

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DANIELI CRISTINA GONÇALVES

“ESTUDOS INICIAIS DE INTERAÇÕES DA HSP90 ATRAVÉS DA CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE UM TRANSGÊNICO E BIOFÍSICA DE UMA CO-CHAPERONA”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Danieli Cristina Gonçalves
Carlos Ramos
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção do Título
de Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos
Co-Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Campinas, 2012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

G586e	<p>Gonçalves, Danieli Cristina, 1986- Estudos iniciais de interações da Hsp90 através da caracterização funcional de um transgênico e biofísica de uma co-chaperona / Danieli Cristina Gonçalves. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Carlos Henrique Inácio Ramos. Coorientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p style="text-align: center;">1. Chaperonas moleculares. 2. Co-chaperonas. 3. Proteínas de choque térmico HSP90. 4. Plantas transgênicas. 5. Interações proteína-proteína. I. Ramos, Carlos Henrique Inácio. II. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães, 1964-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Insights on Hsp90 chaperone interactions using transgenic and biophysical approaches

Palavras-chave em Inglês:

Molecular chaperones

Co-chaperones

Chaperones

HSP90 heat shock proteins

Transgenic plants

Protein-protein interactions

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Carlos Henrique Inácio Ramos [Orientador]

Michel Georges Albert Vincentz

Ljubica Tasic

Data da defesa: 23-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 23 de fevereiro de 2012

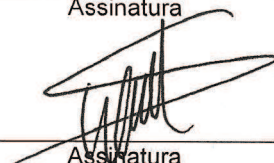
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos (Orientador)



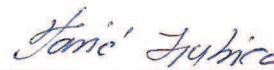
Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz



Assinatura

Profa. Dra. Ljubica Tasic



Assinatura

Prof. Dr. Renato Vicentini dos Santos

Assinatura

Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi de Arruda

Assinatura

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "Estudo inicial das interações de Hsp90 através da caracterização funcional de um transgênico e biofísica de uma co-chaperona".

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

(X) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança, projeto No. CHIR 2010-1, Instituição: Instituto de Química - IQ / UNICAMP

() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto No. _____, Instituição: _____

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.

Danieli C. Gonçalves 23/2
Aluno: Danieli Cristina Gonçalves

Carlos Ramos
Orientador: Carlos Henrique Inácio Ramos

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Marcelo Lancellotti
Carimbo e assinatura

Prof. Dr. MARCELO LANCELOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP



Solicitação/Procolo: CHIR 2010-1

Nome do aluno: Danieli Cristina Gonçalves.

Nível: mestrado

Período: 03/2010 – 02/2012

Nome do orientador: Carlos H. I. Ramos

Resumo:

As chaperonas moleculares exercem papel fundamental no controle de qualidade protéico celular, sendo expressas tanto constitutivamente como em condições de estresse. Estão envolvidas com o auxílio ao enovelamento e degradação de proteínas e, portanto, com a manutenção e modulação de várias vias celulares, vias estas dependentes da função protéica (correto enovelamento) e da disponibilidade (estabilidade e degradação) das proteínas envolvidas. Estudos visando identificar processos e genes-chave para a formação de madeira apontam que as chaperonas podem desempenhar um importante papel neste mecanismo, tornando esta uma importante área de investigação. Resultados preliminares nos grupos de pesquisa envolvidos neste projeto indicam expressão diferencial de algumas chaperonas moleculares tanto em cana de açúcar, quando submetidas a diversas condições de estresse, quanto em eucalipto, quando se compara *Eucalyptus globulus* (espécie com bom rendimento e qualidade de madeira) com outras espécies do mesmo gênero. No nosso grupo, diversas chaperonas recombinantes de cana de açúcar já foram produzidas e caracterizadas quanto à conformação e estabilidade. O objetivo deste projeto é a superexpressão de algumas destas chaperonas de cana de açúcar em *Arabidopsis thaliana* como modelo para o estudo da influência destas proteínas na produção de biomassa. Dada a importância fisiológica e biotecnológica deste processo, os resultados têm o potencial de auxiliar programas de melhoramento de espécies, como as do gênero *Eucalyptus*, visando a introdução de características úteis à produtividade e qualidade.

O projeto de pesquisa acima descrito, a ser conduzido pela aluna de mestrado Danieli Cristina Gonçalves, recebeu autorização desta Comissão Interna de Biossegurança.

Presidente em exercício da CIBio-IQ: Carlos H. I. Ramos

Dedico

Aos meus pais Ermelinda e Amilton, e ao meu irmão Rodrigo, família fonte inesgotável de amor, conforto e força.

Ao meu noivo Kadu, companheiro das horas certas e incertas.

Aos meus amigos, irmãos que a vida me deu.

À Deus.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, saúde, motivação e força para trabalhar.

