando o posicionamento das α -hélices. Observa-se neste caso que nas três primeiras repetições tais aminoácidos são bastante conservados. Porém na região central do zíper de Leucinas, na quarta e quinta repetição, a posição "d" apresenta uma certa heterogeneidade de aminoácidos (área destacada em amarelo). Nesta mesma região, a posição "a" da quinta repetição apresenta somente aminoácidos contendo anéis aromáticos na cadeia lateral ausentes nas outras posições "a".

A

```

|<- região básica ->||<-----ziper de leucinas----->|
OHP1Zm  RLQRRKQSNRESARRSRSRKAAHLNELEAQAQLRVENSSLLRRLADVNQKFNEAAVDNRVLKADVETLRKVKMAEDSVKRV
OHP2Zm  RQQRKQSNRESARRSRSRKAAHLNELEAQAQLRVENSSLLRRLADVNQKFNEAAVDNRVLKADVETLRKVKMAEDSVKRV
REBOs   RLQRRKQSNRESARRSRSRKAAHLNELEAQAQLRVENSSLLRRLADVNQKYNDAVDNRVLKADVETLRKVKMAEDSVKRV
BLZ1Hv  RLRRRKQSNRESARRSRSRKAAHLNELEAQAQLRVENSSLLRRLADVNQKYNDAVDNRVLKADVETLRKVKMAEDSVKRV
RISBZ1Os KVKRRKESNRESARRSRSRKAAHLKDEEQVSLRVENSSLLRRLADANQKYSAAIDNRVLMADIEALRAKVRMAEESVKMVT
O2Jt    RVRKRKESNRESARRSRSRKAAHLKELEDQVEQLKAENSCLLRRLAALNQKYNEANVDNRVLKADMETLRKVKMGEDSLKRV
O2Sb    RVRKRKESNRESARRSRSRKAAHLKDEEQVSLRVENSSLLRRLAALNQKYNEANVDNRVLKADMETLRKVKMGEDSLKRV
O2Zm    RVRKRKESNRESARRSRSRKAAHLKELEDQVQAQLKAENSCLLRRLAALNQKYNDANVDNRVLKADMETLRKVKMGEDSLKRV
SPATa   KANKRKESNRDSARRSRSRKAAHAKLEEQVSLRVANNLSMRHLADVSHRYVNISIDNRVLKANVETLEAKVKMAEETMKRV
BLZ2Hv  KVNKRKESNRDSARRSRSRKAAHAKLEEQVSLRVANNLSMRHLADVSHRYVNTAIDNRVLKANVETLEAKVKMAEETMKRV
BZO2H4At KRARRMLSNRESARRSRSRKAAHLKDEEQVSLRVENSSLLRRLAALNQKYNEANVDNRVLKADMETLRKVKMGEDSLKRV
BZO2H1At KKSRRMLSNRESARRSRSRKAAHLKDEEQVSLRVENSSLLRRLAALNQKYNEANVDNRVLKADMETLRKVKMGEDSLKRV
HBF1Gm  KRVRRMLSNRESARRSRSRKAAHLKDEEQVSLRVENSSLLRRLAALNQKYNEANVDNRVLKADMETLRKVKMGEDSLKRV
CPRF2Pc KRVRRMLSNRESARRSRSRKAAHLKDEEQVSLRVENSSLLRRLAALNQKYNEANVDNRVLKADMETLRKVKMGEDSLKRV
BZO2H3At KRVRRMLSNRESARRSRSRKAAHLKDEEQVSLRVENSSLLRRLAALNQKYNEANVDNRVLKADMETLRKVKMGEDSLKRV
BZO2H2At KRIRRMVSNRESARRSRSRKAAHLKDEEQVSLRVENSSLLRRLAALNQKYNEANVDNRVLKADMETLRKVKMGEDSLKRV
RITA1Os KRMRRMVSNRESARRSRSRKAAHLKDEEQVSLRVENSSLLRRLAALNQKYNEANVDNRVLKADMETLRKVKMGEDSLKRV
RISBZ4Os KRVRRMVSNRESARRSRSRKAAHLKDEEQVSLRVENSSLLRRLAALNQKYNEANVDNRVLKADMETLRKVKMGEDSLKRV
RISBZ5Os KRIRRMVSNRESARRSRSRKAAHLKDEEQVSLRVENSSLLRRLAALNQKYNEANVDNRVLKADMETLRKVKMGEDSLKRV
:  :*  ***:***:**  **  ::  **  .  :  *  .  :  :  :  *  :  *  ::*  .  **..*
Posição  abcdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcde
Repetição |----->|----->|----->|----->|----->|----->|----->|----->
          1         2         3         4         5         6         7         8

```

B

```

|<- região básica ->|<-----ziper de leucinas----->|
OHP1Zm  E Q   R E   L R   N K   A D   K D   R K   E S   T
OHP2Zm  E Q   R E   L R   N K   A D   K D   R K   E S   T
REBOs   E Q   R E   L R   N K   A D   K D   R K   E S   T
BLZ1Hv  E Q   R E   L R   N K   A D   K D   R K   E S   T
RISBZ1Os E Q   R E   L R   N K   A D   M D   R K   E S   T
O2Jt    E Q   K E   L R   N K   N D   R D   R K   E S   M
O2Sb    E Q   K E   L R   N K   T D   K D   R K   E S   I
O2Zm    E Q   K E   L R   N K   N D   R D   R K   E S   I
SPATa   E Q   R A   M H   S R   S D   K N   E K   E T   T
BLZ2Hv  E Q   R A   M H   S R   A D   K N   E K   E T   T
BZO2H4At D Q   R E   I R   N K   A D   R D   R K   E T   T
BZO2H1At E Q   K E   L Q   N K   A G   K D   R K   E T   T
HBF1Gm  E Q   R E   L R   S K   A D   K D   R K   E T   T
CPRF2Pc E Q   R E   L R   S R   A D   K D   R K   E T   T
BZO2H3At E Q   R E   M G   T T   S E   K N   R K   E T   T
BZO2H2At E Q   K D   Y Q   T Q   G N   K D   R K   E L   S
RITA1Os E Q   R E   F Q   N Q   V D   K D   R K   E M   A
RISBZ4Os E Q   R E   F Q   N Q   V D   K D   R K   E M   A
RISBZ5Os E Q   K E   F Q   S Q   V D   K D   R K   E M   A
:  :*  .  :  *  .  :  :  :  *  :  *  ::*  .  **..*
Posição  abcdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcde
Repetição |----->|----->|----->|----->|----->|----->|----->|----->
          1         2         3         4         5         6         7         8

```

continua

C

	<- região básica ->										<------zíper de leucinas----->									
OHP1Zm	L	L	V	L	N	L	L	V	F	A	N	L	V	L	V	A	V	V	V	V
OHP2Zm	L	L	V	L	N	L	L	V	F	A	N	L	V	L	V	A	V	V	V	V
REBOs	L	L	V	L	N	L	L	V	Y	A	N	L	V	L	V	A	V	V	V	V
BLZ1Hv	L	L	V	L	N	L	L	V	Y	A	N	L	V	L	V	A	V	V	V	V
RISBZ1Os	L	L	V	L	N	L	L	A	Y	A	N	L	I	L	V	A	V	V	V	V
O2Jt	L	L	V	L	N	L	L	L	Y	A	N	L	M	L	V	G	L	V	V	V
O2Sb	L	L	V	L	N	L	L	L	Y	A	N	L	M	L	V	G	L	I	V	V
O2Zm	L	L	V	L	N	L	I	L	Y	A	N	L	M	L	V	G	L	V	V	V
SPATa	A	L	V	L	N	L	L	V	Y	I	N	L	V	L	V	A	M	V	V	V
BLZ2Hv	T	L	V	L	N	L	L	V	Y	T	N	L	V	L	V	A	M	I	V	V
BZO2H4At	M	F	V	L	H	L	L	M	Y	A	N	L	I	L	V	A	V	V	V	V
BZO2H1At	T	L	V	L	H	L	L	M	Y	A	N	L	I	L	V	A	V	V	V	V
HBFIgM	L	L	V	L	N	L	L	I	Y	A	N	L	V	L	V	A	V	V	V	V
CPRF2Pc	M	L	V	L	N	L	L	I	Y	A	N	L	I	M	V	A	V	V	V	V
BZO2H3At	L	L	V	L	N	L	L	V	F	A	N	L	I	L	V	A	V	L	V	V
BZO2H2At	L	L	V	L	N	L	L	A	F	A	N	L	V	L	V	A	V	G	V	V
RITA1Os	L	L	V	L	N	L	L	A	F	A	N	L	V	L	V	A	V	G	V	V
RISBZ4Os	L	L	V	L	N	L	L	A	F	S	N	L	V	L	V	A	V	G	V	V
RISBZ5Os	L	L	V	L	N	L	L	S	F	A	N	L	V	L	V	A	V	A	V	V
			*	*		*					*	*			*					
Posição	abcde f g a b c d e f g a b c d e f g a b c d e f g a b c d e f g a b c d e f g a b c d e f g																			
Repetição	-----> -----> -----> -----> -----> -----> -----> ----->																			
	1		2		3		4		5		6		7		8					

Figura 3.9: Comparação da sequência de aminoácidos das bZIPs vegetais pertencentes à Família VIII segundo a classificação de Vincentz *et al* (não publicado). A sequência de cada região bZIP foi alinhada usando CLUSTAL W. Os asteriscos indicam os resíduos conservados em todas as sequências. As posições de cada aminoácido bem como o número de repetições foram obtidos usando o programa Coils2 (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html) (Lupas *et al.*, 1991). As sequências das proteínas foram cedidas pelo Prof. Dr. Michel Vincentz. Os números de acesso para cada proteína no *National Center of Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) são: OHP1Zm (JQ2147), OHP2Zm (JQ2148), REBOs (BAA36492), BLZ1Hv (CAA71795), RISBZ1Os (BAB39173), O2Jt (S42493), O2Sb (S56073), O2Zm (S06022), SPATa (T06767), BLZ2 (CAA71795), BZO2H4At (T47621), BZO2H1At (AAG25727), HBF1Gm (T07154), CPRF2Pc (S16321), BZO2H3At (AAF67360), BZO2H2At (AAG25728), RITA1Os (T03990), RISBZ4Os (BAB39174) e RISBZ5Os (BAB39175). Em A encontra-se o alinhamento da região bZIP de todas as proteínas. Em B, destacam-se os aminoácidos das posições "e" e "g" da α -hélice. Em vermelho estão os aminoácidos de caráter ácido e em azul os aminoácidos de caráter básico. Em C, destacam-se os aminoácidos das posições "a" e "d" da α -hélice.

Com o objetivo de avaliar a influência dos aminoácidos das posições "a" e "d" da quinta repetição na especificidade de dimerização, foram realizados estudos de efeito de substituição destes resíduos.

Para isto, foram elaboradas substituições nas proteínas O2Cx-ABL e O2Cx-L. Tais mutações pontuais foram obtidas por PCR, conforme descrito em "Materiais e Métodos". A Figura 3.10A

mostra as substituições realizadas nas proteínas O2Cx-ABL e O2Cx-L.

As proteínas mutantes foram produzidas e purificadas conforme descrito para O2Cx-ABL e O2Cx-L. Nos experimentos de dimerização as proteínas normais (não mutadas) foram denominadas O2Cx-ABLns e O2Cx-Lns (ns=não substituída).

A Figura 3.10B mostra uma análise das proteínas purificadas em SDS-PAGE. As substituições não

causaram alteração no padrão de migração em SDS-PAGE em nenhum mutante. Nota-se nesta Figura que as proteínas normais e mutantes apresentaram alto grau de pureza, permitindo a realização de ensaios precisos de análise de dimerização. Nos ensaios para determinação da influência do resíduo na posição "a", foram realizadas titulações com quantidades crescentes da proteína O2Cx-Lns, mantendo a mesma quantidade de proteínas O2Cx-ABL (normal e mutantes). As curvas de saturação referentes aos heterodímeros (Figura 3.11A) mostram que a dimerização foi um pouco maior para a proteína O2Cx-ABLV, onde um resíduo de valina substitui o de tirosina normalmente presente na posição "a" (Figura 3.10A). A substituição deste resíduo por outro de fenilalanina (proteína O2Cx-ABLF) causou diminuição na taxa de dimerização, enquanto que a substituição pelo resíduo de serina (proteína O2Cx-ABLS) inibiu

significativamente a formação de heterodímeros (Figura 3.11A).

O mesmo procedimento foi realizado para avaliar a influência do resíduo na posição "d" da quinta repetição no Zíper de Leucinas. Neste caso foi analisada a taxa de dimerização da proteína O2Cx-ABLns com as proteínas O2Cx-L normal e mutantes (Figura 3.11B). As curvas de saturação neste caso mostram que substituição do resíduo de alanina por resíduos de leucina e isoleucina (proteínas O2Cx-LI e O2Cx-LL) causou aumento na taxa de dimerização. A substituição por resíduos de serina e treonina (proteínas O2Cx-LT e O2Cx-LS) causou diminuição na formação de heterodímeros.

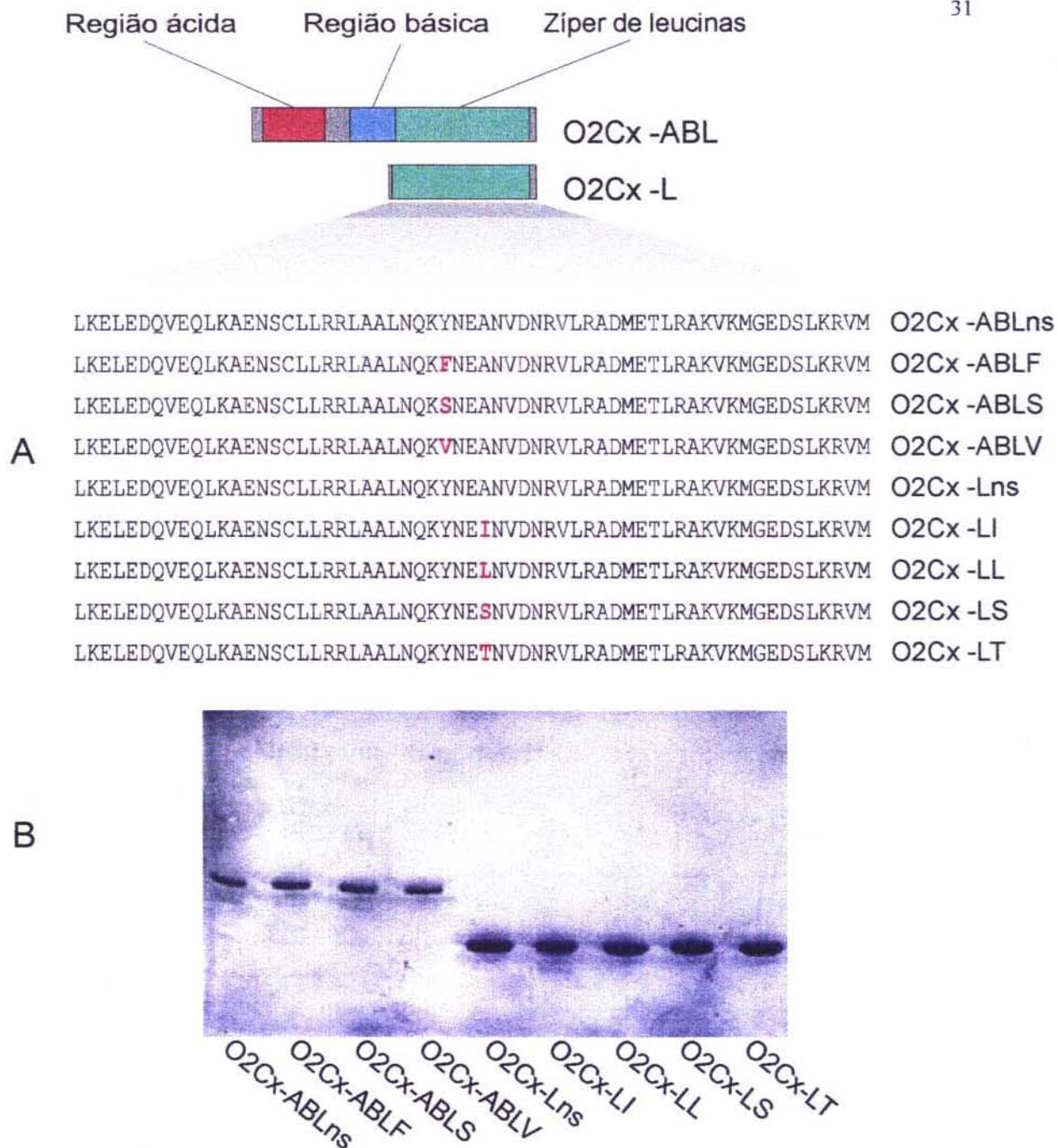


Figura 3.10: Proteínas O2Cx-ABL e O2Cx-L normais e mutantes. Em **A** encontra-se uma representação esquemática dos diferentes domínios nas proteínas recombinantes O2CX-ABL e O2Cx-L onde em vermelho está representado o domínio ácido, em azul o domínio básico e em verde o Zíper de Leucinas. Abaixo dos esquemas encontram-se representadas as seqüências referentes ao Zíper de Leucinas das proteínas normais e mutantes, com destaque em vermelho para os aminoácidos substituintes nas mutações pontuais. Ao lado de cada seqüência encontra-se o nome da proteína recombinante. As proteínas com terminação "ns" equivalem à proteína normal, sem qualquer substituição. Em **B** encontra-se a análise eletroforética em SDS-PAGE (15%) das proteínas recombinantes purificadas.

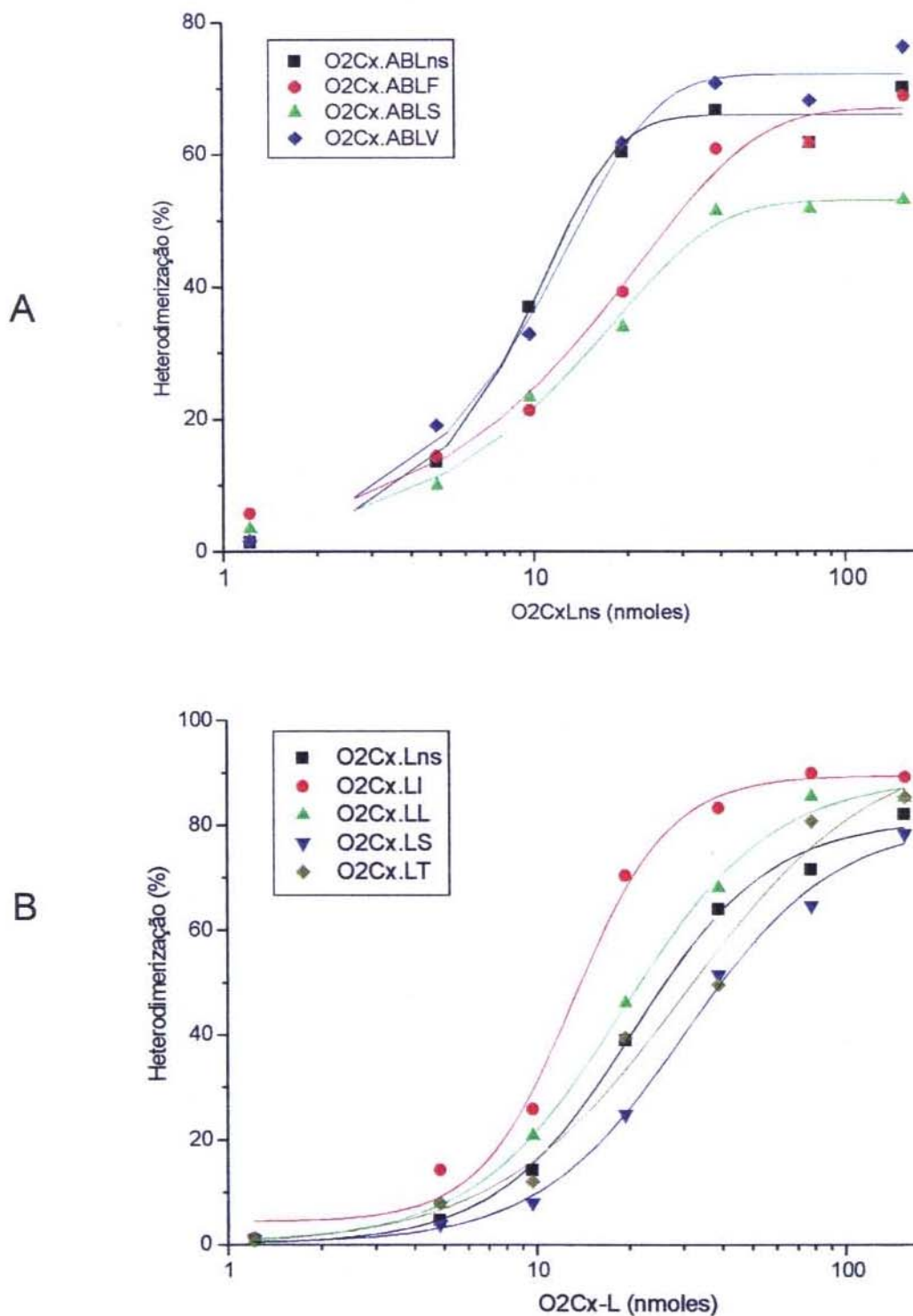
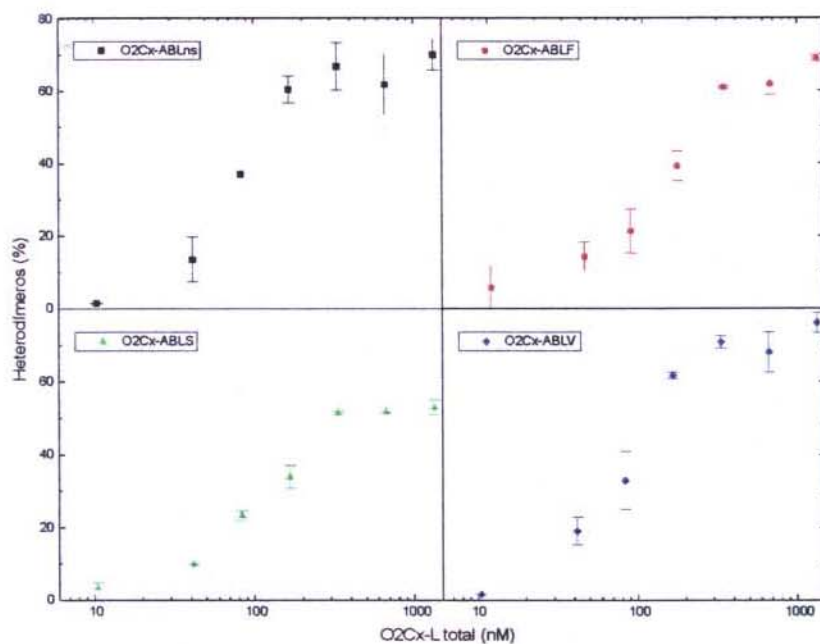


Figura 3.11: Comparação das propriedades de dimerização das proteínas mutantes. Foram feitas reações de estabilização dos dímeros com 125nM das proteínas O2CxABL (normal ou mutante) marcadas por fosforilação, acrescentando-se quantidades crescentes da proteína O2Cx-Lns (normal ou mutante). Foi usado 1 mM de BS3 como *cross-linker* e as reações foram incubadas a 15 °C, por 30 minutos. Em **A** encontra-se representação gráfica da dimerização entre a proteína O2Cx-Lns e proteínas O2Cx-ABL (normal ou mutantes). Em **B** encontra-se representação gráfica da dimerização entre O2Cx-L (normal ou mutantes) e O2Cx-ABLns.

