

BC/23698
IB/80389

T/UNICAMP

So89_a

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS-UNICAMP
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

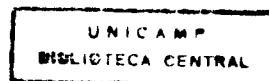
ANÁLISE DA REGIÃO PROMOTORA DE UM GENE
DE α -COIXINA DE 25 KDa

GONÇALO APOLINÁRIO DE SOUZA FILHO

ORIENTADORA: *Dra. LAURA M.M. OTTOBONI*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para
obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas,
área de concentração Genética de Plantas.

1994 Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato a) <i>Gonçalo Apolinário de Souza Filho</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--



Laura M. M. Ottoni
25/11/94

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	7/Unicamp
	Se 89a
V.	Ex.
LARGO	63/23.698
PROD.	43.3/95
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	22/02/95
N.º GPD	

cm 00065532-3

ÍNDICE

Introdução	01
- <i>Coix lacryma-jobi</i> L.	01
-As prolaminas	03
-Os genes de α -prolaminas	04
-A regulação da expressão dos genes de prolaminas	05
-Mutantes de endosperma	05
-Leucine-zippers	07
-A proteína Opaco2 e seus sítios de ligação	08
-Os demais fatores de transcrição de eucariotos	10
Objetivos	13
Materiais e Métodos	15
-Material vegetal	15
-Clone de DNA utilizado	15
-Linhagem de bactéria	15
-Isolamento em larga escala de DNA de plasmídio	15
-Purificação de fragmentos de DNA a partir de geis de agarose	16
-Sequenciamento de DNA	17
-Características dos plasmídios utilizados nos trabalhos de subclonagens, sequenciamento de DNA e expressão transitória.	18
-Isolamento da região promotora do gene α -3B e sua fusão ao gene "reporter" <i>gus</i>	18
-Deleção unidirecional com a enzima Exonuclease III	19
-Construções utilizadas nos experimentos de expressão transitória	20
-Experimentos de expressão transitória via bombardeamento de micropartículas	21
-Isolamento de núcleos de células de endosperma e folha de Coix	21
-Obtenção de extratos de proteínas nucleares	22

-Obtenção e radiomarcção dos fragmentos de DNA utilizados nos experimentos de ligação DNA-proteína	23
-Análise da interação DNA-proteína através de EMSA (Electrophoretic Mobilit Shift Assay)	23
-Anticorpos	24
-Métodos computacionais	24
Resultados	25
-Sequenciamento da região codificadora e promotora do gene α -3B	25
-Análise da sequência de aminoácidos da proteína	28
-Ensaio de expressão transitória em endosperma imaturo de milho	31
-Interação entre fatores nucleares de endosperma e o promotor de gene α -3B	31
-Ocorrência dos complexos DNA-proteína durante o desenvolvimento do endosperma	40
-Interação entre fatores nucleares para a formação dos complexos DNA-proteína	44
-Participação da proteína Opaco2 na formação dos complexos DNA-proteína	44
-Delimitação das regiões do promotor α -3B envolvidas na formação dos complexos DNA-proteína	47
Discussão	52
Conclusões	57
Sumário	58
Summary	60
Literatura citada	62
Apêndice I	72
Apêndice II	75

Apêndice III

78

Apêndice IV

80

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 01-	Esquema ilustrando um ramo de <i>Coix lacryma-jobi</i> L.	02
Figura 02-	Esquemas ilustrando a dimerização entre duas proteínas “leucine zipper”; e modelos de interação com o sítio-alvo no DNA	09
Figura 03-	Mapa de restrição e estratégia de sequenciamento do clone genômico α -3B	26
Figura 04-	Sequência de nucleotídeos e sequência deduzida de aminoácidos do gene α -3B	29
Figura 05	Alinhamento das sequências de aminoácidos de α -prolaminas	30
Figura 06-	Representação esquemática das construções utilizadas nos trabalhos de expressão transitória	32
Figura 07-	Expressão transitória utilizando construções contendo várias extensões do promotor α -3B	35
Figura 08-	Tecido-especificidade do promotor na ativação da transcrição	36
Figura 09-	Representação esquemática dos fragmentos de DNA utilizados nos trabalhos de ligação DNA-proteína	37
Figura 10-	EMSA entre extrato nuclear de endosperma de Coix, estágio 2, e os fragmentos 10Cs, 10Js e 10Ms.	39
Figura 11-	Análise da especificidade das ligações DNA-proteína.	41
Figura 12-	EMSA competitivo utilizando fragmentos de DNA não marcados como competidores. Análise da tecido-especificidade dos fatores nucleares de endosperma	42
Figura 13-	Ocorrência dos diversos complexos DNA-proteína durante o desenvolvimento do endosperma	43
Figura 14-	Interação entre fatores nucleares para formação de complexos DNA-proteína	45
Figura 15-	Participação da proteína Opaco2 nos complexos DNA-proteína	46
Figura 16-	Interação entre a proteína Opaco2 e outro fator nuclear	48

Figura 17-	Regiões do fragmento 10Ms envolvidas na interação com fatores nucleares	49
Figura 18-	Importância da região MMin para a ligação de fatores nucleares ao promotor α -3B	50
Figura 19-	Mapa de restrição do vetor pBluescript KS +/-	76
Figura 20-	Mapa de restrição do vetor de expressão pRT103	77
Figura 21-	Diagrama esquemático do método utilizado para obtenção de deleção unidirecional	79
Figura 22-	Esquema do aparelho utilizado nos experimentos de bombardeamento de micropartículas	78
Tabela I-	Domínios dos principais grupos de fatores de transcrição de eucariotos	12
Tabela II-	Clones e subclones utilizados para o sequenciamento do gene α -3B	27
Tabela III-	Relação das construções utilizadas nos experimentos de bombardeamento de micropartículas	34
Tabela IV-	Fragmentos de DNA utilizados para os trabalhos de ligação DNA-proteína	38

ABREVIATÓES

DAP	dias após a polinização	PCR	“polymerase chain reaction”
DDBJ	DNA Data Bank of Japan	q.s.p.	quantidade suficiente para
DTT	ditiotreitól	rpm	rotações por minuto
EDTA	ácido etilenodiamino-tetracético	SDS	dodecil sulfato de sódio
EMBL	European Molecular Biology Laboratories	Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
GenBank	Genetic Sequence Data Bank	x g	força centrífuga em relação à aceleração gravitacional
HEPES	ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N-2-etanosulfônico	X-gluc	ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurônico
Kb	kilobases		
kDa	kilodaltons		
O2	proteína Opaco2		
o2	gene opaco2		
pb	pares de base		

INTRODUÇÃO

***Coix lacryma-jobi* L.**

Coix lacryma-jobi L. é uma gramínea pertencente a tribo Andropogoneae, que engloba também o milho, o sorgo e o trypsaum (Claynton, 1973; Jain & Benerjee, 1974; Claynton, 1983). Este cereal é originário do sudeste asiático, onde foi extensivamente cultivado antes que o milho se tornasse popular como cultura agrícola (Arora, 1977). Sua propagação foi favorecida, principalmente, pela sua utilização como fonte de alimento, planta medicinal, ornamento e para a produção de bebidas alcoólicas (Venkateswarlu & Chaganti, 1973). Atualmente, o *Coix* é encontrado em todas as regiões tropicais (Shaafhawsen, 1952).

As plantas do gênero *Coix* caracterizam-se por serem monóicas, anuais ou perenes, com polinização anemófila e taxa de fecundação cruzada de aproximadamente 40%. As espiguetas são tricarpeladas, porém apenas um dos carpelos é fértil. Cada espiguetas encontra-se envolvida por uma bainha modificada e endurecida, denominada invólucro. Este invólucro, quando maduro, apresenta coloração variável. A inflorescência masculina, sustentada por uma haste, emerge através de um orifício presente no

ápice do invólucro. As espiguetas masculinas são imbricadas em pares ou em trios, sendo que uma delas, no último caso, a central, é pedunculada. Cada espiguetas apresenta duas floretas, ambas estaminadas, podendo a superior ser estéril (Venkateswarlu & Chaganti, 1973; Jain & Benerjee, 1974; Mello, 1989) (Fig. 1).

Dentre as variedades de *Coix lacryma-jobi* L., a Adlay é uma das mais comuns (Jain & Benerjee, 1974). Esta variedade foi introduzida no Brasil por volta de 1938, através de sementes trazidas das Filipinas, sendo, então, submetida a processos de melhoramento genético, com o objetivo de se obter sementes de melhor qualidade e aumento de produção (Torres & Bergamin, 1951; Shaafhawsen, 1952). Uma das características da variedade Adlay, é a presença de 20% de proteína na semente, o que corresponde a aproximadamente o dobro do teor de proteínas encontrado em sementes de milho. (Torres & Bergamin, 1951; Ottoboni *et al.*, 1990).

A



B

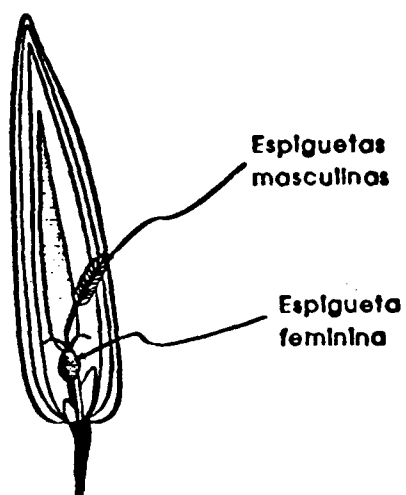


Fig. 1. A. Esquema ilustrando um ramo de *Coix lacryma-jobi* L. (Shaaffhawsen R.V., 1952).

B. Detalhe de um fascículo indicando as espiguetas masculina e feminina de uma inflorescência (Vettore A.L., 1994).

As prolaminas

A fração protéica da semente contém uma enorme variedade de proteínas que apresentam diferentes funções e são depositadas em quantidades variadas. Dentre estas, uma categoria é composta por um número relativamente pequeno de proteínas, que são armazenadas em grandes quantidades no endosperma, funcionando como proteínas de reserva que, através de rápida hidrólise, servirão como fonte de carbono e nitrogênio, durante a germinação do embrião (Higgins, 1984).

As proteínas de reserva de cereais são denominadas prolaminas, sendo constituídas por uma família de polipeptídeos solúveis em álcool, heterogêneos em tamanho e carga (Gianazza *et al.*, 1976; Ottoboni *et al.*, 1990; Righetti *et al.*, 1977; Wilson, 1983). As prolaminas possuem elevados teores de prolina e glutamina (Shewry & Tatham, 1990) e, no caso do *Coix*, são denominadas coixinas (Torres & Bergamin, 1951; Ottoboni *et al.*, 1990).

A síntese das prolaminas ocorre durante o desenvolvimento da semente nos poliribossomos que se encontram ligados às membranas do retículo endoplasmático rugoso, e acumulam-se em organelas de armazenamento denominadas corpúsculos protéicos (Burr & Burr, 1982; Larkins *et al.*, 1984; Targon *et al.*, 1992).

As prolaminas de *Coix*, milho e sorgo, coixinas, zeínas e kafirinas

respectivamente, foram inicialmente classificadas como α -, β - e γ -prolaminas baseando-se em solubilidade diferencial (Esen, 1986; De Rose *et al.*, 1989 e Leite *et al.*, 1990). As α -, β - e γ -prolaminas compreendem, respectivamente, as proteínas solúveis em 40-95%, 30-80% e 0-80% de isopropanol (Esen, 1986). Entretanto, esta classificação não reflete a relação estrutural entre as proteínas. Assim sendo, o sequenciamento de um gene de uma zeína, previamente descrito como pertencente a classe das β -prolaminas, revelou uma estrutura completamente diferente, determinando a criação de uma quarta classe de prolaminas denominadas δ -prolaminas (Kirihaara *et al.*, 1988). A coixina de 17 kDa constitui um outro exemplo, pois apesar de apresentar solubilidade característica de α -prolaminas (Leite *et al.*, 1990), revelou, após o sequenciamento de um clone de cDNA, alta homologia com a β -prolamina de milho (Leite *et al.*, 1992).

As α -prolaminas, a classe mais abundante, correspondem a cerca de 70% do total de prolaminas do endosperma de milho, sorgo e *Coix*. Em milho, esta classe é constituída por duas proteínas de pesos moleculares aparentes de 19 e 22 kDa (Burr & Burr, 1982), o mesmo ocorrendo para as α -coixinas, que incluem proteínas de pesos moleculares aparentes de 25 e 27 kDa (Leite *et al.*, 1990).

Estudos sobre a deposição das prolaminas no interior dos corpúsculos protéicos de milho,

demonstram que as β - e γ -prolaminas são depositadas no início da formação do corpúsculo. As α -prolaminas, entretanto, são depositadas posteriormente, passando a constituir a porção central da organela (Lending & Larkins, 1989).

Ensaio de hibridização de DNA, bem como estudos imunológicos e análise de sequências de clones de cDNA e genômicos, têm revelado a existência de elevada homologia entre os genes que codificam as α -zeínas de 22 kDa e aqueles que codificam as α -coixinas de 25 kDa (Leite *et al.*, 1990; Ottoboni *et al.*, 1993). Genes que codificam proteínas homólogas à α -zeína de 22 kDa foram identificados também em sorgo (De Rose *et al.*, 1989).

Os Genes de α -Prolaminas

Embora não ocorra qualquer similaridade entre as sequências dos genes das diferentes classes de prolaminas (α -, β -, λ - e δ -prolaminas), estes genes apresentam algumas semelhanças estruturais:

- a) Nenhum gene de prolamina, até agora sequenciado, apresenta introns.
- b) As sequências das proteínas são organizadas em domínios estruturais típicos, que permitem às proteínas sintetizadas, assumirem uma

estrutura secundária condizente com o rígido empacotamento dentro dos corpúsculos protéicos (Argos *et al.*, 1982; Garrat *et al.*, 1993).

- c) Todas as proteínas apresentam em sua região amino-terminal um peptídeo sinal, que é responsável pela condução da proteína para o interior do retículo

endoplasmático (Burr & Burr, 1976; Larkins & Hurkman, 1978; Burr & Burr, 1978; Ludevid *et al.*, 1984; Lending & Larkins, 1989; Targon *et al.*, 1992).

Estudos de reconstrução utilizando os genes de α -prolaminas de Coix e milho, demonstram que, os mesmos, pertencem a famílias multi-gênicas constituídas por aproximadamente 100 genes, no caso do milho (Viotti *et al.*, 1979), e 35 genes no caso do Coix (Ottoboni *et al.*, 1993). Através de experimentos de "chromosome walking", concluiu-se que os genes de α -zeínas encontram-se agrupados formando "clusters", e contêm sequências internas repetidas (Spena *et al.*, 1983; Heidecker e Messing, 1986). O isolamento de um clone genômico de Coix que apresentou 3 sequências homólogas ao clone de cDNA de α -zeína de 22 kDa, utilizado como sonda, indica que os genes de α -coixinas também se agrupam sob a forma de "clusters" (Ottoboni *et al.*, 1993).

A regulação da expressão dos genes de prolaminas

A transcrição dos genes de prolaminas de milho e Coix é altamente regulada, sendo que os RNAs mensageiros acumulam-se em altas concentrações nos estágios iniciais do desenvolvimento do endosperma (Marks *et al.*, 1985; Targon *et al.*, 1992).

A deposição diferencial observada para as prolaminas de milho, pode estar associada a níveis mais elevados de mRNA de β - e γ -prolaminas, no início do desenvolvimento das células do endosperma, em relação ao mRNA de α -prolaminas, cuja deposição é mais tardia (Lending & Larkins, 1989). Portanto, a expressão coordenada destes genes, é diferenciada entre as classes de prolaminas, durante o desenvolvimento, onde os genes de β - e γ -prolaminas, são ativados antes que os de α -prolaminas.

Os mecanismos que regulam a expressão coordenada dos genes de prolaminas são, até o momento, pouco conhecidos. Comparações entre sequências de vários promotores das diferentes classes de prolaminas, permitem observar uma região altamente conservada denominada "prolamin box", "endosperm box" ou ainda "-300 box" (Feix & Quayle, 1993). Esta região apresenta a sequência TGTAAG, que possui elevada similaridade com a sequência central do "enhancer" do vírus SV40. Este motivo, foi descrito em

posições similares nos genes das diferentes classes de prolaminas dos cereais da tribo Andropogoneae (De Rose *et al.*, 1989; Ottoboni *et al.*, 1993; Pedersen *et al.*, 1986; Freitas *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1986; Liu & Rubenstein, 1992), bem como genes de outros cereais como cevada (Kreis *et al.*, 1986), trigo (Summer-Smith *et al.*, 1985; Colot *et al.*, 1987), e centeio (Hull *et al.*, 1991). Apesar do alto grau de conservação deste motivo, tanto na sequência quanto na posição, e também de sua capacidade de se associar com proteínas nucleares (Maier *et al.*, 1987), ainda não foi esclarecida a função desta região no controle da expressão de tais genes.

Sequências que envolvidas na expressão tecido-específica de genes de prolaminas têm sido identificadas em trigo (Colot *et al.*, 1987), cevada (Marris *et al.*, 1988), soja (Chen *et al.*, 1988), ervilha (Shirsat *et al.*, 1989) e milho (Schernthaner *et al.*, 1988), através da análise da atividade destes promotores, quando associados a genes repórteres, em plantas transgênicas de tabaco e petúnia.

Mutantes de endosperma

Várias mutações afetando o acúmulo de zeínas têm sido descritas (Motto *et al.*, 1989). Alguns destes mutantes são denominados *opacos*, pois, ao contrário das sementes normais, que apresentam o endosperma duro e translúcido,

estes mutantes produzem sementes com endosperma macio e opaco.

A mutação *opaco2* (*o2*) foi identificada em milho por Singleton & Jones na década de 30 (Emerson *et al.*, 1935). O efeito desta mutação no acúmulo de proteínas na semente foi determinado por Merts *et al.* (1964), demonstrando que a mutação proporcionava um melhor balanço de aminoácidos na semente devido, principalmente, a um aumento no teor de lisina. Tal aumento resulta da redução do acúmulo da fração das prolaminas (zeínas), as quais são deficientes nos aminoácidos essenciais. O fato de uma simples mutação aumentar o conteúdo de lisina, atraiu extensivas pesquisas sobre a mutação *o2* e outras mutações *opaco*, em milho. O objetivo inicial era a obtenção de linhagens de milho com maior valor nutricional. Entretanto, quando comparado com o milho normal, o milho *o2* apresenta uma menor produtividade, suas sementes são mais susceptíveis às injúrias durante a colheita e armazenamento, além de grande susceptibilidade a doenças e pragas (Nelson, 1980).

Nos mutantes *o2* ocorre uma forte redução no conteúdo de zeínas de 22 kDa, em função de um decréscimo da taxa de transcrição gênica, resultando na ausência parcial ou completa de mRNA específicos desta classe de zeínas (Pedersen *et al.*, 1980; Langridge *et al.*, 1982; Marks *et al.*, 1985).

Mutações em outros genes também afetam a expressão das α -zeínas, mas de maneira diferente da

mutação *o2*. Enquanto a mutação *o2* reduz significativamente a expressão das proteínas pertencentes a classe de 22 kDa, a mutação *opaco7* (*o7*) afeta principalmente a expressão da classe de 19 kDa; a mutação *floury 2* (*f12*) diminui a expressão de ambas as classes, 22 e 19 kDa; a mutação *opaco6* (*o6*) causa uma redução generalizada das prolaminas, afetando todas as classes de zeínas e a mutação De-B30 proporciona uma redução de, aproximadamente, 30% das zeínas, principalmente, da classe de 22 kDa (Motto *et al.*, 1989).

Apenas o efeito da mutação *o2* sobre a transcrição dos genes de α -zeínas de 22 kDa foi confirmado (Kodrzycki *et al.*, 1989), entretanto, análises da expressão das zeínas, através de "Northern blot", também indicam que *o7* e *f12* alteram o nível de transcrição destes genes (Burr & Burr, 1982).

Através de estratégias de "transposon tagging", dois grupos distintos clonaram o gene *o2* de milho com o auxílio dos elementos móveis *Suppressor-mutator* (Schmidt *et al.*, 1987) e *Activator* (Motto *et al.*, 1988). O cDNA de *o2* de milho foi isolado e sequenciado (Schmidt *et al.*, 1990; Hartings *et al.*, 1989). As sequências encontradas pelos dois grupos apresentam algumas diferenças, principalmente em suas regiões 3'. Ainda não está claro se estas diferenças se devem a um polimorfismo entre alelos, considerando que diferentes linhagens de milho foram utilizadas por cada grupo, ou ainda, se são

consequência de artefatos de sequenciamento (Schmidt, 1993).

Os genes *o2* de sorgo e de *Coix* foram também isolados e caracterizados (Pirovano *et al.*, 1994; Vettore A.L., 1994). A sequência de aminoácidos deduzida a partir do clone de cDNA apresenta grande similaridade com a sequência da proteína O2 de milho, com exceção da região 3'.

As sequências deduzidas de aminoácidos sugerem que o gene *o2* codifica um polipeptídeo que possui um motivo característico de um grupo de proteínas que se ligam a DNA, tais como, reguladores transcricionais de fungos e oncoproteínas de mamíferos. Este grupo de proteínas é denominado "leucine-zipper" (bZIP) (Landschulz *et al.*, 1988; Vinson *et al.*, 1989).

Leucine-Zippers

O domínio "leucine-zipper" (bZIP) foi primeiramente observado como uma sequência conservada em vários fatores de transcrição de eucariotos. Entre estas proteínas encontram-se o ativador transcripcional de leveduras GCN4, e as oncoproteínas de mamíferos Jun, Fos, Myc, e C/EBP. Esta região, geralmente, possui 60 a 80 resíduos de aminoácidos, e se subdivide em dois domínios: O "zipper de leucinas", responsável pela interação com outras proteínas, promovendo a formação de dímeros, e o outro domínio, rico em

aminoácidos básicos, responsável pelo reconhecimento e ligação à sequência alvo no DNA (Pabo & Sauer, 1992).

A região do "zipper", compreende aproximadamente 30 a 40 resíduos, e é caracterizada por repetições de resíduos de leucina a cada sete aminoácidos (Landschulz *et al.*, 1988b), assumindo uma estrutura secundária em α -hélice, que permite aos resíduos de leucina ficarem alinhados em uma mesma face. Desta forma, estas leucinas podem estabelecer interações hidrofóbicas com aquelas presentes na α -hélice análoga de um outro polipeptídeo, possibilitando a dimerização (Pabo & Sauer, 1992) (Fig. 2A).

O domínio básico, encontra-se na região adjacente anterior às repetições de leucinas. Este domínio contém cerca de 30 resíduos, a maioria deles contendo carga positiva, representados, principalmente, por argininas e lisinas (Turner & Tjain, 1989; Neuberger *et al.*, 1989).

Estudos de proteção, associados a trabalhos de difração de raios-X em cristalografia, sugerem que o domínio básico da região bZIP liga-se ao sulco maior do DNA (Pabo & Sauer, 1992). Existem dois modelos que visam explicar a interação entre as bZIP e o sítio-alvo no DNA (Vinson *et al.*, 1989; O'Neil *et al.*, 1990). Em ambos, as proteínas formam dímeros em forma de "Y". A região do "zipper" une duas proteínas formando a haste do "Y", e as regiões básicas ficam livres formando os braços do "Y", os quais

estendem-se em direções opostas ao longo do sulco maior do DNA. O modelo "scissors grip", o mais aceito, propõe a existência de uma quebra na α -hélice da região básica, permitindo que esta cadeia acompanhe a curvatura do sulco maior do DNA (Vinson *et al.*, 1989) (Fig. 2BI). No modelo "induced helical fork", a hélice não apresenta dobras e, portanto, estende-se além do DNA, após contactar três ou quatro pares de base (O'Neil *et al.*, 1990) (Fig. 2BII).

As proteínas "leucine-zipper" necessitam estar sob a forma de dímeros para se ligarem ao DNA. A dimerização pode ocorrer entre duas proteínas idênticas, formando um homodímero, ou entre proteínas diferentes, formando um heterodímero. Algumas proteínas são ativas somente sob a forma de homodímeros, como C/EBP e Myc, enquanto outras, somente o fazem sob a forma de heterodímeros, como Jun e Fos, e CREB e CREM (Johnson & Mcknight, 1989).

Além de participar no reconhecimento do sítio-alvo, o domínio básico está, também, envolvido no transporte destas proteínas do citoplasma para o núcleo celular (van der Krol & Chua, 1991).

A proteína O2 e seus sítios de ligação

O papel específico do *locus* o2 na regulação da expressão dos

genes de zeína foi demonstrado por Kodrzycki *et al.* (1989), onde se observa que tal *locus* afeta o acúmulo de transcritos de genes da classe das α -zeínas de 22 kDa. Estudos utilizando o mutante o2-676, que apresenta a substituição de uma arginina, do domínio básico, por uma lisina, permitiram observar uma acentuada queda na expressão das zeínas, apesar de tratar-se de uma substituição conservativa. Estes dados sugerem que a proteína o2 regula a expressão das zeínas, através de uma interação direta com os promotores destes genes (Aukerman *et al.*, 1991).

O *locus* o2 também regula a expressão de uma albumina de 32 kDa, chamada b-32 (Soave *et al.*, 1976; Di Fonzo *et al.*, 1986; Lohmer *et al.*, 1991). Esta proteína possui a função de inativadora de ribossomos, ocorrendo em abundância no endosperma de milho e atuando, provavelmente, como agente de defesa contra o ataque de pragas (Bass *et al.*, 1992).

A participação do *locus* o2 na regulação da expressão dos genes de β -prolaminas foi demonstrado por Cord *et al.* (1994).

