

SILVANA PINHEIRO DADALTO

**IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO QUE CONTROLAM A
EXPRESSÃO DO GENE *GmASR3* DE SOJA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

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

T

D121i
2012

Dadalto, Silvana Pinheiro, 1985-

Identificação de fatores de transcrição que controlam a
expressão do gene GmASR3 de soja / Silvana Pinheiro
Dadalto. – Viçosa, MG, 2012.

48 f. : il. ; (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Luciano Gomes Fietto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 41-44

1. Biologia molecular. 2. Plantas - Efeito do stress.
3. Regulação de expressão gênica. 4. Soja. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 572.8

SILVANA PINHEIRO DADALTO

**IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO QUE CONTROLAM A
EXPRESSÃO DO GENE *GmASR3* DE SOJA**

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

APROVADA: 23 de julho de 2012.

Marcelo Ehlers Loureiro

Juliana R. L. S. Ramos
(Co-orientadora)

Prof. Luciano Gomes Fietto
(Orientador)

Aos meus amados: Leila, Luiz, Juliana, Tatiana, Artur e Renata

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e estar sempre presente em minha vida;

À minha família, pelo amor incondicional, incentivo e preocupação, além da educação que me foi dada;

À Universidade Federal de Viçosa, pela qualidade do ensino e pesquisa que oferece aos seus estudantes;

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, professores e funcionários pela excelente convivência e ensinamentos por mim obtidos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico pelo apoio financeiro;

Ao Professor Luciano Gomes Fietto, por ser para seus alunos não somente um ótimo orientador, mas também um ponto de apoio, segurança e amizade sempre presente;

Aos “Brocas” do Laboratório de Biotecnologia Molecular pelo bom humor, troca de informações e por toda ajuda;

A Murilo e Amanda, pela amizade, informalidade, por toda ajuda na condução dos experimentos e bons momentos vividos no LBM (beijo no ombro);

Às ‘bifes’ Larissa, Batata e Glória, pelos lanches, cinemas e por me darem todo apoio que podiam mesmo estando em outro laboratório;

A Drei, Júnior, Bruno, Batata, Amanda, Murilo, Larissa, Ana Paula, Emerson, Aline, Pedro, Gabis, Gui, Lixes, Bruno Valiate, Douglas, Robertinho, Maria e Ciro, Luciana, Hugo, Larissa (Queridona), Glaucos, Bocão, Ruth,

Patrícia, Fernando, Rafael (Byu), Zé e Luciano pela amizade verdadeira, que consistiu em não me deixar desistir quando fraquejei;

Aos demais amigos, que mesmo distantes se fazem sempre presentes;

A Eduardo Monteiro, por cuidar de tudo antes mesmo de eu saber;

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

SUMÁRIO

Figuras	6
Tabelas	6
Resumo	7
ABSTRACT	9
Introdução	10
II - Objetivo	17
III - Metas Específicas	17
IV – Material e métodos	18
1. Mono híbrido	18
1.1. Identificação e caracterização da região promotora do gene GmASR3.....	18
1.2. Obtenção do DNA genômico de soja	18
1.3. Clonagem do promotor de GmASR3.....	19
1.4. - Transformação de leveduras	20
1.5. Triagem líquida de cDNAs que codificam proteínas que se ligam ao promotor de GmASR3.	20
2. Duplo Híbrido	22
2.1. Obtenção do gene GmASR3.....	22
2.2. Clonagem em vetor pDest32.....	22
2.3. Transformação de leveduras.....	23
2.4. Ensaio de transativação	23
2.5. Triagem líquida de fatores que se ligam à proteína GmASR3 a partir do sistema de duplo-híbrido em leveduras	24
2.6. Sequenciamento do cDNA isolado.....	24
3. Técnicas de Biologia Molecular.....	25
V - Resultados e discussão	26
1. Mono híbrido	26
1.1. Identificação e caracterização da região promotora do gene GmASR3...	26
1.2. Obtenção da construção pHISp500GmASR3	28

1.3. Triagem Líquida de cDNAs que codificam proteínas que se ligam ao promotor de GmASR3.	30
2. Duplo Híbrido	33
2.1. Obtenção do gene GmASR3 e análise de bioinformática	33
2.2. Clonagem em vetor pDest32.....	34
2.3. Ensaio de transativação	35
2.4. Triagem líquida de fatores que se ligam à proteína GmASR3 a partir do sistema de duplo-híbrido em leveduras	36
VI - Conclusões	40
VII - Referências bibliográficas	41
3. <i>Bancos de Dados e programas utilizados:</i>	44
ANEXO 1: Vetores utilizados.....	45

FIGURAS

<i>Figura 1: Análise dos cis elementos presentes na região de 500pb amontante do códon de iniciação da transcrição.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 2: grafico de pizza.....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 3: Extração de DNA genômico de soja.....</i>	<i>1</i>
<i>Figura 4: Obtenção da região promotora de GmASR3.....</i>	<i>1</i>
<i>Figura 5: Digestão dupla com as enzimas SacI e EcoRI.....</i>	<i>1</i>
<i>Figura 6: Crescimento em concentrações de 3AT de 5mM até 120mM de culturas positivas durante a triagem líquida realizada com 5mM.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 7: Sequencias previstas para o cDNA e para a proteína GmASR3.....</i>	<i>1</i>
<i>Figura 8: Obtenção do gene GmASR3.....</i>	<i>1</i>
<i>Figura 9: Confirmação de transformantes portadores de pDONR-GmASR3.....</i>	<i>1</i>
<i>Figura 10: Confirmação de células clonadas com a construção pDest32-GmASR3.....</i>	<i>1</i>
<i>Figura 11: gráfico da atividade de β-galactosidase.....</i>	<i>1</i>
<i>Figura 12: Crescimento em concentrações de 3AT de 0 a 90mM das culturas que foram capazes de crescer durante a triagem.....</i>	<i>1</i>

TABELAS

<i>Tabela 1: oligonucleotídeos utilizados para obtenção da região promotora do gene GmASR3 acrescida dos sítios de restrição para EcoRI e SacI e suas respectivas temperaturas de anelamento.....</i>	<i>18</i>
<i>Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para obtenção do gene GmASR3 acrescida dos sítios de anelamento com a sequencia attB1 e attB2.....</i>	<i>22</i>
<i>Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para inserir as sequencias attB1 e attB2 no gene GmASR3 para posterior reação com a enzima BP.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabela 4: D.O. das culturas obtidas em placa deepwell após a triagem líquida.....</i>	<i>1</i>
<i>Tabela 5: Escolha de culturas que contém fatores que possivelmente interagem com a proteína GmASR3.....</i>	<i>37</i>

RESUMO

DADALTO, Silvana Pinheiro M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2012. **Identificação de fatores de transcrição que controlam a expressão do gene GmASR3 de soja.** Orientador: Luciano Gomes Fietto. Co-orientadores: Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Juliana Rocha Lopes Soares Ramos.

Proteínas ASR (ABA, Stress and ripening induced protein) são induzidas em situações de estresses, maturação ou na presença de ABA, em diversas espécies vegetais, como Lírio (*Lilium longiflorum*); cana de açúcar (*Saccharum officinarum*); uva (*Vitis vinifera*); arroz (*Oriza sativa*); petúnia, banana (*Musa acuminata* e *Musa balbisiana*) e milho (*Zea mays*), entre outros. No entanto nenhum gene ASR foi encontrado em *Arabidopsis*. ASRs são proteínas pequenas, hidrofílicas e sem estrutura definida. Sua função é desconhecida, assim como a via de sinalização a qual pertencem. Em soja foi relatada a presença de três ASRs, que foram denominadas GmASR1, GmASR2 e GmASR3.

Este trabalho buscou identificar proteínas que interagem com a região promotora de GmASR3, assim como fatores que se ligam à proteína GmASR3.

Após análise em bancos de dados, a região promotora em torno de 500pb a montante do códon de iniciação da transcrição foi obtida a partir de PCR realizado com o DNA genômico de soja (*Glycine max*, cultivar CD206) e clonado em plasmídeo pHIS2.1. Esta construção foi transformada em leveduras *S. cerevisiae* W303 para posterior triagem líquida de cDNAs que expressam fatores capazes de interagir com o promotor de GmASR3, a partir do método do mono-híbrido de leveduras.

Foi verificado que a proteína GmASR3 possui fraca capacidade de transativação nas condições utilizadas, o que possibilitou a realização de experimentos de duplo-híbrido com o fim de identificar fatores que se ligam à proteína GmASR3. Os fatores que se ligam a GmASR3 foram obtidos através do método do duplo-híbrido de leveduras, utilizando para isso leveduras *S. cerevisiae* AH109 portadoras do plasmídeo pDest32 ao qual foi inserido a sequência do cDNA de GmASR3. As triagens de mono e duplo-híbrido foram realizadas utilizando o método da triagem líquida em placas deep well.

As colônias que foram consideradas portadoras dos fatores que interagem com o promotor ou com a proteína GmASR foram retransformados em *E. coli* Dh5 α e enviados para sequenciamento.

ABSTRACT

DADALTO, Silvana Pinheiro M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2012. **Identification of transcription factors that control the soybean gene GmASR3 expression.** Advisor: Luciano Gomes Fietto. Co-Advisors: Elizabeth Pacheco Batista Fontes and Juliana Rocha Lopes Soares Ramos.

ASR Proteins are ABA, stress and ripening induced proteins present in various plant species such as lily (*Lilium longiflorum*), sugarcane (*Saccharum officinarum*), grape (*Vitis vinifera*); Rice (*Oryza sativa*), petunia, banana (*Musa acuminata* and *Musa balbisiana*) and corn (*Zea mays*). However no single ASR gene has been found in Arabidopsis. ASRs are small, hydrophilic and unstructured proteins. Its function, as well as the signaling pathway to which they belong, remains unknown. In soybean were reported the presence of three ASRs, which were called GmASR1, and GmASR2 GmASR3.

This study aimed to identify factors that interact with the GmASR3 promoter region, as well as factors that bind to the protein GmASR3.

After analysis of databases, the promoter region about 500 bp upstream of the transcription initiation codon was obtained from PCR performed with genomic DNA from soybean (*Glycine max*), and cloned into plasmid pHIS2.1. This construct was transformed in yeast *S. cerevisiae* W303 for subsequent liquid screening of cDNAs that express factors capable of interacting with the promoter GmASR3 by mono-hybrid yeast system.

It was found that the protein GmASR3 has weak transactivation capacity under the used conditions, which enabled the realization of two-hybrid experiments to identify factors that bind to the protein GmASR3. The factors that bind to GmASR3 were obtained by two-hybrid system yeast, using for this yeast *S. cerevisiae* AH109 carrying the plasmid pDest32 which was inserted the cDNA sequence GmASR3. Likewise, the method of liquid screening in deep well plates was used.

The colonies that were considered to have the factors that interact with the promoter or the protein in GmASR were re-transformed in *E. coli Dh5 α* and sent for sequencing.

INTRODUÇÃO

A soja é o principal grão do agronegócio brasileiro, com uma safra esperada para 2012 em torno de 65 milhões de toneladas (IBGE, 2012), sendo os estresses abióticos os principais fatores que limitam o crescimento e a produtividade da planta. Estudos sobre as respostas desencadeadas nas plantas nessas situações são de grande interesse econômico, uma vez que podem gerar alternativas para aumentar a tolerância de cultivares através da manipulação e reprogramação de genes relacionados à via de resposta ao estresse (Mahajan e Tuteja, 2005).

Plantas submetidas a estresses desencadeiam respostas que visam diminuir os impactos causados por estes (Kariola *et al*, 2006). Conhecer os mecanismos dessas respostas em nível celular, fisiológico e bioquímico, é de grande importância para a identificação de genes que têm sua expressão induzida nessas situações e que, portanto, podem ser alvos de manipulação visando o aumento da produtividade das culturas em condições desfavoráveis (Urano *et al*, 2010).