A



B

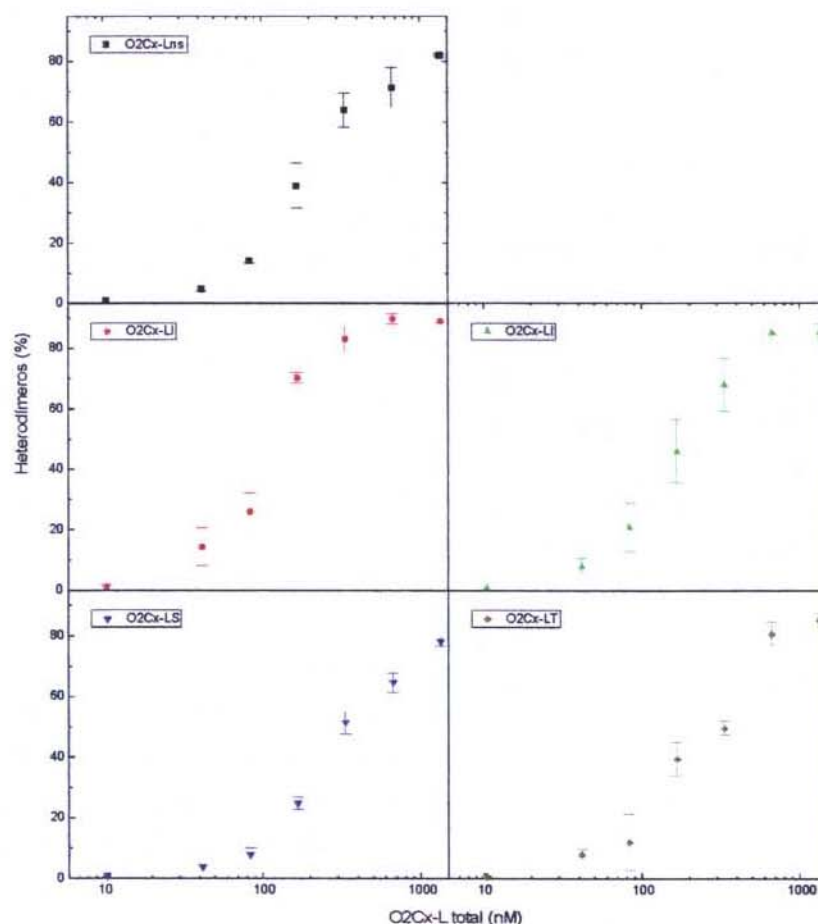


Figura 3.12: Análise da dimerização das proteínas mutantes. São apresentadas as mesmas reações descritas na Figura 3.11, mostrando porém o erro experimental encontrado em cada reação, realizada em duplicata. Em **A** encontra-se representação gráfica da dimerização entre a proteína O2Cx-Lns e proteínas O2Cx-ABL (normal ou mutantes). Em **B** encontra-se representação gráfica da dimerização entre O2Cx-L (normal ou mutantes) e O2Cx-ABLns.

Interação de proteínas nucleares com o promotor do gene *Opaco2*

A interação de proteínas nucleares do endosperma de *Coix* com o promotor do gene *Opaco2* foi analisada inicialmente através de *EMSA*. Nestes experimentos foram utilizados fragmentos de DNA correspondentes a regiões previamente identificadas por Vettore (1998), como regiões possivelmente envolvidas na regulação da expressão do gene *Opaco2* de *Coix*.

A Figura 3.13 resume os resultados do efeito de diversas deleções na região promotora do gene *Opaco2* de *Coix* na expressão transitória do gene repórter *gus*, conforme descrito por Vettore (1998). A Figura 3.13 mostra ainda a posição relativa dos diversos elementos deste promotor e a posição dos fragmentos PO2Cx-RI, PO2Cx-RII, PO2Cx-Gbox utilizados como sondas nos ensaios de *EMSA*.

A Figura 3.14 mostra a formação de complexos de DNA-proteína com migração retardada nos ensaios de *EMSA* com as três sondas. Estes resultados demonstram a presença de fatores protéicos nos extratos nucleares de endosperma *Coix* imaturo capazes de interagir com sítios alvos presentes nas três sondas de DNA testadas.

A presença de duas bandas, uma de baixa (C1) e outra de alta mobilidade eletroforética (C2) no ensaio com a sonda pO2Cx-RI (Figura 3.14A) Já as outras duas sondas produziram apenas um complexo cada, de baixa mobilidade para a sonda pO2Cx-RII (Figura 3.14B) e de alta mobilidade para a sonda pO2Cx-Gbox (Figura 3.14c).

Observa-se ainda na Figura 3.14 que a taxa de formação dos complexos DNA-proteína é dependente do estágio de desenvolvimento do endosperma.

A formação dos complexos C1 e C2 com a sonda pO2CxRI aumenta do estágio I até o estágio III, quando atinge sua concentração máxima, diminuindo no estágio IV e desaparecendo no estágio V (Figura 3.14A). A formação do complexo com a sonda pO2CxRII aumenta do estágio I até o estágio III, diminuindo abruptamente no estágio IV (Figura 3.14B). O complexo com a sonda pO2CxGbox atinge o nível máximo no estágio II, diminuindo gradativamente até o estágio IV (Figura 3.14C).

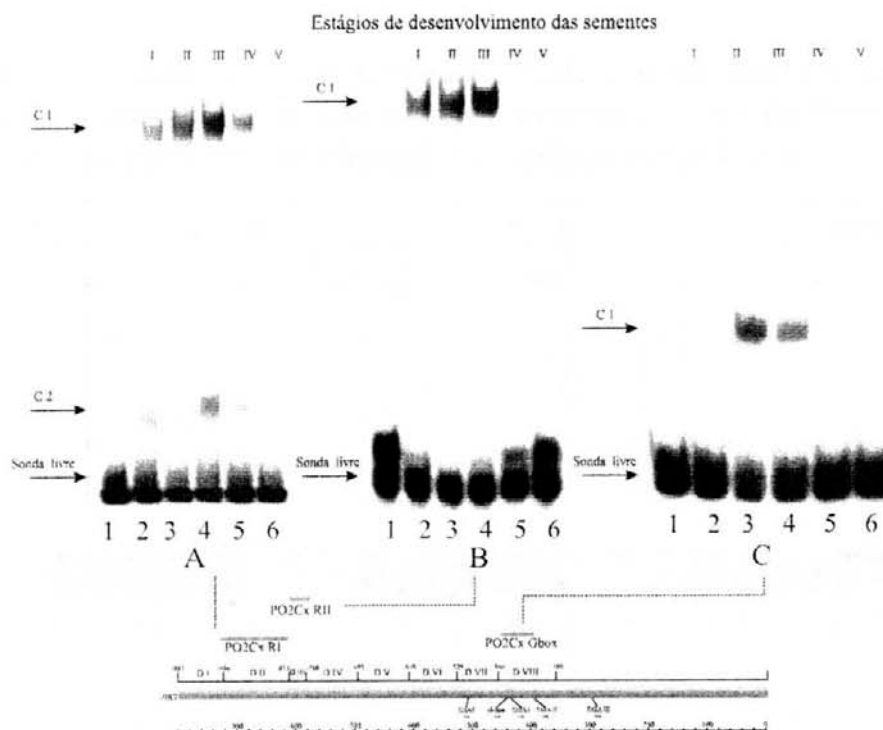


Figura 3.14 - EMSA: Formação dos complexos DNA-Proteína durante o desenvolvimento do endosperma de *Coix*. As colunas 1 mostram os resultados obtidos utilizando-se de 2 a 8 fmoles das sondas correspondentes na ausência de proteínas nucleares. Nas colunas 2 a 6 observa-se a formação dos complexos DNA-proteína resultante da adição de 2µg de proteínas de extrato nuclear de endospermas de *Coix* dos estágios de desenvolvimento de I a V, respectivamente. **A, B** e **C** correspondem às sondas pO2Cx-RI, pO2Cx-RII e pO2Cx-Gbox. A migração dos diferentes complexos formados e da sonda livre encontra-se indicada na lateral esquerda dos géis. O diagrama localizado abaixo das Figuras A, B e C representa a posição das sondas no promotor do gene *Opaco2*.

Especificidade dos complexos

O grau de especificidade das interações DNA-proteína para as três sondas foi avaliado através de experimentos de competição em ensaios de EMSA.

A Figura 3.15 mostra que a adição de fragmentos de DNA iguais ao das sondas, porém não marcados (competidor específico) resultou na diminuição ou até desaparecimento dos complexos C1 de DNA-proteína quando se utilizou um excesso molar de 30 e 50 vezes. A adição de fragmentos de DNA do mesmo tamanho, contendo uma

seqüência de nucleotídeos diferente da sonda (competidor inespecífico) e no mesmo excesso molar, resultou apenas em uma leve redução na quantidade dos complexos C1 em cada experimento.

O complexo C2 resultante da incubação com a sonda pO2CxRI (Figura 3.15A) não apresentou especificidade pela seqüência de nucleotídeos da sonda, pois com a adição de competidor inespecífico (colunas 7 e 8), sua intensidade diminuiu consideravelmente em relação à reação sem competição (coluna 2).

Estes resultados demonstram *Coix* que apresentam capacidade de claramente a existência de pelo menos interagir especificamente com três regiões do promotor de *Opaco2* de proteínas nucleares.

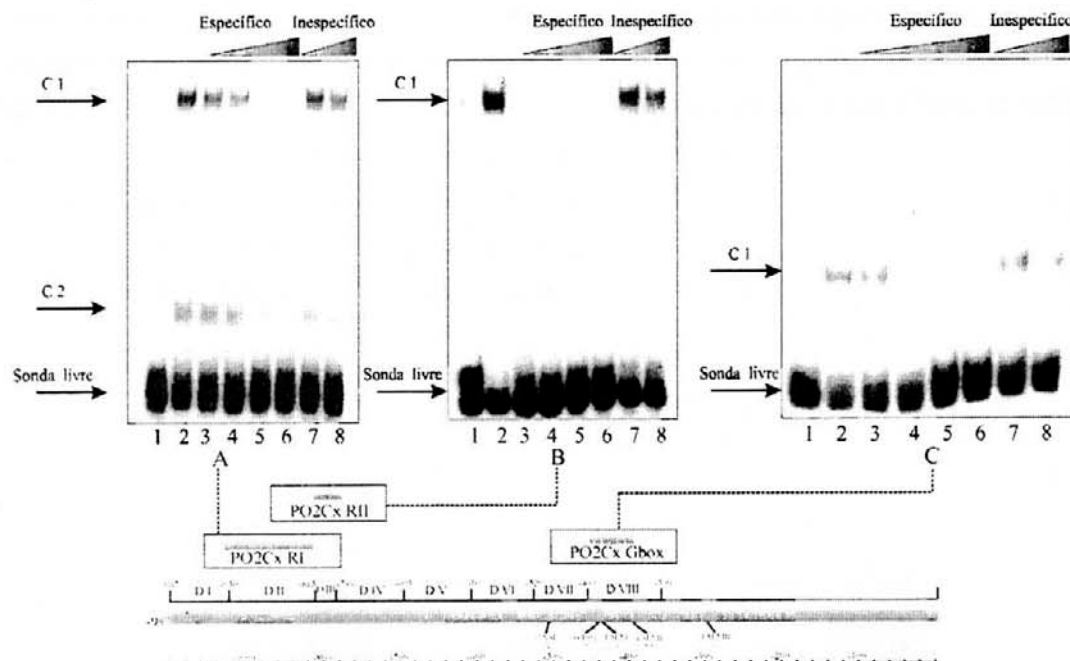


Figura 3.15 - Determinação da especificidade da ligação de proteínas nucleares nas sondas PO2CxRI, PO2CxRII e PO2CxGbox através de EMSA. Em A, observa-se o experimento de competição com a sonda PO2CxRI: A coluna 1, apresenta o resultado obtido com 6 fmoles da sonda PO2Cx-RI na ausência de proteínas nucleares. Na coluna 2 observa-se a formação dos complexos DNA-proteína resultantes da incubação de 3µg de proteínas do extrato nuclear de endospermas de *Coix* (estágio II) com 6 fmoles da sonda PO2Cx-RI. As colunas 3 a 6 apresentam os resultados obtidos com a mesma reação da coluna 2, porém com um excesso molar 5, 10, 30 e 50 vezes do fragmento PO2CxRI não marcado (competidor específico), enquanto que nas colunas 7 e 8 apresentam a mesma reação que na coluna 2 na presença de um excesso molar 30 e 50 vezes de um fragmento de DNA do mesmo tamanho, não marcado, com seqüência totalmente diferente daquele utilizado como sonda (competidor inespecífico). Em B estão representados os resultados obtidos de forma idêntica que em A, porém utilizando-se 2 fmoles da sonda PO2Cx-RII. Em C, são apresentados os resultados de forma idêntica que em A, porém utilizando-se 2 fmoles da sonda PO2Cx-Gbox. A migração dos diferentes complexos formados e da sonda livre encontra-se indicado na lateral esquerda dos géis. O diagrama abaixo das figuras A, B e C representa as posições relativas das sondas PO2Cx-RI, PO2Cx-RII e PO2Cx-Gbox no promotor do gene *Opaco2*.

Interação de proteínas nucleares com o promotor durante o ciclo circadiano

Ciceri *et al.*, (1999) relataram a ocorrência de variações diurnas no nível de transcritos do gene *Opaco2* em milho. Devido à proximidade filogenética entre milho e *Coix* decidiu-se avaliar a relação entre as proteínas nucleares que

interagem com o promotor de *Opaco2* e o controle da transcrição durante o ciclo diurno.

Com esta finalidade foram realizados ensaios de EMSA utilizando-se extratos nucleares de endospermas imaturos de *Coix* coletados ao meio dia e a meia noite.

A escolha destes horários de coleta foi baseada nos resultados descritos por Ciceri, *et al.*, (1999) que os apontaram como aqueles em que ocorre a maior diferença no acúmulo dos transcritos de *Opaco2*.

Os resultados destes experimentos estão representados na Figura 3.16. A análise dos resultados mostra que os complexos formados com cada uma das

sondas não apresentaram diferenças significativas de mobilidade ou intensidade quando foram utilizadas quantidades equivalentes de proteínas nucleares extraídas de sementes coletadas ao meio dia ou à meia noite.

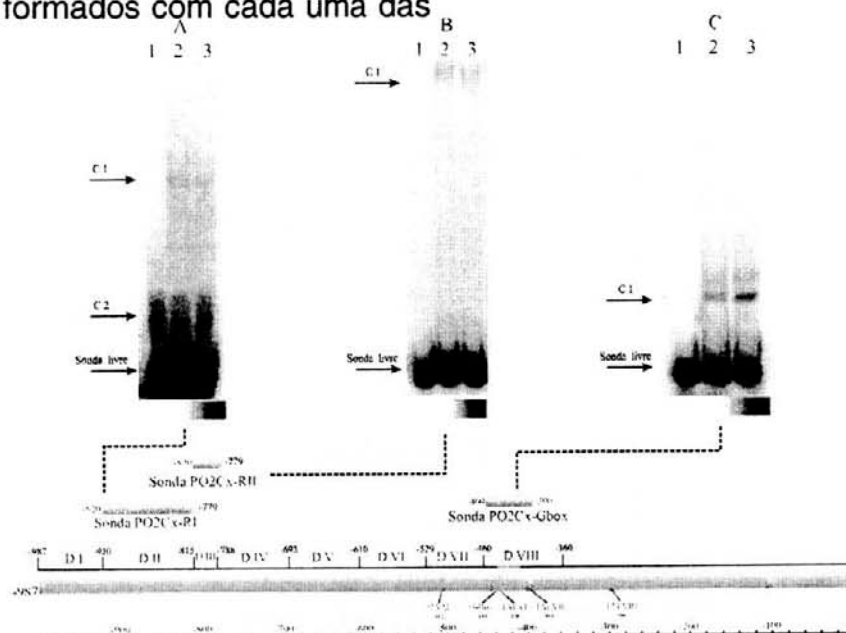


Figura 3.16 - Análise da variação da interação de proteínas nucleares com promotor do gene *Opaco2* durante o ciclo diário através de EMSA. Em A, B e C são apresentados os ensaios de EMSA com as sondas PO2Cx-RI, PO2Cx-RII e PO2Cx-Gbox, respectivamente. Nas colunas 1 são apresentados os ensaios com 10 fmoles de cada sonda na ausência de proteínas nucleares. Nas colunas 2 observa-se a formação dos complexos DNA-proteína resultantes da incubação de 3µg de proteínas do extrato nuclear de endospermas de *Coix* coletados ao meio dia (estágio III) com 10 fmoles de sonda. Nas colunas 3 observa-se a formação dos complexos DNA-proteína resultantes da incubação de 3µg de proteínas do extrato nuclear de endospermas de *Coix* coletados a meia noite (estágio III) com 10 fmoles de sonda. A migração dos diferentes complexos formados e da sonda livre encontra-se indicado na lateral esquerda dos géis. O diagrama abaixo das figuras A, B e C representa as posições relativas das sondas PO2Cx-RI, PO2Cx-RII e PO2Cx-Gbox no promotor do gene *Opaco2*.

Caracterização das proteínas que interagem com o promotor de *Opaco2*

Visando a caracterização dos fatores protéicos presentes nos complexos identificados através de

EMSA, foram realizados dois tipos de experimento: *Southwestern Blot* e cromatografia de afinidade a DNA.

No experimento de *Southwestern Blot* foi observada interação da sonda PO2Cx-Gbox

(Figura 3.13) com duas proteínas nucleares de pesos moleculares distintos (Figura 3.17). Comparando a posição das bandas reveladas com a sonda com um padrão de peso molecular, foi possível determinar a massa molecular aparente das proteínas ligantes de 24 e 55kDa (Figura 3.17). Este ensaio revelou também que as proteínas ligantes encontram-se em pequena quantidade

no estágio final de desenvolvimento de semente de *Coix*.