Trabalhos utilizando a proteína O2 em experimentos de "footprinting" e ligação seletiva, com a região 5' não codificadora de um gene de α -zeína de 22 kDa, demonstraram que a proteína O2 apresenta como sítio-alvo o palíndromo imperfeito 5'-TCCACGTAGA-3' (Schmidt *et al.*, 1992). A sequência ACGT,

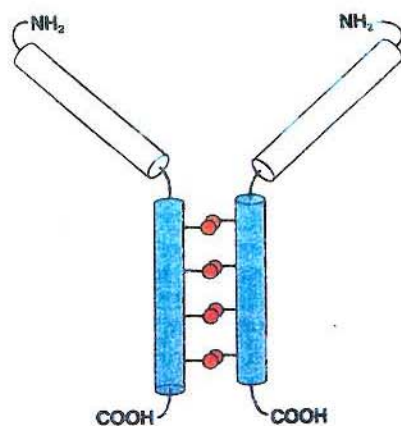
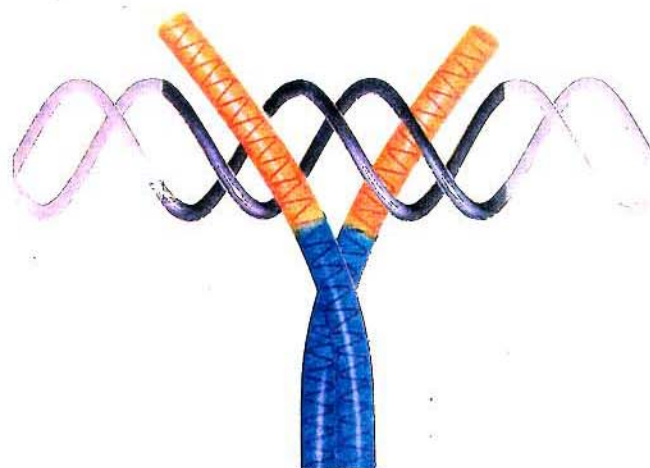
A**B****I****II**

Fig. 2. **A.** Representação esquemática da dimerização entre duas proteínas através de seus domínios "leucine zipper" (McKnight S.L., 1991). **B.** Modelos para interação de proteínas bZIP com o sítio-alvo no DNA (McKnight S.L., 1991). (I) Modelo "scissors grip" (Vinson *et al.*, 1989); (II) modelo "induced helical fork" (O'Neil *et al.*, 1990).

contida no sítio de ligação, foi descrita como condição essencial para a ligação com a proteína O2, "*in vitro*" (Schmidt *et al.*, 1992). Esta sequência tem sido identificada na região central de sítios-alvo de diversos fatores da classe bZIP em plantas (Willians *et al.*, 1992).

Todavia, cinco sítios de ligação da proteína O2 de milho foram descritos no promotor do gene *b-32*, os quais apresentam a sequência consenso GATGAPyPuTGPu, que não contém o motivo ACGT (Lohmer *et al.*, 1991).

Experimentos de hibridização, através de "Southern blot", revelaram a presença de genes homólogos ao *o2* de milho em Coix e sorgo (Ottoboni *et al.*, 1993). Testes de transativação demonstram que a transcrição dos genes de α -coixina de 25 kDa pode ser ativada pela proteína O2 de milho que, neste caso, reconhece uma sequência diferente daquela descrita como sítio-alvo nos promotores de α -zeínas de 22 kDa. A sequência encontrada, caracteriza-se por não apresentar o motivo ACGT, e por apresentar maior similaridade com os sítios B1 e B4 descritos no promotor do gene *b-32* de milho (Yunes *et al.*, 1994).

De Pater *et al.* (1994) demonstraram que a presença da sequência ACGT não é essencial para a ligação da proteína O2 ao promotor de um gene de lectina de ervilha. Experimentos de "footprinting" desenvolvidos em nosso laboratório, utilizando a proteína O2 de milho e um promotor

de um gene de vicilina de feijão, revelaram também, diferentes sítios de ligação da proteína, em relação àqueles já descritos para outros promotores (Vincentz *et al.*, 1994).

Trabalhos utilizando um clone de cDNA do gene *o2* para a transformação de um mutante de levedura que não apresenta o fator GCN4, demonstraram que a proteína *o2* é capaz de transativar o promotor *his4*, normalmente sob o controle do gene *gcn4*. Estes resultados demonstram a existência de mecanismos de controle altamente conservados em eucariotos. Quando realizados experimentos de ligação "*in vitro*", observou-se que a proteína O2, reconhece a sequência TGACTC no promotor do gene *his4*, que corresponde ao sítio de ligação da proteína GCN4, naquele promotor (Mauri *et al.*, 1993).

Todas as informações acima descritas, tanto nos trabalhos de transativação quanto de ligação "*in vitro*", permitem inferir que a proteína O2 apresenta considerável promiscuidade no reconhecimento de sítios-alvo, para ligação nos diversos promotores.

Os demais fatores de transcrição de eucariotos

A região do "TATA box", conservada em todos os genes de eucariotos, constitui o sítio de ligação da RNA polimerase II e seus fatores associados, que

representam os fatores gerais da transcrição. Às outras regiões reguladoras presentes nos promotores, pode se ligar uma ampla variedade de fatores. Estas proteínas podem interagir com o complexo da RNA polimerase diretamente, ou através da interação com "proteínas-ponte" que, embora não reconheçam nenhum sítio de ligação ao DNA, apresentam sítios de contato com a RNA polimerase (Lewin, 1990). Certos fatores, mais específicos, associam-se apenas aos promotores de um ou de poucos genes (Kuhlemeier, 1992), sendo responsáveis, portanto, pelo controle temporal e tecido-específico da expressão dos mesmos.

O isolamento de muitos genes que codificam fatores de transcrição de eucariotos, permitiu um grande progresso no estudo destas proteínas (Johnson & McKnight, 1989; La Thangé & Rigby, 1988; Mitchell & Tjian, 1989). Baseando-se em estudos bioquímicos e das propriedades funcionais das proteínas, os diversos fatores de transcrição são agrupados em diferentes classes. Tais fatores podem, em função dos domínios que os caracterizam, desenvolver função de ligação ao DNA, dimerização entre proteínas e/ou ativação gênica (Latchman, 1990; Schmidt *et al.*, 1993) (Tab.I).

Torna-se importante observar que a taxa de transcrição, bem como sua regulação, são determinadas, não pelas propriedades intrínsecas de um fator de transcrição e sua sequência-alvo de ligação, mas por

uma complicada inter-relação entre múltiplos fatores e múltiplos sítios de ligação (Gilmartin *et al.*, 1990), que podem influenciar a ação da RNA polimerase, positiva ou negativamente (Latchman, 1990). Um fator pode possuir múltiplos sítios, ligando-se cooperativamente. Dois diferentes fatores podem competir por um mesmo sítio ou dois sítios sobrepostos, resultando em interações alteradas com o complexo da RNA polimerase. Modificações pós-traducionais dos fatores de transcrição, podem influenciar as interações acima citadas (Kuhlemeier, 1992).

Tabela I. Domínios dos principais grupos de fatores de transcrição de eucariotos (Latchman, 1990) (Schmidt et al., 1993).

DOMÍNIO	AÇÃO	OCORRÊNCIA	COMENTÁRIOS
Homeobox	Ligação ao DNA	Numerosos fatores homeóticos de <i>Drosophila</i> , fatores relacionados em outros organismos	Ligação ao DNA utilizando motivo "helix-turn-helix"
POU	Ligação ao DNA	Mamíferos Oct-1, Oct-2, Pit-1, nematode unc-86	Relacionados com homeodomínio
Cisteína-histidina "zinc finger"	Ligação ao DNA	TFIIIA, Kruppel, Sp1 etc.	Múltiplas cópias do motivo "finger"
Cisteína-cisteína "zinc finger"	Ligação ao DNA	Família de hormônios receptores Esteróide/tireóide	Único par de "fingers", motivos relacionados em E1A de adenovirus, GAL4 de levedura, etc.
Domínio básico	Ligação ao DNA	C/EBP, c-fos, c-jun, GCN4, Opaco2	Ocorre em associação com os motivos "leucine-zipper", "helix-loop-helix", ou ambos
Leucine zipper	Dimerização entre proteínas	C/EBP, c-fos, c-jun, GCN4, Opaco2	Possibilita a dimerização, que é essencial para a ligação ao DNA
Helix-loop-helix	Dimerização entre proteínas	c-myc, MyoD, E12, E47	Possibilita a dimerização, que é essencial para ligação ao DNA
Amphipatic Acidic α -helix	Ativação da transcrição	GCN4, GAL4 de levedura, receptores de esteróides/tireóides	Provavelmente interage com o fator TFIID
"Glutamine-rich region"	Ativação da transcrição	Sp1	Regiões relacionadas em Oct-1, Oct-2, AP-2, etc

OBJETIVOS

Em trabalhos anteriormente realizados em nosso laboratório, um clone de cDNA de α -coixina de 25 kDa foi obtido através de seleção em biblioteca de cDNA de endosperma de *Coix lacryma-jobi* L., utilizando-se uma sonda heteróloga de cDNA de α -zeína de 22 kDa. Este clone, denominado pBCX 25.10, foi digerido com EcoRI/XhoI dando origem a um fragmento de 988 pb, que foi utilizado como sonda para seleção em uma biblioteca genômica de Coix. Esta seleção resultou no isolamento de um clone de 15 kb, denominado α -3.

Experimentos de "Southern blot" demonstraram que o clone α -3, quando digerido com a enzima EcoRI, forneceu três fragmentos que apresentaram homologia com a sonda de 988 pb, obtida do clone pBCX 25.10. Os três fragmentos foram clonados no plasmídeo pBluescript e designados α -3A (5,2 kb), α -3B (4,1 kb) e α -3C (3,2 kb).

Trabalhos de sequenciamento de DNA dos clones α -3A e α -3C, revelaram que as regiões estruturais destes dois clones apresentam um "stop codon" na posição +652, sendo caracterizados como pseudogenes.

Este trabalho, teve como objetivos o sequenciamento da região estrutural e promotora do

gene α -3B, bem como a caracterização desta região promotora através da determinação das porções envolvidas na expressão do gene α -3B, e o estudo dos fatores nucleares que a ela se associam.

Visando atingir tais objetivos, vários passos foram realizados:

- 1) Sequenciamento da região estrutural e promotora do gene α -3B, com posterior análise da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos da região codificadora do gene. Determinação de sequências conservadas na porção 5' não codificadora, através da comparação com outras sequências já publicadas.
- 2) Isolamento da região promotora do gene, através de reações de PCR e trabalhos de clonagem, seguido de sua fusão ao gene de β -glucuronidase (*GUS*), utilizado como "gene reporter".
- 3) Obtenção de diferentes extensões do promotor, através de digestão unidirecional com a enzima Exonuclease III.

4) Determinação das porções funcionais do promotor, utilizando as diversas extensões da região 5' não codificadora do gene α -3B, associadas ao gene *gus*, em experimentos de expressão transitória via bombardeamento de micropartículas, em tecidos de endosperma de milho.

5) Análise da interação entre fatores nucleares de endosperma e a região promotora do gene α -3B, através de estudos de EMSA ("Electrophoretic Mobility Shift Assay").

MATERIAIS E MÉTODOS

Metodologias básicas de rotina, tais como: a) Minipreparação de plasmídios, b) Digestões com enzimas de restrição c) Clonagem em plasmídios, d) Transformação de *E. coli*, entre outras, foram utilizadas de acordo com Sambrook *et al.*, (1989).

As soluções utilizadas estão descritas no Apêndice I

Material vegetal

Sementes de *Coix lacryma-jobi* L., var. Adlay, foram obtidas da coleção de germoplasma do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Campinas. Sementes de milho híbrido comercial F-352, Agrocere S/A, foram plantadas no campo experimental da Universidade Estadual de Campinas e autopolinizadas.

Clone de DNA utilizado

Para a realização dos diversos trabalhos, foi utilizado o clone denominado α -3B, obtido por subclonagens do clone α -3, isolado de um banco genômico de *Coix lacryma-jobi* L., var. Adlay, construído no vetor EMBL4 (Ottoboni *et al.*, 1993).

Linhagem de bactéria

A bactéria *Escherichia coli*, linhagem DH5 α , foi utilizada na preparação de células competentes para a execução dos trabalhos de transformação, realizados durante as subclonagens.

Genótipo relevante: F-*supE44* Δ (*lacZYA* - *argF*) U169 (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1* (Hanahan, 1983).

Isolamento em larga escala de DNA de plasmídio

Para o isolamento em larga escala do DNA de plasmídio foi utilizada a técnica de lise alcalina descrita em Sambrook *et al.* (1989), com algumas adaptações às condições do laboratório.

A etapa de amplificação, descrita no método original, foi dispensada para os plasmídios contendo origem de replicação derivada de Col E1, como no caso de pBluescript KS+/- . A origem de replicação Col E1 apresenta um controle de replicação plasmidial mais relaxado, resultando em um alto número de plasmídios por célula e, portanto, dispensa a amplificação.

A bactéria hospedeira contendo o plasmídio, foi inoculada

em 25 ml de meio líquido LB/ampicilina (60 µg/ml) e incubada a 37°C durante a noite. Esse cultivo foi utilizado para inocular 500 ml do mesmo meio que, em seguida, foi incubado sob vigorosa agitação (300 rpm) durante a noite, a 37°C. O cultivo foi, então, centrifugado a 7000 rpm em rotor Beckman JA-14, por 10 minutos, a 4°C, e o sedimento foi ressuspensionado em 4 ml de solução I (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; contendo 50 mM de glicose e 10 mM de EDTA). A suspensão foi transferida para um tubo de centrifuga e a ela foi adicionado 1 ml de solução de lisozima (25 mg/ml em solução I). A solução foi misturada e mantida à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 10 ml da solução II (NaOH 0,2 M; SDS 1%), preparada imediatamente antes do uso, e misturou-se através de repetidas inversões. A suspensão foi mantida em gelo por 10 minutos. A cada tubo foram adicionados 7,5 ml de solução gelada de acetato de potássio 3 M pH 4,8; misturando-se por inversão até o desaparecimento das diferentes fases. A suspensão foi mantida em gelo por 10 minutos e centrifugada a 12000 rpm por 20 minutos, a 4°C em rotor Beckman JA-20. O sobrenadante foi filtrado em gaze e transferido para um novo tubo de rotor Beckman JA-20. Adicionou-se 0,6 volumes de isopropanol e incubou-se a temperatura ambiente por 10 minutos. O material foi, então, centrifugado a 11000 rpm, em rotor Beckman JA-20 durante 10 minutos, à temperatura ambiente, e o sedimento obtido foi lavado com

etanol 70% à temperatura ambiente. Após a secagem o sedimento foi ressuspensionado em 4 ml de TE, antes de serem adicionados 4,4 g de CsCl e 0,4 ml de solução de brometo de etídio (10 mg/ml). A amostra foi centrifugada a 10000 rpm, durante 5 minutos, à temperatura ambiente em rotor Beckman JA-20, visando eliminar proteínas precipitadas. A concentração de CsCl foi então corrigida para um índice de refração da solução de 1,3860. O material foi submetido a ultracentrifugação em rotor Beckman VTi-80, a 60000 rpm, por 20 horas, à 20°C. A banda correspondente ao DNA plasmidial foi cuidadosamente retirada sob exposição à luz UV, com o auxílio de uma seringa munida de agulha 30x12. O brometo de etídio foi removido através de sucessivas extrações com n-butanol equilibrado com água. A solução contendo o DNA foi dialisada por 2 vezes contra 1000 volumes de TE, por 24 horas cada. A concentração de DNA foi determinada via espectrofotômetro.

Purificação de fragmentos de DNA a partir de géis de agarose

Fragmentos de DNA foram isolados para utilização nos trabalhos de subclonagens ou visando a marcação, para os experimentos de ligação DNA-proteína. Nestes trabalhos, após a digestão com as enzimas de restrição apropriadas, o DNA foi

submentido à eletrofo-rese em gel de agarose contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio. A concentração da agarose nos géis variou com os tamanhos dos fragmentos que se desejava extrair. Os insertos foram isolados dos géis utilizando-se papel DEAE (DE-81, Whatman), de acordo com técnica descrita por Dretzen *et al.* (1981) e Danner (1982), onde os fragmentos de DNA foram transferidos eletroforicamente para pedaços do papel inseridos à frente das bandas de interesse. A eluição do DNA adsorvido foi realizada incubando-se o papel em 800 µl de tampão de eluição (Tris-HCl 20 mM pH 8,0; contendo EDTA 2,0 mM e NaCl 1,5 M), durante 1 hora em banho-maria a 45°C. A solução foi então transferida para outro tubo e centrifugada por 5 minutos, para a retirada dos fragmentos de papel remanescentes. O DNA foi precipitado com a adição de 2,5 volumes de etanol gelado, seguida de incubação à -20°C durante a noite. Para fragmentos menores que 100 pb, antes da adição do etanol, adicionou-se MgCl₂ para uma concentração final de 10 mM. Após a precipitação, o DNA foi centrifugado durante 20 minutos, o sedimento foi lavado com etanol 70% e, ressuspenso em 10 µl de TE. A concentração do DNA obtido foi estimada visualmente após eletroforese em gel de agarose.

Características dos plasmídios utilizados nos trabalhos de subclonagens, sequenciamento de DNA e expressão transitória

Nas etapas de subclonagem dos materiais a serem sequenciados, foi utilizado o plasmídio pBluescript KS +/- (Short *et al.*, 1988), conforme conveniências com relação ao posicionamento dos sítios enzimáticos na região de policlonagem do mesmo. Para os experimentos de bombardeamento com micropartículas, utilizou-se o vetor de expressão pRT103 (Töpfer *et al.*, 1987), como base para as construções realizadas. A descrição detalhada dos plasmídios pBluescript KS +/- e pRT103 é dada no Apêndice II.

Sequenciamento de DNA

A estratégia adotada e os subclones utilizados para o sequenciamento do clone α-3B, encontram-se descritos nas Fig. 3 e Tab. II, respectivamente.

Os sequenciamentos foram realizados com DNA dupla fita de plasmídios recombinantes de pBluescript KS +/-, contendo o inserto a ser sequenciado. Amostras de 40 µl, contendo 8 µg de DNA plasmidial, obtidos através de minipreparação, foram desnaturadas através de adição de 40 µl de uma

solução contendo 0,4 M de NaOH e 0,4 mM de EDTA. As amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição simultânea de 8 µl de acetato de amônio 2 M pH 4,5 e 176 µl de etanol gelado. As amostras foram mantidas a -20°C durante 1 hora e centrifugadas por 20 minutos. O sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente por 15 minutos. Após a secagem do sedimento, o mesmo foi ressuspensionado em 25 µl de água. Aliquotas de 10 µl foram utilizadas nas reações de sequenciamento segundo a técnica descrita para dideoxi-nucleotídeos (Sanger *et al.*, 1977). As reações foram realizadas conforme instruções fornecidas pelo fabricante do "T7 Sequencing Kit" (Pharmacia). Foram utilizados os "primers" direto, fornecido pelo Kit, e o reverso (Boehringer-Mannheim). Os produtos das reações de sequenciamento, marcados radioativamente pela incorporação de (³⁵S)dATPαS (Amersham), foram analisados através de eletroforese, carregando-se 2 µl de reação por canaleta em géis desnaturantes de poliacrilamida nas concentrações de 5% e 6% (Sambrook *et al.*, 1989). Para a confecção dos géis, foram utilizadas placas de 50 cm de altura (LKB), sendo uma delas tratada com "Repel-silane" (Pharmacia) e a outra com "Bind-silane" (Pharmacia), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram incubadas por 3 minutos a 80°C antes de serem aplicadas nos géis. Os dois géis foram submetidos a aproximadamente 2000 volts, sendo que a potência máxima foi

estabelecida para 50 Watts, utilizando sistema de eletroforese MacroPhor (LKB). O gel 6%, para leitura da sequência localizada próxima ao "primer", foi submetido a eletroforese até a saída do corante azul de bromofenol. O gel 5%, para leitura da sequência mais afastada do "primer", foi submetido à eletroforese por 2 horas adicionais após a saída do corante xileno cianol. Após a eletroforese, os géis aderidos às placas foram incubados por 30 minutos sob leve agitação em uma solução contendo 10% de ácido acético e 10% de metanol (para retirada de uréia e fixação do DNA) e, em seguida, lavados exaustivamente com água corrente. Os géis foram secos a 45°C durante a noite e submetidos à autoradiografia através de exposição a filmes sensíveis à radiação (Hiperfilm-Amersham), por 1 a 4 dias.

Isolamento da região promotora do gene α -3B e sua fusão ao gene "reporter" GUS

Um fragmento de 0,3 kb foi amplificado a partir de um subclone EcoRI/StuI do gene α -3B, utilizando-se o "primer" universal de sequenciamento e o "primer" Alfacoix-ATG (5'-TGCTGGATCCATGGCGACAAGATGCTGCT-3'), complementar a sequência contida entre -18 e +8, o qual gera sítios das enzimas NcoI e

BamHI, após o ATG. O fragmento amplificado foi então digerido com EcoRI/BamHI e inserido no plasmídeo pBluescript KS (Stratagene). O clone resultante foi então verificado via sequenciamento de ambas as fitas. O fragmento clonado foi recuperado através de digestão com HincII/NcoI e inserido no plasmídeo pRT103 (Töpfer *et al.*, 1987) digerido com as mesmas enzimas, substituindo, desta maneira, o promotor CaMV35S. Em seguida, a região codificadora do gene de β -glucuronidase (GUS) foi excisada do plasmídeo pJII140 (Gallie *et al.*, 1987) através de digestão com NcoI/BamHI, e inserida nos sítios correspondentes entre o fragmento promotor e o sinal de poliadenilação CaMV35S. Um fragmento contido entre -1084 e -285 foi excisado do clone α -3C através de digestão com HindIII/EcoRI, e unido à construção anterior, através de inserção direcional, à 5' dos demais insertos. O clone foi denominado P α -CX103 (Fig. 5 e Tab. 3).

Através de digestão do clone acima obtido, com a enzima XbaI, foi isolado um fragmento, contendo 904 pb da região promotora fundida ao gene reporter GUS, que foi então inserido no plasmídeo pBluescript KS+, no sítio correspondente. Este clone foi denominado p α C*GUSKS.

Deleção unidirecional com a enzima Exonuclease III

A técnica utilizada foi a descrita por Henikoff (1987), com algumas adaptações às condições do laboratório. Os princípios básicos da técnica encontram-se descritos no apêndice III.

O clone p α C*GUSKS, foi digerido com as enzimas Sma I e Pst I. Estas enzimas produzem extremidades abrupta e 3' proeminente, respectivamente. A enzima Exonuclease III age uniformemente sobre extremidades abruptas ou 5' proeminentes, não atacando extremidades 3' proeminentes. Portanto, o ataque da enzima só se deu sobre a extremidade Sma I, promovendo deleção unidirecional a partir daquele ponto. Vinte μ g de DNA foram digeridos com SmaI/PstI, durante 3 horas, a 37°C. O DNA digerido foi então extraído com fenol/cloroformio/álcool isoamílico (25:24:1) e com cloroformio/álcool isoamílico (24:1). Após a última extração, adicionou-se à fase aquosa 0,1 volumes de cloreto de sódio 2 M e 2 volumes de etanol gelado. A amostra foi incubada a -70°C durante 30 minutos e, em seguida, centrifugada por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado com etanol 70%. Após liofilização, o precipitado foi solubilizado em 65 μ l do Tampão de Exonuclease III (Tris-HCl 66 mM pH 8,0; 0,66 mM de MgCl₂). Uma

alíquota de 5 µl do material foi submetida a eletroforese em gel para confirmar a completa digestão do DNA. Aos 60 µl restantes da amostra, foram adicionadas 300 unidades de Exonuclease III (GIBCO-BRL). A reação se procedeu à temperatura ambiente. A partir desta reação foram retiradas 25 alíquotas, contendo 2,5 µl, a cada 30 segundos. Estas alíquotas foram imediatamente transferidas para tubos de microcentrífuga que continham 7,5 µl de Mistura de S1 Nuclease (apêndice I). Esta reação foi incubada por 30 minutos, à temperatura ambiente. Adicionou-se então, 1 µl do Tampão "Stop" de S1 Nuclease (0,3 M de Trizma Base; 50 mM de EDTA), e incubou-se por 10 minutos a 70°C. Alíquotas de 2 µl foram retiradas e submetidas a eletroforese em gel de agarose para conferir a extensão das deleções realizadas. Concomitantemente, ao restante das amostras adicionou-se 1 µl da Mistura Klenow (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; 20 mM de MgCl₂ e 3 U de polimerase Klenow [Pharmacia]) e um µl de Mistura de Nucleotídeos 0,4 mM (Apêndice I). As reações foram incubadas por 10 minutos, a 37°C. Após esta incubação, adicionou-se 40 µl de Mistura de Ligase (Apêndice I), incubando-se, por 2 horas, a 16°C.

Os plasmídios assim obtidos foram utilizados na transformação de bactérias DH5α. Após a seleção dos clones que sofreram deleções, foram realizadas minipreparações de plasmídios e, em seguida, o sequenciamento destes DNAs, para

análise da extensão das deleções ocorridas.

Construções utilizadas nos experimentos de expressão transitória

As diversas construções geradas pelos trabalhos de deleção unidirecional com Exonuclease III, foram isoladas através de digestão com as enzimas KpnI/XbaI e inseridas no plasmídio p-35S103, derivado do plasmídio pRT103 através da eliminação da sequência promotora CaMV35S por digestão com HindII/XhoI, seguida de tratamento com Klenow polimerase (Pharmacia) e recircularização. Destes trabalhos, resultaram os clones p1D, p2E, p5C, p6B, p7B, p3G, p10C, p10J e p10M (Fig. 5 e Tab.III).

Através de digestão do clone pαC*GUSKS com a enzima ApaI, seguido de recircularização, obteve-se um clone contendo 90 pb do promotor, fundidos ao gene GUS, que foi denominado pApaKS. Tal construção foi, posteriormente, transferida para o plasmídio p-35S103, através da estratégia descrita para transferência das demais construções. O clone obtido foi denominado pApa (Fig.5 e Tab.III).