A família gênica ASR é induzida em situações de estresse e de maturação de frutos em diversas espécies vegetais. A via de sinalização que leva ao aumento de proteínas ASR na célula ainda não está completamente elucidada, assim como seu papel na resposta ao estresse. Estas proteínas podem atuar como osmoprotetoras, pois são altamente hidrofílicas, assim retêm água no citoplasma, ou como fatores de transcrição, como indicam alguns estudos: VvMSA, uma proteína da família das ASRs em uvas (*Vitis vinífera*), pode ter papel como transfator de um transportador de monossacarídeos, em uma possível via que conecta a resposta a ABA com vias de regulação de açúcares (Çakir *et al*, 2003, Carrari *et al*, 2004); ASR1 encontrado em tomate (*Lycopersicon esculentum*) pode ligar-se ao DNA quando há presença de íons Zn^{+2} (Rom *et al*, 2006); FaASR, encontrado em morango (*Fragaria x ananassa*) é capaz de ativar a expressão dos genes repórteres *LacZ* e *His3* em leveduras da linhagem AH109 (Chen *et al*, 2012).

Neste trabalho realizamos a varredura de fatores de transcrição através do sistema do mono-híbrido e de proteínas parceiras de GmASR pelo sistema do duplo-híbrido com a intenção de caracterizar transfatores que controlam a expressão de GmASR bem como de proteínas que se ligam a GmASR. A caracterização destas proteínas será útil para a identificação da via de sinalização a qual as ASR pertencem, e proporcionará novos conhecimentos acerca da resposta a estresses em plantas.

I - REVISÃO DE LITERATURA

A soja (*Glycine max*) é o principal grão do agronegócio brasileiro, sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais de soja, com safra 2012 estimada em torno de 65 milhões de toneladas (IBGE, 2012). Os estresses abióticos são os principais fatores que limitam o crescimento e produtividade das plantas, que, por possuírem natureza sésil, são expostas a variados estresses, como seca, alta osmolaridade, extremos de temperatura entre outros (Mahajan, 2005). A condição de estresse osmótico resulta em perda de água intracelular e redução do turgor, além de induzir acúmulo de espécies reativas de oxigênio, que levam a um estresse oxidativo secundário e causa danos a lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Pang e Wang, 2008).

A diminuição da hidratação celular leva a quebras nas ligações de hidrogênio e conseqüentemente a mudanças na conformação protéica e nas interações entre macromoléculas. Uma estratégia bioquímica utilizada pelas plantas durante a desidratação celular é o acúmulo de osmoprotetores, como betaína, prolina e alguns açúcares (Pareek, 2010). Estas são moléculas altamente hidrofílicas e além de reter água no citosol podem atuar como chaperones moleculares, pois ajudam a manter a estrutura nativa de proteínas do citosol (Battaglia, 2008).

A sinalização celular durante o estresse osmótico é complexa e uma condição primária de estresse pode ativar múltiplas vias de transdução de sinal. Essas vias não estão completamente elucidadas; as respostas a estresse osmótico, baixa temperatura, estresse salino e ácido abscísico (ABA, um importante fitormônio relacionado à transdução de sinal durante situações de estresses variados) são interligadas. Todos esses estresses levam a uma indução transiente do influxo de Ca^{2+} no citoplasma, mas outros possíveis mensageiros secundários têm sido relatados, como inositol trifosfato, espécies reativas de oxigênio (ROS) e ABA, que seria produzido como resultado da mudança do padrão de Ca^{2+} na célula. As vias que envolvem as MAPK são utilizadas quando há a produção de ROS, mas estas são independentes da via que resulta na transcrição de LEA-like genes, que tem como efeito o reparo dos danos celulares. Ainda há uma terceira via, da resposta SOS, que opera

principalmente em resposta ao estresse iônico, mas pode ser utilizada em resposta a outros estresses ou sinais hormonais. Há indícios de que as vias que resultam na produção de LEA-like genes são completamente dependentes de ABA e regulam positivamente a produção do hormônio. (Xiong, 2002).

LEAs (*Late Embriogenesis Abundant*) são proteínas não estruturadas e altamente flexíveis que são acumuladas em condições de estresses abióticos. Proteínas ASR (*ABA, stress, rippening induced proteins*) pertencem à família das LEAs (Carrari, 2004); são proteínas pequenas e resistentes ao calor (Goldgur, 2007). São acumuladas durante a germinação (em sementes), maturação de frutos, em resposta a condições de limitação de água e sob indução por ABA (Maskin, 2008).

O primeiro gene ASR clonado foi o de tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Iusen, 1993) e desde então mais de trinta genes ASR foram identificados em várias espécies de plantas, como Lírio (*Lilium longiflorum*) (Wang, 2005); cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) (Sugiharto, 2002); uva (*Vitis vinífera*) (Çakir, 2003); Arroz (*Oriza sativa*) (Vaidyanathan, 2004); petúnia (Bai, 2010), Banana (*Musa acuminata e Musa balbisiana*) (Henry, 2011) e milho (*Zea mays*) (Riccardi, 2004, Jeanneau, 2002), entre outros. Entretanto, nenhum gene ASR foi encontrado em *Arabidopsis* (Carrari et al, 2004).

A família ASR possui papel na resposta a estresse. Foi verificado que a superexpressão de ASR foi capaz de induzir tolerância a estresse osmótico em *E. coli* (Daí, 2010), em *Arabidopsis* (Liu, 2010, Yang, 2005) e em plantas de tabaco (Kalifa., 2004).

De acordo com Battaglia (2008), as proteínas ASR possuem cinco domínios funcionais, sendo três motivos conservados (1, 2 e 3). Um destes motivos (motivo 3), localiza-se na região C-terminal e contém um possível sinal de localização nuclear. Os motivos 1 e 2 contêm extensões de resíduos de histidina, assim como o motivo 4, que possui de 8 a 10 resíduos de histidina na porção C-terminal da proteína. O motivo 5 só é encontrado em proteínas ASR1 e deve possuir papel na ligação dependente de zinco ao DNA. (Battaglia, 2008). Porém, outros autores consideram que as proteínas ASR possuem apenas dois domínios conservados: um na região N-terminal, que é rica em

resíduos de histidina e contém uma sequência de ligação ao Zn^{+2} , e um na porção C-terminal, que pode conter um sinal de localização nuclear e forma o domínio WDS (*water, déficit, stress*), que é característico da família ASR (Bücker-Neto, 2010; Çakir, 2003; Kalifa, 2004). Entretanto, ao analisar-se uma proteína ASR, observa-se que os 5 domínios descritos em Battaglia (2008) estão inseridos nos dois domínios descritos pelos demais autores.

Experimentos em tomate, uva e morango (*Lycopersico esculentum*, *Vitis vinífera* e *Fragaria x ananassa*, respectivamente) mostram indícios de que as proteínas ASR podem ter papel não somente como protetores citoplasmáticos, mas também como fatores de transcrição:

1- Apesar de encontrar-se no citoplasma, onde permanece sem estrutura definida, a diminuição da hidratação celular ou a ligação ao Zn^{+} conferem estruturação parcial e dimerização de ASR1 em tomate (Goldgur et al, 2007), fato também observado em *Musa paradisíaca*, onde a ligação ao Zinco induziu estruturação parcial de ASR (Daí, 2010). ASR1 de tomate é encontrada no núcleo (Kalifa, 2004) e no citoplasma (Urtasum, 2010) e, quando assume a forma de dímeros, é capaz de se ligar ao DNA (Maskin, 2007), o que sugere sua atuação como fator de transcrição. Apesar de se ligar a íons Zn^{+2} , as proteínas ASR não são proteínas do tipo dedos de zinco, pois não apresentam ligação ao zinco coordenada por resíduos de cisteína. Não foi observado domínio de ligação ao zinco conhecido, e acredita-se que três íons são ligados a cada dímero de ASR (Rom, 2006).

2- Experimentos de duplo-híbrido, entre outros, mostraram que VvMSA (*Vitis vinifera* Maturation, Stress and ABA induced protein) interage no núcleo com DREB, um conhecido fator de transcrição relacionado a estresse (Saumoneau, 2008). Anteriormente, VvMSA foi isolada por meio de técnica de mono-híbrido, usando como isca o promotor de um possível transportador de monossacarídeos, VvHT1. VvMSA e VvHT1 revelaram padrões de expressão similares durante a maturação da uva. Ambos são induzidos por sacarose, e a indução de VvMSA é consideravelmente elevada por ABA (Çakir, 2003). Estes resultados indicam que VvMSA pode estar envolvida em uma via de

transdução de sinal que conecta a via de resposta a ABA à via de controle de açúcares durante a maturação de frutos (Çakir 2003).

3- Um recente estudo realizado com a proteína FaASR, uma ASR do cultivar de morango mais comumente comercializado (*Fragaria x ananassa*) envolvida na maturação dos frutos, demonstrou qualitativamente a capacidade de ativação da transcrição desta proteína, que estaria localizada na porção N-terminal. Nesta pesquisa a proteína foi expressa em sistema bacteriano e foram produzidos anticorpos contra FaASR, utilizados posteriormente para verificar que a proteína é mais expressa em resposta a ABA endógeno e exógeno (Chen et al, 2012).

A constatação de que a família ASR possui papel como transfatores pode tornar tanto estas proteínas como seus próprios fatores de transcrição alvos para a manipulação genética, visando obter cultivares mais adaptados ao estresse osmótico.

Em soja (*Glycine max*) três genes da família ASR (GmASR1, GmASR2 e GmASR3) foram identificados e clonados em vetores pENTR (Bücker-Neto2009). Destes, foram estudados os padrões de expressão de GmASR1 e GmASR3. Foi demonstrado que a expressão de GmASR3 é predominante tanto em folha quanto em raiz, e que GmASR1 é mais expresso em folhas do que em raízes. O tratamento com ABA, com NaCl (150mM e 75mM) ou com déficit hídrico aumentou os níveis relativos dos transcritos de GmASR1 e GmASR3, indicando que a modulação da expressão destas proteínas possuem relação com estes estresses. Estudos de localização subcelular das proteínas GmASR estão em andamento, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Bücker-Neto 2010).

Os fatores de transcrição estão diretamente envolvidos na resposta a estresses, já que eles regulam positiva e negativamente genes que participam de vias de sinalização que levam à tolerância a essas condições. Sua

identificação se torna fundamental para a melhor compreensão dessas vias e uma possível aplicação no melhoramento de plantas.

Uma maneira amplamente utilizada para o estudo de vias de sinalização são os ensaios de duplo-híbrido, que consistem na utilização de uma proteína como isca, e verificação da interação desta com outras proteínas. Este método se tornou altamente utilizado porque permite a seleção de genes que possivelmente codificam proteínas que interagem com a isca sem que seja necessária a purificação da proteína (Vidal e Legrain, 1999).

O experimento de mono-híbrido é conceitualmente semelhante ao método do duplo-híbrido, porém, em vez de utilizar uma proteína como isca, é utilizado uma sequência de DNA, e são selecionadas as proteínas que possivelmente interagem com esta porção de DNA (Kogel e Uetz, 2008). Assim, este método constitui-se uma importante ferramenta no estudo de fatores de transcrição.

O presente trabalho se baseou no estudo das interações proteína-DNA a partir da clonagem do promotor do gene ASR3 de soja (*Glycine max*) e utilização como isca em experimentos de triagem em busca de fatores de transcrição que controlam sua expressão. Além da varredura da biblioteca avaliou-se o potencial da proteína GmASR3 de agir como transcritor em um ensaio de transativação em leveduras. A baixa atividade de transativação de ASR3 nos permitiu realizar a busca de interações entre proteína-proteína utilizando o método do duplo-híbrido.

II - OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo identificar fatores de transcrição que controlam a expressão do gene GmASR3 e identificar proteínas que interagem com GmASR3 em soja.

III - METAS ESPECÍFICAS

- Identificar o gene GmASR3 e sua região promotora;
- Avaliar a capacidade de transativação de GmASR3
- Realizar triagens de cDNAs que codificam fatores que se ligam à região promotora de GmASR3 a partir do sistema de mono-híbrido em leveduras;
- Realizar triagens de cDNAs que codificam proteínas que interagem com a proteína GmASR3 a partir do sistema de duplo-híbrido em leveduras.