Experimentos similares de *Southwestern Blot* onde foram utilizadas as sondas PO2Cx-RI e PO2Cx-RII não foram capazes de detectar interação com proteínas nucleares.

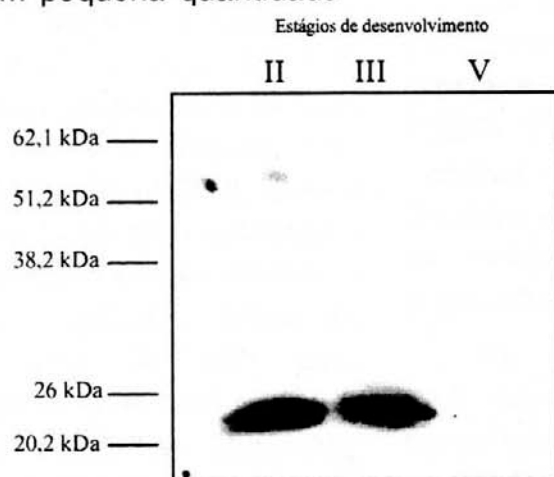


Figura 3.17 – Ensaio de *Southwestern Blot* para determinação do peso molecular aproximado das proteínas nucleares de *Coix* que se ligam na sonda PO2Cx-Gbox: Dez microgramas de proteínas nucleares de endospermas de *Coix* foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente com tampão de amostra 3X (Tris HCl pH6,8 125mM, SDS 0,2%, Glicerol 45% e azul de bromofenol 0,025%), separadas em SDS-PAGE 10%, eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond-C, Amersham) utilizando-se um aparelho Multiphor Novablot (LKB) e incubadas com a sonda PO2Cx-Gbox. Nas colunas 1 a 3 encontram-se os extratos nucleares de endospermas de *Coix* dos estágios II, III e V respectivamente. Os pesos moleculares indicados ao lado foram marcados na membrana com o auxílio do padrão de peso molecular BenchMark Prestained Protein Ladder (Gibco BRL).

Os experimentos de cromatografia de afinidade a DNA foram realizados com o objetivo de isolar e possivelmente identificar as proteínas que interagem com a região promotora do gene *Opaco2*. Tais experimentos basearam-se na metodologia descrita por Nordhoff *et al.* (1999).

Para padronizar a técnica de cromatografia de afinidade foi utilizado como modelo o próprio regulador de transcrição *Opaco2* e seu sítio de ligação no promotor de α -coixina incluído no fragmento CxPCxN (Figura 3.5). Conforme mostra a Figura 3.18, apesar da resina de afinidade ter capturado a proteína O2Cx-ABL, o ensaio revelou a presença de outras proteínas, principalmente uma de alto peso molecular. Como o ensaio foi realizado utilizando-se a proteína O2Cx-ABL recombinante purificada, as bandas adicionais de alto peso molecular observadas correspondem a proteínas presentes na soroalbumina bovina adicionada ao tampão de ligação, condição necessária para maximizar a interação da proteína O2Cx-ABL com o DNA (Figura 3.18 coluna 2).

O ensaio de padronização mostrou ainda a presença de uma proteína de baixo peso molecular que de acordo com os controles provém da própria resina de afinidade e provavelmente corresponde a estreptoavidina (Figura 3.18 coluna 5).

Uma vez padronizada a metodologia, foram realizados ensaios de cromatografia de afinidade utilizando-se os fragmentos PO2Cx-RII e PO2Cx-

Gbox. Devido à baixa abundância dos reguladores nos extratos nucleares impossibilitando sua visualização através de coloração com Comassie Blue e a impossibilidade de utilização, as proteínas isoladas foram identificadas através de incorporação de fósforo radioativo através de fosforilação seguida de autoradiografia

Os resultados obtidos com os experimentos de cromatografia de afinidade utilizando-se os fragmentos PO2Cx-RII, PO2Cx-Gbox e CxPCxN mostram que foi possível selecionar diversas proteínas marcadas através de fosforilação com CKII e PKA (Figura 3.19).

No caso da fosforilação com CKII, nota-se a presença majoritária de proteínas de aproximadamente 25 e 50kDa nos experimentos com qualquer os fragmentos utilizados PO2CxRII, PO2Cx-Gbox e CxPCxN (Figura 3.19; colunas 1,2 e 3 respectivamente). Porém, no ensaio com PO2Cx-Gbox, nota-se a presença de uma proteína exclusiva de aproximadamente 22kDa, indicando claramente tratar-se de uma proteína capaz de ligar-se especificamente ao sítio alvo presente neste fragmento de DNA ligado à resina (Figura 3.19, coluna 2). Observou-se ainda a presença de uma proteína de aproximadamente 12kDa nos ensaio com as resinas contendo PO2Cx-RII (Figura 3.19, coluna 1) e PO2Cx-Gbox (Figura 3.19, coluna 2).

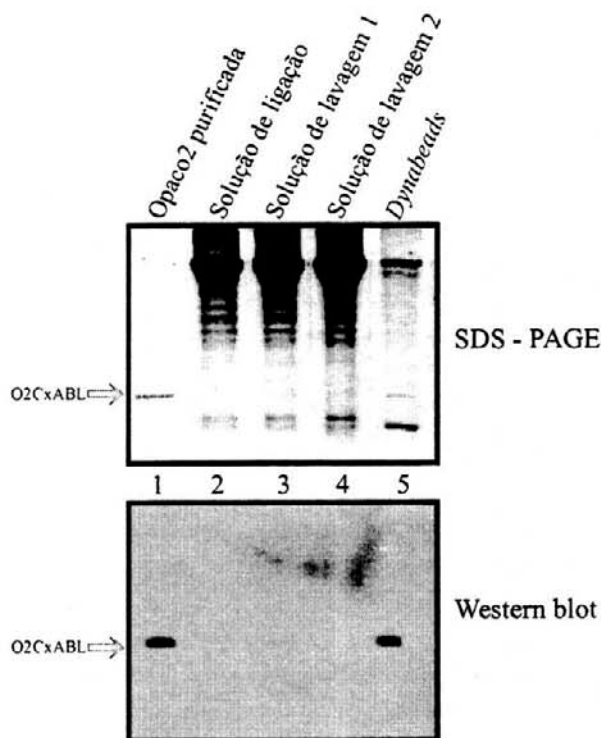


Figura 3.18: Análise do experimento de cromatografia de afinidade com a proteína O2Cx-ABL recombinante purificada. As soluções de ligação, lavagem bem como as partículas magnéticas de poliestireno (*Dynabeads*) foram submetidas à eletroforese em dois géis desnaturantes (SDS-PAGE). Um dos géis foi corado com *Comassie blue-R250* (Sigma). As proteínas do segundo gel foram transferidas para membrana de nylon e submetidas à análise através de *Western Blot* com anticorpo policlonal anti-Opaco2 de *Coix*. A coluna 1 apresenta um controle contendo 300ng da proteína O2Cx-ABL. A coluna 2 apresenta uma amostra da mistura de ligação contendo inicialmente 300ng O2Cx-ABL, após a separação das *dynabeads*. As colunas 3 e 4 apresentam amostras das soluções recuperadas após as duas lavagens sucessivas das *dynabeads*. A coluna 5 apresenta as proteínas eluídas das *Dynabeads*..

O ensaio realizado com marcação por PKA das proteínas selecionadas pela resina contendo o fragmento PO2Cx-Gbox resultou na identificação de proteínas de peso molecular aparente diferente das selecionadas no experimento com CKII (Figura 3.19, colunas 2 e 9).

No caso da resina contendo o fragmento PO2Cx-RII não foi observada a fosforilação de nenhuma proteína selecionada (Figura 3.19, coluna 8). Enquanto que o ensaio com a resina contendo o fragmento CxPCxN, resultou

na seleção de uma única proteína de aproximadamente 49kDa.

Os controles realizados na ausência de extratos nucleares (Figura 3.19, colunas 5 e 12), bem como aqueles realizados na ausência de DNA conjugado às partículas *Dynabeads* (Figura 3.19, colunas 6 e 13) demonstram a especificidade do método de seleção utilizado.

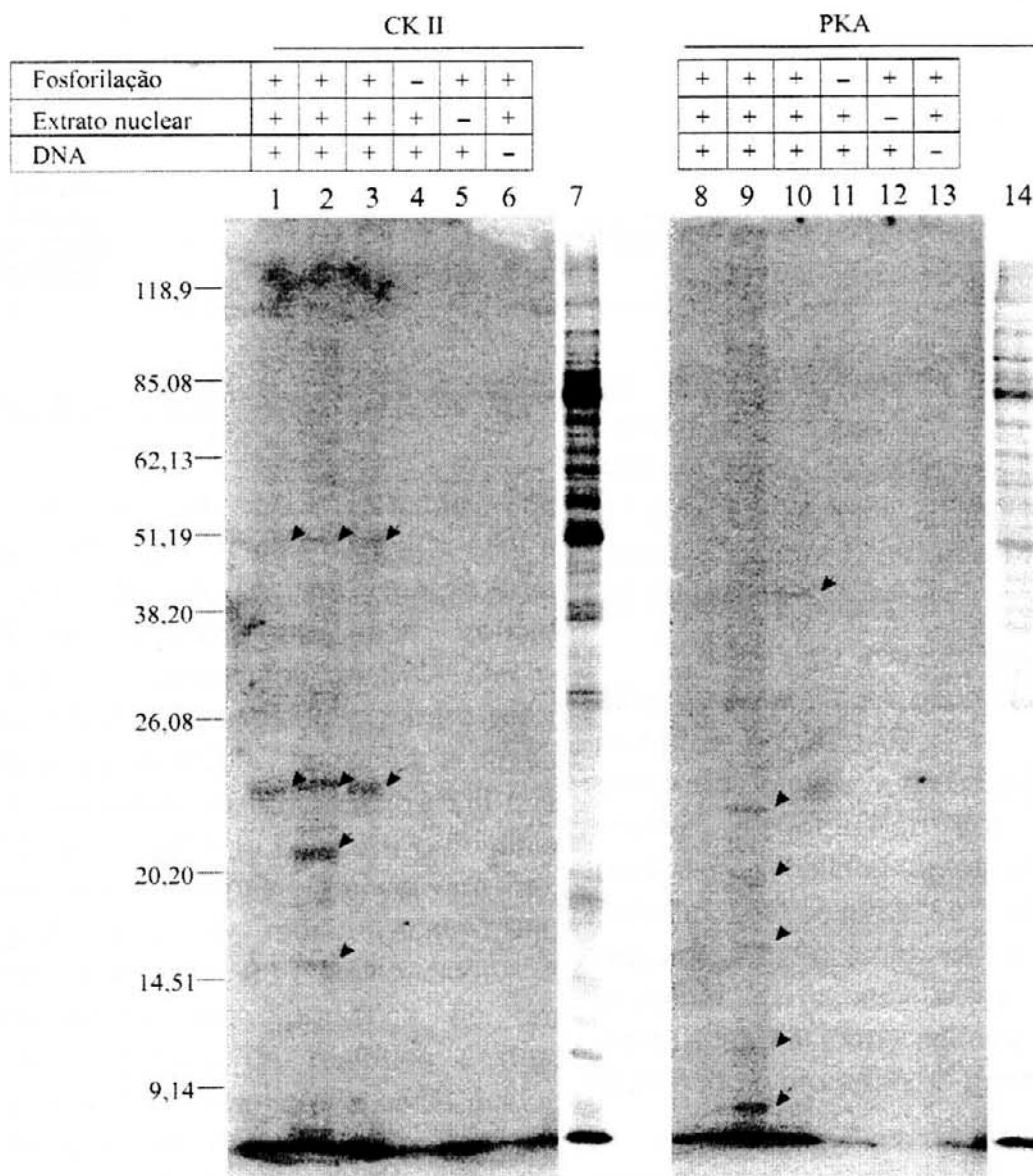


Figura 3.19 - Análise do experimento de cromatografia de afinidade com fragmentos do promotor do gene *Opaco2*. Trinta microgramas de extrato nuclear de endospermas de *Coix* foram adicionados em 60µl de tampão de ligação (Tris 20mM pH7,5, KCl 100mM, EDTA 2mM, DTT 2mM, NP40 0,04%, poli dIdC 1ug/ul e glicerol 20%) e incubados com *dynabeads* contendo diferentes fragmentos de DNA conjugados. Após sucessivas lavagens no mesmo tampão as *dynabeads* contendo proteínas conjugadas foram ressuspendidas em dez microlitros de tampão de fosforilação (Tris [pH7,5] 20mM, MgCl₂ 10mM, DTT 1mM) contendo uma unidade da enzima *Casein Kinase II* (CKII) ou uma unidade de *Protein Kinase A* (PKA). As proteínas foram fosforiladas com de 2µCi de [γ P³²] dATP, incubadas com tampão de amostra de proteínas (50mM Tris-HCl [pH 6,8], 8%glicerol, 1%SDS, 1%βmercaptoetanol, 2mMEDTA, azul de bromofenol), desnaturadas a 100°C por 5 minutos e submetidas a eletroforese em SDS-PAGE 15%. O gel foi seco e submetido e exposto em filme de raios-X. Nas **colunas 1 e 8** observamos o experimento com o fragmento PO2CXRII. Nas **colunas 2 e 9** observamos o experimento com o fragmento PO2CXGbox. Nas **colunas 3 e 10** observamos o experimento com o fragmento CxPCxN. Nas **colunas 4 e 11** foi realizado o experimento sem a adição das kinases (CKII ou PKA). Nas **colunas 5 e 12** foi realizado o experimento de cromatografia de afinidade na ausência de proteínas nucleares. Nas **colunas 6 e 13** foi realizado o experimento com *dynabeads* sem qualquer fragmento de DNA conjugado. As **colunas 7 e 14** contém dois microgramas de proteínas nucleares fosforiladas com CKII ou PKA nas mesmas condições descritas anteriormente. As setas indicam a posição das bandas descritas em "Resultados e Discussão". Os números ao lado correspondem ao peso molecular em kDa.

Capítulo

4

Discussão

Produção e purificação das proteínas O2CxABL e O2Cx-L

A metodologia utilizada na produção e purificação de O2Cx-ABL e O2Cx-L baseou-se na metodologia descrita anteriormente por Vettore (1998). Os fragmentos de DNA O2Cx-ABL e O2Cx-L transferidos para o vetor de expressão pET3C codificam a região bZIP acrescida da região ácida SIII que antecede o domínio básico e o domínio zíper de Leucinas respectivamente, (Figura 3.1). A região ácida SIII, constituída por 23 aminoácidos, é caracterizada pela presença de um elevado número de resíduos ácidos, quatro ácidos aspárticos e cinco ácidos glutâmicos. Apesar de não existirem relatos demonstrando que esta região exerça algum efeito na afinidade de ligação com DNA, decidiu-se por sua inclusão na proteína O2Cx-ABL com a finalidade de reduzir o caráter excessivamente básico do peptídeo contendo apenas o domínio básico e zíper de leucinas (BL). O ponto isoelétrico estimado para o peptídeo BL é de aproximadamente 10,5. A inclusão da região ácida SIII no peptídeo ABL resulta na redução do ponto isoelétrico para aproximadamente 9,2. Como sistemas de expressão bacterianos em geral apresentam-se mais eficientes na produção de proteínas com um conteúdo

de carga total melhor balanceada, decidiu-se pela produção do peptídeo ABL. O ponto isoelétrico estimado de 8,14 para a proteína O2Cx-L pareceu satisfatório para o sistema bacteriano de expressão.

A estratégia adotada resultou em altos níveis de expressão das proteínas O2Cx-ABL e O2Cx-L, conforme demonstra a comparação da análise eletroforética dos extratos bacterianos obtidos antes e após a indução da expressão por IPTG (Figura 3.2, colunas 2 e 3). As proteínas recombinantes foram produzidas na forma solúvel, portanto facilitando o processo de purificação.

O processo de purificação da proteína recombinante foi realizado em três etapas: (1) lise das bactérias; (2) remoção dos contaminantes mais abundantes; (3) polimento da fração protéica purificada.

A utilização da cepa BL21 (DE3) *pLys-S*, uma hospedeira capaz de produzir uma lisozima endógena, simplificou o processo de lise, que foi realizado em vários ciclos de congelamento e descongelamento. Alguns ciclos adicionais de sonicação garantiram a lise completa e propiciou uma considerável redução da viscosidade do extrato, permitindo

desta forma sua clarificação através de centrifugação.

Devido a termo-estabilidade da região bZIP, a desnaturação térmica foi utilizada como primeira etapa de remoção de contaminantes. Apesar de sua alta eficiência na remoção de contaminantes de natureza protéica, este processo não é capaz de remover os ácidos nucleicos presentes em grande abundância no extrato. A remoção dos ácidos nucleicos consiste em uma importante etapa de purificação neste caso, pois a proteína O2Cx-ABL apresenta capacidade de interagir com DNA. Apesar da especificidade de ligação, o excesso de DNA pode promover alterações na afinidade e especificidade de ligação DNA-proteína. No intuito de evitar tais perturbações, os ácidos nucleicos foram removidos do extrato através de precipitação com polietilenoimina. A eliminação de um grande número de bandas de proteínas contaminantes do eletroferograma (Figura 3.2, coluna 5) demonstrou claramente a alta eficiência dos processos intermediários adotados no processo de purificação.

O caráter básico da proteína recombinante CxO2-ABL foi explorado na primeira etapa de polimento do processo de purificação. Esta etapa constitui-se de uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se a resina de perfusão catiônica POROS HS (PerSeptive). Para a etapa final de polimento foi realizada uma segunda cromatografia utilizando-se a resina de

perfusão de fase reversa POROS R2 (PerSeptive). Esta etapa cromatográfica além de promover um maior grau de pureza, teve também como objetivo retirar o excesso de sal e facilitar o processo de concentrar a proteína através da evaporação do solvente volátil.

A análise eletroforética das diversas etapas de purificação mostra uma proteína final com elevado grau de pureza (Figura 3.2, coluna 7), demonstrando a eficácia do processo de purificação desenvolvido.

Os ensaios funcionais da proteína O2Cx-ABL, baseados na capacidade de interação com sítios alvos no DNA demonstraram a manutenção de sua atividade após o processo de purificação (Figura 3.6).

Os resultados mostrados na Figura 3.6 demonstram que a proteína recombinante purificada manteve a capacidade de interagir isoladamente com os sítios GLM e palíndromo (Complexos C1), bem como, de interagir simultaneamente com os dois sítios formando os Complexos C2. Estes resultados estão de acordo com o comportamento descrito por Yunes *et al.* (1998).

Estudos de dimerização da proteína Opaco2 de Coix

As proteínas do tipo bZIP constituem uma das mais conhecidas classes de reguladores de transcrição presentes em eucariotos. Seus

mecanismos de dimerização e interação com DNA têm sido avaliados em bZIPs modelo de leveduras (proteína GCN4) e animais (proteínas CREB, Jun e Fos).

As propriedades estruturais da região bZIP demonstram que ela assume uma estrutura do tipo α -hélice que abrange tanto o zíper de Leucinas quanto o domínio Básico. Apesar disto já foi verificado que algumas bZIPs apenas adquirem esta conformação estrutural na presença de seu sítio de interação com DNA.

O processo de dimerização de bZIPs está intimamente relacionado com o processo de interação com DNA. Vários estudos têm demonstrado que as proteínas do tipo bZIP podem interagir com o DNA de duas maneiras distintas: (i) formando dímeros e depois interagindo com o DNA; (ii) interagindo primeiramente com o DNA na forma de monômeros e depois dimerizando (Kohler *et al.*, 1999; Metallo e Schepartz, 1997; Wu *et al.*, 1998).

Apesar de muitos estudos terem abordado as propriedades de ligação do ativador Opaco2 no DNA, pouco se conhece a respeito de seus mecanismos de dimerização.

Os resultados dos ensaios de dicróismo circular mostrados na Figura 3.7 indicam que a proteína recombinante O2Cx-ABL apresenta uma estrutura do tipo α -hélice em solução aquosa. Isto indica que esta bZIP deve interagir com o DNA na sua forma dimérica.

O aumento da elipticidade, ou aumento do conteúdo de α -hélice, na presença de fragmentos de DNA alvo para Opaco2 (Figura 3.7A) deve-se provavelmente à indução do enovelamento da região básica devido a interação com o DNA.