A digestão do clone p1D com NcoI, seguida de recircularização, forneceu um clone onde o gene GUS apresenta-se na ausência de

região promotora. Este clone foi denominado pGUS (Fig.5 e Tab.III).

O clone p α -CX103, utilizado como base para os trabalhos de deleção e também para o bombardeamento, encontra-se descrito na Fig.5 e Tab.III.

O plasmídio pACT1-F (McElroy *et al.*, 1990), utilizado como controle positivo, contém o gene β -glucuronidase (GUS) sob o controle de um forte promotor constitutivo do gene *actin1* de arroz.

Experimentos de expressão transitória via bombardeamento de micropartículas

Os experimentos de expressão transitória foram realizados através do bombardeamento de micropartículas sobre o material alvo, utilizando um sistema de disparo baseado em pressão gerada por injeção de gás hélio, construído no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do CBMEG. Um diagrama ilustrando o princípio de funcionamento do sistema utilizado encontra-se descrito no Apêndice IV.

Plantas de milho foram crescidas no campo experimental da Universidade Estadual de Campinas e auto-polinizadas. As espigas, colhidas 15 dias após a polinização (15 DAP), foram esterilizadas por 15 minutos com água sanitária comercial 5% e lavadas 5 vezes com

água destilada esterilizada. As sementes, após serem retiradas das espigas, sofreram um corte longitudinal, com a ajuda de um bisturi, e foram distribuídas em placas de petri (135 mm x 17 mm) contendo 20 ml de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com as faces seccionadas voltadas para cima. Cada placa recebeu 16 secções de sementes.

Para a preparação das micropartículas, utilizou-se 5 μ g de DNA; 50 μ l de CaCl_2 2,5 M; 20 μ l de espermidina (0,1 M) e 3 mg de partículas de ouro, de acordo com a metodologia descrita por Ye *et al.* (1990).

Para cada construção, foram bombardeadas 3 placas, sendo que, cada uma delas, recebeu 2 disparos de 0,5 μ g de DNA. Após o bombardeamento, as placas foram incubadas durante 48 horas, na ausência de luz, a 27°C. Em seguida, os tecidos foram revelados para atividade de GUS através da adição do substrato da enzima, X-gluc, de acordo com a metodologia descrita por Jefferson (1987).

Os resultados obtidos através da contagem do número de pontos azuis observados, foram tratados estatisticamente pelo método SNK (Steel & Torrie, 1980).

Isolamento de núcleos de células de endosperma e de folha de Coix

Os núcleos foram preparados segundo alterações na metodologia descrita por Kodrzycki *et al.*, 1989.

Todos os procedimentos foram realizados a 4°C.

A obtenção de núcleos de células de endosperma de Coix, foi realizada a partir de sementes em 6 diferentes estágios do desenvolvimento, denominados estágios 0, 1, 2, 3, 4 e 5. A determinação dos estágios foi realizada visualmente, utilizando como critério a coloração apresentada pelo invólucro da semente.

Sementes de diferentes estágios de desenvolvimento de Coix, tiveram o invólucro retirado, visando a obtenção de 4 a 8 g de endosperma. O material foi então congelado em nitrogênio líquido e maçerado. Após a evaporação do nitrogênio, adicionou-se 10 ml do tampão NIB (Sacarose 0,25 M; Tris-HCl 25mM pH 7,8; MgCl₂ 10mM; Ficoll 2,5% [p/v]; Dextran T-40 5% [p/v]; β-mercaptoetanol 10mM), seguido de revolvimento. A amostra foi filtrada em malha metálica cujos poros apresentam 100 μm de diâmetro e transferida para tubos Falcon de 15 ml. Realizou-se então uma centrifugação a 1000xg, durante 5 minutos, à 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 10 ml de tampão NIB e novamente centrifugado, nas mesmas condições. Após ressusensão em

10 ml de NIB contendo 20% de glicerol, o material foi novamente centrifugado. O sedimento contendo os núcleos e amido foi ressuspenso em 1 ml do Tampão R (Tris-HCl 50 mM pH 8,5; MgCl₂ 5 mM; β-mercaptoetanol 10mM e glicerol 50%). O material foi então aliqotado e estocado a -70°C.

Para extração de núcleos de folhas, sementes foram germinadas no escuro, durante 15 dias, e as folhas das plântulas foram cortadas, resultando em 8 g de material. Os demais procedimentos foram os mesmos citados para extração de núcleos de endosperma, exceto alteração na composição do Tampão NIB (Sacarose 0,44 M; Tris-HCl 25 mM pH 7,8; MgCl₂ 10 mM; Ficoll 2,5% [p/v]; Dextran T-40 5% [p/v]; β-mercaptoetanol 10mM), e o fato de ter sido adicionado Triton X-100 0,1% [v/v] ao material, após a maceração do tecido.

Obtenção de extratos de proteínas nucleares

Extratos de proteínas nucleares foram obtidos a partir das preparações de núcleos, segundo modificações na técnica descrita por So, & Larkins, (1991).

Aos extratos nucleares adicionou-se Espemidina e NaCl para uma concentração final de 5 mM e 0,5 M, respectivamente, e as amostras foram incubadas em gelo durante 45 minutos. Em seguida, o

material foi centrifugado durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente recolhido e dialisado contra 2 trocas em 500 ml do Tampão de Diálise (HEPES 10mM pH 8,0; MgCl₂ 1 mM; glicerol 50%; NaCl 50 mM e PMSF 0,1 mM), a 4°C, durante 2 horas cada. O dializado foi então centrifugado a 14000xg durante 15 minutos, para remover material insolúvel e, em seguida, alíquotado e estocado a -70°C.

A concentração de proteínas nos extratos foi determinada utilizando-se o Kit BIO-RAD "Protein Assay".

Obtenção e radiomarcção dos fragmentos de DNA utilizados nos experimentos de ligação DNA-proteína

Através da digestão dos clones p10C, p10J e p10M (Fig 5) com as enzimas NcoI/HindIII foram gerados os fragmentos 10C, 10J e 10M (Fig.6 e Tab. IV). Após purificação em gel de agarose, os fragmentos foram digeridos com a enzima Sau3AI, permitindo o isolamento dos fragmentos denominados 10Cs, 10Js e 10Ms (Fig.6 e Tab. IV).

A digestão do fragmento 10Ms com as enzimas ApaI e AluI, permitiu o isolamento dos fragmentos MMin e MTAT, respectivamente (Fig.6 e Tab. IV).

O fragmento 5'10C foi isolado através de digestão do clone p10C

com as enzimas HindIII/ApaI (Fig.6 e Tab.IV).

Os fragmentos de DNA tiveram suas extremidades marcadas com α -³²PdNTPs, na presença da enzima Klenow polimerase, utilizando-se o kit "BandShift" (Pharmacia), segundo recomendações do fabricante. Os fragmentos marcados foram então purificados em gel de acrilamida 8% e, em seguida, localizados através de autoradiografia, à temperatura ambiente, por 30 minutos. As porções de gel que apresentaram as bandas radioativas de interesse, foram excisadas e eluídas durante a noite à 37°C em 0,5 M de acetato de amônio, 10 mM de acetato de magnésio, 1 mM de EDTA e 0,1% de SDS. Fragmentos de DNA não marcados foram purificados através de procedimento similar e utilizados como competidores em reações de ligação DNA/proteína.

Análise da interação DNA-proteína através de EMSA ("Electrophoretic Mobilit Shift Assay")

As reações de ligação DNA-proteína foram montadas para um volume final de 20 µl, contendo Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 50 mM; DTT 0,5 mM; detergente NP-40 0,05% [v/v]; Glicerol 10%; 4 µg de extrato nuclear; 0,1 a 5 ng de fragmento de DNA marcado (~10000 cpm). DNA sintético dupla fita poli-dIdC foi utilizado como

competidor para reduzir ligação inespecífica. A mistura foi incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente e, após a adição de 2 μ l de tampão de amostra, foi carregada em gel de poliacrilamida (30:0,8 acrilamida/bisacrilamida) 4%, não desnaturante, contendo Tris-HCl 7,0 mM pH 7,5; 3,0 mM de acetato de sódio e 1,0 mM de EDTA. O gel foi pré-corrido durante 30 minutos a 5 V/cm. Após as amostras terem sido carregadas, a eletroforese se procedeu a 10V/cm durante 2 a 4 horas, a 4°C. O gel foi seco, e autoradiografado à temperatura ambiente.

Nas reações que utilizaram anticorpo, os extratos nucleares foram pré-incubados durante 10 minutos, na presença do anticorpo, antes de serem adicionados à reação.

Anticorpos

Anticorpo policlonal contra a proteína Opaco2 foi gentilmente fornecido pelo Dr. Robert J. Schmidt (University of California at San Diego, USA). Anticorpo policlonal contra a α -coixina de 25 kDa (anti- C2), produzido no laboratório de Biologia Molecular de Plantas do CBMEG (Leite *et al.* 1990), foi utilizado como anticorpo não relacionado.

Métodos computacionais

Todos os programas utilizados foram executados em microcomputador do tipo PC 386.

A edição e análise das sequências de DNA foram realizadas com ajuda dos programas DNASIS (Pharmacia) e ESEE v. 1.04 (Cabot, 1988).

RESULTADOS

Sequenciamento da região codificadora e promotora do gene α -3B

Em trabalhos realizados previamente, o clone α -3 foi digerido com a enzima EcoRI, separado em gel 0,8% de agarose, transferido para uma membrana de nylon Hybond N (Amersham) e hibridizado com um fragmento de 988 pb do clone de cDNA de α -coixina de 25 kDa, pBCX 25.10. Três fragmentos de 5,2; 4,1 e 3,2 kb foram observados. Estes fragmentos foram clonados no plasmídeo pBluescript e designados α -3A (5,2 kb), α -3B (4,1 kb) e α -3C (3,2 kb). A ausência de sítios de restrição para a enzima EcoRI no clone de cDNA de α -coixina, permitiu inferir sobre a existência de, no mínimo, três genes de α -coixina repetidos em "tandem", no clone genômico α -3. Os clones α -3A e α -3C foram sequenciados, e revelaram a ocorrência de um "stop codon" na posição +652, sendo caracterizados como pseudogenes (Ottoboni *et al.*, 1994).

Para o sequenciamento do clone α -3B, digestões com as enzimas PstI, XbaI e BamHI, seguidas de hibridização com a sonda de cDNA de α -coixina, permitiu determinar que a região estrutural do gene α -3B encontra-se inteiramente contida entre sítios das enzimas EcoRI e XbaI. Este fragmento foi clonado no plasmídeo pBluescript e denominado

pBEX (Fig. 3 C e Tab. II). Através da digestão deste clone com as enzimas EcoRI, XbaI e PstI foi possível isolar e clonar os fragmentos, que deram origem aos clones pBEP e pBPX (Fig. 3 C e Tab. II). Os clones pBEX, pBEP e pBPX foram sequenciados nas duas direções e, a partir das sequências obtidas, foram encontrados novos sítios de restrição, que posteriormente permitiram a construção de novos subclones (Fig. 3, Tab. II). O subclone pBX3' foi obtido através de digestão do clone α -3B com XbaI/BamHI, seguida do isolamento de um fragmento de aproximadamente 0,5 kb que foi, então, clonado no plasmídeo pBluescript (Fig. 3 e Tab. II). Este subclone contém a região 3' não codificadora do gene, e foi sequenciado apenas no sentido 5'→3'.

A análise da sequência até então obtida, permitiu observar que o clone α -3B contém apenas 285 pb da região promotora 5' do gene α -3B. Visando o sequenciamento de uma maior extensão da região não codificadora 5' deste gene, o clone α -3 foi digerido com BamHI, um fragmento de 3,2 kb foi isolado e clonado no plasmídeo pBluescript, sendo denominado α -3B 3,2 (Fig. 3B). A digestão deste subclone com HindIII/EcoRI permitiu isolar e clonar um fragmento de 0,8 kb, dando origem ao subclone pPHE (Fig. 3 e Tab. II). O clone pPXE foi obtido através da digestão do clone α -3B 3,2 com XbaI/EcoRI, seguida do

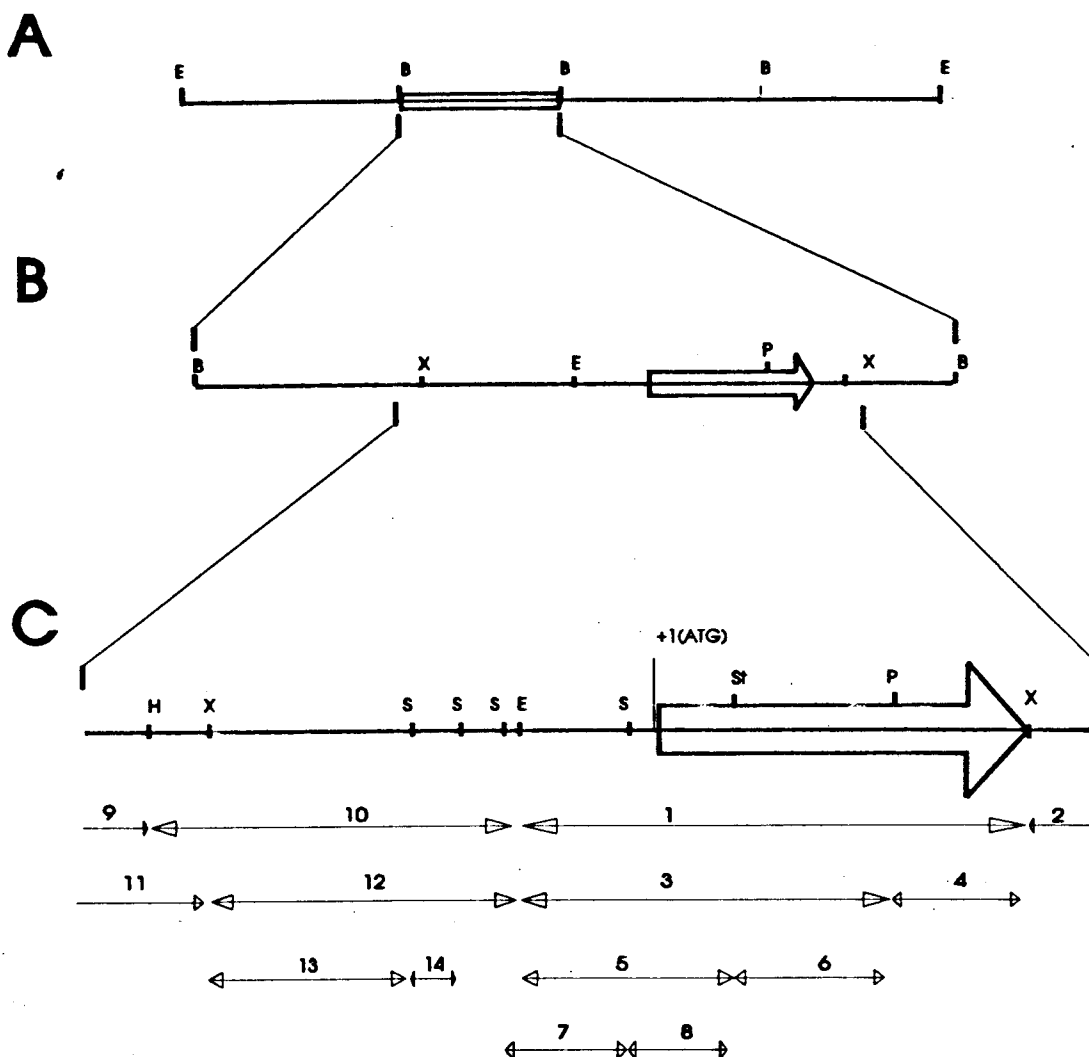


Fig. 3. Mapa de restrição e estratégia de sequenciamento do clone genômico α -3B. (A) Representação do clone genômico α -3 (~15 kb). (B) Subclone de 3,2 kb, obtido através de clivagem do clone original com a enzima BamHI. (C) Região completamente sequenciada correspondente a 2189 pb, sendo indicados todos os subclones utilizados durante o sequenciamento. Somente os sítios enzimáticos relevantes ao sequenciamento são apresentados, sendo; B, BamHI; E, EcoRI; H, HindIII; P, PstI; S, Sau3AI; St, Stul e X, XbaI. Os clones numerados são dispostos na Tab. II. Em (B) e (C) as porções ocupadas por setas correspondem à região codificadora do gene α -3B.

Tabela II: Clones e subclones utilizados para o sequenciamento do gene α -3B

NOME	EXTREMIDADES DO INSERTO	TAMANHO DO INSERTO (pb)	COMENTÁRIOS
1) pBEX	Eco RI/XbaI	1081	Sequenciado apenas nas extremidades
2) pBX3'	XbaI/BamHI	~800	Parcialmente sequenciado, apenas no sentido 5'→3'
3) pBEP	EcoRI/PstI	806	Sequenciado apenas nas extremidades
4) pBPX	PstI/XbaI	275	Completamente sequenciado
5) pBESl	EcoRI/StuI	446	Sequenciado apenas nas extremidades
6) pBSlP	StuI/PstI	358	Completamente sequenciado
7) pBSS	Sau3AI/Sau3AI	261	Completamente sequenciado
8) pBSSt	Sau3AI/StuI	214	Completamente sequenciado
9) pPBH	BamHI/Hind III	~800	Parcialmente sequenciado, apenas no sentido 3'→5'
10) pPHE	HindIII/EcoRI	789	Sequenciado apenas nas extremidades
11) pPBX	BamHI/XbaI	~900	Parcialmente sequenciado, apenas no sentido 3'→5'
12) pPXE	XbaI/EcoRI	679	Sequenciado apenas nas extremidades
13) pPXS	XbaI/Sau3AI	452	Completamente sequenciado
14) pPSS	Sau3AI/Sau3AI	98	Completamente sequenciado

* Todas as clonagens foram realizadas no plasmídeo pBluescript KS+.

isolamento de um fragmento de 0,7 kb e clonagem no plasmídio pBluescript. O sequenciamento das extremidades dos subclones pPHE e pPXE permitiu determinar novos sítios de restrição que, posteriormente, foram utilizados para a obtenção de novos subclones (Fig.3, B; e Tab. II). Utilizando as enzimas HindIII e BamHI para digestão do clone α -3B 3,2, foi isolado um fragmento de 0,8 kb que foi então clonado e denominado pPBH. O clone pPBX foi obtido através da digestão do clone α -3B 3,2 com BamHI/XbaI seguido de isolamento e clonagem. Estes dois últimos clones foram sequenciados apenas no sentido 3' $\rightarrow$ 5' (Fig.3 e Tab.II).

A sequência completa do gene α -3B, incluindo 1084 pb da região não codificadora 5', e 119 pb da região não codificadora 3', bem como a sequência deduzida de aminoácidos, está representada na Fig. 4. A sequência codificadora deste gene possui 758 pb. A região flanqueadora 5' do gene apresenta sequências regulatórias comumente encontradas em genes de plantas. Nas posições -100 e -164, com relação ao ATG inicial, foram encontradas sequências possivelmente correspondentes aos elementos TATA e CATC, respectivamente. A porção 3' não codificadora do gene contém um sinal de poliadenilação AATAAT, comum em genes de plantas, localizado a +863, em relação ao ATG inicial. A sequência TGTAAG designada como "endosperm box", "prolamin box" ou "-300 box" (Kreis *et al.*, 1986), foi localizada na posição -300.

A sequência de nucleotídeos obtida foi depositada nos bancos de dados EMBL, GenBank e DDBJ, com o número de acesso X63113.

Análise da sequência de aminoácidos da proteína

A sequência completa de aminoácidos da α -coixina de 25 kDa, deduzida a partir das sequências dos clones α -3B e pBCX 25.10, representa uma proteína madura rica em glutamina (22,9%), leucina (15,5%), alanina (15,1%) e prolina (7,8%). Estas sequências foram alinhadas com sequências de aminoácidos representando duas α -zeínas e duas α -kafirinas de 22 kDa (Fig. 5). As sequências apresentaram-se altamente homólogas, com homologia intra-espécies e inter-espécies variando em torno de 90% e 70%, respectivamente.

As proteínas consistem de uma região N-terminal, contendo o peptídeo sinal, seguida por dez repetições altamente conservadas de blocos de 15 a 20 aminoácidos ladeados por poliglutaminas, e uma curta região C-terminal (Fig. 5).

```

-1269 CACCCTGGTACAATTATATAGACTAAGTTCAATTAATTCAATTCATAAATAAAAAATGGAA -1210
-1209 CAATAAAGGAAACCATGAAGAGTTTCTTCATTGCGTTTGATTGTGTCAACCGAAGCTATT -1150
-1149 CTTTGTAAATTTTTAGCAATGTTGGATTCTTCAGACTAAAATAGGTGTCCATTCCCTAG -1090
-1089 CAATTAAGCTTATCATCCCAATGTTCTCGATTCTTTGGGACAAGATTCAACTCGTGTG -1030
-1029 TAGGGATAGCCAAAATCTCTCAAGGGTAGAGGGCAACGATTTTAGTGTCTACACACGAC -970
-969 ACATTGTTCTAGAAAAAGAGATGAAGTTTGGGTGTTGTAGTTTTATGTTCAAAAAACA -910
-909 ATGCTGACCCCATTTGTTCAAAGAAATGCACACGTTCAACTAAAGAGCTAGAGTTGAACAT -850
-849 ATACACCCCTTTATTCTGGTTTTATTACATGCTCTAGCTTCTCCCTAATTTAGTTTCCCAA -790
-789 CTTTGACATACTTCCTCGAACGTCTATCCAAAATTTTGAACACGAAGTTTGTTTTGAAT -730
-729 TATTTATGACATATGCCTTGACAGTCCTTTTTGTGGCATAATATATTAATCATTGTC -670
-669 AGAGTTTTACAGATTGGTTTTACACAGTACAAAAGTAAATTGCAAACGAGAATACAAGG -610
-609 AATGTTTGTGGTAATTGACATGTGTATTTATAAGCATTCTAGTTTTGTACATCCTATGTG -550
-549 TGCGCGTGTATGCGTACATGTGATGTTTCAATTAGTCTCGATCTAATAGCATATGTTCA -490
-489 TCAATTGATGAATAACTTCTCACCTAACAAACGTGCATGGCTTAACAATGAGTACAATAC -430
-429 TAAACCAAAGTCATTGTATCCAAATAGCAAGTCAAAACATTACGTACTCATCATGTTAT -370
-369 AAAGTGAACCTTTATGATGTGGCTAAGGCTAAAACGTATGTAAGGTGAAGTATCATG -310
-309 CATGTATTCTCATGAATTAGAAGAAATCCAATAGAAAGCGACACTTTTTTCTGTAT -250
-249 GTAGTGGAAACTATCTTCCAAACAAACCATACAATCCAACGAAACTGAGAACTAAATG -190
-189 ACAAAATTTAGTAGGAGACATGTCTCTCTAGCTTATCTGCTTGTGGCAAAATCTAAA -130
-129 TTTGAACACACATACATGAGCTTAGACTTGTATAAATAGGGCCCAAATCAATAGTTAATC -70
-69 CATCGCCCATAACTGAGATCAATTAGGAACATACCAAGTGAAACACACTAGCAGCATC -10
1 M A T K I F A L L V L L A L S A S 17
-9 TTGGCAAGAATGGCTACCAAGATATTTGCCCTCCTTGTGCTCCTTGTCTTTAGCGAGC 51
18 A T T A V I I P Q C S L A P T A A I I Q 37
52 GCTACAACCTGCGGTCAATTATCCGCAAGTGTCTACTTGTCTCTACTGCTGCTATTATTCAG 111
38 R F L P P V S A I G F E H P A V Q A Y R 57
112 CGGTTCTCCACCTGTTTCTGCTATAGGGTTGGAACACCCAGCTGTGCAGGCCTACAGG 171
58 L Q Q A L A A T I L Q Q P L A Q L Q Q R 77
172 CTACAACAGGCGCTTGGCGCAACCATCTTACAACAACCACTTGCCCAATTGCAACAACGG 231
78 S S A H L T I Q T I A A Q Q Q Q Q F L 97
232 TCCTCGGCTCATCTAACTATACAGACAATCGCAGCACAAACAACAACAGTTCTCTG 291
98 A S L S Q L A A A N P A A Y L Q Q Q L L 117
292 GCATCACTCAGTCAACTAGCAGCGCGAACCAGCTGCATACTTGCAACAACAGCTGCTG 351
118 A S N P L A V A N A I E Y Q Q Q Q Q L R 137
352 GCATCAACCCACTTGCTGTGGCGAACGCTATTGAATACCAGCAACAACAACAGCTGCAA 411
138 Q F L P A L S Q L V V A N P A A Y L Q S 157
412 CAGTTCTGCCAGCGCTCAGTCACTAGTGTGGCAAAACCTGCTGCCTATCTGCAATCA 471
158 Q L F P S N P L V V T N S A A Y L Q Q Q 177
472 CAATTGTTTCCATCAACCCACTAGTGTGACCAATTCGCTGCATACCTGCAGCAACAG 531
178 Q L Q Q I L P A L S Q L A V A N P N S Y 197
532 CAGTACAACAGATCCTACAGCACTCAGTCACTAGCGGTGGCGAACCCTAACTCTAC 591
198 L Q Q Q Q L L P F N Q V A V A N N A V Y 217
592 TTGCAACAACAACAATTCTTCCATTCAACCAAGTGGCTGTGGCGAACAACGCTGTATAC 651
218 Q Q Q Y Q L L Q V N P L V A T F L Q Q Q 237
652 CAGCAACAATATCAGCTGCTGCAAGTTAACCATTGGTTGCCACCTTCTACAGCAGCAG 711
238 Q R Q L L P F N Q M S L M N P A L S W Q 257
712 CAACGGCAACTACTGCCATTCAACCAATGTCTTTGATGAACCTGCCTTGTCTGTGGCAG 771
258 Q P I V G G V G F * 267
772 CAACCCATCGTTGGAGGTGTCGGCTTCTAGATTAAATATGAGTTGACTTGATAAAAAA 831
832 GCTCTCATGCCGGCTTGTGCAACTTCTAGAAATAATCAATATATTGATTGAGATTATCA 891
892 GAGTCTATTTCTTTCTGTGTTCCGAT 919

```

Fig. 4. Sequência de nucleotídeos e sequência deduzida de aminoácidos do gene α -3B. As posições dos nucleotídeos são numeradas no sentido 5'→3' e indicadas nos dois lados de cada linha. As letras que representam cada aminoácido estão indicadas acima da segunda letra de cada códon. O "prolamin box" (nucleotídeo -330) está sublinhado. O TATA, CATC e o sinal de poliadenilação estão grafados em negro.