IV – MATERIAL E MÉTODOS

1. Mono híbrido

1.1. Identificação e caracterização da região promotora do gene GmASR3

A região promotora do gene GmASR3 foi identificada por meio do banco de dados do Phytozome (<http://www.phytozome.net/soybean.php>), utilizando a sequência obtida por Bucker-Neto (2010) como modelo para a busca do gene. Foram sintetizados oligonucleotídeos complementares à região em torno de 500pb a montante do códon de iniciação. Esses oligonucleotídeos foram acrescidos de sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *SacI* (Tabela1).

Análises de bioinformática com o programa PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), foram realizadas para identificar *in silico* possíveis cis-elementos conhecidos presentes no promotor.

Tabela 1: oligonucleotídeos utilizados para obtenção da região promotora do gene GmASR3 acrescida dos sítios de restrição para *EcoRI* e *SacI* e suas respectivas temperaturas de anelamento.

RvSojaSAc	5'- GAGCTCTTGGGAAGCTTAGGTTATCT -3'	50.6 °C
FwSojaEcoRI_500	5'- GAATCTTGCTTCTATTTTCTATAACGTGC -3'	51.5 °C

1.2. Obtenção do DNA genômico de soja

Para extração do DNA genômico, foi utilizado o método baseado em Doyle e Doyle (1990). Folhas de soja - *Glycine max* (L.) Merrill, cultivar CD206 (Emprapa, 2009) - foram retiradas da planta e imediatamente imersas em nitrogênio líquido, dentro de um envelope. Após triturar as folhas em nitrogênio líquido, foi adicionado ao pó obtido 800µL de tampão de extração [Tris-HCl 100mM pH8.0, Brometo de cetil trimetil amônio – CTAB 2% (p/v), NaCl 1,4 mM, EDTA 20 mM pH 8,0, polivinilpirrolidona – PVP 1% (p/v)]. A mistura foi

incubada a 60°C por 30 minutos em microtubos e então centrifugada a 12000 x g por 10 minutos em uma microcentrífuga. A fase aquosa foi transferida para outro microtubo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio, para desproteção das amostras. Estas foram centrifugadas e à fase aquosa foi adicionado 1/3 do volume de acetato de amônio 7,5 M e 1 volume de isopropanol. As amostras foram então incubadas a -20°C “overnight” e centrifugadas a 12000 x g por 20 minutos. O sedimento foi lavado com etanol 70% e seco a 37°C. Foi então ressuscitado em água mili-Q e incubados a 37°C por 30 minutos com 50µL/mL de RNase A. O DNA extraído foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% e visualizado por coloração com brometo de etídeo.

1.3. Clonagem do promotor de GmASR3

Após a reação de PCR utilizando o DNA genômico de soja como molde e os oligonucleotídeos demonstrados na tabela 1, os fragmentos foram visualizados em gel de agarose 1% e clonados em vetor pGEM-T (KIT pGEM®-T Easy Vector System, Promega), obtendo-se as construções pGEM-T-p500GmASR3, que contém sítios de restrição para *EcoRI* e *SacI*. Células competentes de *E. coli* linhagem DH5α foram transformadas e selecionadas em meio contendo ampicilina (100µg/mL) e x-gal (80 µg/mL). As colônias brancas foram confirmadas através de PCR de colônia e os transformantes positivos foram submetidos à extração de DNA plasmidial. Para a recuperação do promotor, as construções pGEM-T-pGmASR3 foram duplamente digeridas com as enzimas *EcoRI* e *SacI*. Os fragmentos foram analisados em gel de agarose 1% (p/v), purificados com o DNA Extraction Kit (Fermentas) e confirmados por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

Em seguida, os fragmentos purificados foram ligados aos vetores pHis2.1(Clontech) pré digeridos com as respectivas endonucleases, obtendo-se o vetor pHis-p500GmASR3, que contém a expressão do gene repórter HIS3 controlada pela região promotora de GmASR3.

As construções obtidas foram utilizadas para transformar células eletrocompetentes de *Escherichia coli* linhagem DH5α, por eletroporação (Gene Pulser X Cell – Bio-Rad). Os clones foram selecionados em meio

contendo ampicilina 100µg/mL, e então submetidas à extração de DNA plasmidial.

Células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* da estirpe W303 (MATa *leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura 3-1 ade2-1 his3-11,15 [phi⁺]*), que é deficiente na produção dos aminoácidos leucina, triptofano, histidina e uracila, foram transformadas pelo método de acetato de lítio/ polietilenoglicol (AcLi/PEG) com a construção contendo a região promotora, assim como com o plasmídeo vazio (controle negativo). As leveduras transformadas foram selecionadas em meio seletivo SD (Synthetic Dropout) –URA –TRP e diagnosticados por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos.

1.4. - Transformação de leveduras

Para a transformação de leveduras, foi utilizado o método de transformação com acetato de lítio/polietilenoglicol (PEG).

Células de *Saccharomyces cerevisiae* foram crescidas em meio YPD-A por 16 h, centrifugadas a 5000 x g por 5 minutos e ressuspendidas em 1 mL de água estéril. Após nova centrifugação (5000 x g, 5 minutos), foi adicionado a mistura de transformação – 240 µL de PEG 50%; 36 µL de Acetato de Lítio 1 M; 25 µL de DNA de esperma de salmão (ssDNA) 2mM e 50 µL de solução aquosa contendo 2-5 µg de DNA plasmidial. Após incubação de 30 minutos a 30°C e 20 minutos a 42°C as células foram centrifugadas a 8000 x g por 15 minutos e o precipitado foi lavado com 1 mL de água, centrifugado novamente, concentrado para 200 µL e então as células foram semeadas em meios seletivos com deficiência em aminoácidos específicos, de acordo com o plasmídeo inserido (anexo I) e crescidos de três a quatro dias a 28°C.

1.5. Triagem líquida de cDNAs que codificam proteínas que se ligam ao promotor de GmASR3.

Antes que a triagem fosse realizada, foi verificado o crescimento das células *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem W303 transformadas com a

construção pHIS-p500GmASR3 em meio SD-TRP-HIS com concentrações de 3AT de 5 mM a 120mM. Esta análise foi utilizada para a escolha da concentração de 3AT utilizada na triagem líquida, que ocorreu utilizando-se uma concentração de 3AT de 5mM.

O protocolo utilizado para a triagem líquida foi desenvolvido pelo Professor Doutor José Miguel Ortega da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e adaptado no Laboratório de Biotecnologia Molecular (DBB-UFV).

Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem W303 transformadas com a construção pHIS-p500GmASR3 foram crescidas em 70 mL de meio SD –TRP até que fosse atingida a D.O. necessária (0,4 - 0,6). As células foram centrifugadas a 5000 x g por 7 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 5 mL de água destilada. O precipitado foi lavado desta forma por três vezes. As células então foram co-transformadas com 20µL da biblioteca de cDNA de soja (Alves, 2011). Para isso, foi adicionado a mistura de transformação calculada para 30 transformações (7,2 mL de PEG 50 %, 1,08 mL de acetato de lítio 1M, 1,5 mL de DNA de esperma de salmão (ssDNA) 2mM, 1,02 mL do DNA da biblioteca diluído em 1mL de água estéril). As células foram agitadas em vortex e incubadas a 42°C por 50 minutos, sendo homogeneizadas a cada 5 minutos. Foram então centrifugadas a 5000 x g por 5 minutos; o precipitado foi ressuspensionado em água estéril e essa lavagem foi realizada mais duas vezes. O precipitado foi posteriormente ressuspensionado em 150 mL de meio de cultura SD–TRP – HIS contendo 5 mM de 3AT (3-aminotriazole), além de ampicilina 100 µg/mL e distribuídos em placas *deepwell* (1,5 mL por poço). Após incubação a 28°C e 200 rpm por 72 horas, foi realizada uma diluição de 1:10, utilizando nova placa *deepwell*, que foram mantidas a 28°C e 200 rpm. Após 24 horas, foi realizada uma nova diluição 1:10, as culturas foram novamente incubadas a 28°C por mais 24 horas e tiveram sua D.O₆₀₀ aferidas em leitor de microplaca (Versa Max – Molecular Devices). As culturas dos poços que apresentaram as maiores D.O. foram semeadas em meio SD–TRP –HIS com uma concentração de 3AT de 10mM. As células que cresceram foram inoculadas em meio SD–TRP –HIS líquido contendo 20mM de 3AT, e então submetidas a extração de DNA plasmidial, utilizando o Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification System (Promega). Estas culturas foram inoculadas em placas *deepwell* com

concentrações crescentes de 3AT e tiveram seu crescimento observado através da medida da DO₆₀₀ em leitor de microplaca após 4 dias.

1.6. Sequenciamento do cDNA que codifica a proteína reguladora

O DNA extraído das colônias selecionadas foram retransformados em células de *E. coli* da estirpe DH5α e selecionadas em meio seletivo contendo ampicilina 50 µg/mL. Os transformantes obtidos tiveram seus plasmídeos extraídos com o mesmo Kit utilizado no item anterior e após serem confirmados em gel de agarose 1% estes plasmídeos foram enviados para seqüenciamento.

2. Duplo Híbrido

2.1. Obtenção do gene GmASR3

Utilizando a sequência do gene GmASR3 obtida por Bücken-Neto (2010) como protótipo para a busca no banco de dados do Phytozome (<http://www.phytozome.net/soybean.php>), foi feita uma análise *in silico* utilizando o programa CLC Main WorkBench (www.clcbio.com) foram sintetizados oligonucleotídeos que permitissem a amplificação do gene. Estes tiveram parte da sequência attB1 e attB2 acrescentadas para que fosse possível a clonagem através do sistema Gateway (tabela 2). A reação de PCR foi realizada utilizando a construção cedida por Bücken-Neto (2010) (pENTR-GmASR3) como DNA molde.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para obtenção do gene GmASR3 acrescida dos sítios de anelamento com a sequência attB1 e attB2, indicados em vermelho na tabela, e suas respectivas temperaturas de anelamento.

FW ASR3 GATEWAY	3' AAAAAGCAGGCTTCACAATGGCTGAGGAGAAGCACCA 5'	71,3 °C
RvASR3GATEWAY	3' AGAAAGCTGGGTCTCAGCCAAACAGATGGTGGT 5'	70,9 °C

2.2. Clonagem em vetor pDest32.

O gene GmASR3 foi clonado em pDest32, utilizando o kit Gateway® LR Clonase® (Invitrogen). Após a reação de amplificação do gene GmASR3, foi realizada uma nova reação com os oligonucleotídeos attB1 e attB2 (tabela 3)

como primers. Após essa reação, 3 µL dos amplicons foram submetidos à reação com a enzima BP (KIT Gateway® BP Clonase II – Invitrogen), utilizando 1µL de pDONR e 1µL de enzima. O DNA foi utilizado para transformar bactérias *E. coli*, da estirpe DH5α, que foram plaqueadas em meio LB contendo canamicina 50µg/mL e tiveram seus plasmídeos extraídos.

Estes foram utilizados para a realização de reação com a enzima LR clonase (1µL enzima + 4 µL de inserto e plasmídeos na mesma concentração), visando obter o plasmídeo pDest32-GmASR3. A reação foi transformada em *E. coli* DH5α e as células foram semeadas em meio contendo gentamicina 35 µg/mL . Os transformantes positivos foram confirmados através de PCR de colônia e posteriormente submetidos à extração de DNA plasmidial.

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para inserir as sequencias attB1 e attB2 no gene GmASR3 para posterior reação com a enzima BP

attB1	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT -3'	61,4°C
attB2	5' – GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT -3'	63,7°C

2.3. Transformação de leveduras

O DNA extraído no item anterior foi transformado em células de *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem AH109 (MATa, Trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATAHIS3, MEL1 GAL2UAS-GALTATA::MELUAS-MEL1TATA-lacZ), que é deficiente na produção de leucina, triptofano e uracila (Trp-, Leu-, Ura-); e contém os genes repórteres LacZ e HIS3, de acordo com protocolo descrito no item 1.4. As células transformadas foram selecionadas em meio SD- LEU.