Foi elaborado um experimento para detectar a taxa de dimerização da região bZIP da proteína Opaco2 de *Coix*. Neste experimento foi possível distinguir a formação tanto de homodímeros O2Cx-ABL:O2Cx-ABL quanto de heterodímeros O2Cx-L:O2Cx-ABL em SDS-PAGE (Figura 3.8A). A titulação das proteínas O2Cx-ABL com O2Cx-L causou um incremento da população de heterodímeros até um ponto próximo ao da saturação (Figura 3.8B). Na última coluna da Figura 3.8A nota-se entretanto um decaimento na formação de heterodímeros. Tal decaimento deve-se provavelmente à formação de complexos protéicos de alto peso molecular resultantes do excesso da proteína O2Cx-L.

O modelo experimental de análise de dimerização em gel foi aplicado na avaliação da influência dos resíduos "a" e "d" da quinta repetição do zíper de leucinas. Para isto foram produzidas proteínas O2Cx-ABL contendo substituições no resíduo da posição "a" e proteínas O2Cx-L contendo substituições no resíduo da posição "d".

Os resultados da substituição do resíduo de tirosina presente na posição "a" podem ser observados na Figura 3.11A. A substituição por fenilalanina, que ocorre naturalmente em outras bZIPs como OHP1 e OHP2 de milho e RITA1, RISBZ4 e RISBZ5 de arroz (Figura 3.9) causou uma diminuição significativa na taxa de dimerização. Apesar de similares, tais aminoácidos parecem exercer papéis distintos no mecanismo de dimerização. Tais resultados sugerem que a posição "a" na quinta repetição pode exercer um papel importante na formação de heterodímeros entre Opaco2 e OHP em milho.

A substituição da tirosina por aminoácidos de cadeia lateral pequena, sem anel aromático, também influenciou a taxa de dimerização. A substituição por um resíduo de valina, presente na posição "a" de outras repetições manteve a taxa de dimerização enquanto que a substituição por serina causou um decaimento significativo nesta taxa. Tais resultados indicam que resíduos hidrofílicos de cadeia lateral pequena nesta posição podem dificultar a formação de dímeros.

O efeito da substituição do resíduo de alanina presente na posição "d" pode ser observado na Figura 3.11B. A substituição por um resíduo de isoleucina, que ocorre naturalmente na bZIP SPA de trigo ocasionou uma elevada taxa de heterodimerização. A substituição por leucina, um aminoácido similar que normalmente está presente

nas posições "d" das outras repetições não exerceu efeito tão elevado.

A substituição da alanina por resíduos hidrofílicos (treonina e serina) causou uma diminuição na taxa de dimerização.

Os resultados dos experimentos de dimerização foram comparados com análises computacionais de predição de formação de estrutura do tipo *coiled-coil*. Esta análise foi realizada via Internet, na página http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html, usando o programa COILS2 (Lupas, *et al* 1991).

Este programa compara a sequência inserida com um banco de dados de seqüências de proteínas que formam estrutura do tipo *coiled-coil* e define uma pontuação de semelhança. Comparando esta pontuação com a distribuição de pontuações em proteínas de estrutura globular e *coiled-coil*, o programa calcula a probabilidade da sequência inserida adotar uma conformação do tipo *coiled-coil* (Lupas, *et al* 1991).

Na análise das substituições da posição "a" pelo programa COILS2 (Figura 4.1A), nota-se grande semelhança com os resultados experimentais obtidos.

A substituição do resíduo de tirosina pelo resíduo de fenilalanina ou serina diminuiu a probabilidade de formação de *coiled-coil* na região da substituição. A substituição pelo

resíduo de valina aumentou um pouco tal probabilidade.

No caso da análise das substituições no resíduo "d" (Figura 4.1B), as semelhanças com os resultados experimentais não foram tão condizentes. A substituição do resíduo

de alanina por isoleucina diminuiu consideravelmente a probabilidade de formação de *coiled-coil*. No caso da substituição pelos resíduos de leucina, treonina ou serina houve concordância com os resultados experimentais obtidos.

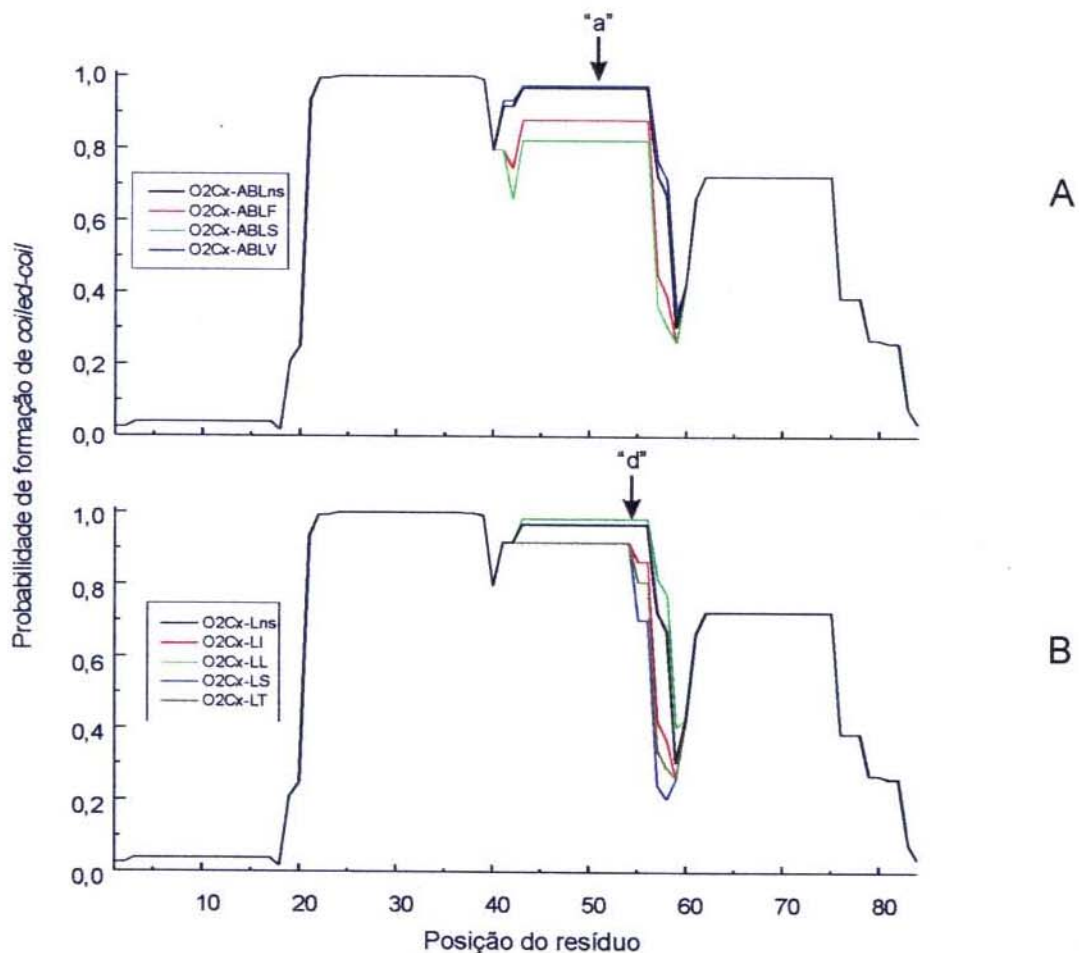


Figura 4.1: Análise computacional da formação de estrutura tipo *coiled-coil*. A sequência de aminoácidos correspondente à região bZIP de Opaco2 de *Coix* foi analisada remotamente pelo programa COILS2 via Internet, na página http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.htm. Foi utilizada a matriz de MTK com a janela de 14 resíduos. As setas indicam as posições das mutações no resíduo da posição "a" ou "d". Em **A** encontra-se a análise das proteínas contendo as substituições na posição "a" da quinta repetição: em preto a proteína normal, (resíduo de tirosina), em vermelho a substituição por fenilalanina, em verde serina e em azul valina. Em **B** encontra-se a análise das proteínas contendo as substituições na posição "d" da quinta repetição: em preto a proteína normal, (resíduo de alanina), em vermelho a substituição por isoleucina, em verde leucina, em azul serina e em marrom treonina.

Apesar de não se ajustarem exatamente ao modelo computacional, os resultados experimentais da influência dos resíduos na posição "d" indicam que a dimerização está relacionada com a hidrofobicidade do aminoácido nesta posição. De fato, os valores de hidrofobicidade dos resíduos analisados segundo a escala de

Einsberg (1984) (Figura 4.2), indicam uma relação direta entre a hidrofobicidade e a taxa de dimerização. Tais resultados podem contribuir para o aperfeiçoamento do programa COILS2 na predição da formação de estrutura secundária em bZIPs.

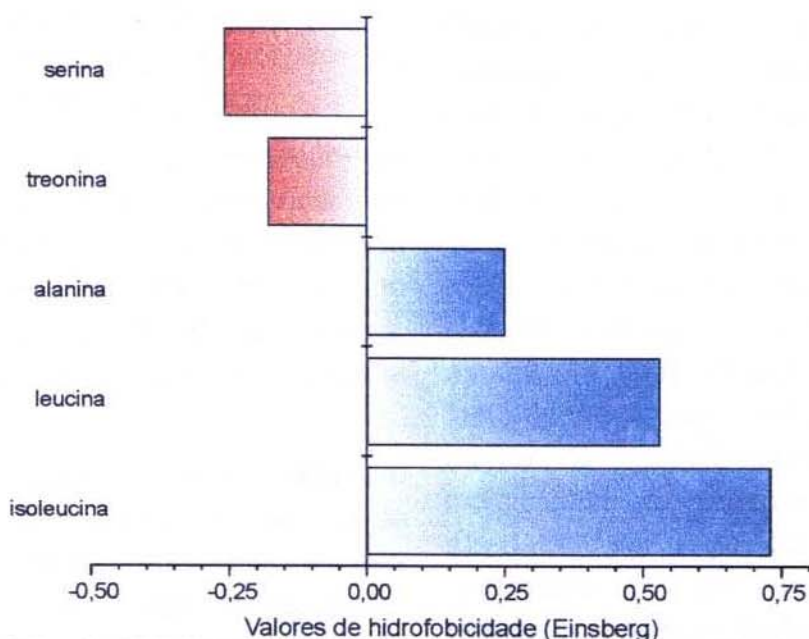


Figura 4.2: Padrão de hidrofobicidade de aminoácidos. Os valores de hidrofobicidade dos aminoácidos analisados na posição "d" estão plotados no gráfico segundo o padrão de Einsberg (1984). A cor vermelha indica menor hidrofobicidade e a cor azul indica maior hidrofobicidade.

Os experimentos de análise de dimerização em SDS-PAGE forneceram resultados satisfatórios quanto à influência dos resíduos "a" e "d" da quinta repetição. Tais resultados porém, foram de caráter qualitativo. Ensaio quantitativos poderiam ser realizados através de curvas de desnaturação térmica usando dicroísmo circular, conforme mostrado na Figura 3.7B para

a proteína O2Cx-ABL. Tais ensaios poderiam determinar a influência de cada substituição no valor da constante de dissociação e da energia livre.

A regulação do gene *Opaco2*

A proteína *Opaco2* de milho é um dos poucos reguladores de transcrição

do tipo bZIP de plantas cuja função regulatória *in vivo* foi claramente definida até o momento. As diversas funções da proteína Opaco2 foram identificadas principalmente através do efeito da mutação sobre a expressão de diversos genes. Além do mais, a proteína Opaco2 é expressa em um único tecido, o endosperma, durante um curto período do ciclo de vida da planta. Tais fatos tornam a proteína Opaco2 um interessante modelo para o estudo de mecanismos moleculares envolvidos na regulação da expressão gênica.

Apesar do extenso conhecimento acumulado sobre a importância da proteína Opaco2 na regulação da expressão de diversos genes no endosperma de sementes de cereais, pouco se conhece de sua própria regulação.

Gallusci *et al.* (1994) identificaram inicialmente no promotor do gene *Opaco2* de milho possíveis regiões contendo elementos reguladores do tipo *cis*. Entretanto, posteriormente nenhum estudo adicional de caracterização destas regiões foi relatado.

Ciceri, *et al.* (1999) demonstraram que o acúmulo de transcritos de *Opaco2* de milho obedece a um ciclo circadiano, onde o nível mais elevado é observado ao meio dia enquanto que o mais baixo ocorre à meia-noite. Os mesmos autores mostraram ainda que o endosperma não está diretamente envolvido na percepção da luz, mas que provavelmente as flutuações durante o ciclo refletem o fluxo diário de metabólitos para este

tecido. As variações diárias nos níveis de transcritos de *Opaco2* foram observadas também no mutante *o2T* que codifica a proteína sem o domínio bZIP, sugerindo portanto que a proteína Opaco2 não está envolvida no seu próprio controle diurno (Ciceri, *et al.*, 1999).

Ciceri *et al.* (1997) haviam também anteriormente demonstrado que a atividade de ligação da proteína Opaco2 aos sítios alvos no DNA depende de modificação pós-traducional por fosforilação. De acordo com estes autores, as formas hipofosforiladas e não fosforiladas desta proteína ligam-se ao DNA com maior afinidade do que as formas hiperfosforiladas *in vitro*. Estes autores mostraram também que o estado de fosforilação apresenta variação diurna. O conjunto destes resultados indica que a variação diurna da atividade do regulador Opaco2 é controlada em dois níveis distintos: regulação transcricional e modificação pós-traducional.

A região promotora do gene *Opaco2*

O estudo da regulação da transcrição de um gene requer inicialmente o conhecimento detalhado do seu promotor. A investigação da presença de elementos *cis* previamente descritos na região flanqueadora 5' pode fornecer pistas e informações importantes sobre possíveis reguladores envolvidos no controle de transcrição de um gene.

A proximidade filogenética entre milho, sorgo e *Coix* e a grande semelhança funcional entre suas proteínas *Opaco2*, sugerem que a regulação da expressão do gene *Opaco2* é também conservada nestas plantas.

De fato, a análise do alinhamento de uma região de aproximadamente 1Kb das regiões flangeadoras 5' dos genes *Opaco2* deste cereais revela a presença de diversos motivos conservados (Figura 4.3). O grau de similaridade entre as três seqüências aumenta com a proximidade do códon de início de tradução.

Início de transcrição dos genes *Opaco2*

O elemento TATA-box está presente na grande maioria dos promotores de eucariotos. Utilizando o programa MatInspector (Quandt *et al.*, 1995), foi possível identificar o elemento TATA-box repetidas vezes nos promotores de *Opaco2*. Em *Coix* e sorgo foram encontrados três seqüências com elevados índices de similaridade com a matriz que define este elemento. Já no promotor de milho foram encontradas apenas duas seqüências (Figura 4.3).

Os sinais de início de transcrição dos genes *Opaco2* de milho e *Coix* foram mapeados através de *Primer Extension* por Vettore (1998). No gene de *Coix* foram identificados três sinais de início de transcrição, *c1* e *c2* localizados, respectivamente, a 41 pb e 72 pb abaixo do TATA 3, e *c3* a 48 pb abaixo do TATA 2 (Figura 4.3). As seqüências dos sinais de início de transcrição identificados nos

promotores dos genes *Opaco2* de milho e *Coix* apresentaram alto grau de correlação com a matriz proposta por Bucher (1990). Ainda segundo este autor, a distância consenso entre o TATA-Box e o início de transcrição é geralmente de aproximadamente 30 pb, entretanto esta distância ocorre somente em 60% dos promotores analisados, indicando portanto que esta distância não é um fator essencial para o funcionamento de um promotor.

Vários reguladores de transcrição de plantas pertencentes à classe das bZIPs, tais como, CPRF1, OBF1, e HBP-1a apresentam fases de leitura (*ORFs*) na região 5' não-traduzida de seus RNAsm (Meshi e Iwabuchi 1995). Os RNAsm de *Opaco2* também apresentam este tipo de seqüência-líder. A região 5' não traduzida do gene *Opaco2* de milho apresenta três *ORFs* adicionais. Lohmer *et al.* (1993) demonstraram o envolvimento de dois deles no controle do processo de proteína *Opaco2*. Na seqüência-líder do gene *Opaco2* de *Coix* foi detectada a presença de cinco *ORFs*. Entretanto, Vettore (1998) observou, através de experimentos de expressão transitória, que a retirada dos códons de iniciação adicionais não proporcionou elevação do nível de expressão do gene.

Elementos reguladores *cis* presentes nos promotores dos genes *Opaco2*

Com a finalidade de investigar a presença de possíveis elementos *cis* nos promotores dos genes *Opaco2*, as

seqüências destes genes foram submetidas a uma análise com o programa SIGNAL SCAN (Prestridge, 1991) utilizando o banco de dados PLACE de elementos reguladores *cis* de plantas (Higo *et al.*, 1999). Este programa permite buscar elementos *cis* reguladores de transcrição. A análise foi realizada remotamente, via Internet, na página <http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/signalscan.html>.

Dezenas de possíveis elementos reguladores *cis* foram detectados através desta análise. Porém, apenas alguns deles encontram-se localizados em regiões conservadas dos promotores dos genes *Opaco2* de milho, sorgo e Coix (Figura 4.3).

Dentre esses elementos, destaca-se o palíndromo Gbox (5'-CACGTG-3') (Menkens *et al.*, 1995). Este elemento, conservado nos promotores dos genes *Opaco2* (Figura 4.3), está envolvido na ativação transcricional mediada por proteínas bZIP em diversos processos fisiológicos em plantas (Katagari e Chua, 1992). Por exemplo, os estudos com o promotor do gene da β -faseolina demonstraram que a presença do motivo G-Box é necessária para a obtenção de altos níveis de expressão deste gene em sementes de tabaco (Burow *et al.*, 1992).

Outra seqüência interessante identificada foi o motivo 5'-AGAAA-3' (pólen-box) representado por seis cópias conservadas nos promotores de *Opaco2*. Este motivo está envolvido na regulação de transcrição em pólen (Bate & Twell, 1998). Apesar de sua atividade

nos promotores de *Opaco2* não ter sido relatada, análises de expressão realizadas em diferentes tecidos de tabaco transgênico indicaram atividade do promotor de *Opaco2* em pólen em nível similar ao descrito para semente (Gallusci *et al.*, 1994).

Além destes elementos *cis*, foram também identificados seqüências correspondentes aos elementos Rav1-A (5'-CAACA-3'), *amylase-box* (5'-ATGGATA-3') e GT-1 (5'-Ga/ga/tAAa/t-3').

O elemento RAV1-A representa o sítio de ligação para o regulador RAV1 presente em rosetas e raízes de *Arabidopsis thaliana* (Kagaya, *et al.*, 1999), enquanto que elemento *amylase-box* é encontrado no promotor de genes que codificam α -amilase em arroz, trigo e cevada (Huang, *et al.* 1990).

O elemento GT-1 é encontrado em vários promotores de genes regulados por luz (ver revisão em Villain *et al.* 1996) e representa o sítio de ligação para o regulador GT-1 (Buchel *et al.*, 1999; Zhou, 1999). Le Gourrierc *et al.* (1999) demonstraram que este regulador é capaz de ativar a transcrição, estabilizando o complexo TFIIA-TFIID-TATABox.

Cabe destacar ainda que foi encontrada no promotor de *Opaco2* de milho a seqüência 5'-GTTGACGT-3' que corresponde ao sítio de ligação para o regulador *Opaco2*. Lohmer *et al.* (1991) demonstraram que *Opaco2* é capaz de interagir com esta

seqüência e ainda ativar a transcrição do seu próprio gene em milho. Conforme pode ser observado na Figura 4.3, esta seqüência encontra-se ausente no promotor de *Coix*.

Análise do promotor do gene *Opaco2* de *Coix*

O experimento de análise de deleção do promotor do gene *Opaco2* de *Coix* realizado por Vettore (1998) (Figura 3.13) mostra que determinadas regiões do promotor influenciam a atividade transcrição em endosperma de milho. De acordo com estes resultados, a presença das regiões DIII e a DVIII estimulam a atividade do promotor, enquanto que a região DII inibe sua atividade. Estes resultados sugerem a existência de diferentes elementos *cis* atuando como alvo tanto para ativadores quanto para repressores de transcrição.

O estudo realizado por Vettore (1998) foi utilizado como base para ensaios de interação com proteínas presentes em extratos nucleares de endosperma de sementes de *Coix* em desenvolvimento. Para estes estudos foram escolhidas as regiões que apresentaram maior influência na atividade do promotor.

Inicialmente foram realizados ensaios do tipo EMSA, nos quais foram

utilizadas como sondas os fragmentos pO2Cx-RI, pO2Cx-RII e pO2Cx-Gbox. Conforme mostra o esquema da Figura 3.14, estes fragmentos cobrem, respectivamente, as regiões DII, DIII e DVIII, regiões estas que exercem maior efeito na atividade do promotor, segundo os ensaios descritos por Vettore (1998).

Os ensaios de EMSA demonstraram que os três fragmentos testados, PO2Cx-RI, PO2Cx-RII e PO2Cx-Gbox, são capazes de interagir com proteínas nucleares de endospermas de *Coix* (Figura 3.14). Cada fragmento foi capaz de formar apenas um complexo específico com proteínas nucleares.