1	MATKIFALLVLLALSASATTA	VIIPQCSLAPTA	AI	IQRFLPPVSAIGFEHPAVQAYR	57
1	MATKIFALLVLLALSASATTA	VIIPQCSLAPTA	AI	IPRFLPPVSAIGFEHPAVQAYR	57
1	MATKILSLALLALFASATNA	SIIPQCSLAP	-SSIIPQFLPPVTSM	AFEHPAVQAYR	56
1	MATKILALLALLALFVSATNA	FIIPQCSLAP	-SAIIPQFLPPVTSM	GFEHLAVQAYR	56
1	MATKIFALLALHALLVSGTTA	AIIPQCSLAP	-NAIIPQFIPFVTAL	GNEHLAVQAYP	56
1	MATKIFVLLALLALSVSTTTA	VIIPQCSLAP	-NAIISQFLPPLTP	VGFEHPALQAYR	56
	*****	***	*****	***	*****
	1	2	3		
58	LQQALAATILQQPLAQIQ	QRSSAHLTIQTIAAQ	QQQQQ-----	FLASLSQLAAANPAAYLQ	113
58	LQQALAASILQQPLAQIQ	QQSSAHLTIQTIAAQ	QQQQ-----	FLPSLSQLAAANPTAYLQ	112
57	LQQAIAASVLQQPIAQIQ	QQSLAHLTIQTIAAQ	QQQQ-----	FLPALSHLAMVNPVAYLQ	112
57	LQQALAASVLQQPINQIQ	QQSLAHLTIQTIAAQ	QQQQ-----	FLPALSQLDVNPVAYLQ	111
57	GQQVLSASILQQPIAQIQ	QQSLAHLTVQTITAAQ	QQQQQQQQQQQQQQ	FLSSLSALAVANQAAYLQ	120
57	LQQALANSILQQPFAQIQ	QQSSAHLTVQTIAAQ	QQQQ-----	FLPALSQLALANFPVAYLQ	112
	**	****	***	*	*****
	4	5	6		
114	QQLLASNPLAVANAIEYQQ	QQQLQQFLPALSQLV	VANPAAYLQ	-SQLFPSNPLVVTNSAAYLQ	175
113	QQLLASNPLAVANAIAVQH	QQQLQQLLPALSQL	AVANPAAYLQ	-SQLFPSNPLV-ANAAAYLQ	173
113	QQLLASNPLALANVVANQQ	QQQLQQFLPALSQL	AMVNPAAAYLQ	QQQLLSSSPLAVANAPTYLQ	175
112	QQLLASNPLALANVAAYQQ	QQQLQQFLPALSQL	AMVNPAAAYLQ	QQQLLSSSPLAVGNAPTYLQ	174
121	QQLLTSNPHSLANAAAYQQ	QQ--Q--L----	QLAMANPTAYVQ	-QQLLLSNPQAATNAATYLQ	174
113	QQLLASNPLALVNNAAYQQ	QQ-LQQVLP	MISQVAMANPAAYLQ	-QQQLAYNPLVAANAAAYLR	173
	*****	*	*	**	*
	7	8	9		
176	QQQLQQILPALSQLAVANPNSYLQ	QQQLLPFNQVAVANNAVY-Q	QQYQLLQ-----	VNPLVATFLQ	235
174	QQQLQQILPVLSQLAVADPNSYLQ	QQQLLPFNQVAVANNAVY-E	QQHQLLQ-----	VNPLAAAFLO	233
176	QELLQQIVPALTQLAVANPVAYLQ	Q--LLPFNQLTMSNSVAYLQ	QRQQLL--	NPLAVANPLVAAFLQ	238
175	QQLLQQIVPALTQLAVANPAAYLQ	Q--LLPFNQLTVSNSAAYLQ	QRQQLL--	NPLEVPNPLVAAFLQ	237
175	QQQFQQILPALSQLRMANPTAYLQ	QQQLLPINQLALANTDAYLQ	QQQ--LLFPVNPLVVANPLVAAFLQ	240	
174	QQQLQQILPALSQLALVNPAAYL-	HTQLLPFNQLAVTNTAAYLQ	QQQ--LLRVNPFVVAANPLCAAFLQ	238	
	*	****	***	*	*****
	10				
236	QQQRQLLPFNQMSLMNPALSWQ	Q-PIVGGVGF	266	α -coixina 25 kDa (alfa3b)	
234	QQQRQLLPFNQMSLMNPALSWQ	Q-PIVGGVGF	264	α -coixina 25 kDa (pBCX25.10)	
239	QQ--QLLPYNRFSLMNPVLSRQ	Q-PIVGGAIFF	267	α -zeina 22kDa (pZ22.3)	
238	QQ--QLLPYSQFSLMNPALSWQ	Q-PIVGGAIFF	266	α -zeina 22kDa (ZA1)	
240	Q---QLSSFNQISLVNPALSWQ	QQPIIGGAIF	269	α -kafirina 22 kDa (PGK1)	
238	PR--QLLPFNQISLMNPAFSWQ	Q-PIVGSAIV	267	α -kafirina 22 kDa (PSKR2)	
	**	***	***	*	*

Fig. 5. Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos das α -prolaminas. As sequências são divididas em peptídeo sinal, região N-terminal, uma série de blocos repetidos (enumerados de 1 a 10) e região C-terminal. Cada sequência é identificada no final do alinhamento. Traços indicam lacunas introduzidas para maximizar a comparação de homologia. Resíduos idênticos são indicados por asteriscos. As posições dos aminoácidos são indicados por números em ambos os lados.

Ensaio de expressão transitória em endosperma imaturo de milho

As diversas construções contendo o gene reporter GUS associado às diferentes extensões do promotor do gene α -3B, no plasmídeo pRT103 (Fig.6 e Tab. III), foram utilizadas para os experimentos de bombardeamento de micropartículas em endosperma imaturo de milho (15 DAP). Para isto, foram bombardeadas placas contendo 16 secções de sementes, 12 das quais sofreram corte longitudinal frontal e as 4 demais, sofreram corte longitudinal lateral, de modo a expor também o embrião ao bombardeamento.

Nestes trabalhos, observou-se que as construções p1D (-904), p2E (-821), p5C (-682), p6B (-459), p7B (-361), p3G (-299) e p10C (-238), apresentaram um nível de expressão praticamente igual àquele fornecido pela construção p α -CX103 (-1084), que contém o promotor inteiro. Entretanto, uma forte queda na expressão do gene "reporter" foi observada quando se utilizou a construção p10J, onde o número de pontos azuis, por placa, correspondeu a aproximadamente 30% do número observado para a construção p α -CX103. Uma baixíssima expressão foi obtida para a construção p10M. As construções pApa e pGUS não apresentaram expressão visualmente detectável (Fig.7).

Para o ensaio onde as sementes sofreram corte longitudinal lateral, de modo a expor o embrião, foi possível verificar a manutenção da

tecido-especificidade para todas as construções que apresentaram expressão transitória. O mesmo não ocorreu quando o plasmídeo pACT1-F (McElroy *et al.*, 1990) foi utilizado, onde observou-se a expressão em todos os tecidos da semente (Fig.8).

Interação entre fatores nucleares de endosperma e o promotor do gene α -3B

Os resultados fornecidos pelos ensaios de expressão transitória permitiram sugerir que a mínima região promotora necessária para uma máxima expressão do gene α -3B, está contida entre a posição -238 e o ATG inicial.

Um primeiro passo no sentido de identificar proteínas nucleares que interagem com esta região do promotor, foi isolar os fragmentos 10Cs, 10Js e 10Ms (Fig.9 e Tab.IV). Após a marcação com ^{32}P , estes fragmentos de DNA foram incubados na presença de 4 μg de extrato nuclear de endosperma, do segundo estágio de desenvolvimento. A formação de complexos DNA-proteína foi analisada através de EMSA ("Electrophoretic Mobility Shift Assay"). Como pode ser observado na Fig.10, foram formados 5 complexos DNA-proteína para cada um dos três fragmentos. Contrariando as expectativas geradas pelos trabalhos de expressão transitória, a ausência da sequência contida entre -238 e -158 não influenciou a associação entre os fatores nucleares e os fragmentos de DNA. Cabe ressaltar

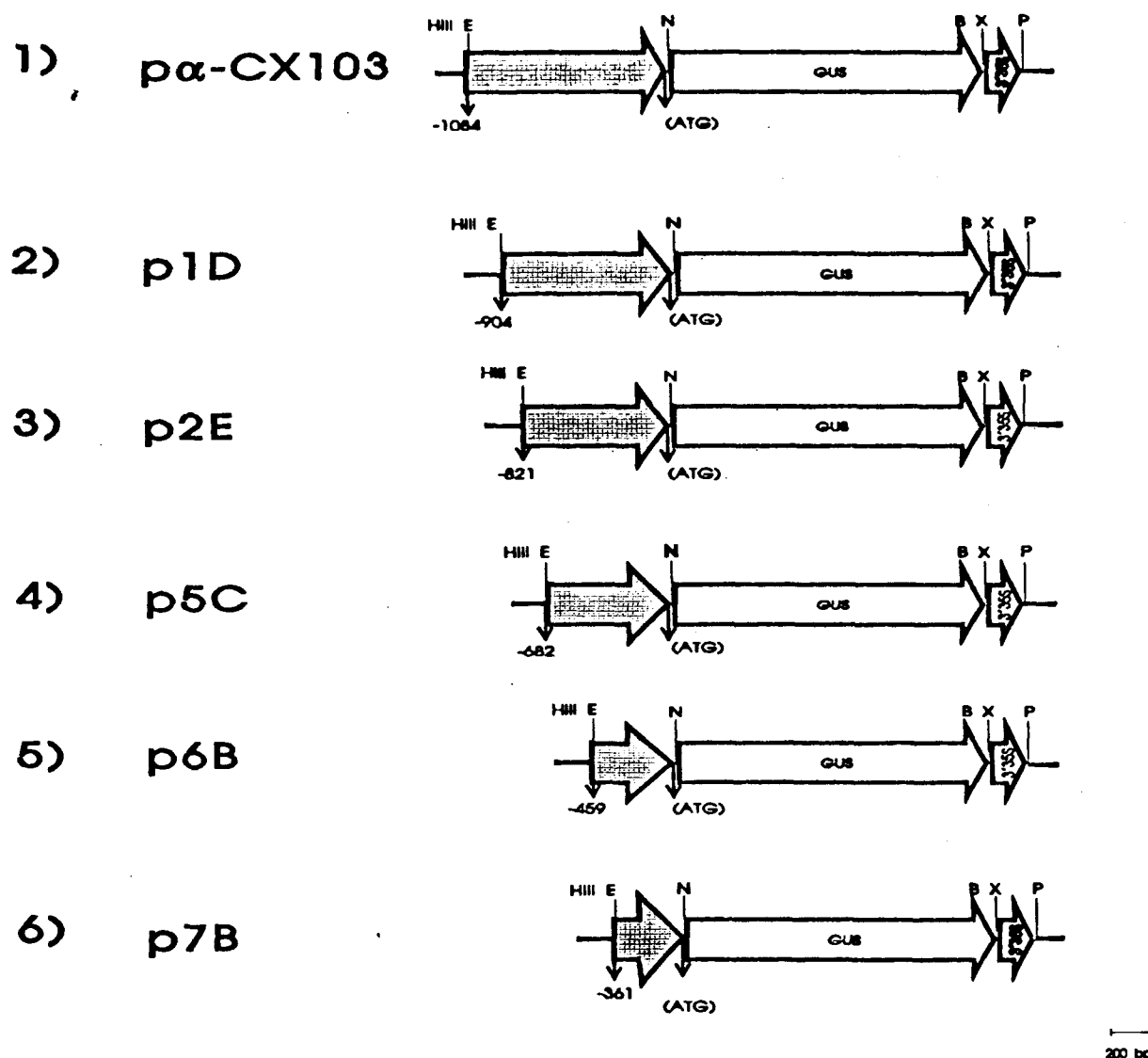


Fig. 6. Representação esquemática das construções utilizadas nos trabalhos de expressão transitória. As construções, inseridas no vetor pRT103, contêm as diferentes extensões da região promotora apresentadas na Tab. III. Somente são indicados os sítios das enzimas que foram relevantes para os trabalhos de clonagem: P, PstI; HIII, HindIII; N, NcoI; X, XbaI; B, BamHI; E, EcoRI.

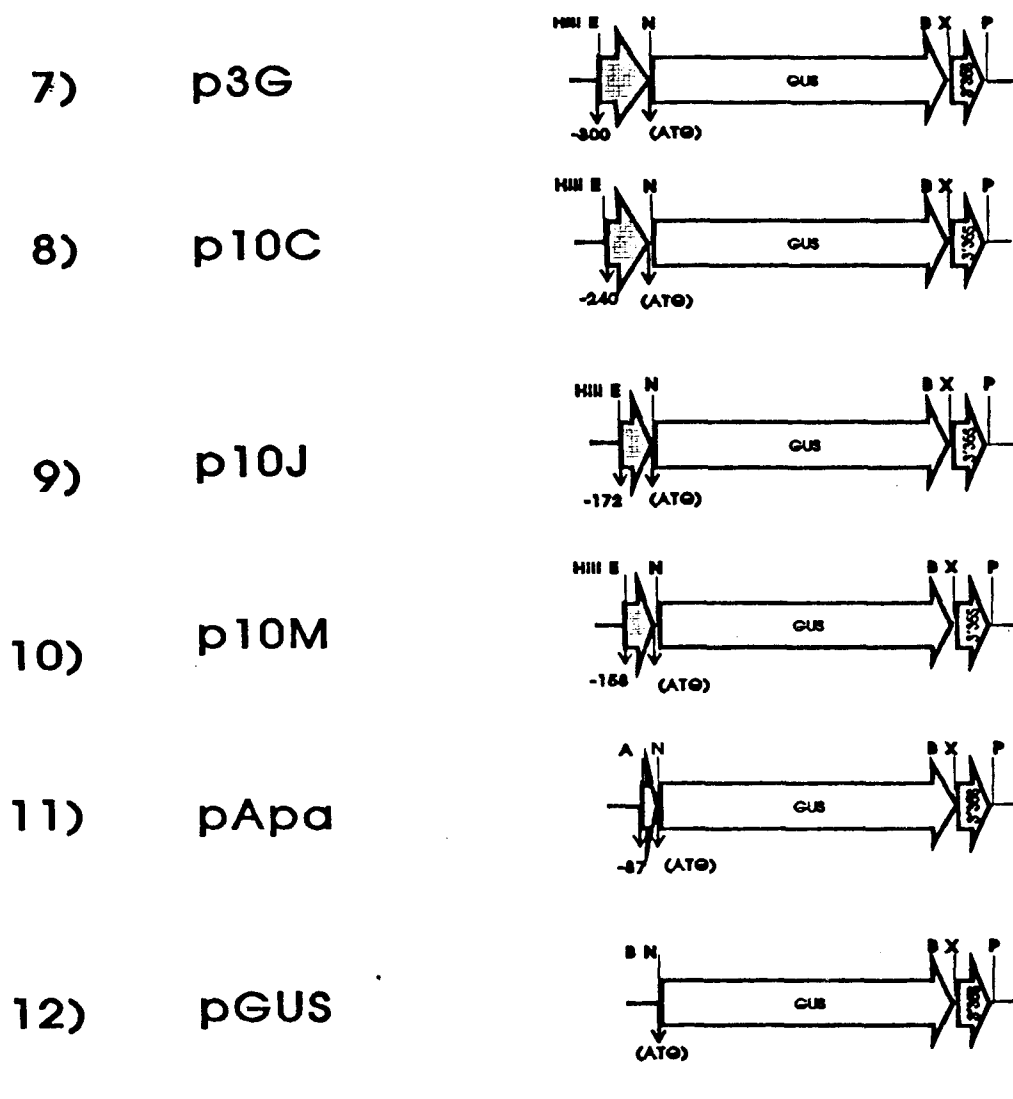


Fig. 6. (Continuação) Representação esquemática das construções utilizadas nos trabalhos de expressão transitória. As construções, inseridas no vetor pRT103, contêm as diferentes extensões da região promotora apresentadas na Tab. III. Somente são indicados os sítios das enzimas que foram relevantes para os trabalhos de clonagem: P, PstI; HIII, HindIII; N, NcoI; X, XbaI; B, BamHI; E, EcoRI, A, ApaI.

Tabela III: Relação das construções utilizadas nos experimentos de bombardeamento de micropartículas. Todas as construções foram realizadas no vetor pRT103, onde as diferentes extensões do promotor encontram-se associadas ao gene GUS.

NOME	EXTENSÃO DO PROMOTOR (pb)	OBTENÇÃO DO PROMOTOR	COMENTÁRIOS
1)p α -Cx103	-1084/+1	Construção através de digestões e clonagens	Corresponde ao promotor inteiro
2)p1D	-904/+1	Deleção unidirecional com a enzima ExoIII	-X-
3)p2E	-821/+1	Deleção unidirecional com a enzima ExoIII	-X-
4)p5C	-682/+1	Deleção unidirecional com a enzima ExoIII	-X-
5)p6B	-459/+1	Deleção unidirecional com a enzima ExoIII	-X-
6)p7B	-361/+1	Deleção unidirecional com a enzima ExoIII	-X-
7)p3G	-299/+1	Deleção unidirecional com a enzima ExoIII	Apresenta deleção da região "prolamin box"
8)p10C	-238/+1	Deleção unidirecional com a enzima ExoIII	Apresenta deleção da região "prolamin box"
9)p10J	-172/+1	Deleção unidirecional com a enzima ExoIII	Apresenta deleção parcial do sítio de ligação da proteína O2 ("O2 box"), além do "prolamin box"
10)p10M	-158/+1	Deleção unidirecional com a enzima ExoIII	Apresenta deleção das regiões "prolamin box", "O2 box" e CATC.
11)pApa	-87/+1	Construção através de digestões e clonagens	Apresenta deleção das regiões "prolamin box", "O2 box" CATC e TATA.
12)pGUS	-X-	Construção através de digestões e clonagens	Não apresenta região promotora associada ao gene GUS

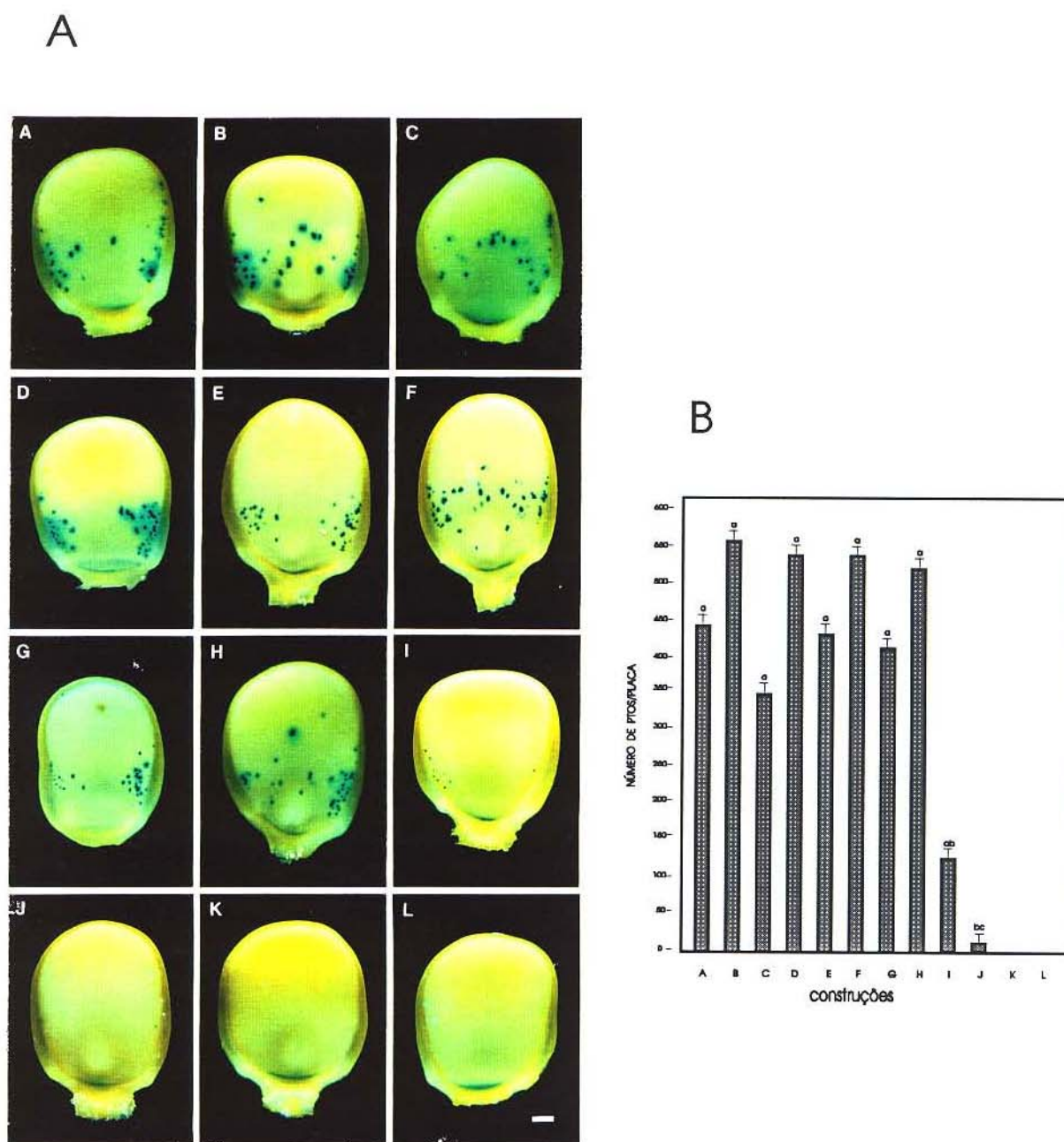


Fig. 7. **A.** Distribuição espacial da atividade GUS em endospermas imaturos de milho após bombardeamento de micropartículas contendo construções com várias extensões do promotor α -3B: p α -CX103 (A); p1D (B); p2E (C); p5C (D); p6B (E); p7B (F); p3G (G); p10C (H); p10J (I); p10M (J); pApa (K); pGUS (L) (Ver Fig. 5). **B.** Níveis de expressão transiente fornecidos pelos experimentos de bombardeamento com micropartículas, quando utilizou-se cada uma das construções acima relacionadas.

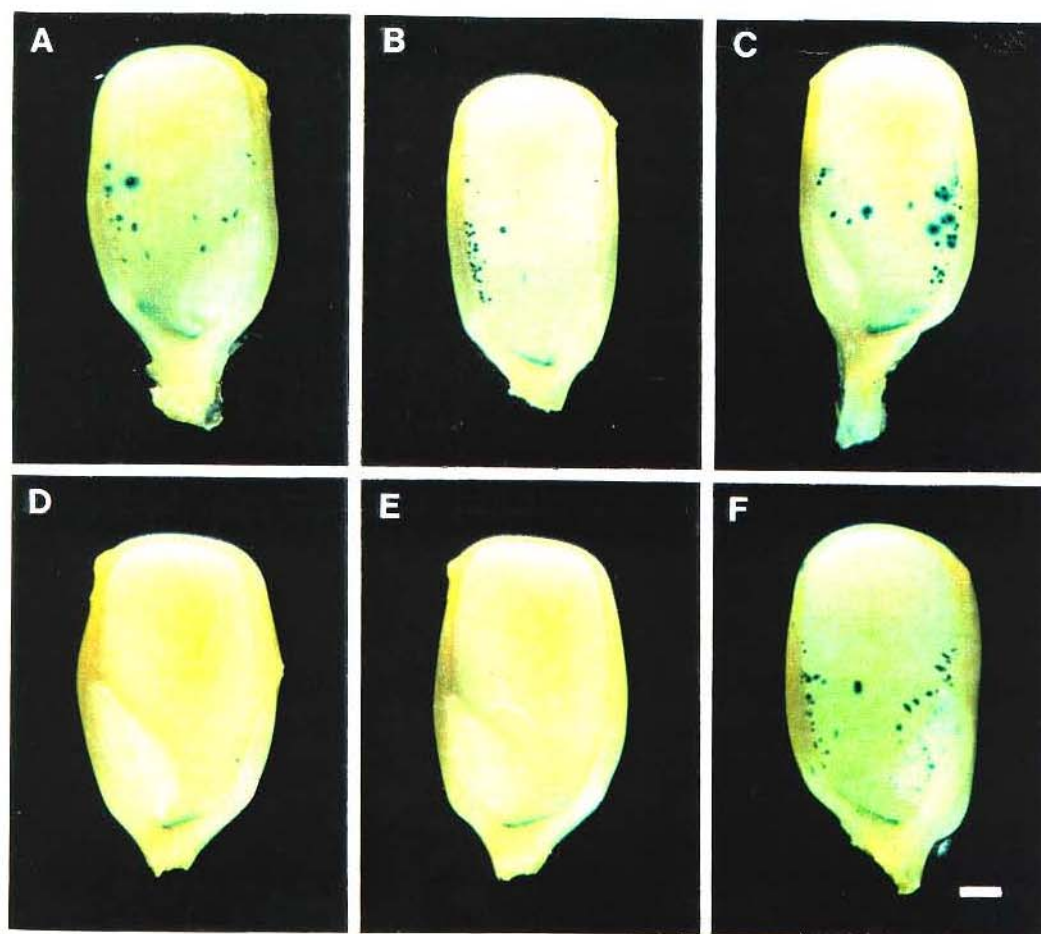


Fig. 8. Tecido-especificidade da atividade GUS em sementes de milho (15 DAP) após bombardeamento com construções contendo diferentes extensões do promotor α -3B: p α -CX103 (A); p7B (B); p10C (C); p10J (D); p10M (E) e pACT1-F (F).