2.4. Ensaio de transativação

Para confirmar uma possível capacidade de transativação de GmASR3, leveduras *Saccharomyces cerevisiae* da cepa AH109 transformadas com a construção pDEST32-GmASR3 tiveram seu crescimento em meio SD –LEU – HIS verificado. 5µL de células a uma DO₆₀₀ foram inoculados em forma de gota

em uma placa contendo o meio seletivo e incubados a 28°C por 4 dias. As células foram posteriormente inoculadas em 10mL de meio SD- LEU-HIS líquido e foram submetidas à medida da atividade de β -galactosidade, segundo protocolo descrito em Alves, 2011. Como controle negativo células *Saccharomyces cerevisiae* da cepa AH109 transformadas com o plasmídeo pDest32 vazio foram submetidas ao mesmo processo.

2.5. Triagem líquida de fatores que se ligam à proteína GmASR3 a partir do sistema de duplo-híbrido em leveduras

Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* da cepa AH109 transformadas com a construção pDEST32-GmASR3 foram submetidas à triagem líquida utilizando uma biblioteca de cDNA de soja, para verificar que fatores são capazes de se ligar ao promotor de GmASR3. Para isso, essas células foram crescidas em 70 mL de meio SD-LEU e, de forma semelhante ao descrito no item 1.5, foram co-transformadas com 20 μ L de DNA da biblioteca, ressuspensos em meio SD-LEU-HIS-TRP + Amp 105 μ g/mL + 20mM de 3AT, distribuídos em placa deepwell, incubados a 28°C e tiveram seu crescimento medido após três diluições.

As culturas que apresentaram maior crescimento foram inoculadas numa nova placa deepweel em meio SD-HIS-LEU-TRP, em concentrações crescentes de 3AT. Nesta placa também foram inoculadas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* da cepa AH109 transformadas com a construção pDEST32-GmASR3 em meios SD-LEU e SD-LEU-HIS, acrescidos de ampicilina 105 μ g/mL e concentrações crescentes de 3AT.

2.6. Sequenciamento do cDNA isolado

As culturas que tiveram sua interação confirmada no item anterior foram submetidas à extração de DNA plasmidial de leveduras, utilizando o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). O DNA extraído foi transformado em células eletrocompetentes de *E.coli* da linhagem DH5 α . Estas células foram selecionadas em meio contendo ampicilina 50

$\mu\text{g/mL}$ e tiveram seus plasmídeos extraídos, visualizados em gel de agarose 1% p/v e enviados para sequenciamento.

3. Técnicas de Biologia Molecular

Todas as técnicas de Biologia Molecular que não estão descritas na presente dissertação, como preparo de géis de agarose e plasmídeos, transformação de bactérias, digestão de DNA por enzimas de restrição, preparo de tampões e soluções estoques foram conduzidas de acordo com Sambrook et al.(1989).

V - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Mono híbrido

1.1. Identificação e caracterização da região promotora do gene GmASR3

Após análise *in silico* da região promotora utilizando o programa PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), foram encontrados diversos cis-elementos relacionados à resposta a estresses abióticos, como estresse por luminosidade (Box 4, G-Box, GA-motif, GAG-motif, I-Box, e MRE), choque térmico (HSE) e seca (MBS); resposta a estresse biótico (ARE), elementos comuns a promotores e enhancers (CAAT-Box), e elementos de expressão tecido-específica (CAT-Box e SKn-1_motif) (figura 1). Há predominância de elementos comuns a promoters e enhancers (16 CAAT box), seguida do elemento MBS, que aparece duas vezes. Os demais elementos são encontrados apenas uma vez na sequência estudada (figura 2).

Anteriormente foi estudado o padrão de expressão de proteínas GmASR em tecidos diferentes, sendo que a presença de elementos de regulação tecido-específica corrobora os resultados obtidos por Bucker-Neto (2010).

Como já observado por diversos autores, as proteínas ASR possuem papel relevante na resposta a estresses, sendo expressas em plantas submetidas a estas condições. Isso explica a presença de cis-elementos para ligação de fatores de transcrição relacionados a estresses (Dai, 2010, Henry, 2010, Iusen, 193). Os fatores que se ligam aos cis-elementos relacionados à seca e ao choque térmico (MBS e HSE, respectivamente), provavelmente estarão representados na biblioteca de cDNA de soja, pois esta foi produzida em condições de estresse osmótico e de retículo, este último também causado durante o choque térmico pelo acúmulo de proteínas mal dobradas na célula (Alves, 2011).

```

+ AAATIGCTTC TATTTCTAT AACGTGCTAT ATATTTCATT TTTTTCCAA TTATGACTTC ATTAAAAAAA
- TTTAACGAAG ATAAAAGATA TTGCACGATA TATAAAGTAA AAAAAAGTT AATACTGAAG TAATTTTTTT

+ ATCAATCAA ATTATTGTT TTAAGAAAAT GAATATTTTC TTTAAAATAT AAATTGATAC AAGAAATTAT
- TAGTTAAGTT TAATAAACAA AATTCTTTTA CTTATAAAG AAATTTTATA TTAACTATG TTCTTTAATA

+ TTCTTCACAT ATTITTTAGG AATTTAAATC ACATTATTGA TATTCAATA AACCAGTTAA ATAATATCAT
- AAGAAGTGA TAAAAAATCC TTAAATTAG TGTAAATACT ATAAGTTAAT TTGGTCAATT TATTATAGTA

+ GAATCCTCAA TTCITGTTGA TAAGCCATAG TGGCCCCATG CATATCGCGG AAGATTTTTT TTTTTTTTCA
- CTTAGGAGTT AAGAACAAC TATCGGTATC ACCGGGGTAC GTATAGCGCC TTCTAAAAAA AAAAAAAGT

+ TCTCCAAATA AGAGITTTCC ACAACTGTAA ACACTGTTAG TTCAGAGTCC AAAATTAGAA GATATATGGA
- AGAGGTTTAT TCTCAAAAGG TGTGACATT TGTGACAATC AAGTCTCAGG TTTAATCTT CTATATACCT

+ TAGTTAGGGA AGCTAGATTA ATTTAGATT CTAAATCATT CATAAAATAA TTTATTATGG CCTACCAAGG
- ATCAATCCCT TCGATCTAAT TAAATCTAAA GATTTAGTAA GTATTTTATT AAATAATACC GGATGGTTCC

+ AAGGTGCACC TAACCAACCA ATCACACAAG GTCAACAAAA TGATCATCAA TTTATAAATA GATAACCTAA
- TTCCACGTGG ATTGGTTGGT TAGTGTGTC CAGTTGTTTT ACTAGTAGT AAATAITTTAT CTATTGGAIT

+ GCTTCCCA
- CGAAGGT

```

 ARE	 CAT-box	 CAAT-box	 HSE	 MRE
 Box 4	 G-Box	 GA-motif	 I-box	 Skn-1_moti
 Box-W	 G-box	 GAG-motif	 MBS	

Figura 1: Análise dos cis- elementos presentes na região de 500pb a montante do códon de iniciação da transcrição. Os cis- elementos encontrados estão marcados na sequência e mostrados na legenda com cores características.

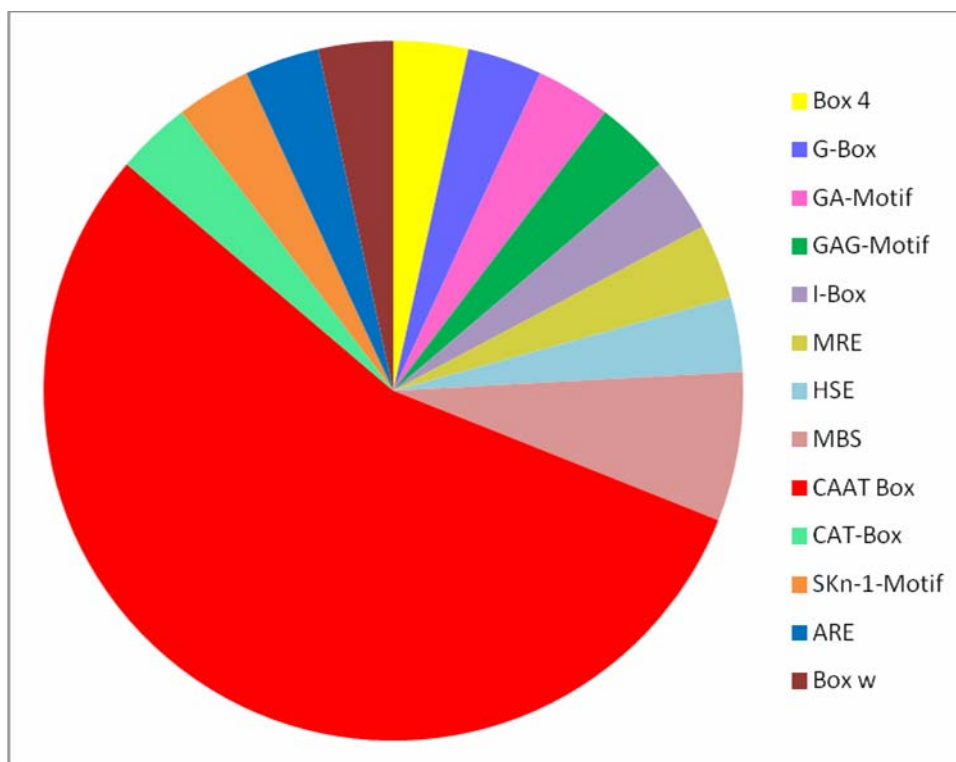


Figura 2: Análise dos cis-elementos encontrados na região promotora de GmASR3.

1.2. Obtenção da construção pHISp500GmASR3

O DNA genômico de soja foi obtido com êxito a partir do método de CTAB e PVP em três das quatro extrações (poços 2, 3 e 4 da figura 3). A visualização em gel de agarose mostrou a extração eficiente do DNA que foi utilizado para os passos subsequentes de clonagem.

A figura 4 apresenta o gel para a visualização da reação de amplificação da região promotora de GmASR3. Como esperado, a visualização em gel de agarose mostrou uma banda em torno de 500 pb. Este fragmento foi chamado p500GmASR3. A reação foi realizada com a enzima AccuTaq™ LA DNA Polymerase (Sigma), para diminuir os erros causados pela amplificação.

Após a reação de ligação do fragmento p500GmASR3 ao pGem-T e posterior seleção de colônias brancas, estas foram submetidas a reação de PCR de colônias com os primers Rv_Soja_SacI e Fw_soja_EcoRI p500, que demonstrou que as colônias selecionadas estavam clonadas com a região promotora de GmASR3.

A figura 5 mostra o gel de agarose com a digestão dupla do plasmídeo pGEM-p500GmASR3 com as enzimas SacI e EcoRI em duas colônias

diferentes. Houve a digestão esperada para as colônias selecionadas (figura 5), resultando no fragmento da região promotora de 500 pb que possui extremidades coesivas com o plasmídeo pHIS2.1, previamente digerido com as mesmas enzimas. Após a ligação, o plasmídeo pHIS2.1 portando o fragmento da região promotora foi chamado de pHISp500GmASR3

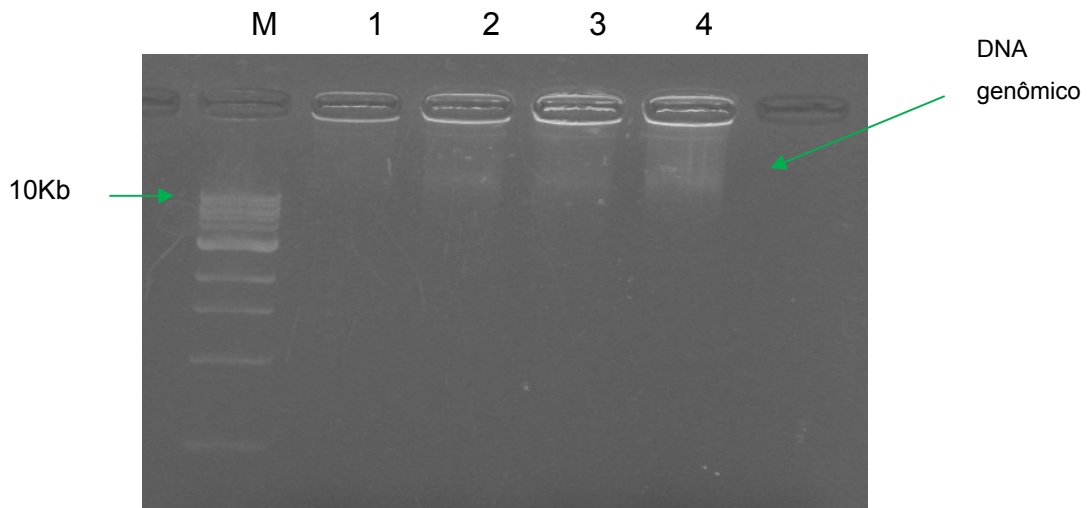


Figura 3: Extração de DNA genômico de soja. M- marcador molecular 1kb DNA Ladder (BioLabs). 1, 2, 3 e 4- extrações do DNA genômico de folhas de soja.