Os resultados de EMSA da Figura 3.14 mostram também que os níveis das proteínas ligantes nos extratos nucleares dependem do estágio de desenvolvimento da semente. Observa-se que a intensidade dos complexos DNA-proteína nos três casos coincide com a fase de alta atividade de transcrição do gene *Opaco2* que aumenta do estágio I até o estágio III, diminuindo então até o estágio V (Vettore *et al.*, 1998).

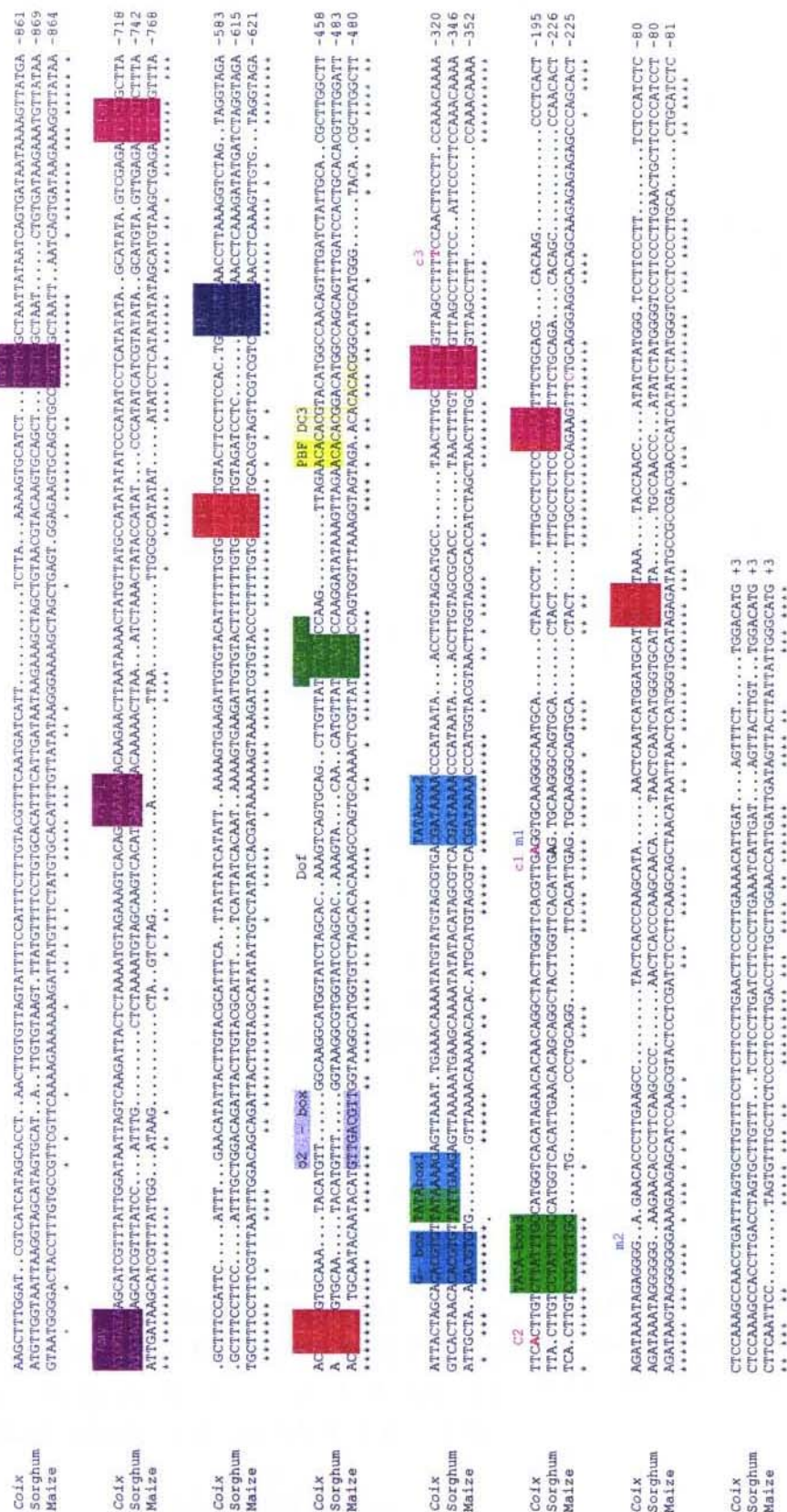


Figura 4.3: Alinhamento das regiões flaqueadoras 5' dos genes *opaco2* de *Coix*, *sorgo* e *milho*. Os espaços para maximizar o alinhamento estão representados por hifens. Os nucleotídeos idênticos estão assinalados por asterisco. Os elementos *cis* estão marcados nos quadrados coloridos: *lav* 1-A em lilás, *amy-box* em roxo, *1em* marrom, *pólen-box* em vermelho, *TATA-box* em verde claro, *CAAT-box* em verde escuro, *myc* em azul escuro, *O2 box* em cinza, e *PBFD* em amarelo. Os números correspondem a sequência de nucleotídeos dos promotores dos genes *opaco2*, sendo que a posição +1 corresponde ao nucleotídeo "A" do sítio de início de tradução. O alinhamento foi realizado utilizando-se o programa CLUSTAL X (Higgins & Sharp, 1989) e otimizado manualmente. Os sítios de início de transcrição de milho (*m1* e *m2*) estão marcados em azul, enquanto que os de *Coix* (*c1*, *c2* e *c3*) estão marcados em vermelho (Vettore, 1998).

A especificidade de formação dos complexos identificados foi analisada através de ensaios de competição (Figura 3.15). Os resultados destes experimentos mostram que a formação dos complexos DNA-proteína foi específica para todos os fragmentos de DNA, com exceção da formação do complexo C2 no fragmento PO2Cx-RI que não resistiu a competição com fragmentos de DNA não relacionados.

A baixa mobilidade eletroforética dos complexos C1 detectados com as sondas PO2Cx-RI e PO2Cx-RII, pode indicar que as proteínas formadoras desses complexos são de alto peso molecular ou são produzidos pela interação com mais de uma proteína. Já a alta mobilidade do complexo C1 com na sonda PO2Cx-Gbox indica provavelmente a participação de um único componente protéico de baixo peso molecular.

A capacidade demonstrada pelas proteínas presentes nos extratos nucleares de interagir com os fragmentos de DNA testados, formando complexos estáveis, sugere que tais proteínas possivelmente representam fatores envolvidos na regulação da transcrição do gene *Opaco2*. Neste caso, as proteínas que interagem com os fragmentos PO2Cx-RII e PO2Cx-Gbox, que incluem respectivamente as regiões DIII e DVIII do promotor (Figura 3.13), representariam ativadores da transcrição. Esta hipótese é corroborada pela observação de que a etapa do desenvolvimento da semente em que se

obteve maior intensidade de formação dos complexos coincide com aquela que apresenta os níveis mais elevados de transcrição do gene *Opaco2* (Figura 3.14).

O fragmento PO2CxRI inclui a região DII do promotor do gene *Opaco2* de *Coix* que de acordo com os ensaios de expressão descritos por Vettore (1998) deve incluir elementos *cis* que exercem controle negativo na expressão do gene (Figura 3.13). Assim sendo, a proteína ou proteínas nucleares que participam da formação do complexo com o fragmento PO2CxRI representam repressores de transcrição do gene *Opaco2*. Entretanto, o resultado do ensaio de EMSA mostra que a maior intensidade de formação dos complexos coincide também com a fase do desenvolvimento da semente que apresenta maior atividade de transcrição do gene *Opaco2*. Este resultado sugere um mecanismo de modulação no qual a interação com o elemento *cis* presente no fragmento DIII resultaria em ativação, enquanto que a ocupação simultânea dos elementos *cis* dos fragmentos DIII e DII resultaria em repressão.

Devido ao relato prévio de variação diurna nos níveis de transcritos do gene *Opaco2* em milho (Ciceri *et al.*, 1999), decidiu-se verificar se as proteínas formadoras dos complexos identificados estariam envolvidas no controle desta variação.

Os resultados de *EMSA* utilizando-se extratos nucleares de endospermas imaturos de *Coix* coletados ao meio dia e a meia noite mostram não haver variação significativa nos níveis das proteínas formadoras dos complexos testados (Figura 3.16). Este resultado, portanto, indica que as proteínas associadas aos fragmentos não estão envolvidas no controle diurno da expressão do gene *Opaco2* de *Coix*.

Com a finalidade de estimar a massa molecular das proteínas envolvidas na formação dos complexos identificados nos ensaios de *EMSA*, foram realizados experimentos de *Southwestern Blot*. Apenas o fragmento PO2CX-Gbox apresentou capacidade de interagir com proteínas fracionadas em SDS-PAGE. A sonda PO2Cx-Gbox interagiu intensamente com uma proteína de 24 kDa, e com menor intensidade com uma proteína de 55 kDa (Figura 3.17).

A presença de duas bandas no *Southwestern Blot* e uma única no *EMSA*, apesar dos dois ensaios terem sido realizados utilizando-se como sonda o mesmo fragmento de DNA, pode ser explicada pelas diferentes condições utilizadas nestes ensaios. São duas as principais diferenças nos dois ensaios. A primeira diz respeito ao período de formação dos complexos DNA-proteína, que no caso do *EMSA* são produzidos antes da eletroforese, enquanto que no *Southwestern Blot* os mesmos são formados posteriormente à eletroforese. A segunda diferença reside no fato que

no *EMSA* as proteínas associadas ao DNA encontram-se na sua estrutura nativa, inclusive se for o caso na sua forma polimérica funcional. Já as proteínas ligantes do ensaio de *Southwestern Blot* são submetidas à eletroforese na forma desnaturada. Portanto, no ensaio de *Southwestern Blot* as proteínas fracionadas pela eletroforese são submetidas a um processo de renaturação antes do ensaio de ligação com as sondas nucleotídicas.

Levando-se em conta estas diferenças, a presença da banda de 55 kDa de menor intensidade no resultado de *Southwestern Blot* (Figura 3.17) poderia ser interpretada como a presença da forma dimérica da proteína responsável pela banda de maior intensidade. A relação entre os pesos moleculares aparentes das proteínas ligantes identificadas através deste ensaio corrobora esta hipótese. A menor intensidade da banda correspondente a proteína de menor peso molecular indica que um número muito reduzido dos dímeros resistiu ao processo de desnaturação. Se esta hipótese estiver correta, o complexo C1 observado no ensaio *EMSA* com o fragmento PO2Cx-Gbox seria resultante da ligação da proteína dimérica com o sítio alvo presente no fragmento utilizado como sonda.

O experimento de *Southwestern Blot* mostra ainda maior intensidade de formação de complexos DNA-proteína nos estágios II e III de

desenvolvimento do que no estágio V. Este resultado coincide com o comportamento observado no ensaio de EMSA (Figura 3.14).

A ausência de complexos DNA-proteína nos experimentos de *Southwestern Blot* quando foram utilizados como sondas os fragmentos PO2Cx-RI e PO2Cx-RII pode ser explicada se a formação destes complexos depender da associação de diferentes subunidades protéicas. Neste caso não seria possível renaturar o complexo protéico, pois estas apresentariam migrações eletroforéticas distintas.

Isolamento e identificação das proteínas que interagem com o promotor de *Opaco2*

Os resultados da interação DNA-proteína demonstram claramente que proteínas nucleares do endosperma de *Coix* são capazes de interagir especificamente com o promotor de *Opaco2* de *Coix*. Portanto, para esclarecer os mecanismos envolvidos na regulação da transcrição do gene *Opaco2* foram realizados ensaios para isolar e possivelmente identificar a natureza dos possíveis reguladores detectados.

Baseados nos resultados positivos obtidos com EMSA e *Southwestern Blot* com o fragmento PO2Cx-Gbox foram realizadas tentativas de seleção de clones de cDNAs codificadores do fator protéico detectado nos extratos

nucleares. Foram testadas duas estratégias, a primeira delas através da seleção dos clones a partir de biblioteca de expressão de cDNA de endosperma de *Coix*, utilizando-se a mesma sonda e condições descritas para o *Southwestern*. A segunda estratégia baseou-se na expressão dos mesmos cDNAs em levedura. Neste caso a seleção dos clones expressando o fator protéico foi realizada através do método *One Hybrid System* (Clontech). Porém, as duas estratégias testadas não forneceram resultados satisfatórios.

Como alternativa, foi aplicada uma nova metodologia descrita por (Nordhoff *et al.*, 1999). Originalmente, esta metodologia baseia-se no isolamento de reguladores de transcrição a partir de extratos nucleares através cromatografia de afinidade a DNA, seguido da caracterização e possível identificação através de espectrometria de massa.

Inicialmente, visando padronizar esta metodologia foram realizados ensaios o próprio ativador de transcrição *Opaco2* de *Coix* e um fragmento de DNA (CxPCxN), que inclui um sítio alvo de ligação para este regulador. Os resultados obtidos no ensaio de padronização (Figura 3.18) demonstram claramente que a resina de afinidade contendo o sítio alvo apresentou capacidade de ligação para a proteína *Opaco2*.

Uma vez padronizada a metodologia, a mesma foi então

aplicada no isolamento das proteínas que interagem com os fragmentos PO2Cx-RII e PO2Cx-Gbox do promotor de *Opaco2*.

O fragmento PO2Cx-RI não foi utilizado neste experimento por ter apresentado interações não específicas com proteínas nucleares. Este fato poderia dificultar a interpretação dos resultados obtidos na cromatografia de afinidade.

Apesar dos ensaios de padronização com a proteína *Opaco2* purificada haverem sido realizados com quantidade suficiente de proteína para ser visualizada em SDS-PAGE corado com Comassie Blue ou prata, o mesmo não ocorreu quando foram utilizados extratos nucleares. Isto porque as proteínas ligantes dos extratos encontram-se presentes em níveis abaixo do limite de detecção das técnicas de coloração utilizadas. Por isso, com a finalidade de aumentar a sensibilidade de detecção optou-se por marcar as proteínas isoladas na cromatografia de afinidade através da incorporação enzimática de ^{32}P por intermédio das proteína-quinases PKA (proteína-quinase A) e CKII (caseína-quinase II). A justificativa para a utilização de proteína-quinases baseou-se no fato de que a atividade da maioria dos reguladores transcricionais é modificada através de fosforilação (Yamaguchi, *et al.*, 1998; Janknecht, 1992).

Os resultados dos experimentos de cromatografia de afinidade (Figura 3.19) mostram que as resinas preparadas

foram capazes selecionar a partir dos extratos nucleares diversas proteínas. As proteínas selecionadas além de apresentar afinidade pelo sítio alvo obrigatoriamente apresentam sítios de fosforilação para as proteína-quinases CKII e/ou PKA.

O fragmento de DNA CxPCxN, que foi utilizado como controle, resultou na seleção de uma proteína fosforilada por PKA, de peso molecular aparente de 49 kDa (Figura 3.19). O peso molecular desta proteína é compatível com o predito para a sequência de aminoácidos da proteína *Opaco2* de *Coix* (45kDa). Este resultado, aliado ao fato de que a proteína *Opaco2* é eficientemente fosforilada *in vitro* pela PKA (resultados ainda não publicados pela Dra. Alba Chiesse da Silva), indica que a resina de afinidade foi capaz de selecionar a partir de extratos nucleares de endosperma de *Coix* a proteína *Opaco2*.

A resina de afinidade conjugada ao fragmento PO2Cx-Gbox selecionou uma proteína exclusiva de aproximadamente 22kDa fosforilada pela proteína-quinase CKII. Uma proteína de peso molecular aparente de aproximadamente 30 kDa fosforilada pela proteína-quinase PKA foi também selecionada com a mesma resina de afinidade. A semelhança entre os pesos moleculares aparentes das proteínas selecionadas com aquela identificada através de *Southwestern Blot* com a sonda

PO2Cx-Gbox, indica provavelmente tratar-se da mesma proteína.

O fragmento PO2Cx-Gbox inclui além do motivo G-box a sequência de um dos TATA-boxes presentes no promotor (Figura 4.4). O valor do peso molecular da proteína identificada nos experimentos de *Southwestern Blot* e na cromatografia de afinidade (22kDa) é muito próximo ao valor de 22,3kDa predito de para o fator basal de transcrição TBP (*tata binding protein*) de milho (Vogel *et al.*, 1993). A presença de sítios de fosforilação para CKII constitui-se em outra propriedade comum entre TBPs e a proteína identificada pelo fragmento PO2Cx-Gbox (Maldonado e Allende, 1999). O conjunto destas informações sugere que a proteína detectada nos experimentos de *EMSA* e *Southwestern Blot* e selecionada no experimento de cromatografia de afinidade representam provavelmente a proteína de endosperma de *Coix* que se liga ao TATA-box do gene *Opaco2*. Neste caso as demais proteínas selecionadas por este fragmento poderiam representar fatores protéicos associados a TBP.

As demais bandas observadas nos experimentos de cromatografia de afinidade não foram selecionadas de forma exclusiva pelas diferentes resinas de afinidade (Figura 3.19). Estas podem ser resultantes de interações inespecíficas, ou ainda, representar componentes de complexos muti-protéicos. A heterogeneidade do padrão de proteínas selecionadas não permitiu a

caracterização através de espectrometria de massa, conforme planejado.

O experimento de cromatografia de afinidade foi realizado com a intenção inicial de isolar e posteriormente identificar as proteínas que interagem com o promotor do gene *Opaco2*. A identificação seria realizada através de digestão proteolítica seguida de espectrometria de massa, utilizando a metodologia descrita por Nordhoff *et al.* (1999). Porém, a heterogeneidade de peptídeos selecionados nas cromatografias de afinidade não permitiu a utilização da espectrometria de massa na identificação das proteínas selecionadas.

Capítulo

5

Materiais e Métodos

Material vegetal

As sementes *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay foram obtidas da coleção de germoplasma do Departamento de Genética da Universidade Estadual de Campinas. As plantas foram mantidas em fecundação aberta na área experimental do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Unicamp.

Oligonucleotídeos sintéticos

Os oligonucleotídeos não fosforilados, dessalinizados foram sintetizados sob encomenda pela GIBCO BRL *Custom Primers*. A Tabela 5.2 mostra a sequência dos oligonucleotídeos sintéticos utilizados como iniciadores nas diversas reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Construção do vetor de expressão pETO2Cx-ABL e pETO2Cx-L

Os fragmentos *O2Cx-ABL* e *O2Cx-L* correspondentes respectivamente à região codificadora da região bZIP e Zíper de Leucinas da proteína Opaco2 de *Coix*, foram obtidos através de PCR. Foi utilizado como molde o plasmídeo pCO2-1 contendo o cDNA de *Opaco2* de *Coix* (Vettore *et al.*,

1998). Foram utilizados como iniciadores os oligonucleotídeos AB5o2Cx e BL3o2Cx para o fragmento *O2Cx-ABL* e BL3o2Cx e BL5o2Cx para o fragmento *O2Cx-L* (Tabela 5.2). As reações de PCR foram realizadas em trinta ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 40 °C por um minuto, extensão com a enzima *Tli polimerase* (Promega) a 72 °C por um minuto e um último ciclo de dez minutos a 72 °C.

Os iniciadores utilizados adicionaram aos fragmentos amplificados seqüências correspondentes aos sítios de restrição *NcoI* na extremidade 5', e *HindIII* na extremidade 3'. Os fragmentos amplificados, após digestão com *NcoI* e *HindIII*, foram inseridos no vetor pET 3C (Novagem), resultando no plasmídeo pETO2Cx-ABL e pETO2Cx-L (Figura 5.1).

Produção e purificação das proteínas O2Cx-ABL e O2Cx-L recombinantes produzida em bactéria

Bactérias *E. coli* da linhagem BL21 pLys-S (DE3) foram transformadas com o plasmídeo pETO2Cx-ABL ou pETO2Cx-L.

Cinquenta mililitros de meio 2YT contendo 60µg/ml de ampicilina e 25µg/ml de cloranfenicol foram inoculados com uma colônia transformada do vetor pETO2Cx-ABL ou pETO2Cx-L e incubados a 37°C durante uma noite sob agitação. Duzentos e cinquenta mililitros do mesmo meio foram inoculados com bactéria suficiente para obter DO₆₀₀ de 0,1 e incubados a 37°C sob agitação até a DO₆₀₀ alcançar o valor de 0,7. A expressão das

proteínas recombinantes foi então induzida através da adição de 1mM de IPTG seguido de incubação a 37°C sob agitação por três horas. As células foram coletadas por centrifugação e suspensas em 5ml de tampão de lise (Tris HCl 100 mM pH 7,5, EDTA 5mM, Benzamidina 5mM, DTT 5mM). As suspensões foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas por uma noite a -70°C.