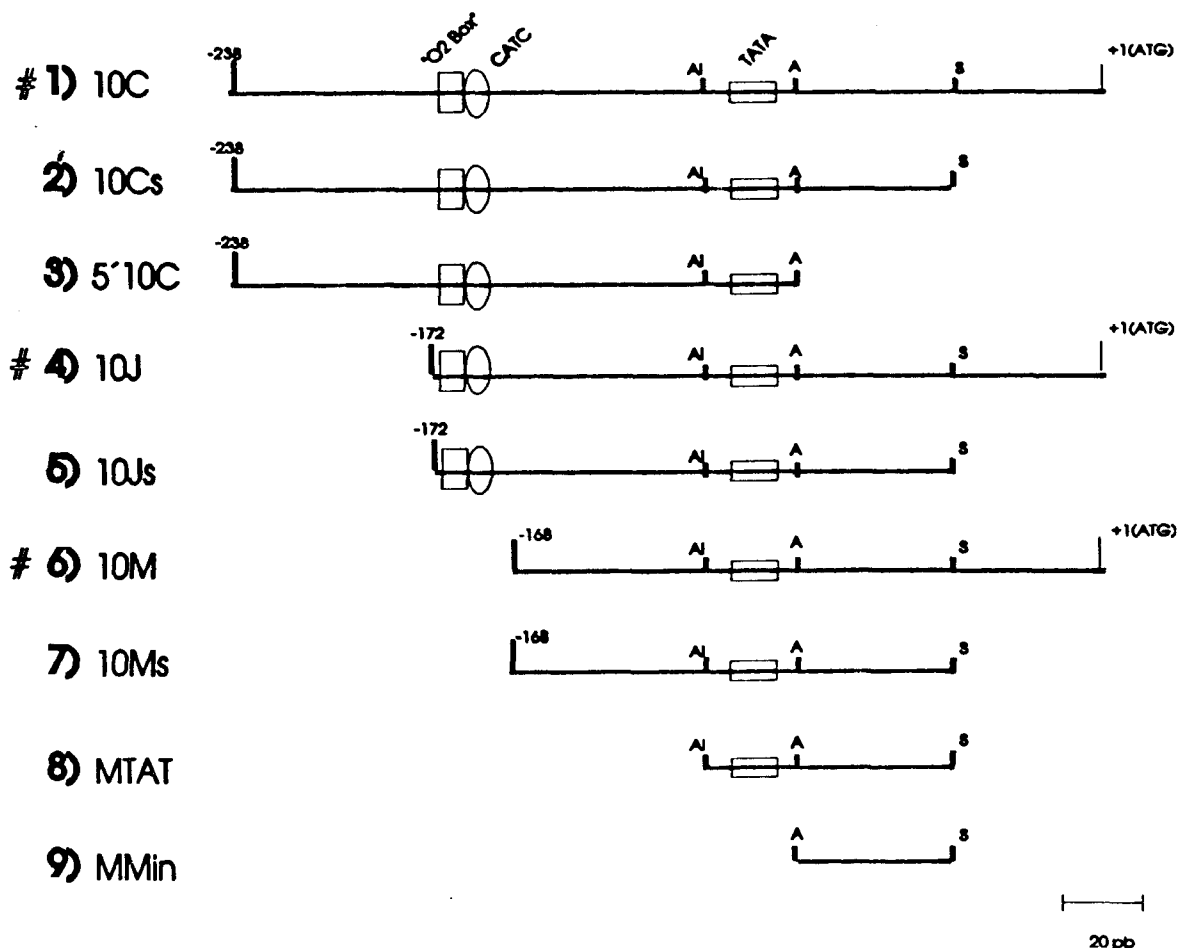


Fig. 9. Representação esquemática dos fragmentos de DNA utilizados para trabalhos de ligação DNA-proteína. Os fragmentos numerados são dispostos na Tab. IV. Somente os sítios enzimáticos relevantes à obtenção dos fragmentos são representados, sendo A, Apal; Al, Alul; S, Sau3Al. Os sítios de ligação da proteína OPACO 2 (Yunes *et al.*, 1994) são representados por retângulos verticais. As regiões CATC são representadas por elipses, e as regiões TATA, por retângulos horizontais. Os fragmentos marcados por # não foram utilizados nos experimentos de ligação DNA-proteína, e sim, como fonte para a obtenção dos demais fragmentos.

Tabela IV: Fragmentos de DNA utilizados para os trabalhos de ligação DNA-proteína

NOME	EXTREMIDADES	TAMANHO (pb)	ORIGEM	COMENTÁRIOS
10C	NcoI/HIII	238	p10C	Utilizado como fonte dos demais fragmentos
10Cs	HIII/Sau3AI	191	Fragmento 10C	Inclui o "box O2" (Yunes <i>et al.</i> , 1994) além das regiões TATA e CATC. Utilizado para EMSA
5'10C	HIII/ApaI	152	p10C	Apresenta uma deleção de 39 pb em relação ao fragmento 10Cs na sua região 3'. Utilizado para EMSA
10J	HIII/NcoI	172	p10J	Utilizado como fonte do fragmento 10Js
10Js	HIII/Sau3AI	125	Fragmento 10J	Inclui parte do "box O2", além das regiões TATA e CATC. Utilizado para EMSA
10M	HIII/NcoI	158	p10M	Utilizado como fonte do fragmento 10Ms
10Ms	HIII/Sau3AI	111	Fragmento 10M	Apresenta o "box O2" e a região CATC deletados, restando o TATA. Utilizado para EMSA
MTAT	AluI/Sau3AI	72	Fragmento 10Ms	Inclui a região TATA. Utilizado para EMSA
MMin	ApaI/Sau3AI	39	Fragmento 10Ms	Utilizado para EMSA

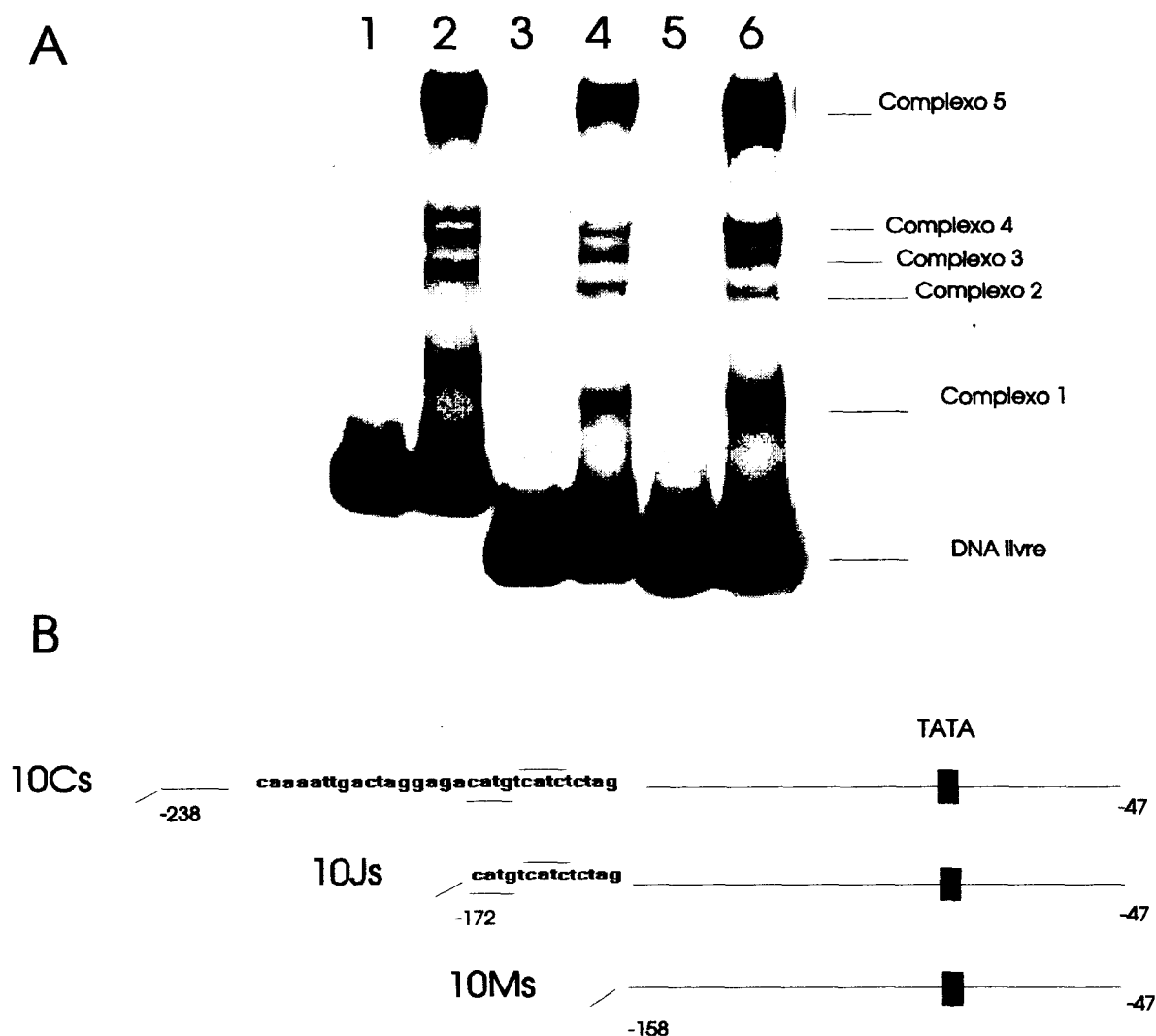


Fig. 10 EMSA utilizando extrato nuclear de endosperma de *Coix*, estágio 2, e os fragmentos 10Cs, 10Js e 10Ms. A. Linhas 1 e 2, fragmento 10Cs; linhas 3 e 4, fragmento 10Js e linhas 5 e 6, fragmento 10Ms. As linhas 1, 3 e 5 contêm as reações na ausência de extrato nuclear. As linhas 2, 4 e 6 contêm as amostras incubadas com 4 μ g de extrato nuclear. B. Diagrama ilustrando os fragmentos de DNA utilizados.

que esta região engloba o sítio de ligação da proteína O2, na posição -174 (Yunes *et al.*, 1994), e a região CAJC, a -164. Os complexos formados foram denominados complexos 1, 2, 3, 4 e 5, em ordem crescente de tamanho.

A estabilidade dos complexos DNA-proteína, foi analisada através da incubação do fragmento 10Ms com 4 µg do extrato nuclear de endosperma, estágio 1 de desenvolvimento, na presença de crescentes concentrações de competidor inespecífico poli-dIdC dupla-fita (Fig.10, linhas 2 a 6). Os complexos formados mostraram-se estáveis mesmo na presença de 1 µg do competidor, sendo que os complexos 1 e 5, permaneceram mesmo na presença de 5 µg de poli-dIdC (Fig.11, linha 6).

A especificidade da ligação das proteínas ao fragmento 10Ms foi demonstrada através de experimento de ligação competitiva. A adição de 10 e 20x excesso molar do fragmento 10Ms não marcado às reações contendo o mesmo fragmento marcado radioativamente, na presença de 4 µg de extrato nuclear de endosperma, estágio 2, reduziu significativamente a quantidade de radioatividade nos complexos DNA-proteína (Fig.12 A, linhas 2 a 4). Tal fato não se verificou quando 20x excesso molar de um fragmento de 82 pb do promotor do gene EBNA-1 do vírus Epstein-Barr (Rawlins *et al.*, 1985; Ambinder *et al.*, 1990) foi adicionado à reação (Fig.12 A, linhas 5 e 6).

Para verificar se as proteínas envolvidas na formação dos

complexos são específicas dos tecidos do endosperma, foram preparados extratos nucleares de endosperma de Coix, estágio 2, e de plântulas de Coix com 4 dias de idade. Como mostrado na Fig.12 B, os complexos formados entre o fragmento 10Ms e as proteínas, são observados apenas na presença de extrato nuclear de endosperma, não sendo detectada nenhuma interação quando o extrato nuclear de plântula foi utilizado.

Ocorrência dos complexos DNA-proteína durante o desenvolvimento do endosperma

Foram preparados extratos nucleares de endospermas de 5 diferentes estágios de desenvolvimento (estágios 1 a 5), visando determinar os períodos de ocorrência dos diversos complexos DNA-proteína, durante a formação do endosperma. Reações contendo os extratos obtidos de endospermas dos 5 diferentes estágios foram incubadas com o fragmento marcado 10Ms.

Como pode ser observado na Fig.13 (linhas 2 a 6), os 5 complexos DNA-proteína distribuem-se diferentemente no decorrer do desenvolvimento do endosperma. O complexo 1, ocorre durante os 5 estágios, apresentando-se muito enfraquecido no estágio 5; o complexo 5 ocorre também em todos os estágios, entretanto, apresenta

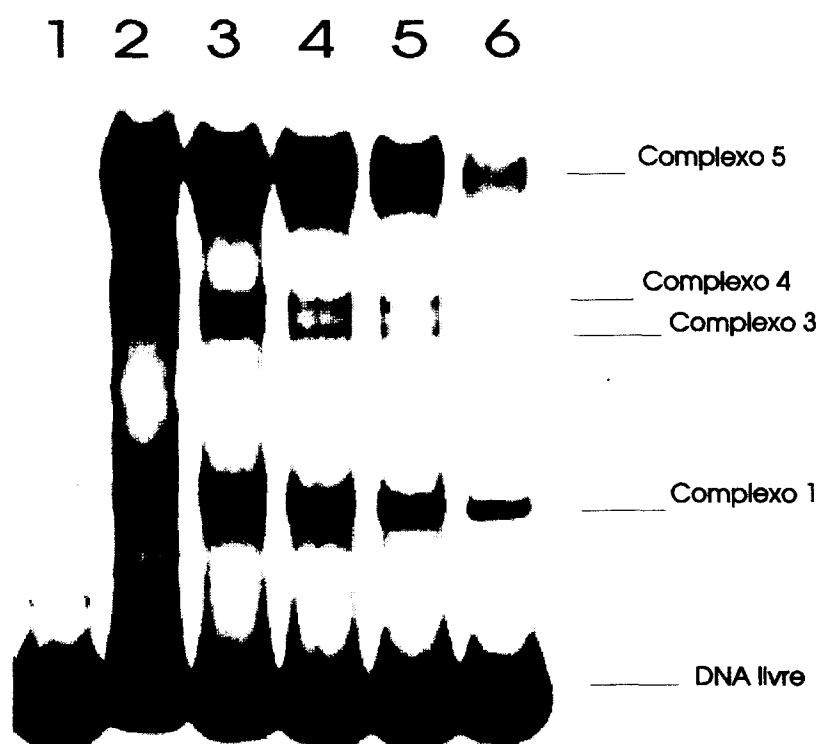


Fig. 11. EMSA utilizando extrato nuclear de endosperma, estágio 1, contra o fragmento 10Ms. A linha 1 contém a reação na ausência de extrato nuclear. As linhas 2 a 6 contêm os amostras incubadas com 4 μ g de extrato nuclear, na presença de crescentes concentrações de poli-dIdC dupla fita (100, 250, 500, 1000 e 5000 ng, respectivamente).

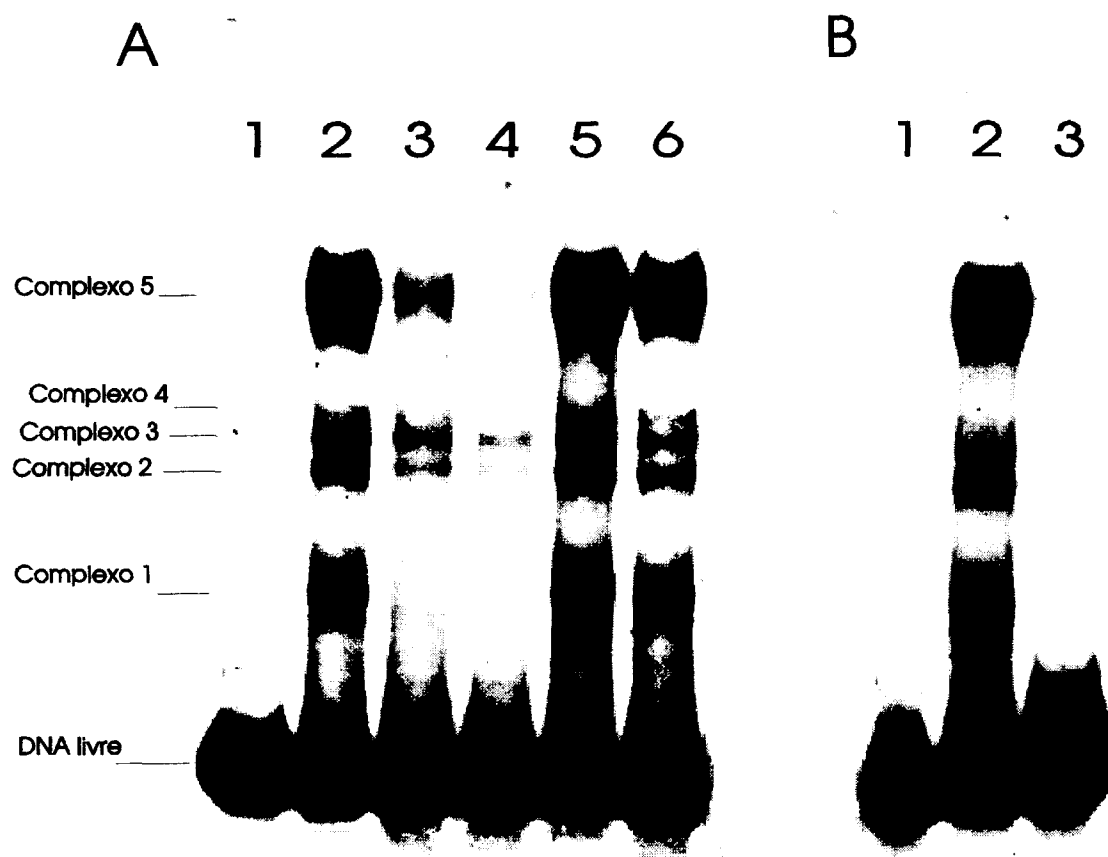


Fig. 12. EMSA competitivo utilizando extrato nuclear de endosperma, estágio 2, e o fragmento 10Ms. **A.** A linha 1 contém a reação na ausência de proteína nuclear. Nas linhas 2 a 6, as reações contêm 4 μ g de extrato nuclear. As linhas 3 e 4, contêm 10x e 20x excesso molar do fragmento não marcado, respectivamente. A linha 6, contém a reação na presença de 20x excesso molar do fragmento promotor do gene EBNA-1 do vírus Epstein-barr. **B.** Reações entre o fragmento 10Ms e extratos nucleares de endosperma, estágio 2 (linha 2); e de plântula (linha 3). A linha 1, contém a reação na ausência do extrato nuclear.

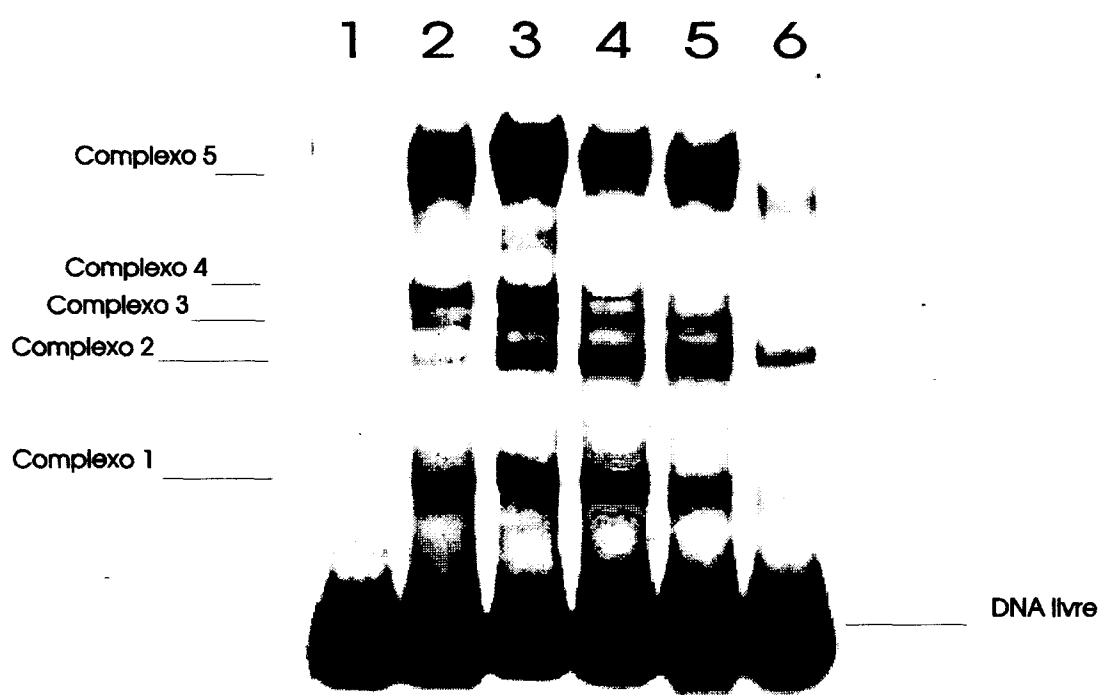


Fig. 13 EMSA entre o fragmento 10Ms e extratos nucleares de endosperma em 5 estágios de desenvolvimento. A linha 1, contém a reação na ausência de extrato nuclear. Nas linhas 2, 3, 4, 5 e 6, as reações foram incubadas na presença de 4 μ g de extratos nucleares de endosperma dos estágios 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

maior mobilidade no estágio 5, além de mostrar-se enfraquecido; o complexo 4 ocorre nos 3 primeiros estágios do desenvolvimento, estando ausente nos estágios 4 e 5. O complexo 3, apresenta maior intensidade nos estágios 2, 3 e 4, estando pouco perceptível no estágio 1 e ausente no último estágio. A partir do estágio 2, o complexo 2 pode ser observado em maior intensidade, passando a ser o único complexo formado no estágio 5, além do complexo 5.

Interação entre fatores nucleares para a formação dos complexos DNA-proteína

Os diferentes períodos de ocorrência dos diversos complexos, durante o desenvolvimento, permitiu sugerir que tais complexos poderiam ser consequência de diferentes interações entre fatores presentes nos extratos nucleares. Com o objetivo de testar tal hipótese, obteve-se um extrato nuclear cuja reação com o fragmento promotor forneça apenas os complexos 1, 4 e 5. Tal extrato foi obtido a partir de endospermas em estágio de desenvolvimento anterior ao estágio 1, denominado estágio 0. Os complexos 1, 4 e 5, formados quando este extrato nuclear foi incubado na presença do fragmento marcado 10Ms, podem ser observados na Figura 14 (linha 2). Em reação que utilizou extrato nuclear do estágio 5, somente os complexos 2 e 5 foram observados (Fig.14, linha 3). Entretanto, quando quantidades

iguais dos dois extratos foram unidas e pré-incubadas durante 5 minutos, antes de serem adicionadas à reação, observa-se a formação de 5 complexos, incluindo o complexo 3, que não ocorre quando o fragmento de DNA é incubado com cada extrato separadamente (Fig.14, linha 4).

Participação da proteína Opaco2 na formação dos complexos DNA-proteína

O envolvimento da proteína O2 na formação dos diversos complexos foi analisado através de sua inativação nos extratos, via adição de anticorpo policlonal contra o proteína opaco2 de milho.

Na Fig.15 (linhas 2 a 5), o fragmento 10Ms foi adicionado às reações, na presença de 4 µg de extrato nuclear de endosperma, estágio 2, pré-incubado com crescentes concentrações do anticorpo (diluição 1:10000, linha 2; 1:5000, linha 3 e 1:2000, linha 4). A inativação da proteína opaco2 do extrato, provocou a eliminação de todos os complexos normalmente formados, exceto o complexo 2, que permaneceu inalterado, revelando o não envolvimento da proteína opaco2 em sua formação. Um aumento na mobilidade do complexo 5 foi observada quando o anticorpo foi adicionado em baixa concentração (diluição 1:10000) (Fig. 15, linha 3). Para avaliar a especificidade do anticorpo anti-o2 na eliminação dos complexos 1,3,4 e 5, concentrações equivalentes de anticorpo policlonal

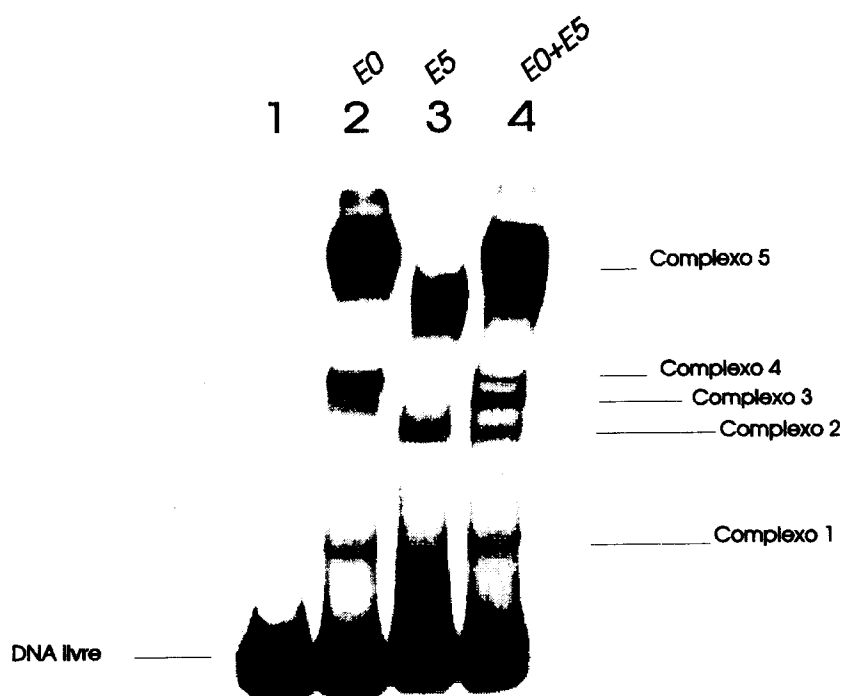


Fig. 14 Interação entre fatores nucleares para a formação dos complexos DNA-proteína com o fragmento 10Ms. A linha 1 contém a reação na ausência de extrato nuclear. Na linha 2, a reação foi incubada com 2 μ g de extrato nuclear de endosperma do estágio 0 (E0); na linha 3, foram utilizados 2 μ g de extrato nuclear do estágio 5 (E5); na linha 4, 2 μ g de cada um dos extratos acima foram misturados e incubados durante 5 minutos, antes de serem adicionados à reação.