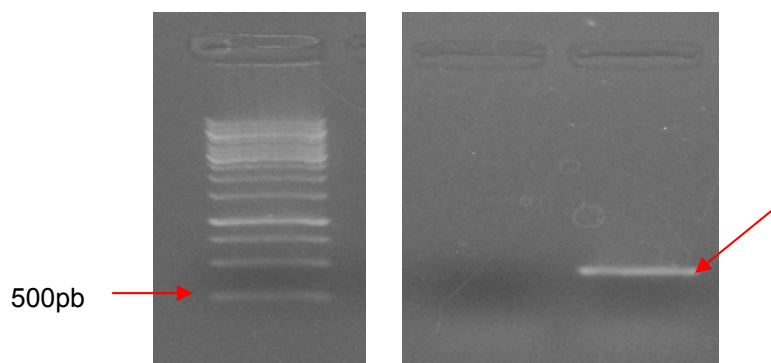


Figura 4: Obtenção da região promotora de GmASR3. M- 1 μ L de marcador 1kb DNA Ladder (BioLabs); 1- controle negativo, 2- banda em torno de 500pb obtida após reação de PCR.

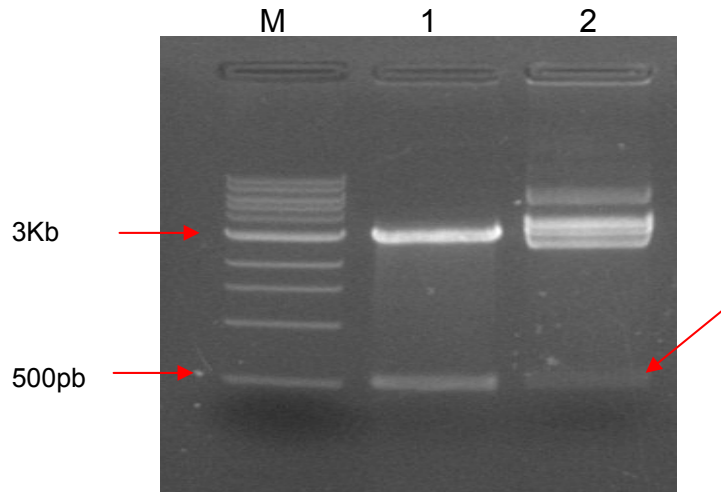


Figura 5: Digestão dupla com as enzimas *SacI* e *EcoRI*. M-marcador 1kb DNA Ladder (BioLabs), 1 e 2- Digestão dupla do plasmídeo pGemp500GmASR3. Indicado na seta: fragmento de interesse (em 1 e 2)

1.3. Triagem líquida de cDNAs que codificam proteínas que se ligam ao promotor de GmASR3.

Após transformação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* da estirpe W303 com o plasmídeo pHISp500GmASR3, a confirmação foi realizada através de PCR de colônia com primers específicos e as leveduras confirmadas foram utilizadas para a triagem líquida.

A triagem pelo método do mono-híbrido de leveduras foi realizada utilizando-se meio seletivo deficiente em histidina e triptofano, ao qual foi adicionado 3AT na concentração de 5 mM. Esta concentração foi escolhida tomando por base o experimento realizado com o controle negativo, que consistiu de leveduras transformadas com a construção pHISp500GmASR3 e não co-transformadas com a biblioteca de cDNA. Estas não eram capazes de crescer neste meio a partir de concentrações de 2mM de 3AT. Este reagente é um inibidor competitivo da atividade da enzima HIS3, que possui papel na biossíntese de histidina. Assim, leveduras que não estejam expressando o gene HIS3 (que estará sob controle do promotor de GmASR3) em grande quantidade não conseguirão sobreviver em um meio acrescido de 3AT. A

triagem resultou em seis culturas selecionadas como positivas (Tabela 4), que posteriormente foram caracterizadas quanto à capacidade de crescimento em meio SD-TRP-HIS adicionado de concentrações crescentes de 3AT (figura 6).

0,0391	0,0391	0,039	0,0388	0,1549	0,2072	0,0408	0,0417	0,0471	0,0406	0,0413
0,0386	0,0378	0,0378	0,0566	0,0942	0,0394	0,4372	0,0384	0,041	0,0411	0,039
0,0398	0,0402	0,0389	0,037	0,0479	0,0403	0,0444	0,0378	0,0383	0,6194	0,0417
0,0415	0,0448	0,038	0,0395	0,0392	0,039	0,0399	0,0383	0,0445	0,0465	0,6336
0,0456	0,0384	0,039	0,0397	0,0382	0,0385	0,0407	0,0397	0,0445	0,0408	0,0398
0,0422	0,0434	0,0385	0,0383	0,0381	0,0385	0,0386	0,0391	0,046	0,0391	0,0399
0,0386	0,0389	0,0453	0,042	0,0393	0,0395	0,0385	0,0459	0,045	0,0394	0,0501
0,0384	0,0388	0,0387	0,0443	0,0462	0,0376	0,0368	0,0391	0,037	0,0455	0,0482

Tabela 4: D.O das culturas obtidas em placa deepwell após a triagem líquida. Os clones selecionados como portadores de possíveis fatores que interagem com o promotor de GmASR3 estão marcados de azul.

A figura 6 mostra a DO alcançada após 4 dias de crescimento em diferentes concentrações de 3AT para as 6 culturas positivas na triagem com 5mM de 3AT (MH1 – MH6). Destas culturas, até o momento, apenas a cultura MH3 teve seus plasmídeos extraídos e retransformados em *E. coli* DH5α com sucesso. Estes foram novamente extraídos e enviados para sequenciamento. As demais culturas também terão seus plasmídeos enviados para sequenciamento.

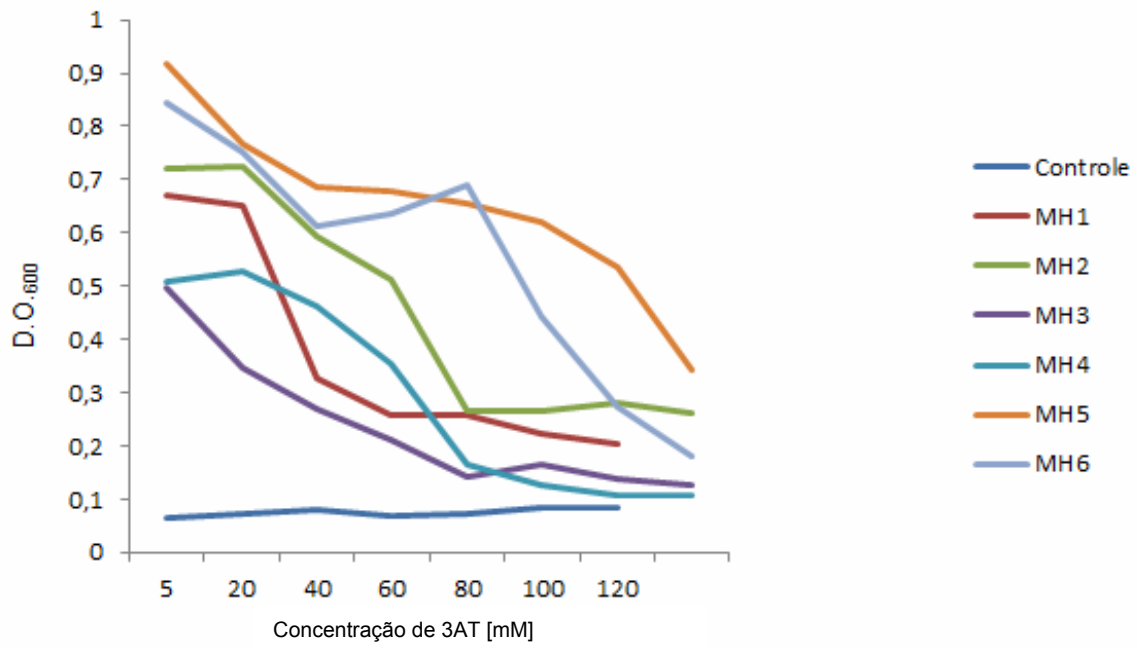


Figura 6: Crescimento em concentrações de 3AT de 5mM até 120mM de culturas positivas durante a triagem líquida realizada com 5mM.

2. Duplo Híbrido

2.1. Obtenção do gene GmASR3 e análise de bioinformática

A sequência analisada no banco de dados do Phytozome retornou as sequências preditas para o cDNA de 336 pb e para uma proteína GmASR3 de 111 aminoácidos, entre outras (Figura 7). A sequência peptídica predita foi analisada com o programa CLC Main WorkBench (www.clcbio.com) e seu ponto isoelétrico e massa molecular foram estimados em 6,67 e 12,6 KDa, respectivamente.

▣ CDS sequence [336 nucleotides]

```
>Glyma16g28150.1 CDS
ATGGCTGAGGAGAAGCACCACCACCACTTCCACCACCACAAGGGCGATGATGTGCCTGGCGAGGTTGATTATAAGAAGGAGGAGAAGCACCACAAGCATC
TTGAGCACCTTGGGGAACTTGGTGCTGCGGCTGCCGGTGCTTATGCCTTGCATGAGAAGCATGAGGCCAAGAAAGACCCAGAGCATGCTCACAGGCACAA
GGTAGAAGAGGAGATTGCGGCAGCAGCTACTGTTGGTGCTGGTGGTTTTGTCTTGCATGAACACCATGAGAAAAAGGAAGTTAAGAAAGAAGATGAGGAA
GCTCATGGAAAGAAGCACCACCATCTGTTTGGCTGA
```

▣ Peptide sequence [111 residues]

```
>Glyma16g28150.1
MAEEKHHHFFHHKGGDDVPGEVDYKKEEKHHKLEHLGELGAAAAGAYALHEKHEAKKDPEHAHRHKVEEIIAAAATVGAGGFVLHEHHEKKEVKKEDEE
AHGKHHHLFG*
```

Figura 7: Sequências preditas para o cDNA e para a proteína GmASR3. As cores separam as sequências originadas por éxons diferentes.

A construção pENTR-GmASR3, cedida por Bucker-Neto (2010), foi utilizada como molde para a reação de PCR com AccuTaq™ LA DNA Polymerase (Sigma). Como explicado no item 2.1 dos materiais e métodos, os fragmentos amplificados possuíam em suas extremidades uma parte da sequência para anelamento nos primers attB1 e attB2, que foram utilizados posteriormente para nova amplificação (figura 9). Assim como esperado, houve amplificação de um fragmento em torno de 300pb, que por sua vez foi inserido em pDONR (item 2.2 dos materiais e métodos). A construção obtida foi chamada de pDONR-GmASR3.