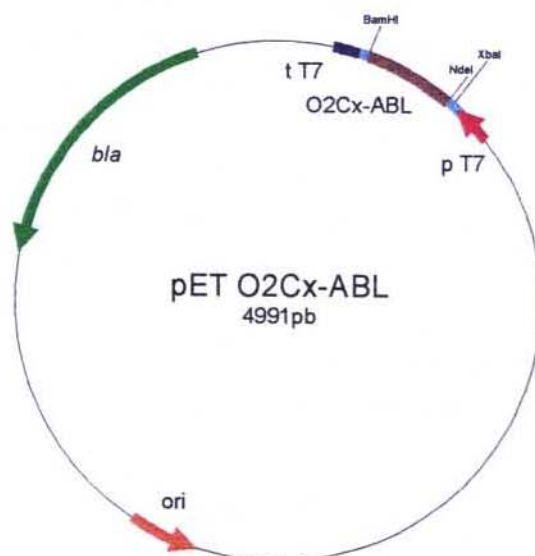


Figura 5.1: Esquema do plasmídeo pETO2Cx-ABL. O promotor viral T7 está representado em vermelho, em azul claro a região de policlonagem do plasmídeo pET3C contendo o fragmento que codifica a região bZIP de Opaco2 de *Coix* em marrom. Em roxo encontra-se representado o terminador T7. O gene *bla*, que confere resistência a ampicilina encontra-se representado em verde, e a origem de replicação do plasmídeo (*ori*) em cor de laranja. O plasmídeo pETO2Cx-L obedece ao mesmo esquema descrito para o plasmídeo pETO2Cx-ABL.

A lise das células foi completada através de cinco ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C. As suspensões resultantes foram submetidas a cinco ciclos de sonicação de 15 segundos para redução da alta viscosidade

proporcionada pelo DNA bacteriano. Os extratos foram centrifugados a 12.000 rpm por 20min a 4°C, e os sobrenadantes coletados.

Os sobrenadantes foram incubados sob constante agitação a 80°C por 3min e em seguida resfriados

em banho de gelo. As proteínas desnaturadas foram então removidas através de centrifugação a 12.000 rpm a 4°C por 30 minutos.

As proteínas dos sobrenadantes foram precipitadas através de *salting out* pela adição de sulfato de amônio a 80% de saturação a 0°C. As suspensões obtidas foram armazenadas 4°C.

Os precipitados foram recolhidos através de centrifugação a 12.000 rpm por 30min e dissolvidos em tampão PEI (Tris HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 1M, EDTA 5mM, DTT 2mM). As soluções foram centrifugadas nas mesmas condições e aos sobrenadantes foi adicionada solução de polietilenoimina 5% (m/v) suficiente para uma concentração final de 0,5% (m/v). Os precipitados contendo DNA bacteriano foram removidos através de centrifugação. As proteínas presentes nos sobrenadantes foram novamente precipitadas com sulfato de amônio a 80% de saturação e mantidas a 4°C por uma noite. O excesso de polietilenoimina foi eliminado através de três lavagens sucessivas do precipitado com 40ml de tampão de lavagem (Tris HCl 20mM pH 7,5, sulfato de amônio 80% de saturação, EDTA 5mM, DTT 2mM). As amostras contendo as proteínas recombinantes O2Cx-ABL ou O2Cx-L foram armazenadas em solução de sulfato de amônio 80% a 14°C.

Etapas cromatográficas da purificação da proteína O2Cx-ABL recombinante

A proteína O2Cx-ABL precipitada em sulfato de amônio foi dissolvida em 5 ml de tampão A (Hepes 25mM pH 7,3,

EDTA 1mM, DTT 5mM). A amostra foi centrifugada a 12.000rpm por 30min a 4°C e injetada em uma coluna AP-1 (10x100mm, Waters) contendo aproximadamente 6ml da resina de troca iônica POROS HS (PerSeptive) previamente equilibrada com o tampão A. Após a injeção da amostra a coluna foi lavada com 50ml de tampão A. As proteínas foram eluídas utilizando-se um gradiente salino linear de 0 a 2M de NaCl em tampão A. O fluxo foi mantido em 2ml/min durante todo o processo cromatográfico. Foram coletadas frações de 1ml que foram analisadas através de SDS-PAGE. As frações contendo a proteína O2Cx-ABL recombinante foram reunidas em uma única amostra.

A proteína O2Cx-L precipitada em sulfato de amônio foi submetida ao mesmo processo, com a diferença de que ao invés de tampão A, foi usado tampão A' (MES 20mM pH 6,2, EDTA 1mM, DTT 5mM).

Após a primeira etapa cromatográfica, as amostras foram injetadas em uma coluna AP-1 (10x100mm, Waters) contendo aproximadamente 6ml da resina de fase reversa POROS R2 (PerSeptive) previamente equilibrada com solução B (acetonitrila 2%, ácido trifluoroacético 0,065% v/v). Após a injeção das amostras as colunas foram lavadas com 50ml de solução B. As proteínas foram eluídas com um gradiente de 2 a 50% de acetonitrila em 30 min, e 50 a 100% de acetonitrila. A acetonitrila 100% foi adicionada 0,05% de ácido

trifluoracético. O fluxo de 2ml/min foi mantido durante todas as etapas da cromatografia.

Foram coletadas frações de 1ml que foram analisadas através de SDS-PAGE. As frações contendo a proteína O2Cx-ABL ou O2Cx-L recombinantes foram reunidas e as amostras resultantes foram divididas em frações de 0,5ml, que foram liofilizadas e armazenadas a -20°C.

A quantificação das proteínas O2Cx-ABL e O2Cx-L recombinantes recuperadas foi realizada através de espectrometria a 205nm (Scopes, 1974).

Ensaio de dicroísmo circular

Os ensaios com o uso de espectroscopia de dicroísmo circular foram realizados utilizando-se um aparelho da marca Jasco no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron em colaboração com o Dr. Carlos Ramos.

Os ensaios de análise de espectro foram realizados com 22µM da proteína O2Cx-ABL em tampão fosfato de sódio 100mM contendo 5mM de DTT usando uma cubeta com capacidade para 250µl. Foram também realizados ensaios contendo 11µM do fragmento de DNA CxP-CxN. Nos ensaios de dicroísmo circular foram descontados os espectros correspondentes ao tampão e ao fragmento de DNA na solução.

A curva de desnaturação térmica foi realizada nas mesmas condições dos ensaios de análise de espectro, porém usando 20µM de proteína O2Cx-ABL recombinante. O controle da temperatura

foi realizado acoplando-se um banho refrigerado ao aparelho de leitura. Foram realizadas medições em comprimento de onda de 220 nm, na faixa de temperatura de 10°C a 70°C em intervalos de 5°C. Cada leitura foi realizada em um intervalo de tempo de 20 minutos para permitir a estabilização das proteínas na temperatura desejada.

A determinação da constante de dissociação (Kd) foi calculada a partir na mudança de elipticidade usando a metodologia descrita por Marky e Breslauer (1987) e citada por Jelesarov (1998) :

$$K_d = \frac{2 [\text{proteína total}] f_u^2}{1 - f_u}$$

onde [proteína total] equivale à concentração total de proteína e f_u a fração de monômeros obtida por:

$$f_u = \frac{\Delta [\theta]}{\Delta [\theta]_{\max}}$$

onde:

$$\Delta [\theta] = [\theta] - [\theta]_D$$

$$\Delta [\theta]_{\max} = [\theta]_M - [\theta]_D$$

e:

$[\theta]$ = elipticidade média na temperatura de desnaturação,

$[\theta]_D$ = elipticidade do dímero,

$[\theta]_M$ = elipticidade do monômero.

Ensaio de dimerização

As proteínas recombinantes (O2Cx-ABL e O2Cx-L) foram utilizadas em ensaios para analisar a taxa de dimerização. Para distinguir as populações de monômeros, homodímeros e heterodímeros, foi utilizada a técnica de SDS-PAGE. A estabilização de tais complexos foi obtida pela adição do *cross-linker* bis sulfosuccinimidil- substrato (BS³) (Pierce Co., IL, USA).

Para possibilitar a quantificação do experimento de dimerização, a proteína recombinante O2Cx-ABL foi marcada por fosforilação com a enzima caseína quinase tipo II – subunidade catalítica de *Zea mays*, recombinante em bactéria (Calbiochem), na presença de 1 µCi de [γ -³²P]-ATP, em tampão de fosforilação (Hepes pH 7,5 20 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1mM).

Cinquenta nanogramas de O2Cx-ABL foram dissolvidas em tampão de dimerização (50 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl e 5 mM de DTT) contendo diferentes quantidades de proteínas O2Cx-L. As proteínas foram desnaturadas a 80°C por 5 minutos e renaturadas a 15°C por 30 minutos para permitir a formação de heterodímeros. Foi então adicionado o *cross-linker* BS³, suficiente para 1µM em 20µl de reação, incubando-se por mais 20 minutos a 15°C. As proteínas foram desnaturadas a 80°C com 10µl de tampão de amostra de proteínas.

As proteínas foram separadas em SDS-PAGE (15%) . Os géis foram secos e submetidos à análise em um aparelho

PhosphorImager (Fujifilm FLA 3000) onde as bandas correspondentes aos heterodímeros foram quantificadas.

Produção das proteínas O2Cx-ABL e O2Cx-L com substituições pontuais

As substituições dos aminoácidos presentes na posição "a" da quinta repetição no zíper de Leucinas foram obtidas através da técnica de PCR. Como pode ser observado na Figura 5.2A o vetor pETO2Cx-ABL foi usado como molde em reações de PCR na amplificação dos fragmentos I e II. Na amplificação do fragmento II, foi inserida uma mutação silenciosa através do oligonucleotídeo ABL-SB que gerou um sítio para a enzima de restrição Sal I (Figura 5.2 destaque amarelo). Na amplificação do fragmento I, a mesma mutação foi inserida com o oligonucleotídeo ABL-SXF. Esse mesmo oligonucleotídeo gerou a substituição do resíduo de tirosina da posição "a" na quinta repetição do zíper de leucinas por um resíduo de fenilalanina (Figura 5.2A destaque em vermelho). O fragmento I foi digerido com as enzimas XbaI e Sal I, enquanto que o fragmento II foi digerido com Sal I e BamHI.

O fragmento II foi ligado ao fragmento I pelo sítio de Sall, gerando o inserto O2Cx-ABLF (Tabela 5.1) que foi posteriormente inserido no plasmídeo pET3C, entre os sítios de XbaI e BamHI.

molde: pET02Cx-ABL

Fragmento II

GACACCACACAGGGTTCCCTCTAGAAAA...
 ...N Q K Y N E A N V D N R V L...
 ...AACCAAAAGTACACAGGGTAAATGTTGACACAGGGTACT...
 ...N Q K E A N V D N
 ← GGTTCCTGTTGCTCGATTACACTCTTGT
 oligo ABL-SX
 Oligo ABL-SB
 GAGGCTAACTGTGACACACAG →
 Oligo ABL-ES
 ← CCAGTACTAGGCTGACGATT
 ...AGGGGTCTCATGGTGGGGGGCTGTAACAAAA...
 R V M D P A A N K...

A

Fragmento I

GACACCACACAGGGTTCCCTCTAGAAAA...
 ...N Q K E N E A N V D N R V L...
 ...AACCAAAAGTTCACAGGGTAAATGTCACACAGGGTACT...
 ...AGGGGTCTCATGGTGGGGGGCTGTAACAAAA...
 R V M D P A A N K...

Fragmento 02Cx-ABLF

molde: pET02Cx-L

Fragmento II

GACACCACACAGGGTTCCCTCTAGAAAA...
 ...N Q K Y N E A N V D N R V L...
 ...AACCAAAAGTACACAGGGTAAATGTTGACACAGGGTACT...
 ...N Q K Y N E A N V D N
 ← GCTCCTTACAGCTGTGTGTC
 oligo L-SXL
 Oligo ABL-SB
 GAGGCTAACTGTGACACAG →
 Oligo ABL-ES
 ← CCAGTACTAGGCTGACGATT
 ...AGGGGTCTCATGGTGGGGGGCTGTAACAAAA...
 R V M D P A A N K...

B

Fragmento I

GACACCACACAGGGTTCCCTCTAGAAAA...
 ...N Q K Y N E L N V D N R V L...
 ...AACCAAAAGTTCACAGGGTAAATGTCACACAGGGTACT...
 ...AGGGGTCTCATGGTGGGGGGCTGTAACAAAA...
 R V M D P A A N K...

Fragmento 02Cx-LT

Figura 5.2: Esquema da produção dos insertos de 02CxABL e 02Cx L contendo substituições. Em A é mostrada a produção dos fragmentos mutantes de 02CxABL onde a área em amarelo representa a mutação silenciosa para criar o sítio de restrição para SalI. Em vermelho está representada a substituição dos aminoácidos na proteína. Em azul está representado o sítio de restrição para XbaI e em verde o sítio de restrição para BamHI. Em B encontra-se o mesmo esquema descrito para os fragmentos 02CxL contendo substituições.

Os fragmentos *O2Cx-ABLS* e *O2Cx-ABLV* contendo as substituições da tirosina para serina e valina respectivamente (Tabela 5.1) foram obtidos de maneira similar à descrita para *O2Cx-ABLF*. Neste caso foram usados os oligonucleotídeos e ABL-SXV respectivamente.

As substituições dos aminoácidos presentes na posição "d" da quinta repetição no zíper de Leucinas foram obtidas de maneira similar à descrita anteriormente. Neste caso, porém, foi usado o vetor pETO2Cx-L como molde (Figura 5.2B) na obtenção dos fragmentos *O2Cx-L* mutantes. Os oligonucleotídeos, L-SXL, L-SXI, L-SXS e L-SXT (Tabela 5.2) foram usados na obtenção dos fragmentos *O2Cx-LL*, *O2Cx-LI*, *O2Cx-LS* e *O2Cx-LT*, respectivamente.

A Tabela 5.1 descreve claramente as substituições obtidas em cada fragmento, os nomes de cada vetor e proteína, os aminoácidos trocados e a posição da substituição na α -hélice.

O processo de produção e purificação das proteínas mutantes foi exatamente o mesmo usado para a produção das proteínas normais *O2Cx-ABL* e *O2Cx-L*. O peso molecular observado em SDS-PAGE e o grau de pureza obtido para essas proteínas também foram idênticos aos observados para as proteínas normais.

Avaliação da influência das mutações pontuais na dimerização

A influência dos resíduos "a" e "d" da quinta repetição do Zíper de Leucinas

no processo de dimerização foi avaliada através dos ensaios de dimerização descritos anteriormente.

Foram realizadas titulações das proteínas *O2Cx-ABL* com quantidades crescentes de *O2Cx-L*. Nestes ensaios porém, foram utilizados 10ng de *O2Cx-ABL* em cada reação.

Nos ensaios para determinação da influência do resíduo "a", foram realizadas titulações com quantidades crescentes da proteína *O2Cx-Lns*, mantendo a mesma quantidade de proteínas *O2Cx-ABL* (normal e mutantes).

Já nos ensaios para determinação da influência do resíduo "d", foi realizado o inverso, titulando-se a proteína *O2Cx-ABLns* (normal) com quantidades crescentes de *O2Cx-L* (normal e mutantes).

Obtenção dos extratos nucleares de endospermas *Coix*

Sementes de *Coix lacryma jobi* L. de cinco estágios de desenvolvimento (I, II, III, IV e V) (Targon, *et al.*, 1992) foram colhidas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Os extratos nucleares foram preparados a partir dos endospermas imaturos conforme a técnica descrita por Maier, *et al* (1987) para endospermas de milho, com algumas modificações.

Todos os procedimentos foram realizados a 4°C. Cinco gramas de endospermas isolados de sementes de cada estágio de desenvolvimento foram macerados em 50ml de tampão de homogeneização (Tris HCl 25mM,

pH 8,5; EDTA 25mM; Sacarose 0,44M; Ficol 400 2,5% (m/v); Dextran T-40 0,5% (m/v); Triton X-100 0,5% (v/v); espermina 2mM; espermidina 0,5mM; β -mercaptoetanol 10mM).

O homogeneizado foi filtrado em malha 40 e posteriormente em malha 100. O filtrado foi centrifugado a 1.000 g por cinco minutos.

Tabela 5.1: Descrição dos peptídios contendo substituições no Zíper de Leucinas

Fragmento	Vetor	Proteína	Posição da substituição	Aminoácido substituído	Aminoácido substituinte
<i>O2Cx-Lns</i>	pETO2Cx-Lns	O2Cx-Lns	"d"		
<i>O2Cx-LI</i>	pETO2Cx-LI	O2Cx-LI	"d"	alanina	isoleucina
<i>O2Cx-LL</i>	pETO2Cx-LL	O2Cx-LL	"d"	alanina	leucina
<i>O2Cx-LS</i>	pETO2Cx-LS	O2Cx-LS	"d"	alanina	serina
<i>O2Cx-LT</i>	pETO2Cx-LT	O2Cx-LT	"d"	alanina	treonina
<i>O2Cx-ABLns</i>	pETO2Cx-ABLns	O2Cx-ABLns	"a"		
<i>O2Cx-ABLF</i>	pETO2Cx-ABLF	O2Cx-ABLF	"a"	tirosina	fenilalanina
<i>O2Cx-ABLS</i>	pETO2Cx-ABLS	O2Cx-ABLS	"a"	tirosina	serina
<i>O2Cx-ABLV</i>	pETO2Cx-ABLV	O2Cx-ABLV	"a"	tirosina	valina

O sedimento foi suspenso em um total de 10 ml de tampão de solubilização (Tris HCl 50mM, pH 8,5; MgCl₂ 5mM; glicerol 25% (v/v); β -mercaptoetanol 10mM), e centrifugado a 20.000 g por vinte minutos.

O sedimento enriquecido em núcleos foi suspenso em 1ml de tampão de lise (Hepes 20mM pH 7,5; MgCl₂ 5mM; glicerol 25% (v/v); NaCl 0,5M; EDTA 0,2mM; PMSF 0,5mM DTT 0,5mM; espermidina 5mM) e incubado em banho de gelo por 45 minutos.

A suspensão resultante foi centrifugada por dez minutos em microcentrífuga. O sobrenadante foi

coletado e submetido à diálise contra 100ml de tampão de diálise (Hepes 20mM, pH 7,5; Glicerol 20% (v/v); KCl 100mM; EDTA 0,2mM; PMSF 0,5mM; DTT 0,5mM). O extrato foi então dividido em alíquotas e armazenado a -70°C.

A quantificação de proteína presente nos extratos foi realizada através do método descrito por Bradford, *et al* (1976) utilizando-se o Kit Protein Assay (Biorad).

* No caso das proteínas com terminação "ns", não há aminoácidos substituintes e substituídos pois estas proteínas correspondem à proteína Opaco2 normal.

Obtenção de fragmentos de DNA para produção de sondas

Os fragmentos de DNA utilizados como sondas nos ensaios EMSA foram obtidos através de amplificação por PCR, ou através do anelamento de oligonucleotídeos sintéticos.

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se como iniciadores os oligonucleotídeos PO2CxRI dir, PO2CxRI rev, OLD e Gb (Tabela 5.2) para amplificar as regiões PO2Cx-RI e PO2Cx-Gbox, respectivamente (Figura 3.7). Como molde foi utilizado o plasmídeo pCO2-Gus (Vettore, 1998). Este plasmídeo apresenta o promotor do gene *Opaco2* de *Coix* controlando a expressão do gene *Gus*. As reações de amplificação foram realizadas em trinta ciclos, constituído de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 50°C por um minuto e extensão pela *Taq DNA polymerase* (Gibco BRL) a 72°C por um minuto e um último ciclo de dez minutos a 72°C. Os oligonucleotídeos utilizados como iniciadores adicionaram nas extremidades 5' dos fragmentos amplificados seqüências correspondentes aos sítios de restrição XhoI e BamHI, respectivamente, nos fragmentos PO2Cx-Gbox e PO2Cx-RI. Os fragmentos amplificados foram previamente digeridos com as respectivas enzimas de restrição antes da reação de marcação.

Baseado na seqüência nucleotídica do promotor, foram sintetizados dois oligonucleotídeos complementares entre si correspondentes às regiões -779 a

-806 (PO2CxRII dir) e -789 a -820 (PO2CxRII rev). Três microgramas de cada oligonucleotídeo foram misturados em 50µl de tampão de anelamento (Tris-HCl 10mM pH8,0, EDTA 1mM, NaCl 150mM) seguido dos seguintes períodos de incubações sucessivos: 15 minutos a 65°C, 15 minutos a 42°C, 15 minutos a 37°C e 15 minutos a temperatura ambiente. O fragmento de DNA resultante foi denominado PO2Cx-RII (Figura 5.3).