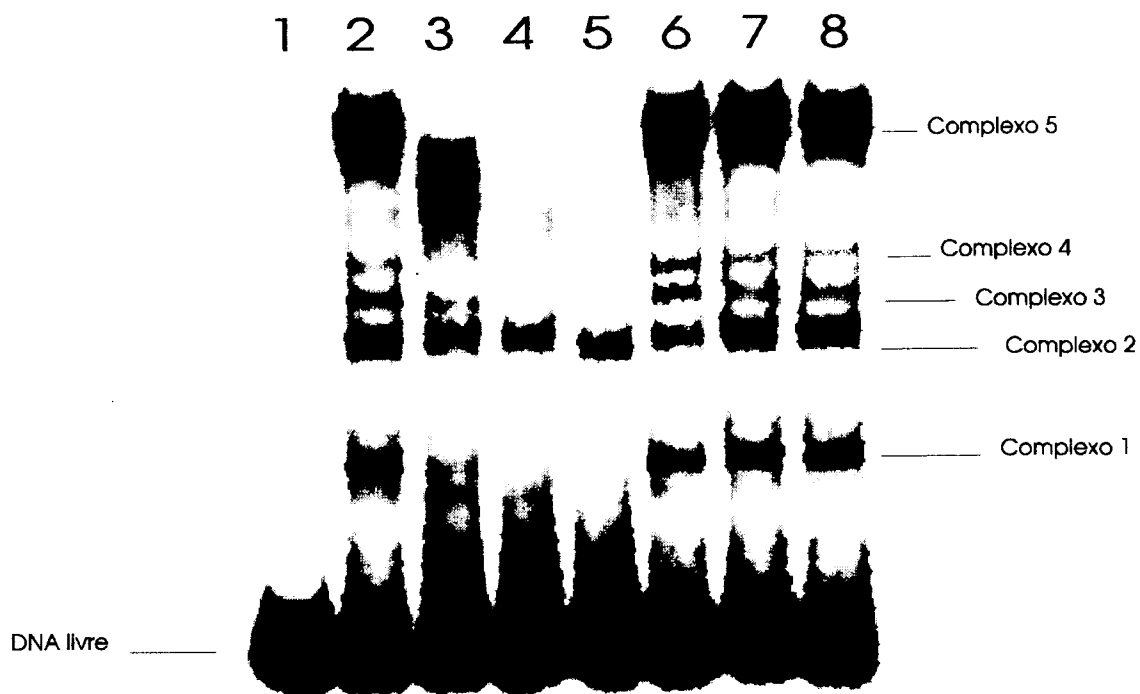


Fig. 15. Estudo da participação da proteína Opaco2 na formação do complexo DNA-proteína. A linha 1 contém o fragmento 10Ms, na ausência de extrato nuclear. Nas linhas 2 a 8, as reações foram incubadas na presença de 4 μ g de extrato nuclear de endosperma, estágio 2. Nas linhas 3, 4, e 5, o extrato foi pré-incubado na presença do anticorpo policlonal contra a proteína Opaco2 de milho, nas diluições 1:10000, 1:5000 e 1:2000, respectivamente. As linhas 6, 7 e 8 contém reações cujos extratos nucleares foram pré-incubados na presença de anticorpo policlonal contra α -coixina de 25 kDa, utilizado nas mesmas diluições acima.

contra α -coixina de 25 kDa, foram adicionadas às reações (linhas 6,7 e 8) e, neste caso, nenhum complexo foi eliminado.

Visando analisar se o complexo 4 compreende os fatores presentes nos complexos 2 e 3, o fragmento 10Ms foi adicionado às reações contendo 4 μ g de extrato nuclear de endosperma, estágio 0, pré-incubado na presença de crescentes concentrações do anticorpo policlonal contra a proteína opaco2 de milho (Fig.16, linhas 2 a 5). A inativação da proteína opaco2 pelo anticorpo, adicionado na diluição 1:10000, provocou o desaparecimento do complexo 4, dando origem aos complexos 2 e 3 (Fig.16, linhas 2 e 3), além de aumentar a mobilidade do complexo 5. Na presença do anticorpo em menor diluição (1:5000 e 1:2000), o único complexo restante foi o 2 (Fig. 16, linhas 4 e 5). Quando o fragmento 10Ms foi adicionado às reações contendo extrato nuclear do estágio 5, pré-incubado em crescentes concentrações do anticorpo, o complexo 5 desapareceu, mas o complexo 2 permaneceu inalterado (Fig 16, linhas 7 a 10).

Delimitação das regiões do promotor α -3B envolvidas na formação dos complexos DNA-proteína

Para melhor elucidar quais as regiões do fragmento 10Ms envolvidas na formação dos complexos DNA-proteína, foram obtidos os

fragmentos MTAT e MMin (Fig.7 e tab.4), que representam porções do fragmento 10Ms. Na Fig.17 A, os fragmentos 10Ms, MTAT e MMin foram incubados na presença de 4 μ g de extrato nuclear, estágio 2 (linhas 2, 4 e 6, respectivamente). Na reação que recebeu o fragmento MTAT, foi possível observar que na ausência da sequência contida entre -158 e -115 os complexos 4 e 5 não se formaram. Quando foi utilizado o fragmento MMin, apenas os complexos 1 e 2 se formaram (linhas 5 e 6).

Os resultados anteriores sugerem que a região contida entre -158 e -87 está envolvida na formação dos complexos 3, 4 e 5, mas os complexos 1 e 2 conseguem se associar aos 39 pb do fragmento MMin.

Com o objetivo de testar a importância da região compreendida pelo fragmento MMin na formação dos complexos DNA-proteína, o fragmento 10C5', que não contém esta região (Fig.7 e Tab.4), foi incubado com 4 μ g de extratos nucleares de endosperma do estágio 0 (Fig.18, linha 2), estágio 5 (Fig.18, linha 3) e estágio 2 (linhas 4 e 5). O fragmento 10Ms foi incubado com 4 μ g de extrato nuclear, estágio 2 (Fig.18, linha 6). Na linha 5 da Fig.18, o extrato nuclear do estágio 2 foi previamente incubado, durante 5 minutos, na presença de anticorpo contra a proteína opaco2 de milho (diluição 1:10000), antes de ser adicionado à reação. Os resultados permitiram concluir que na ausência da região de 39 pb correspondente ao fragmento MMin, apenas o complexo 5 é formado (Fig.18, linhas 2 a 4),

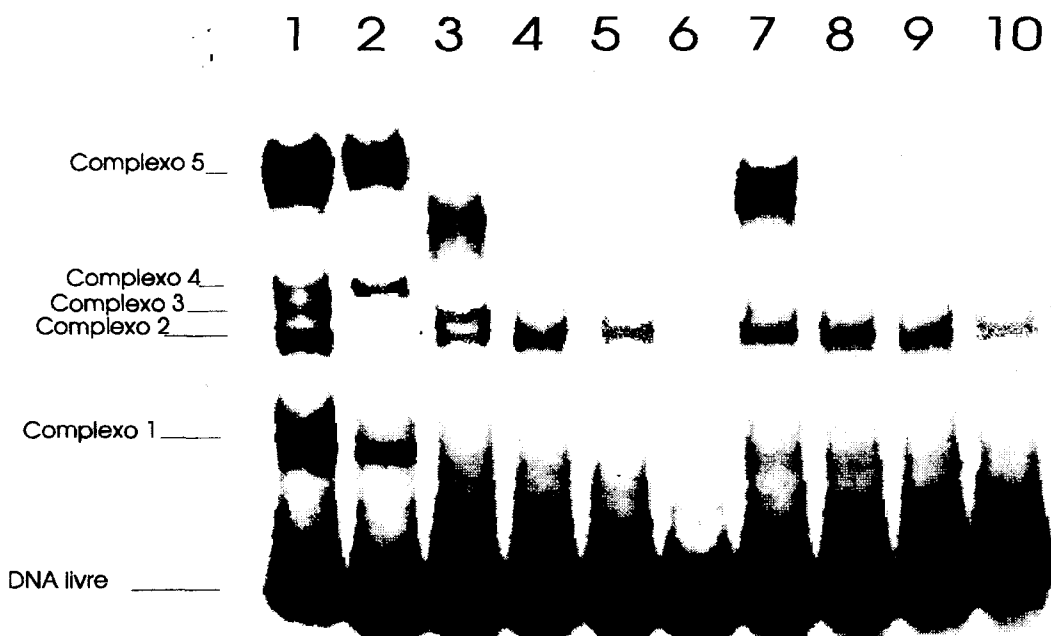


Fig. 16. Interação entre a proteína Opaco2 e outro fator nuclear para a formação dos complexos DNA-proteína. As reações utilizaram o fragmento 10Ms. A linha 1, contém a reação incubada na presença de extrato nuclear de endosperma, estágio 2. Nas linhas 2 a 5, as reações foram incubadas na presença de extrato nuclear de endosperma, estágio 0. As linhas 7 a 10, contêm reações incubadas na presença de 4 μ g de extrato nuclear de endosperma, estágio 5. Na linha 6, não foi adicionado extrato nuclear à reação. O anticorpo contra a proteína Opaco2 de milho, foi adicionado às reações, nas diluições 1:10000, linhas 3 e 8; 1:5000, linhas 4 e 9; e 1:2000, linhas 5 e 10.

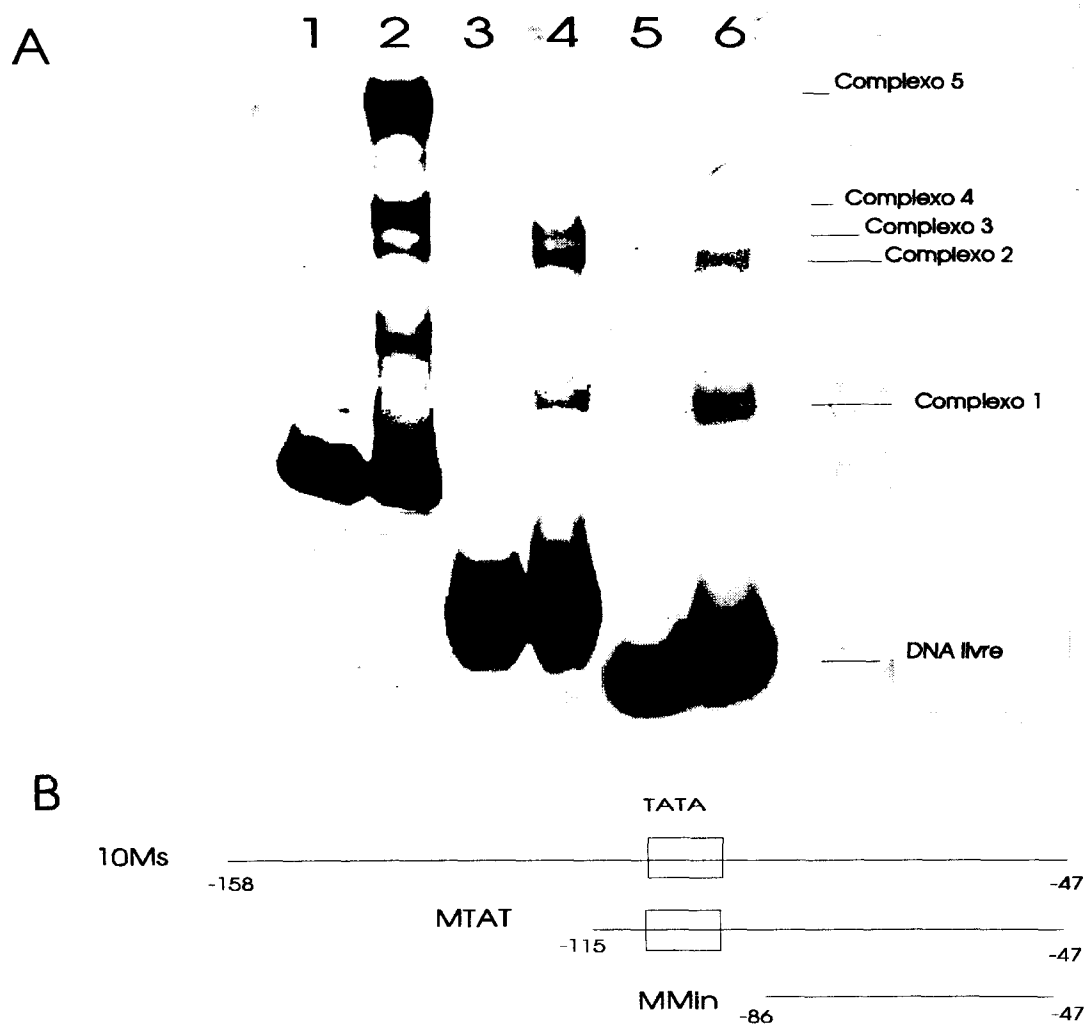


Fig. 17. Regiões do fragmento 10Ms envolvidas na formação dos complexos DNA-proteína. **A.** EMSA entre os fragmentos 10Ms (linhas 1 e 2), MTAT (linhas 3 e 4) e Mmin (linhas 5 e 6); e 4 μ g de extrato nuclear de endosperma, estágio 2 (linhas 2, 4 e 6). As linhas 1, 3 e 5, contêm as amostras na ausência de extrato nuclear. **B.** Diagrama ilustrando os fragmentos de DNA utilizados.

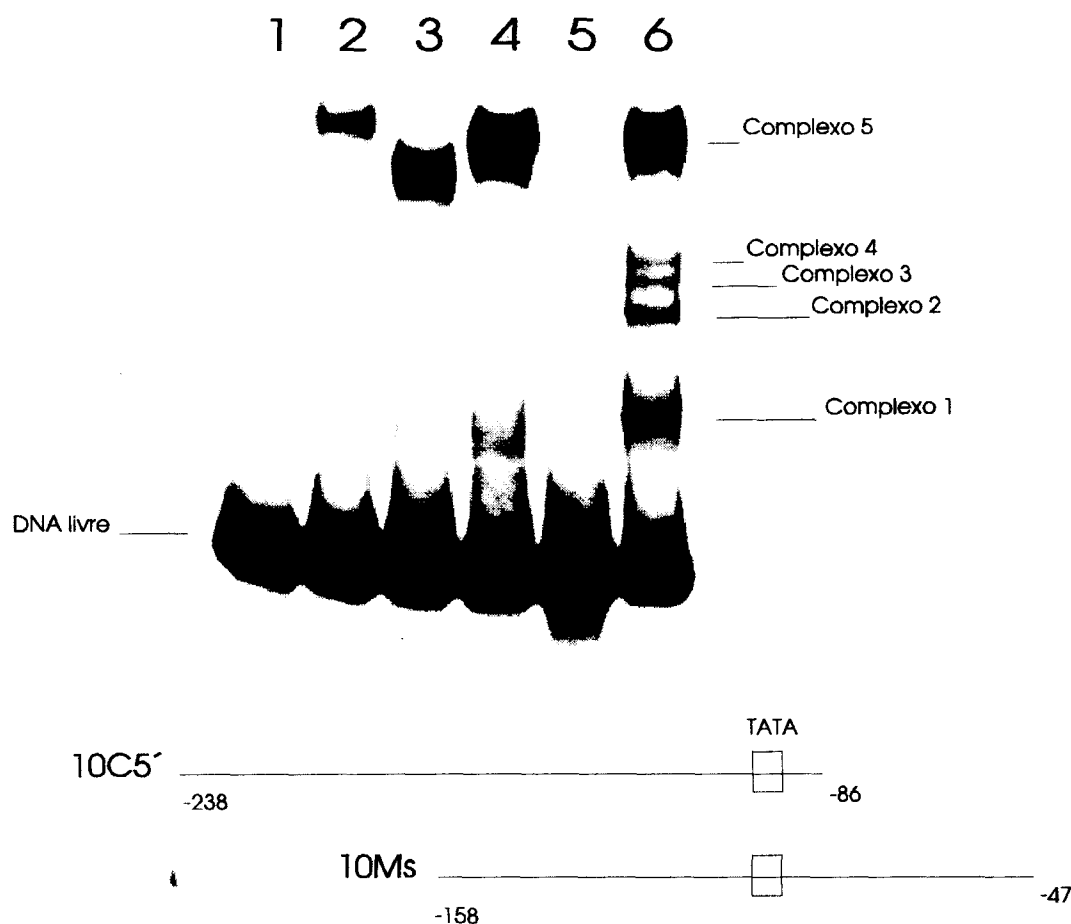


Fig. 18. Importância da região Mmin (39 pb) para a formação dos complexos DNA-proteína. **A.** EMSA utilizando o fragmento 10C5' (linhas 1 a 5) na presença de 4 μ g de extrato nuclear do estágio 0, linha 2; estágio 5, linha 3; e estágio 2, linhas 4 e 5. Na linha 5, o extrato foi pré-incubado na presença do anticorpo contra a proteína Opaco2 de milho, antes de ser adicionado à reação. A linha 6, contém a reação entre o fragmento 10Ms e 4 μ g de extrato nuclear do estágio 2. Na linha 1, a reação não contém extrato nuclear. **B.** Diagrama ilustrando os fragmentos de DNA utilizados

revelando desta forma, a essencialidade daquela região para a formação dos demais complexos. A eliminação do complexo 5 pela adição do anticorpo (Fig.18, linha 5), revela o envolvimento da proteína Opaco2 na formação do mesmo.

DISCUSSÃO

A comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do clone α -3B com as sequências publicadas dos genes de α -zeínas e de α -kafirina de 22 kDa, revelou uma estrutura de proteína altamente conservada (Fig.4). Segundo Kreis *et al.* (1985), a elevada homologia entre a estrutura primária das prolaminas é determinada pela conservação de elementos essenciais requeridos para o correto empacotamento destas proteínas.

A região 5' não codificadora do gene α -3B, apresenta as sequências CATC e TATA, característicos de eucariotos, e o "prolamin box" em localização conservada, em relação aos genes de α -zeínas (Schmidt *et al.*, 1990) e α -kafirinas (DeRose *et al.*, 1989).

Apesar da região do "prolamin box" ser altamente conservada nos promotores de genes de prolaminas de cereais, pouco se conhece sobre sua função na regulação destes genes. Os resultados fornecidos pelos experimentos de expressão transitória, demonstraram que a ausência desta região não afetou o a atividade do promotor α -3B, o que pode ser observado quando a construção p3G (-299) foi utilizada (Fig. 6). Em trabalhos de expressão transitória utilizando um promotor de hordeína-C em cevada, Müller & Knudsen (1993) demonstraram que o "prolamin box" participa da

resposta a níveis de nitrogênio, induzida pela incubação dos endospermas em meios contendo diferentes fontes e teores daquele elemento. Tal observação, sugere que a função desta região na regulação dos genes de prolaminas, pode estar associada a períodos específicos do desenvolvimento do endosperma, quando a disponibilidade de nitrogênio seja mais elevada.

Através de experimentos de transativação e "footprinting", Yunes *et al.* (1994) demonstraram que a proteína Opaco2 de milho ativa a expressão do gene α -3B, reconhecendo uma sequência compreendida entre as posições -182 e -160 que, em sua porção 3', se sobrepõe ao CATC (-164). Estes resultados são compatíveis com a queda de aproximadamente 70% na atividade do promotor, observada nos experimentos de expressão transitória, quando se utilizou a construção p10J (-172) (Fig. 6), o que coincidiu com a eliminação de parte do sítio de ligação da proteína Opaco2. O nível da expressão praticamente desapareceu quando se utilizou a construção p10M (-158) (Fig.6), onde o sítio de ligação da proteína Opaco2 fora completamente eliminado, juntamente com o CATC. Estes resultados demonstram a importância da ligação da proteína Opaco2 ao promotor, para a ativação da

expressão destes genes. Entretanto, não foi possível concluir se a drástica queda da expressão, observada quando se utilizou a construção p10M, deve-se a ausência do sítio de ligação da proteína Opaco2 ou a falta da região consenso CATC.

Em experimentos de expressão transitória que utilizaram secções de sementes de milho onde os embriões foram expostos ao bombardeamento, foi possível observar que, apesar dos diferentes níveis de expressão verificados para as diversas construções, em todas elas, a expressão se restringiu ao tecido do endosperma (Fig. 7), sugerindo que a região do promotor responsável pelo controle da tecido-especificidade da expressão do gene α -3B encontra-se entre a posição -158 e o ATG inicial.

Vários fatores presentes em extratos nucleares de endosperma são capazes de reconhecer e se associar aos promotores de genes de α - e β -zeínas conforme demonstrado por So & Larkins (1991) e Quayle & Feix (1992). No caso do promotor α -3B, a observação de 5 complexos DNA-proteína (Fig. 9) sugere a existência de um elaborado modelo de regulação para estes genes. Contrariando as expectativas, nenhum complexo foi abolido quando o sítio de ligação da proteína Opaco2 foi eliminado (Fig. 9). Uma explicação diferente podem ser formuladas para este resultado: a) A proteína Opaco2, quando presente no extrato nuclear, seria capaz de reconhecer outras

regiões para ligação ao DNA diferentes daquela verificada quando se utilizou a proteína produzida em bactéria, nos trabalhos realizados por Yunes *et al.* (1994); b) Os processos de obtenção do extrato nuclear podem ter causado alterações na proteína Opaco2, quanto a capacidade de reconhecimento do seu sítio de ligação ao DNA.

Os fatores que interagem com o promotor α -3B para a formação dos complexos DNA-proteína, possuem diferentes períodos de ocorrência durante o desenvolvimento do endosperma (Fig. 12). A distribuição temporal destes fatores pode estar relacionada com a expressão coordenada dos genes de α -prolaminas. Os estágios de desenvolvimento do endosperma de Coix em que os 5 complexos ocorrem simultaneamente (estágios 2 e 3), coincidem com o período no qual se verifica a maior taxa de transcrição dos genes de α -coixina, definido por Targon *et al.* (1992), consistindo em mais uma evidência da relação entre estes fatores e a expressão dos genes de α -coixina de 25 kDa.

A ativação da transcrição dos genes de eucariotos, se dá através da ligação de fatores que reconhecem sequências específicas de DNA e então interagem com a RNA polimerase II diretamente, ou através de "proteínas-ponte" (Lewin, 1990). Os diversos fatores de transcrição são agrupados em diferentes classes, que podem, em função dos domínios que os

caracterizam, desenvolver função de ligação ao DNA, dimerização, e/ou ativação gênica (Latchman 1990). Dentre estes grupos, as proteínas do grupo "leucine-zipper", ao qual pertence a proteína Opaco2, caracterizam-se por se ligarem ao DNA sob a forma de dímeros, que podem ocorrer entre proteínas idênticas, dando origem a homodímeros, ou entre proteínas diferentes, formando heterodímeros. Algumas proteínas são ativas somente sob a forma de homodímeros, como C/EBP e Myc, enquanto outras, somente o fazem sob a forma de heterodímeros, como Jun e Fos, e CREB e CREM (Johnson & Mcknight, 1989). Entretanto, a proteína Opaco2, que normalmente liga-se ao DNA sob a forma de homodímero, também pode formar heterodímero com a proteína OHP-1 para se associar ao DNA (Pysh *et al.*, 1993).

A ocorrência de interação entre os fatores para a formação dos complexos pode ser observada na Fig. 13, onde dá-se o surgimento do complexo 3 a partir da mistura entre os extratos nucleares dos estágios 0 e 5, que não apresentam tal complexo quando incubados separadamente na presença do promotor. Estas informações apoiam a idéia de que mais que um fator podem estar se associando para a formação dos complexos observados.

A participação da proteína Opaco2 na formação dos complexos DNA-proteína, foi demonstrada através de sua inativação, via adição de anti-corpo policlonal

contra a proteína Opaco2 de milho aos extratos nucleares.

Quando foram adicionadas concentrações crescentes do anticorpo ao extrato nuclear utilizado nas reações de ligação (Fig. 14, linhas 2 a 5), os primeiros complexos a serem eliminados foram os complexos 1 e 4. Isto evidencia a necessidade de uma maior disponibilidade de moléculas da proteína Opaco2 no extrato, para que a formação destes complexos se verifique. A eliminação dos complexos 3 e 5, quando concentrações mais elevadas do anticorpo foram adicionadas ao extrato, demonstra que a proteína Opaco2 também participa da formação dos mesmos. O fato da formação do complexo 2 não ser afetada pela inativação da proteína Opaco2, revela que outro fator, além da proteína Opaco2, é capaz de se associar a este promotor, dando origem a um complexo DNA-proteína.

A presença exclusiva do complexo 2, observada quando a proteína Opaco2 foi inativada no extrato (Fig. 14, linha 5), constitui situação similar àquela observada quando o extrato nuclear do estágio 5 foi utilizado na reação (Fig. 12, linha 6). Estas observações são compatíveis com a idéia de que a proteína Opaco2 ocorre apenas nos estágios iniciais do desenvolvimento.