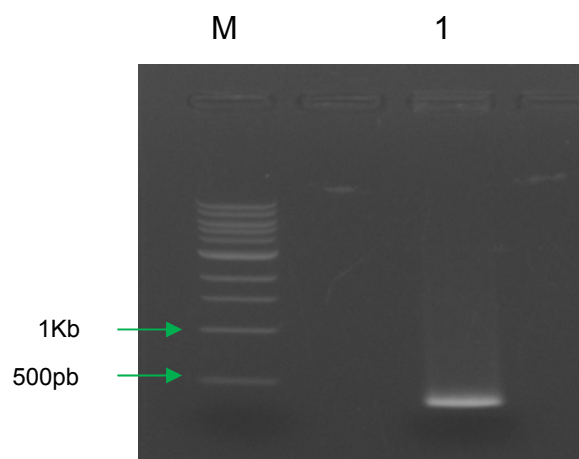


Figura 8: Obtenção do gene GmASR3.
M- 1kb DNA Ladder (BioLabs), 1-
fragmento em torno de 300pb.

2.2. Clonagem em vetor pDest32.

Cepas de *E. coli* DH5 α portando a construção pDONR-GmASR3 foram confirmadas através de PCR de colônia com os primers explicitados na tabela 2 dos materiais e métodos. O gel da amplificação esta representado na figura 9, que mostra que todos os clones testados são portadores do gene GmASR3.

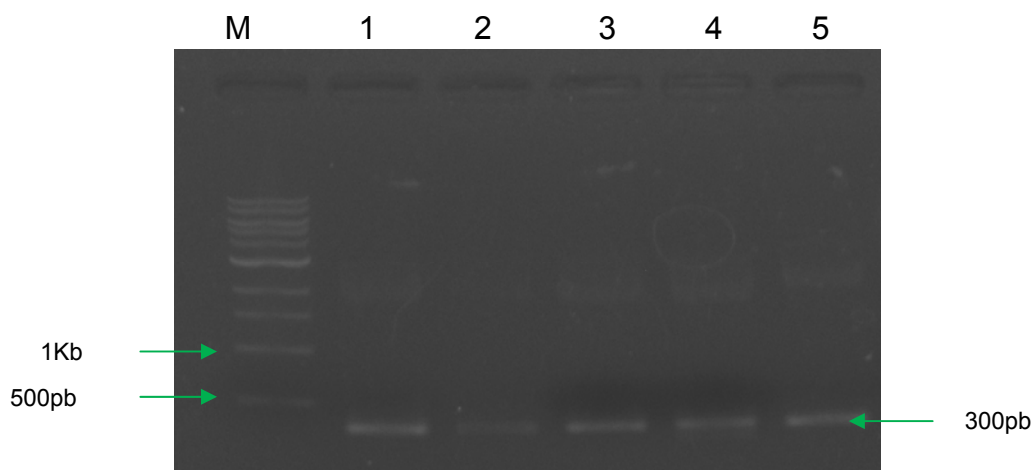


Figura 9: Confirmação de transformantes portadores de pDONR-GmASR3. M- 1kb DNA Ladder (BioLabs), 1, 2, 3, 4, 5- fragmentos em torno de 300pb obtidos após PCR de colônia.

Após a extração, a construção foi utilizada para reação de LR clonase, obtendo-se, então, a construção pDest32-GmASR3, que foi inserida em bactérias *E. coli* DH5 α e confirmadas através de PCR de colônia (figura 10). Os clones confirmados tiveram seu DNA plasmidial extraído e estes foram

utilizados para transformar leveduras *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem AH109.

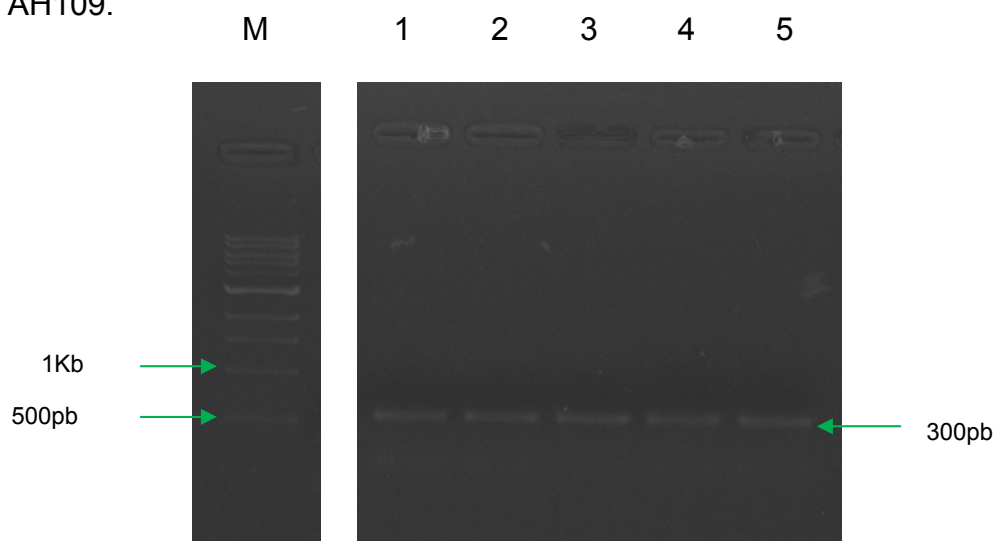


Figura 10: Confirmação de células clonadas com a construção pDest32-GmASR3. M- 1kb DNA Ladder (BioLabs), 1, 2, 3, 4, 5- fragmentos em torno de 300pb obtidos após PCR de colônia.

2.3. Ensaio de transativação

As leveduras transformadas com pDest32-GmASR3 não foram capazes de crescer em meio SD- Leu-His sólido. O crescimento em meio líquido foi fraco, mas foi possível realizar o ensaio para a medida de atividade da enzima β -galactosidase (figura 11). Como controle negativo, foram utilizadas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* da cepa AH109 portadora do plasmídeo pDest32 vazio. O ensaio realizado mostrou que a proteína GmASR3 sozinha possui uma capacidade fraca de ativação da transcrição em leveduras, o que possibilitou a realização do experimento de duplo-híbrido para verificar a interação de GmASR3 com outras proteínas.

A capacidade de transativação demonstrada para a proteína GmASR3 é corroborada por experimentos anteriores realizados com a proteína FaASR (Chen *et al*, 2012). Foi verificado que a capacidade de ativar a transcrição dos genes repórteres está relacionada à porção N-terminal da proteína. Também foi testada a capacidade de ativação da transcrição de FaASR através da transcrição dos genes repórteres *LacZ* e *His3* em leveduras AH109, de forma

semelhante ao estudo presente, porém utilizando um sistema de verificação da capacidade de transcrição qualitativo, enquanto a medida da atividade da enzima β -galactosidase é um sistema quantitativo, em que pode-se inferir sobre o nível, ou a “força” da ativação da transcrição do gene repórter *LacZ*.

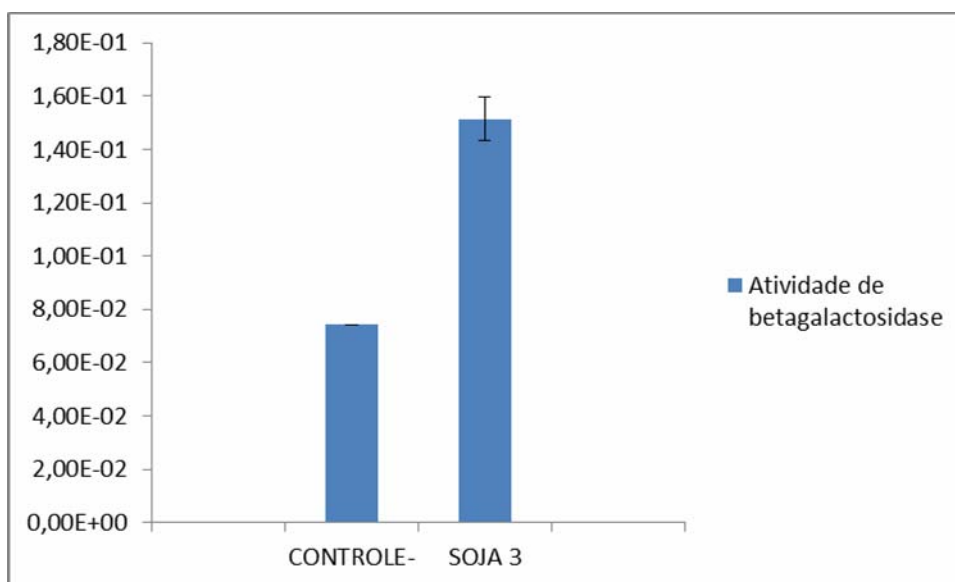


Figura 11: gráfico da atividade de β -galactosidase e desvio-padrão. A diferença da atividade de β -galactosidase entre pDest32-GmASR3 e o controle negativo foi significativa de acordo com o teste T de student.

2.4. Triagem líquida de fatores que se ligam à proteína GmASR3 a partir do sistema de duplo-híbrido em leveduras

As culturas que possivelmente contém fatores que interagem com a proteína GmASR3 foram selecionadas como sendo aquelas que apresentaram crescimento (DO_{600}) igual ou superior a 0,181 em triagem realizada com concentração de 3AT de 20 mM (tabela 5). A concentração de trabalho escolhida para a triagem foi baseada na ausência de crescimento demonstrada por células de *Saccharomyces cerevisiae* da cepa AH109 transformadas com a isca (pDest32-GmASR3) mas não co-transformadas com a biblioteca de cDNA para esta concentração de 3AT em experimentos anteriores. Assim como no mono-híbrido, as quatro culturas selecionadas (DH1- DH4) foram avaliadas

quanto à capacidade de crescimento em concentrações crescentes de 3AT (Figura 12).

Tabela 5: Escolha de culturas que contém fatores que possivelmente interagem com a proteína GmASR3. A figura mostra as DO₆₀₀ obtidas durante a triagem e as culturas selecionadas como positivas – indicadas em azul.

0,1922	0,0735	0,1239	0,1168	0,1396	0,1494	0,1081	0,1151	0,1355	0,1571	0,1437	0,1445
0,1286	0,126	0,1466	0,181	0,1684	0,1263	0,09	0,1014	0,1085	0,0994	0,1119	0,14
0,1379	0,1035	0,1163	0,1194	0,1395	0,1608	0,0883	0,105	0,0904	0,1013	0,0527	0,098
0,1563	0,1352	0,1158	0,1005	0,106	0,113	0,0821	0,1055	0,0963	0,0967	0,1106	0,1124
0,1048	0,1102	0,1093	0,1087	0,0978	0,1193	0,0955	0,1507	0,102	0,1124	0,1059	0,1246
0,1426	0,1231	0,1222	0,1064	0,1454	0,1221	0,0978	0,1231	0,1057	0,105	0,118	0,1266
0,1475	0,1817	0,1329	0,1115	0,115	0,1328	0,1081	0,1455	0,1075	0,1077	0,1118	0,1183
0,1635	0,1542	0,1807	0,1942	0,1393	0,1144	0,1364	0,1193	0,1045	0,1354	0,1453	0,1739

Após ser inoculada para a avaliação, a cultura DH3 foi descartada pelo crescimento fraco durante a fase de pré-inóculo. A figura 12 mostra o crescimento das demais culturas em concentrações crescentes de 3AT. Os resultados mostram que não apenas a cultura DH3, como também as culturas DH4 e DH2 não foram capazes de crescer em meio com pequenas concentrações de 3AT. Assim, foram considerados falsos positivos e somente a cultura DH1 teve seu DNA enviado para sequenciamento. Houve crescimento da cultura DH1 em concentrações de 3AT que chegam a 90 mM, em contraste com o controle negativo (leveduras não transformadas com a biblioteca de cDNA). O crescimento da cultura DH1 foi semelhante ao obtido pelo controle positivo, que consistiu de leveduras que não foram transformadas com a biblioteca, porém foram inoculadas em meio que continha histidina.

Em ambos os experimentos de mono-híbrido e duplo-híbrido foi verificado por microscopia que havia apenas leveduras nas culturas, descartando-se, assim, a hipótese de contaminação por bactérias durante o experimento.

A análise do promotor de GmASR, o ensaio de transativação e até o fato da levedura transformada apenas com pDest32-GmASR3 crescer em meio contendo até 20mM de 3AT trazem indícios de que a proteína GmASR3 é possível transfator de soja relacionado a estresses abióticos.