Os fragmentos CxPCxN, CxPCxN-glm e CxPCxN-palind, utilizados nos experimentos de EMSA com a proteína O2Cx-ABL purificada, foram obtidos de maneira similar à descrita para PO2Cx-RII.

Marcação das sondas para EMSA e Southwestern blot

Duzentos e cinquenta nanogramas de cada fragmento de DNA dupla fita obtido foram misturados com 30µCi de [α P³²] dCTP (3000Ci/mmol, 10mCi/ml - Amersham) em 50µl de tampão de Klenow (Tris-HCl 50mM pH 7,6, MgCl₂ 10mM), contendo 0,4mM de dGTP, dATP e dTTP. Três unidades de *Large Fragment of DNA polymerase I* (*Klenow fragment*) (Gibco-BRL) foram adicionadas na reação, que foi incubada a 37°C por 45 minutos.

As sondas foram purificadas em gel de poliacrilamida 5% e as atividades específicas determinadas através de contagem Cerenkov em um

contador líquido de cintilação Rackbeta 1217 (LKB).

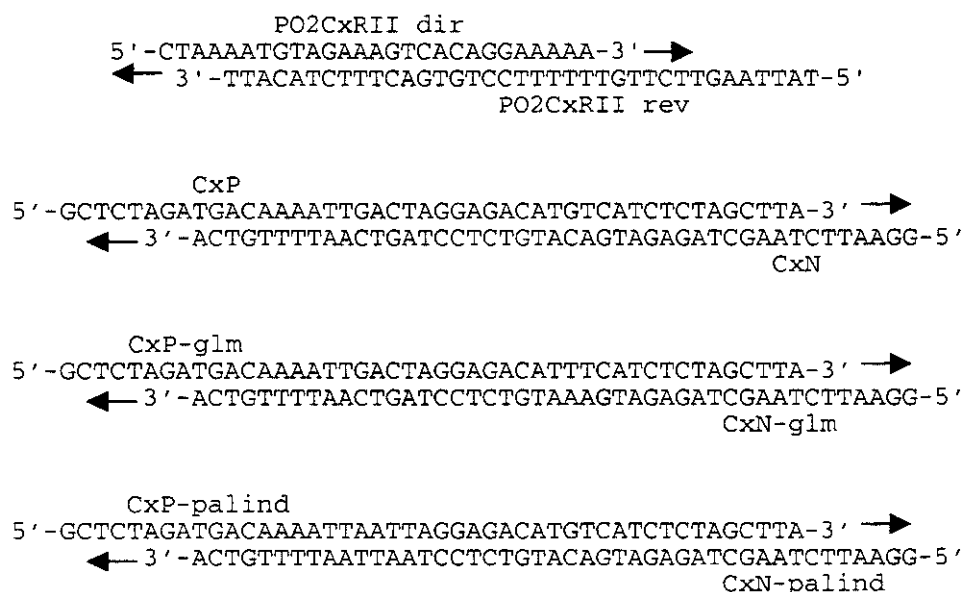


Figura 5.3: Obtenção dos fragmentos PO2Cx-RII, CxPCxN, CxPCxN-glm e CxPCxN-palind. Três microgramas de cada par de oligonucleotídeos, sintetizados sob encomenda pela GIBCO BRL *Custom Primers*, foram misturados em tampão de anelamento e incubados em temperaturas decrescentes para anelar sua região complementar. As setas indicam a direção da polimerização para o preenchimento das extremidades e conseqüente formação dos respectivos fragmentos PO2Cx-RII, CxPCxN, CxPCxN-glm e CxPCxN-palind.

Ensaio de EMSA com a proteína O2Cx-ABL purificada

A determinação da atividade da proteína purificada foi realizada através de ensaio de EMSA. A formação de complexos DNA-Proteína foi analisada através da adição de 4 ng da proteína O2Cx-ABL com 400 fmoles do fragmento de DNA em tampão de ligação (Hepes 10mM, pH 7,5 NaCl 50mM, DTT 1mM, EDTA 1mM, BSA 2mg/ml, ssDNA 0,25ng/μl, Glicerol 10%) por 5 minutos a temperatura ambiente. Foi então adicionado fragmento de DNA marcado radioativamente (2 a 10 fmol) (cerca de

10.000cpm), totalizando um volume de 50μl de reação. A mistura foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente. Adicionaram-se então 5μl de Tampão de amostra de EMSA (Tris-HCl 250mM pH7,5, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,2%, xileno cianol 0,2%). Nos experimentos de competição, os competidores foram adicionados ao tampão de ligação antes da adição dos extratos protéicos.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida 5% (30:1 acrilamida-

bisacrilamida), preparado em TBE 0,25X (Trizma base 50mM, Ácido Bórico 42mM, EDTA 0,5mM) contendo 5% de glicerol. O tampão de corrida utilizado foi TBE 0,25X. O gel foi pré-corrido por 30 minutos a $20V.cm^{-1}$. A eletroforese foi realizada a 400V, 4°C por cerca de 150 minutos. O gel foi seco e submetido à auto-radiografia por 12 a 24 horas.

Ensaio de EMSA com extratos nucleares

A formação de complexos DNA-Proteína foi analisada através da adição de extrato nuclear (1 a 3µg) em Tampão de Ligação (Tris-HCl 10mM pH 7,5, NaCl 100 a 300mM, DTT 1mM, Nonidet NP40 0,02%, EDTA 1mM, poly dIdC 20 a 40ng/µl, Glicerol 10%) por 5 minutos a temperatura ambiente. Foi então adicionado fragmento de DNA marcado radioativamente (2 a 10 fmol) (cerca de 10.000cpm), totalizando o volume de 50µl de reação. A mistura foi incubada 20 minutos a temperatura ambiente. Adicionaram-se então 5µl de Tampão de Amostra de EMSA. As demais condições utilizadas no ensaio foram similares às descritas para o ensaio EMSA com a proteína O2Cx-ABL recombinante.

Ensaio de Southwestern Blot com extratos nucleares

Amostras contendo dez microgramas de proteínas nucleares de endospermas de *Coix* dos estágios II, III e V de desenvolvimento foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE e transferidas para membrana de

nitrocelulose (Hybond-C, Amersham). A membrana foi incubada durante a noite a 4°C em tampão de renaturação (Tris-HCl 10mM pH7,4, EDTA 1mM, NaCl 50mM, Triton X-100 1%, solução de Denhart's 1X e 100ng/ml de DNA de esperma de salmão). A membrana foi adicionalmente lavada por duas vezes e incubada a temperatura ambiente em 6ml da mesma solução acrescentada de $2,0 \times 10^6$ com da sonda PO2Cx-Gbox. O excesso de DNA marcado foi removido através de quatro lavagens com a solução de renaturação. A membrana foi seca e submetida a auto-radiografia.

Conjugação de fragmentos de DNA em partículas paramagnéticas

Os fragmentos de DNA dupla fita utilizados no ensaio de cromatografia de afinidade foram obtidos a partir do anelamento de oligonucleotídeos sintéticos ou através de amplificação por PCR, conforme descrito anteriormente para as sondas de EMSA. O fragmento correspondente à região PO2Cx-RII biotinilada foi obtido através do anelamento dos oligonucleotídeos: PO2CxRII-rev e PO2CxRII-bio (Tabela 5.2) de maneira similar àquela descrita para o fragmento PO2CX-RII na Figura 5.3. O fragmento contendo o sítio de ligação para o ativador de transcrição Opaco2 foi obtido a partir do anelamento dos oligonucleotídeos CxP e CxN-bio (de maneira similar à mostrada na Figura 5.3). O fragmento correspondente à

região PO2Cx-Gbox foi obtido por PCR com os oligonucleotídeos OLD e Gbox-bio (Tabela 5.2). Os oligonucleotídeos com a terminação “bio” apresentam uma molécula de biotina na extremidade 5’.

No caso dos fragmentos obtidos por anelamento de oligonucleotídeos, as extremidades não pareadas foram preenchidas em 50µl de tampão de Klenow (Tris-HCl 50mM pH7,6, MgCl₂ 10mM), contendo 0,4mM de dCTP, dGTP, dATP e dTTP. Três unidades de Klenow (Gibco) foram adicionadas na reação, que foi incubada a 37°C por 45 minutos.

Uma amostra da reação de preenchimento contendo dez picomoles de DNA biotinilado foi adicionada a 10µg de esferas magnetizadas de poliestireno conjugadas com estreptoavidina (*Dynabeads* – Dynal) em 20µl de tampão Tris HCl 5mM pH7,5, EDTA 0,5mM e NaCl 1M. A solução foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos sob agitação em um homogeneizador orbital (Marconi). Com a finalidade de remover o excesso de DNA biotinilado as *Dynabeads* imobilizadas através de magnetismo foram lavadas três vezes em 40µl do mesmo tampão.

Cromatografia de afinidade a DNA com a proteína O2Cx-ABL purificada

Trezentos nanogramas da proteína O2Cx-ABL purificada foram adicionados em 20µl de tampão de ligação (Hepes 10mM pH7,9, KCl 50mM, EDTA 1mM, DTT 10mM e BSA 2mg/ml) e incubados

a temperatura ambiente por 5 minutos. As partículas de poliestireno magnéticas (*Dynabeads*) contendo DNA conjugado foram suspensas no tampão de ligação contendo a proteína recombinante O2Cx-ABL e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos sob agitação em homogeneizador orbital. As *Dynabeads* imobilizadas por magnetismo foram lavadas duas vezes à temperatura ambiente por 3 minutos com 40µl de tampão de ligação.

Análise da cromatografia de afinidade com O2Cx-ABL purificada

Amostras das soluções de ligação, de lavagem bem como das *Dynabeads* foram incubadas com tampão de amostra de proteínas (Tris-HCl 50mM pH 6,8, glicerol 8%, SDS 1%, βmercaptoetanol 1%, EDTA 2mM, azul de bromofenol) a 100°C por 5 minutos e submetidas a eletroforese em dois géis de SDS-PAGE 15%. Um dos géis foi corado com comassie blue R-250 (Sigma), e o segundo foi submetido a análise de *Western blot*.

Na análise por *Western blot* as proteínas foram transferidas para uma membrana de Nylon (Hybond-N, Amersham), utilizando-se o aparelho *Multiphor Novablot* (LKB) conforme as condições descritas por Ausubell *et al.* (1994). Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de bloqueio (2,5mM Tris, 137mM NaCl, 0,7mM KCl, 0,05%Tween20, 5%

molico) a 4°C por uma noite. Em seguida a membrana foi incubada na solução tampão 2,5mM Tris, 137mM NaCl, 0,7mM KCl, 1% molico contendo anticorpo primário anti-Opaco2 de *Coix* (1:10.000) por uma hora. Após três lavagens de 5 minutos com solução de lavagem (2,5mM Tris, 137mM NaCl, 0,7mM KCl, 0,05%Tween20), a membrana foi incubada com anticorpo secundário monoclonal anti-IgG (1:5000) conjugado com fosfatase alcalina (Sigma). O excesso desse anticorpo foi removido através de três lavagens por 5 minutos com a solução de lavagem. A membrana foi incubada por 5 minutos em tampão de revelação (Tris 100mM pH 9,0 contendo 100mM de NaCl) e em seguida incubado no escuro por 10 minutos com 5ml do substrato quimioluminescente CSPD (Tropix) diluído 1:2.000 no mesmo tampão. A membrana foi submetida a autoradiografia.

Cromatografia de afinidade a DNA com extratos nucleares

Trinta microgramas de extrato nuclear de endospermas de *Coix* foram adicionados a 60µl de tampão de ligação (Tris 20mM pH 7,5, KCl 100mM, EDTA 2mM, DTT 2mM, NP40 0,04%, poli dIdC 1ug/ul e glicerol 20%) e incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. As *Dynabeads* contendo DNA conjugado foram suspensas no tampão de ligação contendo as proteínas nucleares e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos sob agitação em um

homogeneizador orbital. As *Dynabeads* foram imobilizadas por magnetismo e lavadas duas vezes à temperatura ambiente por 20 minutos com 120µl do mesmo tampão de ligação.

Análise da cromatografia de afinidade com extratos nucleares

As *Dynabeads* contendo proteínas conjugadas foram suspensas em 10 µl de tampão de fosforilação (Tris 20mM pH 7,5, MgCl₂ 10mM, DTT 1mM) contendo uma unidade de caseína-quinase II (CKII originária de milho, produzida em bactérias) ou proteína-quinase A (PKA, obtida a partir de coração de boi). As proteínas selecionadas pelas *Dynabeads* foram fosforiladas através da adição de 2µCi de [γ P³²] dATP (3000Ci/mmol, 10mCi/ml - Amersham), incubando-se a 30°C por 30 minutos. A reação de fosforilação foi interrompida com a adição de 1µl de EDTA 0,5M.

Foram adicionados 5µl de tampão de amostra de proteínas diretamente nas reações de fosforilação. As proteínas foram desnaturadas a 100°C por 5 minutos e submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 10%. O gel foi seco e autoradiografado.

Tabela 5.2: Sequências dos oligonucleotídeos sintéticos utilizados.

PET-X	5'-GAGAGCACAAACGGTTTCCCTC-3'
ABL-SB	5'-GAGGCTAATGTCGACAACAGG -3'
ABL-BS	5'-TTAGCAGCCGGATCCATGACC-3'
ABL-SXV	5'-TGTTGTCGACATTAGCCTCATTGACCTTTTGG -3'
ABL-SXF	5'-TGTTGTCGACATTAGCCTCATTGAACTTTTGG -3'
ABL-SXS	5'-TGTTGTCGACATTAGCCTCATTGACTTTTGG -3'
L-SXL	5'-CCCTGTTGTCGACATTGAGCTC -3'
L-SXI	5'-CCCTGTTGTCGACATTAATCTC -3'
L-SXS	5'-CCCTGTTGTCGACATTTGACTC -3'
L-SXT	5'-CCCTGTTGTCGACATTGGTCTC -3'
BL5o2Cx	5'-AAGACATATGAAAGCCGCTCAC-3'
AB5o2Cx	5'-GATCATATGGTGAGGCTTGC-3'
BL3o2Cx	5'-GTGAGCTCGGATCCATGACCCG-3'
PO2Cx RI dir	5'-TGTACGTTTCAAGGATCCTTTC-3'
PO2Cx RI rev	5'-ACATTTTAGAGTAAGCTTGAC-3'
OLD	5'-CTATCTCGAGCTTGGCTTATTAC-3'
Gb	5'-TCGTCACGCTACATACAT-3'
Gbox-bio	5'Bio*-TCGTCACGCTACATACAT-3'

* A denominação "Bio" na extremidade 5' dos oligonucleotídeos equivale a uma molécula de biotina covalentemente ligada.

Capítulo

6

Conclusões

- 1 - Foi estabelecido um novo processo de produção e purificação das proteínas O2Cx-ABL e O2Cx-L recombinantes em larga escala em bactéria.
- 2 - As proteínas O2Cx-ABL e O2Cx-L recombinantes purificadas apresentaram alto grau de pureza.
- 3 - Ensaio de ligação demonstraram que a proteína O2CX-ABL recombinante purificada apresentou atividade de ligação a sítios alvos específicos, podendo ser útil em estudos de interação DNA-proteína, e no estabelecimento de sua estrutura tridimensional através das técnicas de ressonância magnética nuclear e difração de raios-X.
- 4 - Os ensaios de dicroísmo circular demonstraram que a proteína recombinante purificada O2Cx-ABL é capaz de formar α -hélice mesmo na ausência de DNA. Isto fornece indícios sobre a maneira pela qual a proteína Opaco2 interage com o DNA.
- 5 - Foi estabelecida uma metodologia baseada em SDS-PAGE para analisar a formação de dímeros e heterodímeros da proteína Opaco2 de *Coix*.
- 6 - Através desta metodologia foi demonstrado que a quinta repetição do zíper de leucinas na proteína Opaco2 de *Coix* influencia a dimerização. Isto indica que a estrutura *coiled-coil* se estende até essa região do zíper de leucinas.
- 7 - Os ensaios de dimerização indicaram que a substituição da tirosina por fenilalanina na posição "a" da quinta repetição influencia significativamente a taxa de dimerização.
- 8 - Os ensaios de dimerização indicaram ainda que a influência da posição "d" na quinta repetição está relacionada com a hidrofobicidade do resíduo, indicando assim outro possível mecanismo de dimerização.
- 9 - Os ensaios de dicroísmo circular permitiram calcular a constante de dissociação da a proteína O2Cx-ABL. O cálculo desta constante para as proteínas O2Cx-ABL e O2Cx-L contendo mutações pontuais poderá fornecer valores precisos sobre as propriedades de dimerização.
- 10 - Foram identificadas três regiões do promotor do gene Opaco2 que

apresentaram capacidade de ligação com fatores protéicos presentes em extratos nucleares de endospermas imaturos de sementes de *Coix*.

representada pelo fragmento PO2Cx-Gbox sugerem a participação da proteína TBP (*tata binding protein*) na formação dos complexos DNA-proteína.

- 11 - Foi demonstrado que a intensidade máxima de formação dos complexos DNA-proteína detectados para as três regiões do promotor coincide com o estágio de desenvolvimento do endosperma em que ocorre o maior acúmulo de transcritos do gene *Opaco2*. Uma indicação de que os fatores protéicos envolvidos na formação dos complexos constituem moduladores envolvidos na regulação da expressão do gene *Opaco2*.
- 12 - Ensaios de *EMSA* com extratos nucleares de sementes coletadas ao meio dia e meia noite sugerem que os fatores protéicos detectados não estão envolvidos no controle diurno de transcrição do gene *Opaco2*.
- 13 - A comparação entre os resultados da análise de deleção do promotor e os dos ensaios de *EMSA* sugere um padrão complexo de modulação para a transcrição do gene *Opaco2*, envolvendo a participação de ativadores e repressores.
- 14 - Os resultados dos ensaios de *EMSA*, *Southwestern Blot*, e de cromatografia de afinidade indicam a participação de complexos multi-protéicos na regulação da expressão do gene *Opaco2*.
- 15 - Os resultados de *Southwestern* e cromatografia de afinidade da região

Capítulo

7

Referências Bibliográficas

- Arndt K., Fink G.R.** (1986). GCN4 protein, a positive transcription factor in yeast, binds general control promoters at all 5' TGA CTC 3' sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 22:8516-8520.
- Arora, R.K.** (1977). Job's tears (*Coix lacrym-jobi*) - a minor food and fodder crop from North Eastern India. *Econ. Bot.* 31, 358-366.
- Azevedo, R.A., Brennecke, K. e Lea, P.J.** (1995). Aspartate Kinas from maize mutants *ask 1* and *opaque2*. *Plant Physiol* 108, 133.
- Bass, H.W., Webster, C., Obian, G.R., Roberts, J.K.M., Boston, R.S.** (1992). A maize ribosome-inactivating proteins controlled by the transcriptional activator *opaque-2*. *Plant Cell* 4, 225-234.
- Bate N., Twell D.** (1998). Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Mol. Biol.* 5:859-69.
- Brochetto-Braga, M.R., Leite, A. e Arruda, P.** (1992). Partial purification and characterisation of Lysine-Ketoglutarate reductase in normal and opaque-2 maize endosperms. *Plant Physiol.* 98, 1139-1147.
- Buchel A.S., Brederode F.T., Bol J.F., Linthorst H.J.M.** (1999). Mutation of GT-1 binding sites in the Pr-1A promoter influences the level of inducible gene expression in vivo. *Plant Mol Biol* 40:387-396.
- Bucher, P.** (1990). Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA Polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J.Mol.Biol.* 212, 563-578.
- Burley S.K., Roeder R.G.** (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem* 65:769-99.
- Burow, M.D., Sen, P., Chian, C.A. e Muari, N.** (1992). Developmental control of α -phaseolin gene requires positive, negative, and temporal seed-specific transcriptional regulatory elements and a negative element for stem and root expression. *Plant J.* 2, 537-548.
- Chiu, R., Angel, P. e Karin, M.** (1989). Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-jun. *Cell* 59, 979-986.
- Ciceri P., Locatelli F., Genga A., Viotti A., Schmidt R.J.** (1999). The activity of the maize Opaque2 transcriptional activator is regulated diurnally. *Plant Physiol.* 121:1321-1328.
- Ciceri, P., Gianazza, E., Lazzari, B., Lippoli, G., Genga, A., Hoschek, G., Schmidt, R.J. e Viotti, A.** (1997). Phosphorylation of Opaque2 changes diurnally and impacts its DNA binding activity. *Plant Cell* 9, 97-108.
- Cord-Neto, G., Vettore, A.L., Silva, M.J., Arruda, P. e Leite, A.** (1995). The involvement of Opaque2 on α -prolamin gene regulation in maize and *Coix* suggest a more general role for this transcriptional activator. *Plant Mol.Biol.* 27, 1015-1029.
- Cord-Neto, G., Vettore, A.L., Silva, M.J., Arruda, P. e Leite, A.** (1995). The involvement of Opaque2 on α -prolamin gene regulation in maize and *Coix* suggest a more general role for this transcriptional activator. *Plant Mol.Biol.* 27, 1015-1029.
- Damerval, C. & Le Guilloux, M.** (1998). Characterisation of novel proteins affected by the o2 mutation and expressed during maize endosperm development. *Mol Gen Genet* 257, 354-361.
- de Pater, S., Katagari, F., Kijne, J. e Chua, N.-H.** (1994). bZIP proteins bind to a palindromic sequence without an ACGT core located in a seed-specific element of the pea lectin promoter. *Plant J.* 6, 133-140.