Quando o fragmento 10Ms foi incubado com o extrato nuclear do estágio 0, apenas os complexos 1, 4 e 5 foram observados. Entretanto, verificou-se o surgimento dos

complexos 3 e 2, quando concentrações crescentes do anticorpo anti-O2 foram adicionadas ao extrato nuclear (Fig. 15), revelando que a inativação de moléculas de proteína Opaco2 do extrato nuclear não permite a formação do complexo 4, normalmente formado. A inativação de parte da proteína Opaco2 do extrato nuclear, promovida pela adição do anticorpo em baixa concentração (diluição 1:10000) (Fig. 15, linha 3), permitiu a formação dos complexos 2 e 3. Quando concentrações mais elevadas do anticorpo foram adicionadas ao extrato (diluição 1:5000 e 1:2000) (Fig. 15, linhas 4 e 5), apenas o complexo 2 se formou, em virtude da inativação da proteína Opaco2. Destas observações, resulta a hipótese de que os complexos 3 e 4 correspondem a incorporação de 1 ou 2 moléculas da proteína Opaco2 ao complexo 2, respectivamente.

A adição do anticorpo contra a proteína Opaco2, em baixa concentração (diluição 1:10000), ao extrato nuclear do estágio 2, promoveu um aumento na mobilidade do complexo 5 (Fig. 15, linha 3 e Fig. 16, linha 3). Esta mobilidade é similar àquela observada quando extrato nuclear do estágio 5 foi utilizado (Fig. 13, linha 6). Tais resultados, permitem sugerir que o complexo 5 apresenta moléculas da proteína O2 em sua formação. Uma menor disponibilidade desta proteína, no final do desenvolvimento do endosperma (estágio 5), resultaria na incorporação de um número

menor de moléculas da mesma, ao complexo 5, dando origem a um complexo de menor tamanho e, conseqüentemente, de maior mobilidade.

Quando os fragmentos MTAT e MMin foram utilizados nas reações de ligação, observou-se que os complexos 4 e 5 não se formam na ausência da região compreendida entre -158 e -115, e o complexo 3 depende da presença da região compreendida entre -115 e -86 para se formar (Fig. 16 A). Os fatores que constituem os complexos 1 e 2 são capazes de se ligar à região de 39 pb compreendida pelo fragmento Mmin. Entretanto, a utilização do fragmento 10C5' com extratos nucleares do estágio 0, 5 e 2, revelou que na ausência da região contida entre -86 e -47, os complexos 1, 2, 3 e 4 não se formam (Fig. 17 A). Portanto, a região compreendida pelo fragmento MMin (39 pb) é essencial para a ligação dos fatores nucleares. O complexo 5, deve-se a ligação de fatores em outra região, compreendida entre as posições -158 e -115. A eliminação da formação do complexo 5 através da adição do anticorpo anti-O2, revela que a proteína Opaco2 participa deste complexo, porém, o não surgimento de novos complexos permite inferir que o fator que participa da formação do complexo 2, não está envolvido na formação daquele complexo.

A delimitação da região do promotor responsável pela ligação dos fatores que dão origem aos 5 complexos observados, fornece evidências para concluir que, além

do sítio de ligação da proteína Opaco2, outras regiões do promotor α -3B são importantes para associação com fatores nucleares.

A inexistência de sequências que se assemelhem aos sítios descritos para a ligação da proteína Opaco2, no fragmento 10Ms, somada aos resultados fornecidos pelos trabalhos de adição de anticorpo anti-O2 aos extratos nucleares, levam a concluir que a proteína Opaco2 seja capaz de se associar a outras proteínas para formar complexos com o DNA. Nestes casos, no entanto, a proteína Opaco2 parece não estar diretamente envolvida no reconhecimento e ligação ao DNA, atividade esta, realizada por outras proteínas constituintes do complexo.

Em trabalhos realizados com o mutante o2-676, foi determinado que a proteína O2-676 apresenta a substituição de uma arginina por uma lisina no seu domínio básico. Tal alteração, elimina a habilidade desta proteína em reconhecer o seu sítio de ligação no DNA, conforme demonstrado em testes realizados "*in vitro*" (Aukerman *et al.*, 1991). Entretanto, em análises "*in vivo*", o fenótipo o2-676 corresponde a um intermediário entre o milho normal e os mutantes o2-nulo, que não produzem a proteína Opaco2, tanto com respeito aos níveis de acumulação de zeínas quanto aos níveis de mRNA de zeínas de 22 kDa (Pysh *et al.*, 1993). O fato da expressão dos genes de zeínas ser maior neste mutante que nos mutantes o2-nulo, sugere que a proteína Opaco2 é capaz de

participar da ativação gênica mesmo não sendo capaz de reconhecer sequências no DNA. Portanto, os resultados onde demosramos a associação entre a proteína Opaco2 com proteínas que se ligam ao DNA, podem constituir um modelo capaz de explicar os fatos acima comentados. Neste caso, a proteína Opaco2 apresentaria a função ativadora da transcrição desvinculada da função de reconhecimento e ligação ao DNA. Para isto, entretanto, a existência de uma proteína acessória, capaz de se ligar ao DNA, torna-se essencial. Neste modelo, o fator Opaco2 funcionaria como uma "proteína-ponte" entre a proteína acessória e a RNA polimerase.

CONCLUSÕES

1) O gene α -3B possui uma região estrutural de 758 pb, codificando a uma proteína que consiste de uma região amino-terminal, contendo um peptídeo sinal, seguido por 10 repetições de blocos de 15 a 20 aminoácidos ladeadas por poliglutaminas, e uma curta região carboxi-terminal. Tal estrutura é altamente conservada entre os genes de α -coixinas, α -zeínas e α -kafirinas.

2) A mínima região funcional do promotor α -3B está contida entre a posição -238 e o ATG, sendo suficiente para o nível máximo de expressão, verificado nos experimentos de expressão transitória. A região entre -158 e o ATG é suficiente para a manutenção da tecido-especificidade da expressão do gene α -3B.

3) Vários fatores nucleares são capazes de se associar ao promotor α -3B, dando origem a 5 diferentes complexos DNA-proteína, sugerindo um elaborado modelo de regulação para este gene.

4) Os fatores nucleares que interagem com o promotor, possuem diferentes períodos de ocorrência durante o desenvolvimento do endosperma. A distribuição temporal destes fatores pode estar relacionada ao controle da expressão

coordenada dos genes de prolaminas.

5) Um fator nuclear, diferente da proteína Opaco2, é capaz de se associar ao promotor, numa região compreendida entre -86 e -47. A proteína Opaco2 associa-se a este fator dando origem a dois outros complexos DNA-proteína.

6) Uma região de 39 pb, compreendida entre -86 e -47, é necessária para a formação de 4 complexos DNA-proteína. Tal porção do promotor α -3B não apresenta nenhuma sequência que corresponda a sítios de ligação de fatores nucleares até agora descritos.

7) A proteína Opaco2 é capaz de se associar a um outro fator nuclear e, desta forma, participar da formação de complexos com um fragmento de DNA que não contenha seu "sítio-alvo" de ligação.

SUMÁRIO

Coix lacryma jobi L. é uma gramínea pertencente à tribo Andropogoneae, que engloba também o milho, o sorgo e o trypsaum (Claynton, 1973; Jain & Benerjee, 1974; Claynton, 1983). Dentre as variedades de *Coix*, uma das mais comuns é a Adlay (Jain & Benerjee, 1974). Uma das características desta variedade é a presença de 20% de proteína na semente, o que corresponde a aproximadamente o dobro de teor de proteínas encontrado em sementes de milho (Torres & Bergamin, 1951; Ottoboni *et al.*, 1990).

Da mesma forma que nos demais membros da tribo Andropogoneae, as proteínas de reserva mais abundantes em *Coix* são representadas pelas prolaminas, chegando a atingir 50 a 70% do total de proteínas da semente (Ottoboni *et al.*, 1990; Leite *et al.*, 1990). As prolaminas de *Coix* são denominadas Coixinas e, dentre elas, predominam as α -coixinas, correspondendo a 70% das prolaminas totais do endosperma.

As α -coixinas são codificadas por uma família multigênica, composta por aproximadamente 35 genes (Ottoboni *et al.*, 1993). O isolamento de um clone contendo 3 sequências gênicas que codificam α -coixina de 25 kDa (Ottoboni *et al.*, 1993), sugere que, como no caso dos genes de α -prolaminas de milho, estes genes encontram-se agrupados formando "clusters". A

transcrição dos genes de α -coixina é altamente regulada, sendo que os RNAs mensageiros acumulam-se em altas concentrações nos estágios iniciais do desenvolvimento do endosperma (Targon *et al.*, 1992). Entretanto, os mecanismos que regulam a expressão coordenada destes genes são, até o momento, pouco conhecidos.

Em trabalhos anteriormente realizados em nosso laboratório, foi isolado um clone genômico de 15 kb que, quando digerido com a enzima EcoRI, forneceu 3 fragmentos em homologia com o gene de α -zeína de 22 kDa. Os 3 fragmentos foram clonados em pBluescript, dando origem aos clones α -3A, α -3B e α -3C. Os sequenciamento dos clones α -3A e α -3C revelou que as regiões estruturais dos genes neles contidos, apresentam um "stop codon" na posição +652, sendo caracterizados como pseudogenes.

Neste trabalho, foi obtida a sequência completa do gene contido no clone α -3B, incluindo 1084 pb da região não codificadora 5', e 119 pb da região não codificadora 3'. A comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos deste clone com sequências publicados dos genes de α -zeínas e α -kafirinas, revelou uma estrutura de proteína altamente conservada.

A região promotora do gene α -3B foi isolada e ligada à região codificadora do gene *gus*. Através de digestão unidirecional com

Exonuclease III, foram obtidas diversas extensões do promotor. As construções foram transferidas para o vetor pRT103 e utilizadas em experimentos de expressão transitória em endosperma imaturo de milho. Os resultados revelaram que a região contida entre -238 e o ATG, é suficiente para uma máxima atividade deste promotor. A ausência da sequência contida entre -238 e -172 promove uma drástica queda na expressão do gene. A região responsável pela tecido-especificidade encontra-se entre -158 e o ATG.

Trabalhos de EMSA demonstraram que 5 complexos DNA-proteína se formam entre fatores presentes no extrato nuclear de endosperma de Coix e um fragmento contido entre -158 e -47. Estes fatores nucleares distribuem-se diferentemente durante o desenvolvimento do endosperma.

Através da adição de anticorpo contra a proteína Opaco2 de milho a extratos nucleares utilizados para experimentos de EMSA, foi observado a participação desta proteína na formação de 4 complexos DNA-proteína, dentre os 5 complexos observados. A observação de um complexo insensível a adição do anticorpo, revela a existência de um novo fator nuclear, capaz de se associar com este promotor. Estes trabalhos, também permitiram verificar que a proteína Opaco2 é capaz de se associar a este novo fator para a formação de complexos com o promotor.

Em experimentos de EMSA que utilizaram fragmentos da região contida entre -158 e -47, foi observado que uma região de 39 pb, compreendida entre -86 e -47 é essencial para a formação de 4 dos complexos DNA-proteína. O quinto complexo associa-se a região contida entre -158 e -87.

A associação entre a proteína Opaco2 e um outro fator nuclear para a interação com uma região promotora, sugere um novo modelo para atuação desta proteína na regulação da expressão dos genes de α -prolaminas.

SUMMARY

Coix lacryma-jobi L, together with maize, sorghum and trypsaum belongs to the grass tribe Andropogoneae (Clayton, 1973; Jain & Benergee, 1974; Clayton, 1983). The seeds of *Coix* contain around 20% of protein, the major constituent of which is a prolamin called coixin. Based on differential solubility, coixins can be grouped into distinct classes being the α -coixins class the most abundant one corresponding to 70% of the total coixin (Ottoboni, 1990).

The α -coixins are encoded by a multigene family containing ca. 35 genes (Ottoboni, 1993). Three contiguous α -coixin genes designated α -3A, α -3B and α -3C were found in the 15 Kb α -3 genomic clone. The α -3A and α -3C genes presented in frame stop codons at position +652.

The α -coixin genes are expressed in the endosperm of the developing seed. They are regulated at the transcriptional level. The mechanisms responsible for the regulation of these genes are not well understood by the present moment.

In this work, the complete sequence of the α -3B clone including 1084 bp from the 5' flanking region of the structural gene and 119 bp from the 3' flanking region was reported. Comparison of the deduced aminoacid sequence of α -3B with published sequences of α -zein and α -kafirin reveled a highly conserved

protein structure. For a functional analysis of the α -3B promoter, 1084 bp from the 5' flanking region of the gene was fused to *gus* and a series of 5' deletions were obtained using Exonuclease III. After being transferred to pRT103 the effect of the deletions on gene expression was tested by bombardment of immature maize endosperm. The results suggested that deletion to -238 (relative to the ATG) had no effect on expression of the gene but deletion to -172 decreased expression levels. The sequence between -158 and the ATG contains the information necessary for proper tissue-specific expression of the gene.

Binding sites for proteins have been found in the 5' flanking sequences of α -3B by EMSA analysis. Five DNA-protein complexes having different electrophoretic mobility were detected in binding experiments using nuclear extracts from *Coix* endosperm and the α -3B promoter region -158 to -47. The binding observed with extracts from seeds of different ages have shown that the nuclear proteins that interacted with the α -3B promoter are present in the endosperm in different stages of development. No binding was observed between the α -3B promoter and nuclear extracts prepared from seedlings.

In order to observe if any of the five complexes contain the O2

protein, the nuclear extract was preincubated with antisera raised against the O2 protein. Afterwards, the protein extract was used in EMSA. The results indicated that the O2 protein is involved in the formation of 4 of the observed complexes. The complex 2 was not affected by the addition of the O2 antibody, suggesting the existence of a new nuclear factor capable of recognizing the α -3B promoter. Further experiments, indicated that the O2 protein is capable of making associations with this new factor forming complexes.

EMSA experiments using fragments of the promoter region from -158 to -47 demonstrated that a 39 bp region from -86 to -47 is essential for the formation of the complexes 1, 2, 3 and 4. The complex 5 makes association with fragment from -158 to -87. The association of the O2 protein with the other nuclear factor described in this work suggested a novel mechanism of interaction of the O2 protein with the α -3B promoter and in this way, a new system of regulation of the α -prolamin genes.

LITERATURA CITADA

- Ambinder, R.F., Shah, W.A., Rawlins, D.R., Hayward, G.S., Hayward, S.D.** (1990). Definition of the sequence requirements for binding of the EBNA-1 protein to its palindromic target sites in Epstein-barr virus DNA. *J. Virol.* **64**, 2369-2379.
- Argos, P., Pedersen, K., Marks, M.d., Larkins, B.A.** (1982). A structural model for maize zein proteins. *J. Biol. Chem.* **257**, 9984-9990.
- Arora, R.K.** (1977). Job's tears (*Coix lacryma-jobi*)- a minor food and fodder crop from North Eastern India. *Econ. Bot.* **31**, 358-366.
- Aukerman, M.J., Schmidt, R.J., Burr, B., Burr, F.A.** (1991). An arginine to lysine substitution in the bZip domain of an *opaque-2* mutant in maize abolishes specific DNA binding. *Genes Dev.* **5**, 310-320.
- Bass, H.W., Webster, C., Obian, G.R., Roberts, J.K.M., Boston, R.S.** (1992). A maize ribosome-inactivating protein controlled by the transcriptional activator *opaque-2*. *Plant cell* **4**, 225-234.
- Brown, J.W.S., Wandelt, C., Feix, G., Neuhaus, G., Schweiger, H.G.** (1986). The upstream regions of zein genes - Sequence analysis and expression in the unicellular alga *Acetabularia*. *Eur. J. Cell. Biol.* **42**, 161-170.
- Burr, B. & Burr, F.A.** (1976). Zein synthesis in maize endosperm by polyribosomes attached to protein bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 1767-1769.
- Burr, B. & Burr, F.A.** (1978). In Vitro uptake and processing of prezein and other maize preproteins by maize membranes. *J. Cell. Biol.* **90**, 427-434.
- Burr, B. & Burr, F.A.** (1982). Three mutations in *Zea mays* affecting zein accumulation: A comparison of zein polypeptides, *in vitro* synthesis and processing, mRNA levels and genomic organization. *J. Cell. Biol.* **94**, 201-206.
- Cabot, E.** (1988). The Eyeball Sequence Editor. (programa obtido a partir do banco de dados de sequências EMBL). Email: NETSERV@EMBL-Heldelberg. DE.
- Chen, Z.L., Pan, N.S., Beachy, R.N.** (1988). A DNA sequence element that confers seed-specific enhancement of a constitutive promoter. *EMBO J* **7**, 297-302.

- Clayton, W.D. (1973). The awnless species of Andropogoneae. Kew Bull. 28, 49-58.
- Clayton, W.D. (1983). Notes on tribe Andropogoneae (Gramineae). Kew Bull. 35, 813-818.
- Colot, V., Robert, L.S., Kavanagh, T.A., Bevan, M.V., Thompson, R.D. (1987). Localization of the sequences in wheat endosperm protein genes which confer tissue-specific expression in tobacco. EMBO J. 6, 3559-3564.
- Cord Neto, G., Yunes, J. A., da Silva, M.J., Vettore, A.L., Arruda, P., Leite, A. (1994). The involvement of Opaque2 on β -prolamin gene regulation in maize and *Coix* suggests a more general role for this transcriptional activator. Plant Mol. Biol. (Submitted).
- Danner, D.B. (1982). Recovery of DNA fragments from gels by transfer to DEAE-paper in electrophoresis chamber. Anal. Biochem. 125, 139-142.
- de Pater, S., Katagiri, F., Kijne, J., 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. The Plant Journal 6, 133-140.
- De Rose, R.T., Ma, D.P., Kwon, I.S., Hasnain, S.E., Klassy, R.C., Hall, T.C. (1989). Characterization of the kafirin gene family from sorghum reveals extensive homology with zein from maize. Plant. Mol. Biol. 12, 245-256.
- Di Fonzo, N., Mandocchi, L., Salamini, F., Soave, C. (1986). Purification and properties of endospermic protein of maize associated with the *opaque-2* and *opaque-6* genes. Planta 167, 587-594.
- Dretzen, G., Bellard, M., Sassone-Corsi, P., Chambon, P. (1981). A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. Anal. Biochem. 112, 295-298.
- 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 Phys. 80, 623-627.
- Feix, G. & Quayle, T. (1993). Structure and expression of zein genes of maize. Crit. Rev. Plant Sci. 12, 111-127.

- Freitas, F.A.** (1993). Clonagem e caracterização dos genes que codificam as γ -prolaminas de Coix *sorgo*. Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas.
- Freitas, F.A., Yunes, J.A., Silva, M.J., Arruda, P., Leite, A.** (1994). Structural characterization and promoter activity of the γ -kafirin gene from sorghum. *Mol. Gen. Genet.* **244**: *in press*.
- Gallie, D.L., Sleat, D.E., Watts, J.N., Turner, P.C., Wilson, T.M.A.** (1987). A comparison of eukaryotic viral 5'-leader sequences as enhancers of mRNA expression *in vivo*. *Nucl. Acids Res.* **15**, 8693-8711.
- Garrat, R., Olliva, G., Caracelli, I., Leite, A., Arruda, P.** (1993). Studies of the zein-like α -prolamins based on an analysis of amino acid sequences: Implications for their evolution and three-dimensional structure. *Prot. Stru. Func. Genet.* **15**, 88-99.
- Gianazza, E., Righetti, P.G., Pioli, F., Galante, E., Soave, C.** (1976). Size and charge heterogeneity of zein in normal and *opaque 2* maize endosperm. *Maydica* **21**, 1-17.
- Gilmartin, P.M., Sarokin, L., Memelink, J., Chua, N.H.** (1990). Molecular light switches for plant genes. *Plant Cell* **2**, 369-378.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557.
- Hartings, H., Maddaloni, M., Lazzaroni, N., Di Fonzo, N., Motto, M., Salamini, F., Thompson, R.D.** (1989). The O2 gene which regulates zein deposition in maize endosperm encodes a protein with structural homologies to transcriptional activators. *EMBO J.* **8**, 2795-2801.
- Heidecker, G. & Messing, J.** (1986). Structural Analysis of Plant Genes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **37**, 439-466.
- Henikoff, S.** (1987). Unidirectional digestion with exonuclease III in DNA sequence analysis. *Method. Enzymol.* **155**, 156-165.
- Higgins, T.J.V** (1984). Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **35**, 191-221.
- Hull, G.A., Halford, N.G., Kreis, M., Shewry, P.R.** (1991). Isolation and characterization of genes encoding rye prolamins containing a highly repetitive sequence motif. *Plant Mol. Biol.* **17**, 1111-1115.
- Jain, S.K., & Benerjee, D.K.** (1974). Preliminary observations on the ethnobotany of the genus Coix. *Econ. Bot.* **28**, 38-42.

- Jefferson, R.A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The *gus* gene fusion system. *Plant Mol. Biol.* **5**, 387-405.
- Johnson, P.F., & McKnight, S.L. (1989). Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **58**, 799-839.
- Kirihara, J.A., Husperger, J.P., Mahoney, J.W. (1988). Differential expression of a gene for a methionine-rich storage protein in maize. *Mol. Gen. Genet.*, **211**, 477-484.
- Kodrzycki, R., Boston, R.S., Larkins, B.A. (1989). The *opaque-2* mutation of maize differentially reduces zein gene transcription. *Plant Cell* **1**, 105-114.
- Kreis, M., Shewry, P.R., Forde, B.G., Forde, J., Mifflin, B.J. (1985). Structure and evolution of seed storage proteins and their genes with particular reference to those of wheat, barley and rye. *Oxford Surv. Plant Mol. Biol. Cell* **2**, 253-317.
- Kreis, M., Williamson, M.S., Forde, J., Schmutz, D., Clark, J., Buxton, B., Pywell, J., Marris, C., Henderson, J., Harris, N., Shewry, P.R., Forde, B.G.; Mifflin, B.J. (1986). Differential gene expression in the developing barley endosperm. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **314**, 355-356.
- Kuhlemeier, C. (1992). Transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression in plants. *Plant Mol. Biol.* **19**, 1-14.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., Adashi, E.Y., Graves, B.J., McKnight, S.L. (1988a). Isolation of a recombinant copy of a gene encoding C/EBP. *Genes Dev.* **2**, 786-800.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., McKnight, S.L. (1988b). The leucine-Zipper: A hypothetical structure common a new class of DNA binding protein. *Science*, **290**, 1759-1764.
- Langridge, P., Pintor-toro, J.A., Feix, G. (1982). Zeins precursor mRNAs from Maize endosperm. *Mol. Gen. Genet.* **187**, 432-438.
- Larkins B.A. & Hurkman, W.J. (1978). Synthesis and deposition of zeins in protein bodies of maize endosperm. *Plant Physiol.* **62**, 256-263.
- Larkins B.A., Pedersen K., Marks, M.D., Wilson, D.R. (1984). The zein proteins of maize endosperm. *Trends Biochem. Sci.* **9**, 306-308.
- Latchman, D. (1990). Eukaryotic transcription factors. *Biochem. J.* **270**, 281-289.
- La Thangue, N.B. & Rigby, P.W.J. (1988). In *Transcription and Splicing* (Hames, B.D. & Glover, D.M., eds.), pp. 3-42, IRL Press, Oxford.

- Leite, A., Ottoboni, L.M.M., Targon, M.L.P.N., Silva, M.J., Turcinelli, S.R., 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.
- Leite, A., Freitas, F.A., Yunes, A., Arruda, P.** (1991). Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding γ -coixin from *Coix lacryma-jobi* seeds. *Plant physiol.* **97**, 1604-1605.
- Leite, A., Yunes, A., Turcinelli, S.R., Arruda, P.** (1992). Cloning and characterization of a cDNA encoding a sulfur-rich coixin. *Plant Mol. Biol.* **18**, 171-174.
- Lending, C.R. & Larkins, B.A.** (1989). Changes in the zein composition of protein bodies during the maize endosperm development. *Plant Cell* **1**, 1011-1023.
- Lewin, B.** (1990). Commitment and Activation at Pol II Promoters: A tail of protein-protein interactions. *Cell* **61**, 1161-1164.
- Liu, C.-N. & Rubenstein, I.** (1992). Molecular characterization of two types of 22 kilodalton α -zein genes in a gene cluster of maize. *Mol. Gen. Genet.* **234**, 244-253.
- Lohmer, S., Maddaloni, M., Motto, M., Di Fonzo, N., Hartings, H., Salamini, F., Thopson, R.D.** (1991). The maize regulatory locus *opaque-2* encodes a DNA-binding protein which activates the transcription of the *b-32* gene. *EMBO J.* **10**, 617-624.
- Ludevid, M.D., Torrent, M., Martinez-Izquierdo, J.A., Puigdomenech, P., Palau, J.** (1984). Subcellular localization of glutelin-2 in maize (*Zea mays* L.). *Plant Mol. Biol.* **3**, 277-234.
- Maier, U.G., Brown, J.W.S., Toloczkyk, C., Feix, G.** (1987). Binding of nuclear factor to a consensus sequence in the 5' flanking region of zein genes from maize. *EMBO J.* **6**, 17-22.
- Marks, M.D., Lindell, J.S., Larkins, B.A.** (1985). Quantitative analysis of the accumulation of zein mRNA during maize endosperm development. *J. Biol. Chem.* **260**, 16451-16459.
- Marris, C., Gallois, P., Copley, J., Kreis, M.** (1988). The 5' flanking region of a barley B hordein gene controls tissue and developmental specific CAT expression in tobacco plants. *Plant. Mol. Biol.* **10**, 359-366.