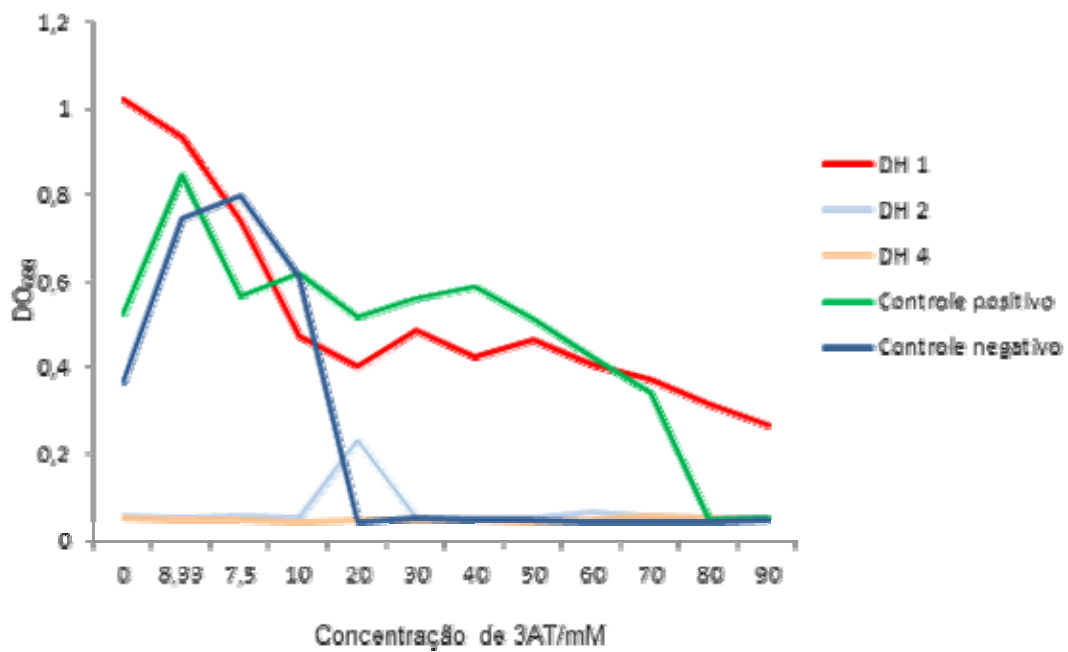


Figura 12: Crescimento em concentrações de 3AT de 0 a 90mM das culturas que foram capazes de crescer durante a triagem. Em vermelho a cultura que foi considerada positiva, que foi capaz de crescer até em 90mM de 3AT. Em Azul escuro, o controle negativo, contendo a proteína GmASR3, porém sem a biblioteca de cDNA. Em verde, o controle positivo, que consiste do mesmo controle negativo, mas com meio contendo Histidina. As demais linhas mostram que os resultados DH2 e DH4 são falsos positivos

Concentração de 3AT [mM]

O protocolo de triagem líquida é suficientemente maleável para ser utilizado tanto em experimentos de duplo-híbrido quanto em experimentos de mono-híbrido, não só em biologia molecular de plantas, mas em diferentes tipos de análises de interações. A opção de escolha de maiores D.O.₆₀₀ ou de todas as culturas crescidas trás a opção de estudar todas as interações, ou apenas aquelas que são mais fortes nas condições utilizadas, assim como no caso da escolha de culturas que crescem em maiores concentrações de 3AT ou não. A análise de interações a partir do método de mono e duplo híbrido trazem ainda algumas desvantagens, por serem baseados numa biblioteca de cDNA; entre elas, a possibilidade de “falsos negativos” explicada por Vidal e Legrain (1999), em que a não detecção de uma determinada interação pode acontecer não só pela ausência de interação entre as proteínas, mas também pela estabilidade da própria proteína no sistema empregado, caso que ocorre com algumas proteínas quinases, que são tóxicas quando expressas em grande quantidade e não podem ser empregadas como isca; a ausência da proteína nas bibliotecas de DNA, pois estas são construídas refletindo o nível de transcrição dos cDNAs que a compõem, assim, no caso do experimento de mono-híbrido realizado no presente trabalho, há uma dificuldade extra na identificação de interações realizadas com o promotor do gene GmASR3 pela própria natureza das proteínas que interagem com esta isca de DNA, uma vez que pela necessidade de uma fina regulação nas respostas moleculares, as proteínas que regulam a transcrição de um determinado DNA provavelmente serão produzidas em pequenas quantidades e terão sua concentração na célula regulada de forma a serem rapidamente degradadas. Além disso, *in vivo* podem acontecer modificações pós-traducionais que não estarão presentes nos sistemas utilizados para o estudo da interação (Koegl e Uetz, 2008).

Ao comparar-se os dois experimentos (mono-híbrido e duplo-híbrido) realizados no presente trabalho nota-se que há maior dificuldade em identificar fatores que interagem nos experimentos de mono-híbrido, do que em experimentos de duplo híbrido.

VI - CONCLUSÕES

Verifica-se que a proteína GmASR3 possui uma capacidade de transativação fraca, motivo pelo qual foi possível buscar proteínas que interagem com esta e possibilita a ativação da transcrição do gene repórter contido no sistema utilizado. Os fatores que interagiram com o promotor de GmASR3 e com a própria proteína nas condições estudadas foram enviados para sequenciamento e podem vir a ser fatores – chave para o estudo da via que leva ao aumento de ASR celular em diversos organismos, uma vez que ainda não há pesquisa realizada visando a identificação do promotor de ASR em outras plantas. Este estudo ainda contribui para a adequação de um método de triagem mais rápido e com a maleabilidade necessária para ser utilizado em experimentos posteriores neste e em outros laboratórios.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves MS, Reis PA, Dadalto SP, Faria JA, Fontes EP, Fietto LG (2011) A Novel Transcription Factor, ERD15 (Early Responsive to Dehydration 15), Connects Endoplasmic Reticulum Stress with an Osmotic Stress-induced Cell Death Signal. *J Biol Chem.* 2011 Jun 3;286(22):20020-30.

Bai S, Willard B, Chapin LJ, Kinter MT, Francis D M, Stead AD, Jones ML (2010) Proteomic analysis of pollination-induced corolla senescence in petunia. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 61, No. 4, pp. 1089–1109

Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias AA (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol* 148(1):6–24

Bücker-Neto L, Oliveira R R, Arenhart R A, Pinheiro-Margis M, Passaglia L M P, Bodanese-Zanettini M H (2009) Caracterização da família gênica ASR (*abscisic acid, stress, and ripening*) de soja [*glycine max* (L.) Merrill]. REUNIÃO DE PESQUISA DA SOJA DA REGIÃO SUL, 3, Porto Alegre, 2009. Programa e resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2009

Bücker-Neto L (2010) Caracterização de genes codificantes de proteínas ASR (ABA, STRESS and RIPENING) de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] com potencial para conferir menor suscetibilidade ao déficit hídrico. 93f. (*Magister Scientiae*)- Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2010.

Çakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A, Delrot S, Atanassova R (2003) A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15(9):2165–2180

Carrari F, Fernie AR, Iusem ND (2004) Heard it through the grapevine? ABA and sugar cross-talk: the ASR story. *Trends Plant Sci* 9(2):57–59

Chen J, Liu, Jiang Y, Zhao M, Shan W, Kuang J, Lu W (2012) Molecular Characterization of a Strawberry FaASR Gene in Relation to Fruit Ripening. *PLoS ONE* 6(9):1-14

Conab (2011) Acompanhamento de safra brasileira: grãos, Segundo levantamento, novembro 2011 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: 12-14.

Dai J R, Liu B, Feng D R, Liu H V, He Y, Qi K, Wang H, Wang J F (2010) MpAsr encodes an intrinsically unstructured protein and enhances osmotic tolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Cell Rep* DOI 10.1007/s00299-011-1030-1.

Doyle JJ, Doyle JL, Brown AH, Grace JP (1990) Multiple origins of polyploids in the Glycine tabacina complex inferred from chloroplast DNA polymorphism. Proc Natl Acad Sci U S A. 87(2):714-7.

Embrapa

(<http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/soja/snpc.htm>)

Acesso: 17/06/12

Goldgur Y, Rom S, Ghirlando R, Shkolnik D, Shadrin N, Konrad Z, Bar-Zvi D (2007) Desiccation and zinc binding induce transition of tomato abscisic acid stress ripening 1, a water stress- and salt stress-regulated plant-specific protein, from unfolded to folded state. Plant Physiol 143(2):617–628

Henry IM, Carpentier SC, Pampurova S, Van Hoylandt AV, Panis B, Swennen R, Remy S Structure and regulation of the Asr gene family in banana. *Planta* [S.l.], Jun 1 2011.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

(http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201209_2.shtm). Acesso: 16/10/12.

Iusem ND, Bartholomew DM, Hitz WD, Scolnik PA (1993) Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening. Plant Physiol 102(4):1353–1354

Jeanneau, M., Gerentes, D., Foueillassar, X., Zivy, M., Vidal, J. Toppan, A. and Perez, P. (2002) Improvement of Drought tolerance in Maize: towards the functional validation of the Zm-Asr1 gene and increase of water use efficiency by overexpressing C4-PEPC. Biochimie 84, 1127–1135.

Kalifa Y, Gilad A, Konrad Z, Zaccari M, Scolnik PA, Bar-Zvi D (2004a) The water- and salt-stress-regulated Asr1 (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. Biochem J 381(Pt 2):373–378

Kariola T, et al.(2006) Early Response to Dehydration 15, a negative regulator of abscisic acid responses in Arabidopsis. Plant Physiol. 142(4) 1559-1573.

Kogel M, Uetz P (2008) Improving yeast two-hybrid screening systems. Briefings in Functional Genomics and Proteomics. 6(4) 302-312

Liu H-Y, Dai J-R, Feng D-R, Liu B, Wang H-B, Wang J-F (2010) Characterization of a novel plantain Asr gene, MpAsr, that is regulated in response to infection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and abiotic stresses. J Integr Plant Biol 52(3):315–323

Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. Arch. Biochem. Biophys. 444 (2) 139-158.

Maskin L, Gudesblat GE, Moreno JE, Carrari FO, Frankel N, Sambade A, Rossi M, Iusem ND (2001) Differential expression of the members of the Asr gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Sci* 161(4):739

Maskin L, Frankel N, Gudesblat G, Demergasso MJ, Pietrasanta L, Iusem ND: Dimerization and DNA-binding of ASR1, a small hydrophilic protein abundant in plant tissues suffering from water loss. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 352 (2007) 831–835.

Maskin L, Maldonado S, D. Iusem N D: Tomato leaf spatial expression of stress-induced Asr genes. *Mol Biol Rep* (2008) 35:501–505.

Pang CH, Wang BS (2008) Oxidative stress and salt tolerance in plants. In: Lu'ttge U, Beyschlag W, Murata J (eds) *Progress in botany*. Springer, Berlin, pp 231–245.

Pareek A, Sopory SK, Bohnert HJ, Govindjee, Majumder AL, Sengupta S, Goswami L (2010) Osmolyte regulation in abiotic stress. In: *Abiotic stress adaptation in plants*. Springer, The Netherlands, p 349.

Philippe R, Courtois B, McNally KL, Mournet P, El-Malki R, Le Paslier MC, Fabre D, Billot C, Brunel D, Glaszmann JC, This D (2010) Structure, allelic diversity and selection of *Asr* genes, candidate for drought tolerance, in *Oryza sativa* L. and wild relatives. *Theor Appl Genet* 121:769–787

Riccardi F, Gazeau P, Jacquemot MP, Vincent D, Zivy M (2004) Deciphering genetic variations of proteome responses to water deficit in maize leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:1003–1011

Rom S, Gilad A, Kalifa Y, Honrad Z, Karpasas MM, Goldgur Y, Bar-Zvi D (2006) Mapping the DNA- and zinc-binding domains of ASR1 (abscisic acid stress ripening), as abiotic-stress regulated plant specific protein. *Biochimie* 88: 621-628.