- Eisenberg D.** (1984). Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Annu Rev Biochem* **53**:595-623.
- Emerson, R.A., Beadle, G.W., Fraser, A.C.** (1935). A summary of linkage group in maize. *Cornell Univ. Agric. Exp. Sta. Men.* **180**.
- Esen, A.** (1986). Separation of alcohol-soluble proteins (zeins) from maize into three fractions by differential solubility. *Plant Physiol.* **80**, 623-627.
- Forde, B.G., Heyworth, A., Pywell, J. e Kreis, M.** (1985). Nucleotide sequence of a B1 hordein gene and the identification of possible upstream regulatory elements in endosperm storage protein genes from barley, wheat and maize. *Nucl.Acids Res.* **13**, 7327-7339.
- Gallusci, P., Salamini, F. e Thompson, R.D.** (1994). Differences in cell type-specific expression of the gene *Opaque 2* in maize and transgenic tobacco. *Mol.Gen.Genet.* **244**, 391-400.
- Gille, H.; Sharrocks, A. e Shaw, P.** (1992). Phosphorylation of p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at cFos promoter. *Nature* **358**: 414-417.
- Gilmartin, P.M.; Sorokin, L.; Memelink, J. e Chua, N.** (1990). Molecular light switches for plant genes. *Plant Cell* **2**: 369-378.
- Giroux, M.J., Boyer, C.D., Feix, G. e Hannah, C.** (1994). Coordinated transcriptional regulation of storage product genes in maize endosperm. *Plant Physiol.* **106**, 713-722.
- Gonzales, G.A. & Montminy, M.** (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* **59**, 675-680.
- Goodrich, J.A. e Tjian, R.** (1994). TBP-TAF complexes: selectivity factors for eukaryotic transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**: 403-409.
- Greenfield, N., Fasman G.D.** (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry.* **8**: 4108-4116.
- Grodberg, J., Dunn J.J.** (1988). ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* **170**:1245-1253.
- Gstaiger, M., Knoepfel, L., Georgiev, O., Schaffner, W., Hovens, C.M.** (1995) A B-cell coactivator of octamer binding transcription factors. *Naute*, **373**, 360-362.
- Higgins, D.G. & Sharp, P.M.** (1989). Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput.Appl.Biosci.* **5**, 151-152.
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T.** (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res.* **27**:297-300.
- Hill, D.E., Hope, I.A., Macke, J.P. e Struhl, K.** (1986). Saturation mutagenesis of yeast *his3* regulatory site: requirements of transcriptional induction and for binding by GCN4 activator protein. *Science* **234**, 451-457.
- Hill, S.H. & Treisman, R.** (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: Mechanism and specificity. *Cell* **80**, 199-211.
- Holdsworth, M.J., Blanco, J.M., Hammond-Kosack, M.C., Colot, V., Schuch, W. e Bevan, M.V.** (1995). The maize transcriptional factor Opaque-2 activates a wheat glutenin promoter in plant and yeast cell. *Plant Mol.Biol.* **29**, 711-720.
- Huang, N.; Sutliff, T.D.; Litts, J.C. e Rodriguez, R.L.** (1990). Classification and characterization of the rice alpha-amylase multigene family. *Plant Mol. Biol.* **14**: 655-668.
- Hunter, T. & Karin, M.** (1992). The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* **70**, 375-387.
- Hunter, T.** (1995). Protein Kinases and Phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signalling. *Cell* **80**, 225-236.
- Izawa, T., Foster, R. e Chua, N.-H.** (1993). Plant bZIP protein DNA binding specificity. *J.Mol.Biol.* **230**, 1131-1144.
- Izawa, T., Foster, R., Nakajima, M., Shimamoto, K. e Chua, N.-H.** (1994). The rice bZIP transcriptional activator RITA-1 is highly expressed during seed development. *Plant Cell* **6**, 1277-1287.

- Jain, S.K. & Benerjee, D.K.** (1974). Preliminary observations on the ethnobotany of the genus *Coix*. *Econ.Bot.* **28**, 38-42.
- Janknecht R., Hipskind R.A., Houthaeve T., Nordheim A., Stunnenberg H.G.** (1992). Identification of multiple SRF N-terminal phosphorylation sites affecting DNA binding properties. *EMBO J.* **3**:1045-1054.
- Jelesarov I., Dürr E., Thomas R. M., Bosshard H. R.** (1998). Salt effects on hydrophobic interaction and charge screening in the folding of a negatively charged peptide to a coiled coil (leucine zipper). *Biochemistry* **37**:7539-7550.
- Jones, R.A., Larkins, B.A. e Tsai, C.Y.** (1977). Storage protein synthesis in maize II. Reduced synthesis of a major zein component by opaque2 mutant of maize. *Plant Physiol* **59**, 525-529.
- Kagaya Y., Ohmiya K., Hattori T.** (1999). RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Res.* **2**:470-478.
- Katagari, F. & Chua, N.-H.** (1992). Plant transcriptional transcription activators: present knowledge and future challengers. *Trends Genet.* **8**, 22-27.
- Keller, W., König, P. e Richmond, T.J.** (1995). Crystal structure of a bZIP/DNA complex at 2.2 Å: determinants of DNA specific recognition. *J.Mol.Biol.* **254**, 657-667.
- Kerstetter, R., Vollbrecht, E., Lowe, B., Veit, B., Yamaguchi, J. e Hake, S.** (1994). Sequence analysis and expression patterns divide the maize *knotted1*-like homeobox genes into two classes. *Plant Cell* **6**, 1877-1887.
- Kohler, J.J., Metallo, S. J., Schneider, T.L., Schepartz, A.** (1999). DNA specificity enhanced by sequential binding of protein monomers. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **117**:35-11739.
- Kouzarides, T. & Ziff, E.** (1989). Leucine zipper of *fos*, *jun* and GCN4 dictate dimerization specificity and thereby control DNA binding. *Nature* **340**, 568-571.
- Kuhlemeier, C.** (1992). Transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression in plants. *Plant Mol.Biol.* **19**, 1-14.
- Latchman, D. S.** (1997). Transcription factors: an overview. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **12**:1305-1312.
- Le Gourrierec J., Li Y.F., Zhou D.X.** (1999). Transcriptional activation by Arabidopsis GT-1 may be through interaction with TFIIA-TBP-TATA complex. *Plant J.* **18**:663-668.
- Lehming N., Thanos, D., Brickman, J.N., Ma J., Maniatis T., Ptashne, M.** (1994). Na HMG-like protein that can switch a transcriptional factor to a repressor. *Nature* **371**, 175-179.
- Leite, A., Ottoboni, L.M.M., Targon, M.L.P.N., Silva, M.J., Turcinelli, S.R. e Arruda, P.** (1990). Phylogenetic relationship of zeins and coixins as determined by immunological cross-reactivity and Southern blot analysis. *Plant Mol.Biol.* **14**, 743-751.
- Loesch, P.J., Foley, D.C. e Cox, D.F.** (1976). Comparative resistance of Opaque-2 and normal inbred lines of maize to ear-rotting pathogens. *Crop Sci.* **16**, 841-842.
- Lohmer, S., Maddaloni, M., Motto, M., Salamini, F. e Thompson, R.D.** (1993). Translation of the mRNA of the maize transcriptional activator opaque-2 is inhibited by upstream open reading frames present in the leader sequence. *Plant Cell* **5**, 65-73.
- Luo Y., Vyjaichander S., Stiler J., Zhu L.** (1996) Cloning and analysis of DNA binding proteins by yeast one hybrid and two hybrid systems. *Biotechniques.* **20**, 564-568.
- Maddaloni, M., Donini, G., Balconi, C., Rizzi, E., Gallusci, P., Forlani, F., Lohmer, S., Thompson, R.D., Salamini, F. e Motto, M.** (1996). The transcriptional activator *Opaque2* controls the expression of a cytosolic form of pyruvate orthophosphate dikinase-1 in maize endosperm. *Mol.Gen.Genet.* **250**, 647-654.
- Maier, U.G., Brown, J.W.S. e Feix, G.** (1987). Binding of a nuclear factor to a

- consensus sequence in the 5' flanking region of the zein genes from maize. *EMBO J.* **6**, 17-22.
- Maldonado, E. e Allende J.E.** (1999). Phosphorylation of yeast TBP by protein kinase CK2 reduces its specific binding to DNA. *FEBS Lett.* **443**: 256-260.
- Maldonado, E. e Reinberg, D.** (1995). News on initiation and elongation of transcription by RNA polymerase II. *Curr.Opin.Cell Biol.* **7**, 352-361.
- Marocco, A., Santucci, A., Cerioli, S., Motto, M., Di Fonzo, N., Thompson, R.D. e Salamini, F.** (1991). Three high-lysine mutations control the level of ATP-binding HSP70-like proteins in the maize endosperm. *Plant Cell* **3**, 507-515.
- Mauri, I., Maddaloni, M., Lohmer, S., Motto, M., Salamini, F., Thompson, R.D. e Martegani, E.** (1993). Functional expression of the transcriptional activator Opaque-2 of *Zea mays* in transformed yeast. *Mol.Gen.Genet.* **241**, 319-326.
- Mello, L.V.** (1989). Estudo da biologia da reprodução em *Coix sp.* Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Ciência.
- Meshi, T. & Iwabuchi, M.** (1995). Plant transcription factors. *Plant Cell Physiol.* **36**(8), 1405-1420.
- Metallo S. J. e Schepartz A.** (1997). Certain bZIP peptides bind DNA sequentially as monomers and dimerize on the DNA. *Nat. Struct. Biol.* **(4)**, 115-117.
- Misra, P.S., Mertz, E.T. e Glover, D.V.** (1975). Studies on corn proteins. VIII. Free amino acid content of opaque2 double mutants. *Cereal Chem.* **52**, 844-848.
- Morot-Gaudry, J.F., Farineau, J. e Jolivet, E.** (1979). Effect of leaf position and plant age on photosynthetic carbon metabolism in leaves of 8 and 16 day-old maize seedlings (W64A) with and without the gene Opaque-2. *Photosynthetica* **13**, 365-375.
- Motto, M., Maddaloni, M., Ponziani, G., Brembilla, M., Marotta, R., Di Fonzo, N., Soave, C., Thompson, R.D. e Salamini, F.** (1988). Molecular cloning of the *o2-m5* allele of *Zea mays* using transposon marking. *Mol.Gen.Genet.* 488-494.
- Murphy, J.J. & Dalby, A.** (1971). Changes in the protein fractions of developing normal and opaque-2 maize endosperm. *Cereal Chem.* **48**, 336-349.
- Nordhoff E., Krogsdam A-M., Jorgensen H. F., Kallipolitis H.B., Clark B.F.C., Roepstorff, P., Kristiansen, K.** (1999). Rapid identification of DNA-binding proteins by mass spectrometry. *Nature Biotechnology*, **17**, 884-888.
- O'Shea E.K., Rutkowski R., Kim P.S.** (1992). Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer. *Cell* **68**:699-708.
- O'Shea, E.K., Klemm, J.D., Kim, P.S. e Alber, T.** (1991). X-ray Structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* **254**, 539-544.
- Pabo, C.O. & Sauer, R.T.** (1992). Transcriptional Factors: Structural families and principles of DNA recognition. *Ann.Rev.Biochem.* **61**, 1053-1095.
- Pedersen K., Argos P., Naravana S.V., Larkins B.A.** (1986). Sequence analysis and characterization of a maize gene encoding a high-sulfur zein protein of Mr 15,000. *J. Biol. Chem.* **261**:6279-6284
- Pirovano, L., Lanzini, S., Hartings, H., Lazzarini, N., Rossi, V., Joshi, R., Thompson, R.D., Salamini, F., Motto, M.** (1994). Structural and functional analysis of an *Opaque-2*-related gene from sorghum. *Plant. Mol. Biol.* **24**, 515-523.
- Prestridge D.S.** (1991). SIGNAL SCAN: a computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. *Comput. Appl. Biosci.* **2**:203-206.
- Purugganan, M.D.; Rounsley, S.D.; Schmidt, R.J. e Yanofsky, M.F.** (1995). Molecular evolution of flower development: diversification of the plant MADS-box regulatory gene family. *Genetics* **140**: 345-356.
- Pysh, L.D., Aukerman, M.J. e Schmidt, R.J.** (1993). OHP1: A maize basic domain/leucine zipper protein that interacts with Opaque2. *Plant Cell* **5**, 227-236.

- Quandt K., Frech K., Karas H., Wingender E., Werner T.** (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* **23**:4878-4884.
- Ramachandran, S., Hiratsuka, K. e Chua, N.** (1994). Transcription factors in plant growth and development. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **4**, 642-646.
- Roeder R.G.** (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* **9**:327-335.
- Schmidt, R.J., Burr F.A., Aukerman, M.J., Burr, B.** (1990). Maize regulatory gene *opaque-2* encodes a protein with a "leucine zipper" motif that binds to zein DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 46-50.
- Schmidt, R.J., Burr, F.A. e Burr, B.** (1987). Transposon tagging and molecular analysis of the maize regulatory locus *opaque-2*. *Science* **238**, 960-963.
- Schmidt, R.J., Ketudat, M., Aukerman, M.J. e Hoschek, G.** (1992). Opaque-2 is a transcriptional activator that recognises a specific target site in 22-kD zein genes. *Plant Cell* **4**, 689-700.
- Schmitz, D., Lohmer, S., Salamini, F. e Thompson, R.D.** (1997). The activation domain of the maize transcription factor Opaque2 resides in a single acidic region. *Nucleic Acids Res.* **25**, 756-763.
- Schutte J., Viallet J., Nau M., Segal S., Fedorko J., Minna J.** (1989). jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun. *Cell* **59**:987-997.
- Serizawa H, Conaway JW, Conaway RC** (1994). Transcription initiation by mammalian RNA polymerase II. In "Transcription Mechanisms and Regulation", Conaway RC & Conaway JW ed., Raven Press, NY, p. 27-43.
- Shaaffhausen, R.V.** (1952). Adlay or Job's tears - a cereal of potentially greater economic importance. *Econ.Bot.* **6**, 216-227.
- Shuai, K., Stark, G.R., Kerr, I. e Darnell, J.E.J.** (1993). A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma. *Science* **261**, 1744-1746.
- Smale S.T.** (1994). Core promoter architecture for eukaryotic protein-coding genes. In "Transcription Mechanisms and Regulation", Conaway RC & Conaway JW ed., Raven Press, NY, p. 63-81.
- Smeal T., Angel P., Meek J., Karin M.** (1989). Different requirements for formation of Jun: Jun and Jun: Fos complexes. *Genes Dev.* **12B**:2091-2100.
- Sodek, L. & Wilson, C.M.** (1970). Incorporation of leucine-C¹⁴ and lysine-C¹⁴ into protein in the developing endosperm of normal and opaque2 corn. *Arch.Biochem.Biophys.* **140**, 29-38.
- Souza Filho, G.A., Silva, M.J., Vieira, J., Yunes, J.A., Leite, A., Arruda, P. e Ottoboni, L.M.M.** (1998). Identification of a DNA-binding factor that recognises an $\square$ -coixin promoter and interacts with the *Coix Opaque2* protein. *Plant Mol.Biol.* **39**:95-104.
- Steitz T.A.** (1990). Structural studies of protein-nucleic acid interaction: the sources of sequence-specific binding. *Q. Rev. Biophys.* **3**:205-80.
- Takatsuji, H., Nakamura, N. e Katsumoto, Y.** (1994). A new family of zinc finger proteins in petunia: structure, DNA sequence recognition, and floral organ-specific expression. *Plant Cell* **6**, 947-958.
- Tjian, R. & Maniatis, T.** (1994). Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* **77**, 5-8.
- Tjian, R.** (1995). Molecular machines that control genes. *Scientific American* **272**: 38-45.
- Torres, P. & Bergamin, A.** (1951). O cereal Adlay. Estudo do seu valor agrícola e nutricional para aves. *Anais da Escola Superior "Luiz de Queiroz"* **8**, 669-685.
- Ueda, T., Waverckak, W., Ward, K., Sher, N., Ketudat, M., Schmidt, R.J. e Messing, J.W.** (1992). Mutations of the 22- and 27-kD zein promoter affect transactivation by the Opaque-2 protein. *Plant Cell* **4**, 701-709.
- Varagona, M.J., Schmidt, R.J. e Raikhel, N.V.** (1992). Nuclear localisation signal(s) required for nuclear targeting of maize

- regulatory protein, Opaque-2. *Plant Cell* **4**, 1213-1227.
- Venkateswarlu, J. & Chaganti, R.S.K.** (1973). Job's Tears (*Coix lacryma-jobi* L.). ICAR Tech.Bull.(Agric.) **43-44**, 1-54.
- Vettore, A.L., Yunes, J.A. , Cord Neto, G., Silva, M.J., Arruda, P. e Leite, A.** (1998). The molecular and functional characterisation of an Opaque2 homologue gene from *Coix* and a new classification of plant bZIP proteins. *Plant Mol.Biol.* **36**, 249-263.
- Vettore, A. L.**, O ativador transcricional Opaco2: análise de seu promotor e efeito da fosforilação do seu domínio bZIP na interação proteína:DNA. *Tese de doutorado*, 1998. Unicamp. 122p
- Vicente-Carbajosa, J., Moose, S.P., Parsons, R.L. e Schmidt, R.J.** (1997). A maize zinc finger protein binds to prolamin box in zein genes promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **94**.
- Villain P., Mache R., Zhou D.X.** (1996). The mechanism of GT element-mediated cell type-specific transcriptional control. *J Biol Chem* **271**:32593-32598.
- Vincentz, M., Leite, A., Neshich, G., Vriend, G., Mattar, C., Barros, L., Weinberg, D., Almeida, R.R., Paes de Carvalho, M., Aragão, F. e Gander, E.S.** (1997). ACGT and vicilin core sequences in a promoter domain required for seed-specific expression of a 2S storage protein gene are recognised by the opaque2 regulatory protein. *Plant Mol.Biol.* **34**, 879-889.
- Vogel,J.M., Roth,B., Cigan,M. and Freeling,M.** (1993) Expression of the two maize TATA binding protein genes and function of the encoded TBP proteins by complementation in yeast. *Plant Cell* **5**, 1627-1638
- Wang, M.M., Reed R.R.** (1993) Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Nature*, **364**, 121-126.
- Wagner, S. e Green, M.R.** (1994). DNA-binding domains: targets for viral and cellular regulators. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**: 410-414.
- Wilson, C.M. & Alexander, D.E.** (1967). Ribonuclease activity in normal and opaque-2 mutant endosperm of maize. *Science* **155**, 1575-1576.
- Wu, X., Spiro, C., Owen, W.G., Mc.Murray, C.** (1998). *J. Biol. Chem.* **273**, 20820-20827.
- Yamaguchi, Y., Wada, T., Susuki, F., Takagi, T., Hasegawa, J., Handa, H.** (1998). Casein kinase II interacts with the bZIP domains of several transcription factors. *Nucl. Acids Res.* **26**, 3853-3861.
- Yunes, J.A., Cord-Neto, G. , Leite, A., Ottoboni, L.M.M. e Arruda, P.** (1994b). The role of Opaque2 transcriptional factor in the regulation of protein accumulation and amino acid metabolism in maize seeds. *An.Acad.bras.Ci.* **66**, 227-218.
- Yunes, J.A., Cord-Neto, G. , Silva, M.J., Leite, A. , Ottoboni, L.M.M. e Arruda, P.** (1994a). The transcriptional activator Opaque2 recognise two different target sequences in the 22-kD-Like $\square$ -prolamin genes. *Plant Cell* **6**, 237-249.
- Yunes, J.A., Vettore, A.L. , Silva, M.J., Leite, A. e Arruda, P.** (1998). The Opaque2 transcription factor binds to two adjacent GCN4-like motifs in a cooperative manner. *Plant Cell* **11**:1941-55.
- Zhou D.X.** (1999). Regulatory mechanism of plant gene transcription by GT-elements and GT-factors. *Trends in Plant Science* **4**:210-214.