- Neuberg, M., Schuermmam, M., Hunter, J.B., Müller, R. (1989). Two functionally different regions in Fos are required for sequence-specific DNA interaction of the Fos/Jun protein complex. *Nature* **338**, 589-590.
- O'Neil, K.T., Hoess, R.H., Degrado, W.F. (1990). Design of DNA-binding peptides on Leucine Zipper motif. *Science* **249**, 774-778.
- Ottoboni, L.M.M., Leite, A., Targon, M.L.P.N., Crozier, A., Arruda, P. (1990). Characterization of the storage protein in seeds of *Coix lacryma-jobi* var. Adlay. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 631-635.
- Ottoboni, L.M.M., Leite, A., Yunes, J.A., Targon, M.L.P.N., Souza Filho, G.A., Arruda, P. (1993). Sequence analysis of 22 kDa-like α -coixin genes and their comparison with homologous zein and kafirin genes reveals highly conserved protein structure and regulatory elements. *Plant Mol. Biol.* **21**, 765-778.
- Pabo, C.O. & Sauer, R.T. (1992). Transcriptional Factors: Structural families and principles of DNA recognition. *Ann. Rev. Biochem.* **61**, 1053-1095.
- Pedersen, K., Bloom, K.S., Anderson, J.N., Glover, D.V., Larkins, B.A. (1980). Analysis of the complexity and frequency of zein genes in the maize genome. *Biochemistry* **19**, 1644-1650.
- Pedersen, K., Argos, P., Naravana, S.L.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.* **14**, 6279-6284.
- Pirovano, L., Lanzini, S., Hartings, H., Lazzarini, N., Rossi, V., Joshi, R., Thopson, 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.
- Pysh, L.D., Aukerman, M.J., Schmidt, R.J. (1993). OHP1: A maize basic domain/leucine zipper protein that interacts with Opaque2. *Plant Cell* **5**, 227-236.
- Quayle, T. & Feix, G. (1992). Functional analysis of the -300 region of maize zein genes. *Mol. Gen. Genet.* **231**, 369-374.
- Rawlins, D.R., Milman, G., Hayward, S.D., Hayward, G.S. (1985). Sequence-specific DNA binding of the Epstein-barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell* **42**, 859-868.
- Righetti, P.G., Gianazza, E., Viotti, A., Soave, C. (1977). Heterogeneity of storage proteins in maize. *Planta* **136**, 115-123.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. **74**, 5463-5467.
- Schernthaner, J.P., Matze, M.A., Matze, A.J.M. (1988). Endosperm-specific activity of a zein promoter in transgenic tobacco plants. EMBO J. **7**, 1249-1255.
- Schindler, U., Beckmann, N., Kadesch, T., Cashmore, A.R. (1992). DNA binding site preferences and transcriptional activation properties of the *Arabidopsis* transcriptional factor GBF1. EMBO J. **11**, 1275-1289.
- Schmidt, R.J. (1993). Opaque-2 and zein gene expression. In Control of gene expression, Desh Pal. S. Verma, ed. (Boca Raton: CRC Press), pp. 337-355.
- Schmidt, R.J., Burr, F.A., Burr, B. (1987). Transposon tagging and molecular analysis of the maize regulatory locus *opaque-2*. Science **238**, 960-963.
- 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., Ketudat, M., Aukerman, M.J., Hoschek, G. (1992). Opaque-2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes. Plant Cell **4**, 689-700.
- Shaafhawsen, R.V. (1952). Adlay or Job's tears - a cereal of potentially greater economic importance. Econ. Bot. **6**, 216-227.
- Shewry, P.R. & Tatham, A.S. (1990). The prolamin storage of cereal seeds: Structure and evolution. Biochem. J. **267**, 1-12.
- Shirsat, A., Wilford, N., Croy, R., Boulter, D. (1989). Sequence responsible for the tissue specific promoter activity of pea legumin gene in tobacco. Mol. Gen. Genet. **215**, 326-331.
- Short, J.M., Fernandes, J.M., Sorge, J.A., Huse, W.D. (1988). ZAP: A bacteriophage 1 expression vector with *in vivo* excision properties. Nucl. Acids Res. **16**, 7583.
- So, J-S. & Larkins, B.A. (1991). Binding of an endosperm-specific nuclear protein to a maize beta-zein gene correlates with zein transcriptional activity. Plant Mol. Biol. **17**, 309-319.
- Soave, C., Righetti, P.G., Lorenzoni, C., Gentinetta, E., Salamini, F. (1976). Expressivity of *opaque-2* gene at the level of zein molecular components. Maydica **21**, 61-75.

- Spena, A., Viotti, A., Pirrotta, V. (1983). Two adjacent genomic zein sequence: Structure, organization, and tissue-specific restriction pattern. *J. Mol. Biol.* **169**, 799-811.
- Steel, R.G.D. & Torrie, J.H. (1980). Principles and procedures of statistics, a biometrical approach (2nd ed), McGraw-Hill, New York, 1980, pp. 186-187.
- Summer-Smith, M.; Rafalski, J.A., Sugyama, T., Stoll, M., Soll, D. (1985). Conservation and variability of wheat a/b- gliadin genes. *Nucl. Acids Res.* **13** 3905-3916.
- Targon, M.L.N., Ottoboni, L.M.M., Leite, A., Ludevid, D., Puigomenèch, P., Arruda, P. (1992). Synthesis and deposition of coixin in seeds of *Coix lacryma-jobi*. *Plant Sci.* **83**, 169-180.
- Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J., Steinbiss, H.H. (1987). A set of plant expression vectors for transcriptional fusions. *Nucl. Acids. Res.* **15**, 5890.
- 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.
- Turner, R. & Tjain, R. (1989). Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional cFos-cJun heterodimers. *Science* **243**, 1689-1694.
- van der Krol, A.R., & Chua, N.H. (1991). The basic domain of plant B-ZIP proteins facilitates import of a reporter protein into plant nuclei. *Plant Cell* **3**, 667-675.
- Venkateswarlu, J., & Chaganti, R.S.K. (1973). Jobs Tears (*Coix lacryma-jobi* L.). ICAR Tech. Bull. (Agric.) **43.44**, 1-54.
- Vettore, A.L. (1994). Clonagem e caracterização do fator de transativação Opaco2 de *Coix lacryma-jobi* L. Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para obtenção do grau de Mestre em Ciências.
- Vincentz M., Leite, A., Barros, L., Weinberg, D., de Almeida, E.R., Pães de Carvalho, M., Aragão, F., Gander, E. (1994). ACGT and Vicilin core sequences in an essential seed specific promoter region from a Brazil nut 2S albumin gene are recognized by the Opaque-2 regulatory protein. (Submetido).
- Vinson, C.R., Singler, P.B., McKnight, S.L. (1989). Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science*, **246**, 911-916.
- Viotti, A., Sala, E., Marotta, R., Alberti, P., Paducci, C., Soave, C. (1979) Genes and mRNA coding for zein polypeptides in *Zea mays*. *Eur. J. Biochem.* **102**, 211-222.

Willians, M.E., Foster, R., Chua, N.H. (1992). Sequences flanking the hexameric G-box core CACGTG affect especificity of protein binding. *Plant Cell* **4**, 485-496.

Wilson, C.M. (1983). Seed protein fractions of maize, sorghum and related cereals. In: Gottschal KW, Muller HP (eds) *Seeds Proteins: Biochemical, Genetics, Nutritive Value*, pp. 271-307. Martinus Nijhoff/Junk, The Hague, Netherlands.

Ye, G-N., Daniell, H., Sanford, J.C: (1990). Optimization of the delivery of foreign DNA into higher plant chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* **15**, 809-819.

Yunes, A., Cord Neto, G., Silva, M.J., Leite, A., Ottoboni, L.M.M., Arruda, P. (1994). The transcriptional activator Opaque 2 recognize two different target sequences in the 22 kDa-prolamin genes. *Plant Cell.* **6**, 237-249.

APÊNDICE I

Acetato de Amônio 2 M

Acetato de amônio	30,8 g
H ₂ O q.s.p.	200 ml

-Ajustar pH para 4,5 ou 5,0 com ácido acético.

Acetato de Potássio 3M

Acetato de Potássio	58,9 g
H ₂ O q.s.p.	200 ml

-Ajustar pH para 4,8 com ácido acético.

Acetato de Sódio 3M

Acetato de Sódio	49,2 g
(anidro)	
H ₂ O q.s.p.	200 ml

-Ajustar pH para 5,2 ou 7,0 com ácido acético.

Brometo de Etídio 10 mg/ml

Brometo de Etídio	0,2 g
H ₂ O q.s.p.	20 ml

EDTA 0,5 M

EDTA (dissódico, 2·H ₂ O)	37,2 g
H ₂ O q.s.p.	200 ml

-Ajustar o pH para 8,0 com NaOH

Mistura de Ligase

Tampão de ligase 5x	200 µl
T4 DNA ligase	5 U
H ₂ O	800 µl

Mistura de Nucleotídeos (0,4 mM)

dATP 100 mM pH 7,5	4 µl
dTTP 100 mM pH 7,5	4 µl
dGTP 100 mM pH 7,5	4 µl
dCTP 100 mM pH 7,5	4 µl
H ₂ O q.s.p.	1 ml

Mistura de S1 nuclease

Tampão da S1 (10x)	27 µl
S1 Nuclease (1 U/µl)	60 µl
H ₂ O	183 µl

PMSF 100 mM

Fluoreto de Fenilmetilsulfonil	17 mg
Etanol gelado	1 ml

Poliacrilamida 40%

Acrilamida	38 g
N,N'-metileno diacrilamida	2 g
H ₂ O q.s.p.	100 ml

-Filtrar e estocar a 4°C.

SDS 10% (m/v)

Dodecil Sulfato de Sódio	20 g
H ₂ O q.s.p.	200 ml

Tampão de ligase 5x

Tris-HCl 0,25 mM pH 7,6; MgCl₂ 50 mM; ATP 5 mM; DTT 5 mM, Polietileno Glicol 8000 (PEG-8000) 25% (m/v).

Tris-HCl 1M pH 7,6	250 µl
MgCl ₂ 1M	50 µl
ATP 100 mM	50 µl
DTT 1M	5 µl
PEG 50%	500 µl
H ₂ O q.s.p.	1 ml

TEA 50x

Tris-base 2 M, EDTA 50 mM

Tris-base	242,2 g
EDTA dissódico	18,6 g
Ácido Acético glacial	51 ml
H ₂ O q.s.p.	600 ml

-Após a dissolução, corrigir pH para 7,4 com NaOH e completar o volume para 1000 ml.

TBE 5x

Tris-base 1 M, Ácido bórico 0,5 M e EDTA 10 mM

Ácido Bórico	30,9 g
Tris-base	21,1 g
EDTA dissódico	3,73 g
H ₂ O q.s.p.	600 ml

-Após a dissolução, completar o volume para 1000 ml.

TE

-Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM

Tris-HCl 1M pH 7,5	100 µl
EDTA 0,5 M pH 8,0	20 µl
H ₂ O q.s.p.	1,0 l

Tris-HCl 1 M

Tris-base	121,1 g
H ₂ O	800 ml

-Ajustar o pH com HCl concentrado

pH	HCl
7,4	~70 ml
7,8	~50 ml
8,0	~45 ml
9,0	~20 ml
H ₂ O q.s.p.	1000 ml

Meio de cultura

LB (Meio Luria-Bertani)

Bacto-Tryptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O q.s.p.	1000 ml

- Ajustar o pH para 7,0 com NaOH 2 M e esterilizar por autoclavagem por 20 minutos.

APÊNDICE II

pBluescript KS +/-

O vetor pBluescript KS+/- é um "Phagemid" que contém a região intergênica do fago filamentososo do tipo f1, podendo ser secretado como um DNA fita simples na presença de um fago "helper" do tipo f1 (Stratagene Cloning System). Esta região intergênica codifica para funções *cis* requeridas para o empacotamento e replicação do fago. Existem "phagemids" pBluescript contendo uma das duas possíveis orientações da região intergênica, sendo denominados pBluescript KS+ (pBKS+) e pBluescript KS- (pBKS-). O pBKS+ replica-se de forma que a fita codificadora do gene da β -galactosidase seja secretado na partícula do fago, enquanto o pBKS- secreta a fita não codificadora deste gene.

O vetor pBKS+/- possui 2961 pb e é derivado dos plasmídeos da série pUC. Portanto, este vetor também possui α -complementação, além de permitir a utilização dos mesmos "primers" utilizados para sequenciamento de insertos clonados em pUC.

A denominação KS refere-se à orientação da região de policlonagem, com relação aos sítios das enzimas de restrição presentes nas extremidades da região (KpnI $\rightarrow$ SacI). Este tipo de plasmídeo é denominado "phagemid" em virtude

de apresentar origem de replicação de fago simples fita e também uma origem de replicação plasmidial (derivado de ColE1), que é utilizada na ausência do bacteriófago "helper". Da mesma forma que os plasmídios da série pUC, este plasmídeo contém o gene que confere resistência à ampicilina (Fig. 19).

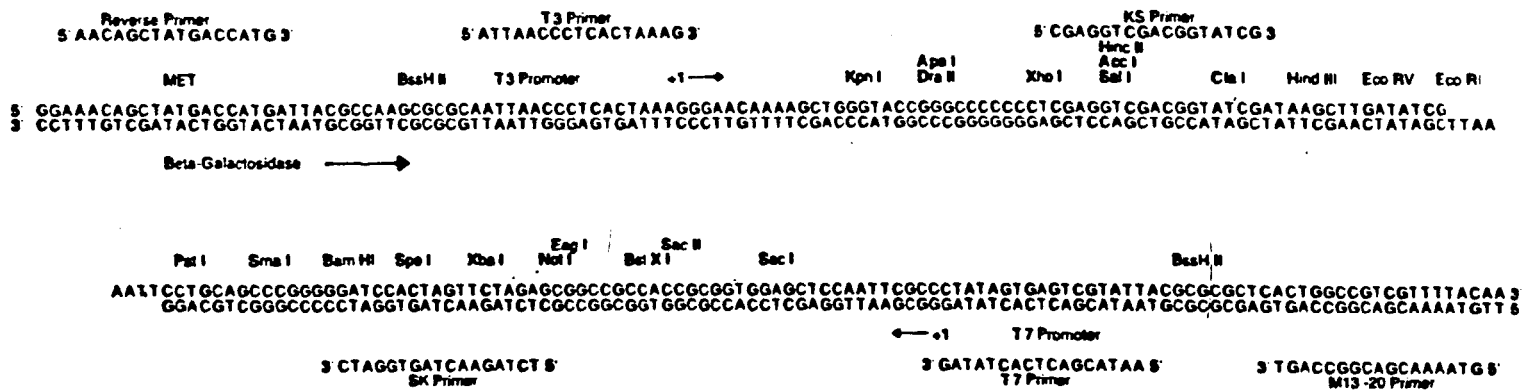
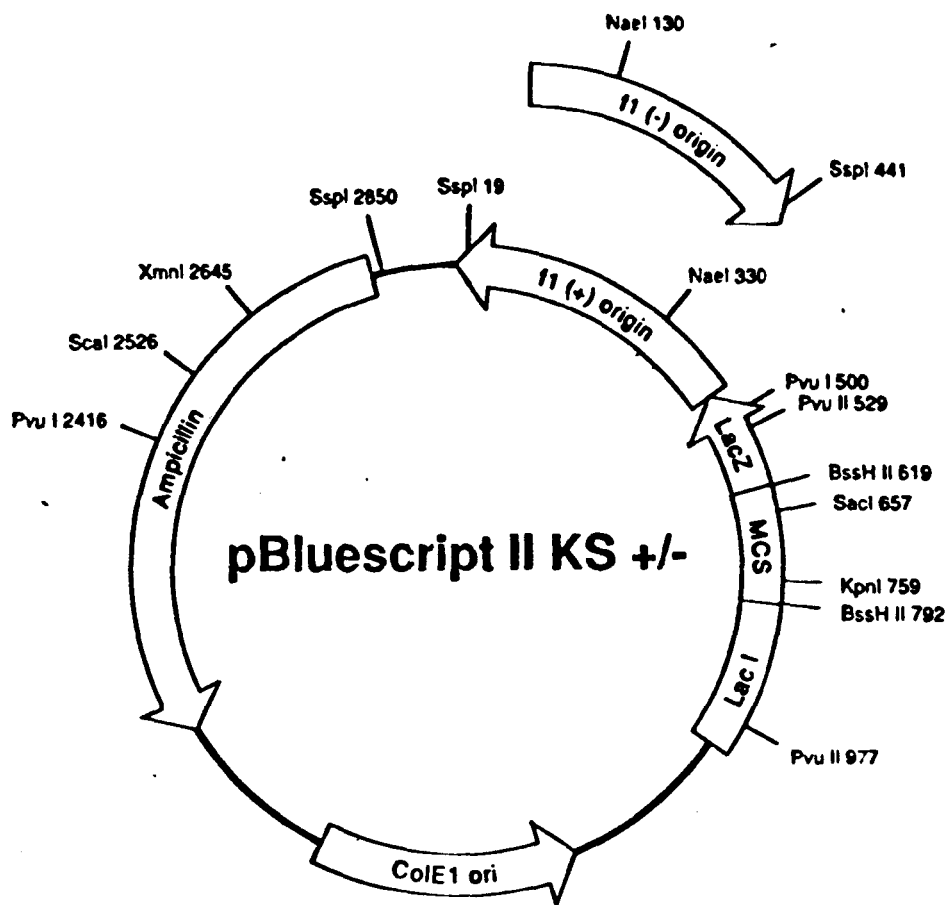


Fig. 19. Mapa de restrição do vetor pBluescript KS +/- (Catálogo Stratagene, 1988).

APÊNDICE III

Deleção Unidirecional com Exonuclease III

O método baseia-se na digestão do fragmento de DNA com Exonuclease III, a partir de uma de suas extremidades.

A enzima ataca apenas as extremidades proeminentes 5' ou abruptas, e não, as proeminentes 3'. Portanto, o fragmento de interesse deve ser clonado em um sítio de policlonagem, de forma a que permaneçam pelo menos dois sítios únicos entre o inserto e o sítio de ligação do "primer" de sequenciamento. A enzima de restrição que corta próximo ao inserto de interesse deve deixar uma extremidade com proeminência 5' ou abrupta, a partir da qual as deleções se procederão. A outra enzima a ser

utilizada, deve possuir sítio de restrição mais distante que o da enzima anterior, em relação ao inserto, devendo deixar uma extremidade proeminente 3'. Por vezes, o ataque da Exonuclease III sobre a extremidade 5', ocorre apenas sobre uma das fitas deixando proeminências 3', estas porções remanescentes são removidas pela ação da enzima S1 Nuclease, na presença de Zn^{2+} , em pH ácido. Após inativação térmica da S1 Nuclease, adiciona-se a polimerase Klenow, para reparar as extremidades. Finalmente os fragmentos são recircularizados através da ligação de suas extremidades (Fig. 21).

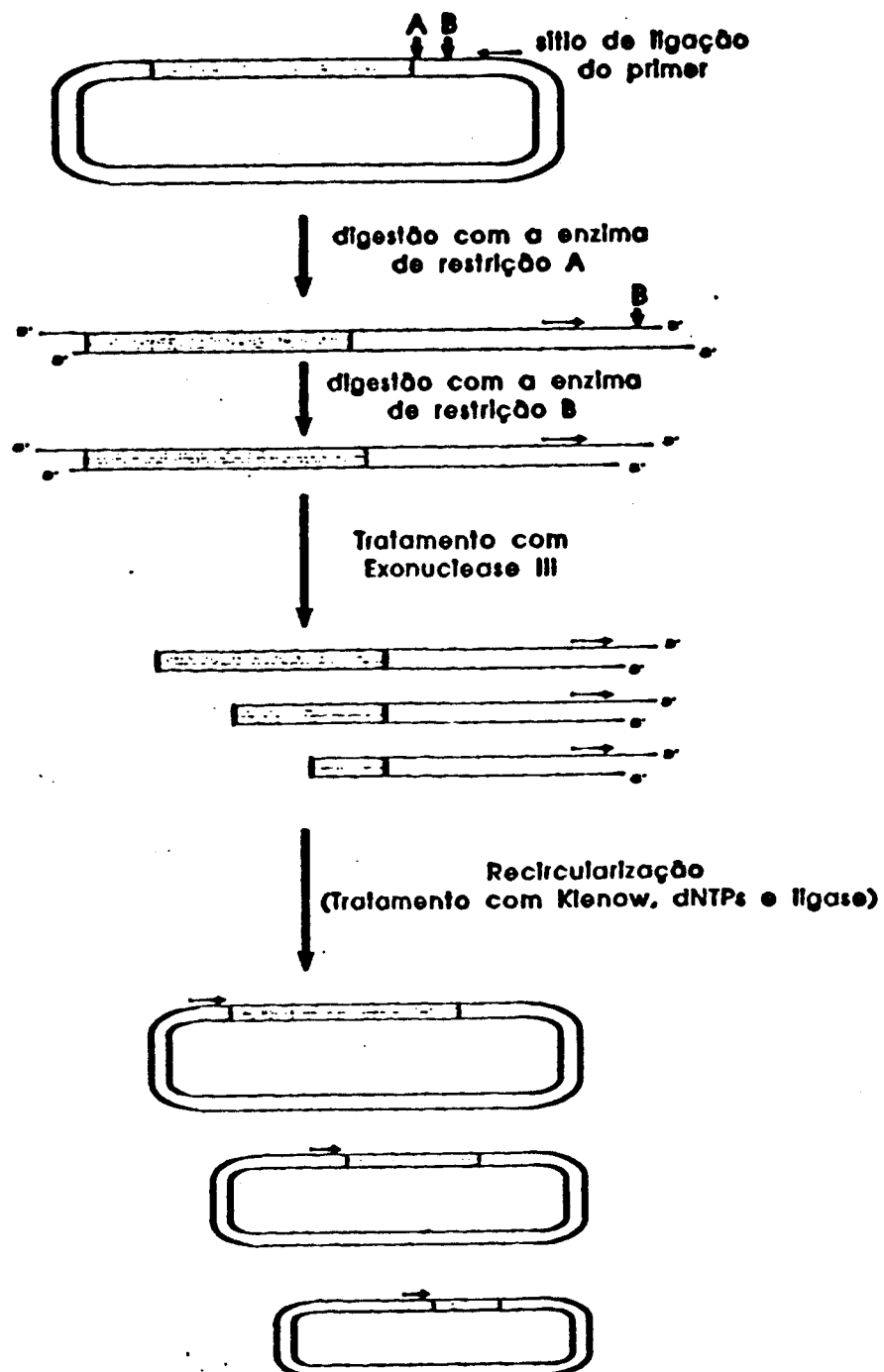


Fig. 21. Diagrama esquemático do método de deleções unidirecionais com Exonuclease III (Vettore A.L., 1994).

APÊNDICE IV

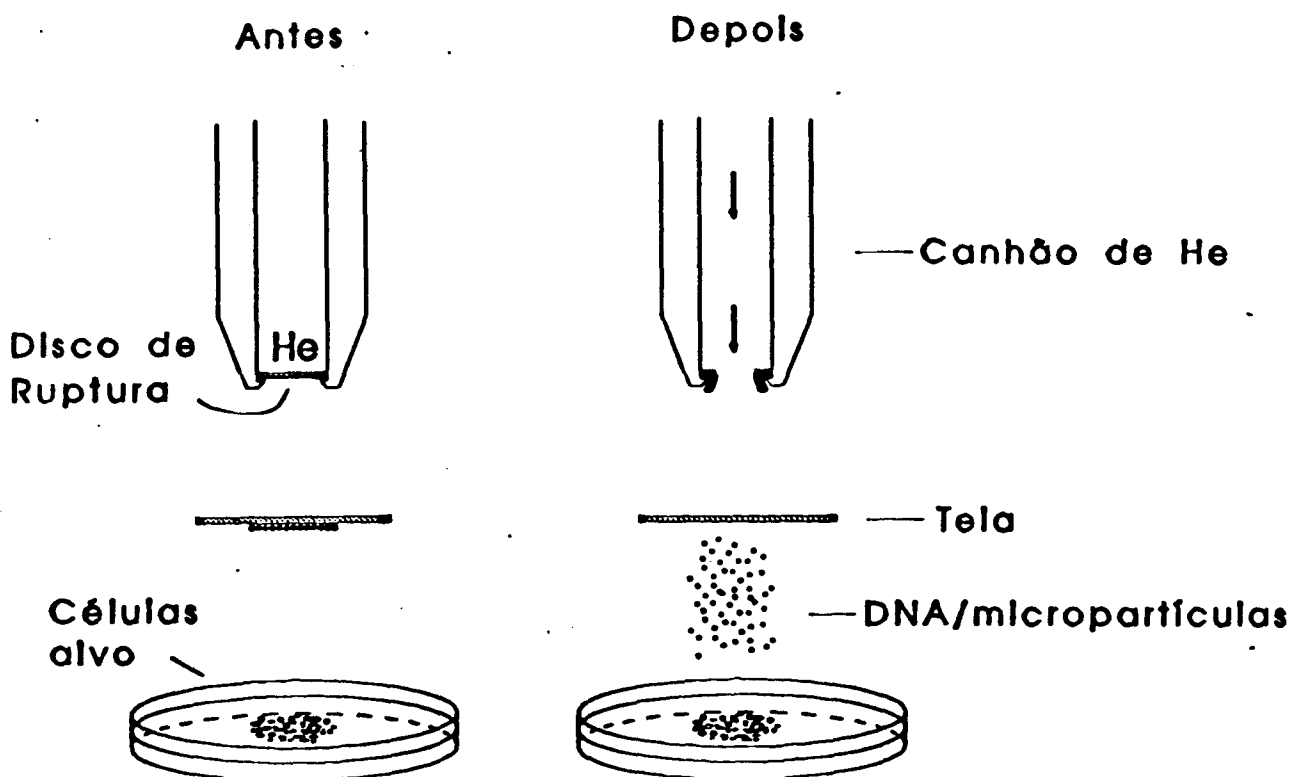


Fig. 22 Esquema do aparelho utilizado nos experimentos de bombardeamento do micropartículas (Freitas F.A., 1993).