Saumonneau A, Agasse A, Bidoyen MT, Lallemand M, Cantereau A, Medici A, Laloi M, Atanassova R (2008) Interaction of grape ASR proteins with a DREB transcription factor in the nucleus. *FEBS Lett* 582(23–24):3281–3287.

Sambrook J, et al. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

Sugiharto B, Ermawati N, Mori H, Aoki K, Yonekura-Sakakibara K, Yamaya T, Sugiyama, Sakakibara H (2002) Identification And Characterization Of A Gene Encoding Drought-Inducible Protein Localized In The Bundle Sheath Cell Of Sugarcane. *Plant cell physiol.* 43(3): 350-354

Urano K, et al. (2010) 'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 13(2): 132-138.

Urtasun N, García S C, Iusem N D, Moretti M B: Predominantly Cytoplasmic Localization in Yeast of ASR1, a Non-Receptor Transcription Factor from Plants. *The Open Biochemistry Journal*, 2010, 4, 68-71.

Vaidyanathan R, Kuruvilla S, Thomas G (2004) Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from rice. *Plant Science* 140 (1999) 21–30

Vidal M, Legrain P (1999) Yeast forward and reverse 'n'-hybrid systems. *Nucleic Acids Research* 27(4): 919-929.

Wang H J, Wang H J, Hsu C M, Jauh G Y, Wang C S (2005) A lily pollen ASR protein localizes to both cytoplasm and nuclei requiring a nuclear localization signal. *Physiologia Plantarum* 23: 314–320.

Yang CY, Chen YC, Jauh GY, Wang CS (2005) A Lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol* 139(2):836–846.

Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK (2002) Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. *The Plant Cell* S165-S183.

3. Bancos de Dados e programas utilizados:

- MEGA

<http://www.megasoftware.net/>

- NCBI:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>

- Phytozome:

<http://www.phytozome.net/soybean.php>

- PlantCARE

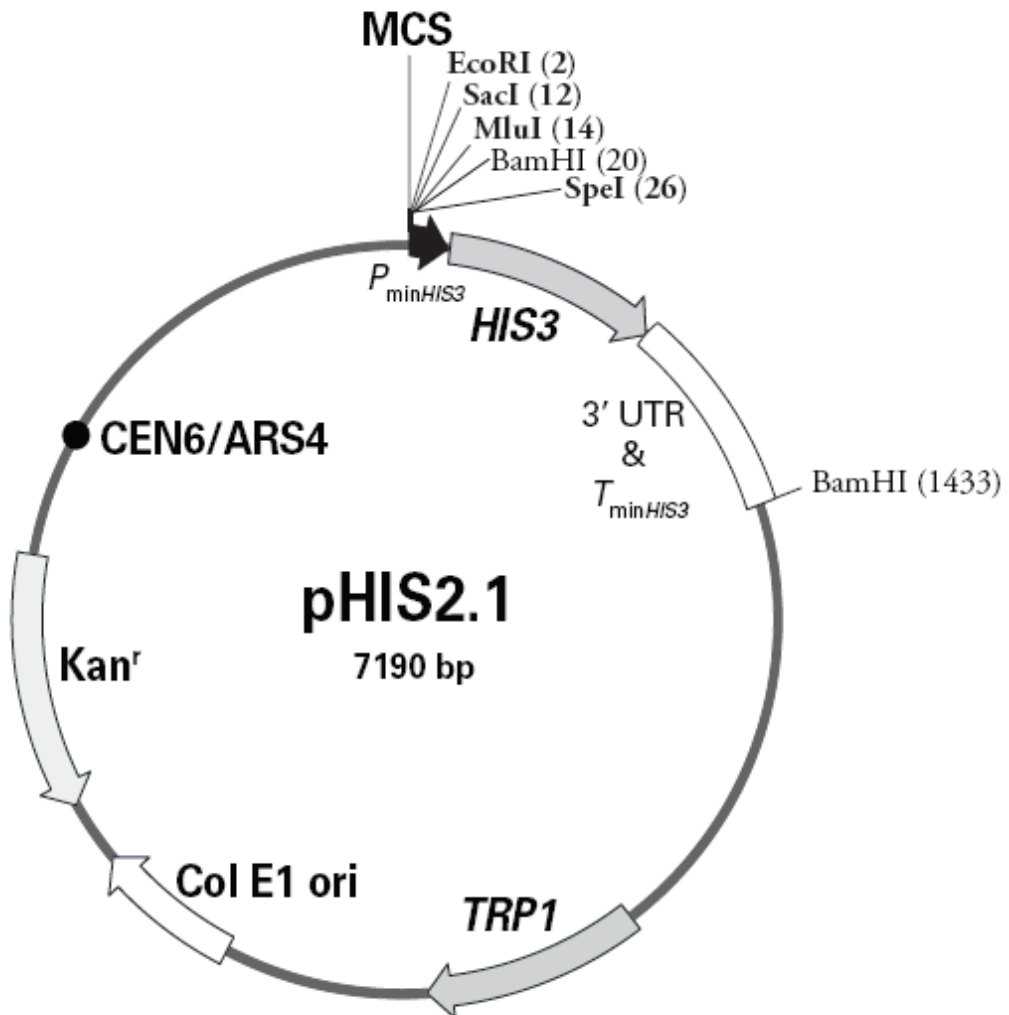
<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>

- CLC Main WorkBench

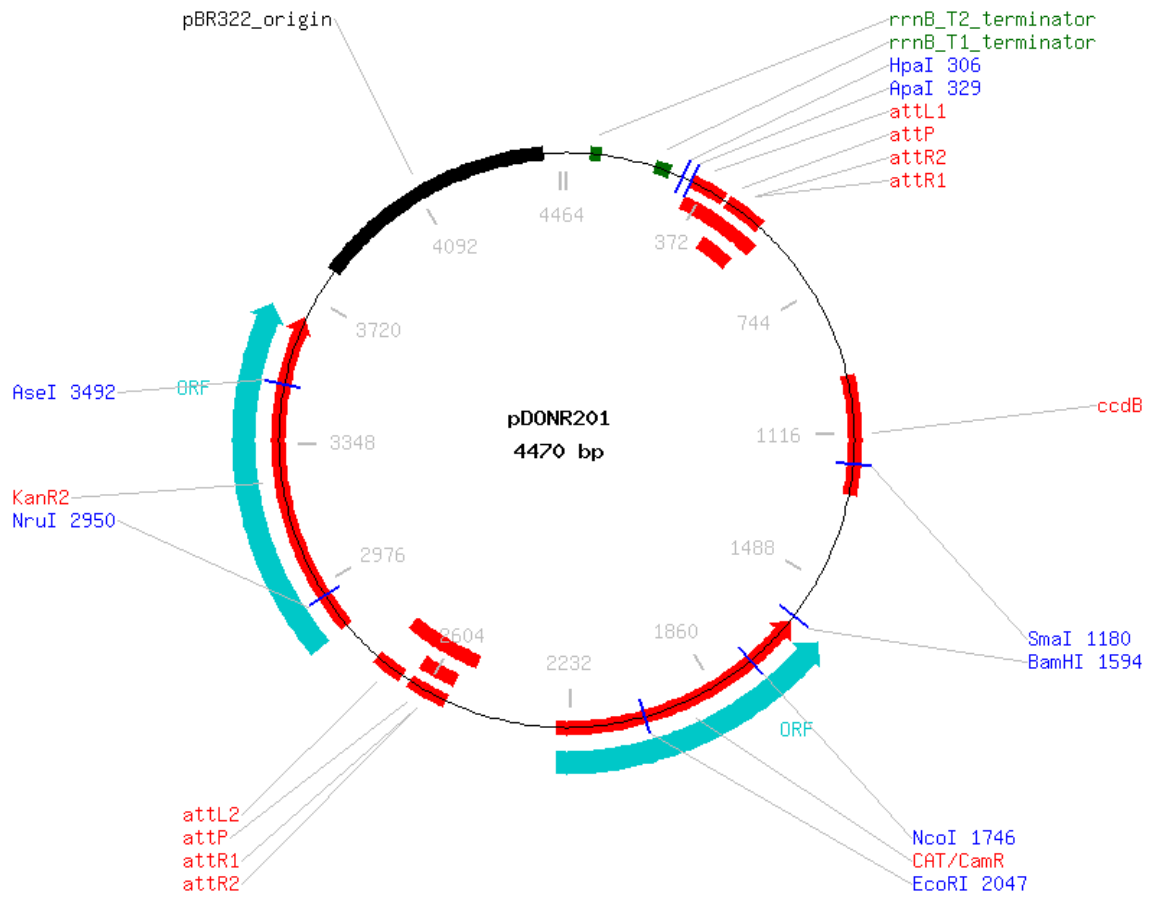
www.clcbio.com

ANEXO 1: VETORES UTILIZADOS

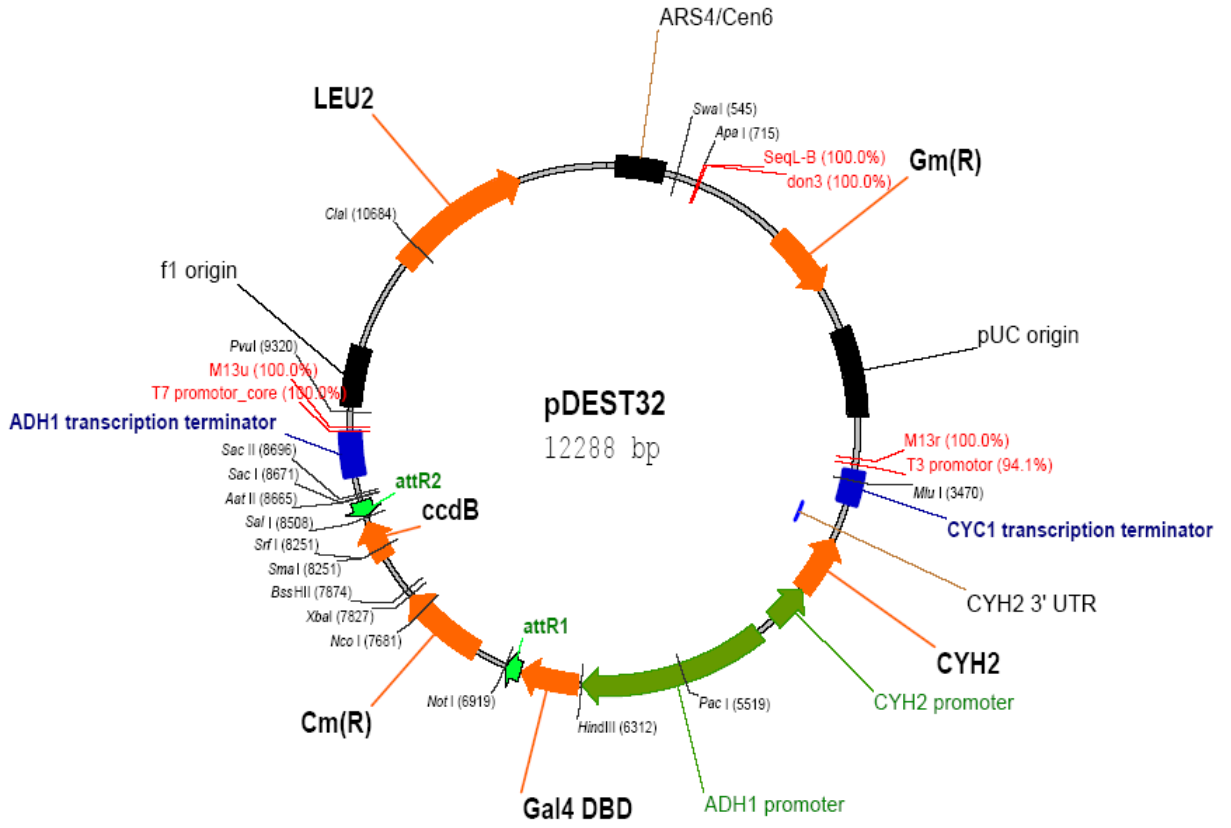
pHIS2.1 (Clontech)



pDONR201 (Invitrogen)



pDEST32 (Invitrogen)



pEXP-AD502 (Invitrogen)