À minha família. Vocês são minha razão de ser e viver. São minha fonte de amor incondicional, minha base e centro, meus exemplos de honestidade, humildade, zelo, força e vontade de se superar e ser cada dia melhor. Ermelinda e Amilton, meus pais, e Rodrigo, meu irmão, amo vocês!

Ao Kadu, meu noivo, por estar ao meu lado em todas as horas, meu amigo fiel e companheiro.

Muito obrigada pela compreensão, pelo respeito, paciência, amor e por sempre acreditar em mim.

Você é muito especial, te amo!

Aos meus amigos, irmãozinhos enviados por Deus. Aos amigos que me acompanham desde a infância e adolescência, aos amigos da ETECAP e da UNICAMP. Muito obrigada pelos conselhos, amizade, cumplicidade e momentos de alegria.

Ao Prof. Dr. Carlos Ramos, a quem considero meu 'pai científico'. A oportunidade de trabalhar durante quase 6 anos em seu grupo foi fundamental para minha formação. Muito obrigada por acreditar em meu potencial, pela orientação e pela oportunidade do Mestrado.

Ao Prof. Dr. Gonçalo Pereira, co-orientador deste trabalho. Agradeço as valiosas discussões, conselhos, e divertidas conversas. Também pela estrutura de trabalho oferecida no Laboratório de Genômica e Expressão.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Bioquímica de Proteínas pelas ricas discussões científicas, pela ajuda com as metodologias, pela convivência e amizade. Sentirei muitas saudades de todos vocês! Gostaria de agradecer especialmente a Melissa R. Fessel e Viviane C. Heinzen da Silva pela ajuda com a revisão deste trabalho, discussão dos resultados e auxílio na metodologia de *Western Blot*, e ao Thiago C. Cagliari, Julio C. Borges e a Lisandra M. Gava pela orientação dos trabalhos com a proteína Hop. Agradeço também à Veruska M. Soares e Fábio A. Schaberle pelo auxílio com os trabalhos realizados no LNBio. E à Bárbara L. T. Santos, Michelle Alexandrino

e Jéssica B. B. de Souza pelo apoio técnico e por organizarem e zelarem pelo laboratório de forma exemplar.

Aos colegas do Laboratório de Genoma e Expressão pelo auxílio com as técnicas relacionadas ao cultivo e transformação de *A. thaliana*. Ao Leandro C. Nascimento pelo auxílio com os dados de RNAseq, à Marcela M. Salazar, Eduardo L. O. Camargo, Wesley L. Marques, e Jorge Lepikson-Neto pelo aprendizado e amizade.

Ao Prof. Piotr Mieczkowski (*University of North Carolina at Chapel Hill*) pelo acesso à técnica de sequenciamento de RNAm, e ao Javier C. Alvarez por construir as bibliotecas e realizar o sequenciamento.

À empresa International Paper pelo auxílio financeiro e as instituições de fomento FIRCA-NIH, CNPq, CAPES e FAPESP. Em especial a FAPESP pela concessão de minha bolsa de estudos. A UNICAMP e ao LNBio (Laboratório Nacional de Biociências) pela estrutura oferecida para o desenvolvimento do trabalho.

A toda equipe do programa de pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, em especial a Profa. Carmem Veríssima Ferreira e a Andréia Aparecida Vigilato pela estrutura oferecida pelo programa e pela atenção dedicada aos alunos.

Aos Professores Celso E. Benedetti, Fernanda R. Gadelha e Michel G. A. Vincentz, que fizeram parte de minha banca de qualificação, com contribuições muito importantes para a versão final da dissertação. Aos membros da banca examinadora: Michel G. A. Vincentz, Ljubica Tasic, Renato Vicentini e Marco A. Zezzi de Arruda. Muito obrigada pela atenção e disponibilidade.

À todos que direta ou indiretamente participaram deste trabalho, que é fruto de muitas e valiosas interações, meu muito obrigada!

*“A mente que se abre a uma nova idéia nunca mais volta ao seu tamanho original.”
(Albert Einstein)*

SUMÁRIO

Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiii
Abreviações	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xx
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Chaperonas moleculares e enovelamento protéico	2
1.2. Hsp90	5
1.3. Hop (<i>Hsp70-Hsp90 Organizing Protein</i>).....	14
1.4. Chaperonas e o potencial biotecnológico em plantas	16
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivos gerais	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. MATERIAIS	22
3.1. cDNA plasmidial	22
3.2. Oligonucleotídeos e enzimas	23
3.3. Vetores para clonagem e expressão.....	24
3.4. Cepa de <i>A. tumefaciens</i>	24
3.5. Cepas de <i>E. coli</i>	25
3.6. Cultivo e transformação de <i>A. thaliana</i>	25
3.7. Soluções e meios de cultura	26
4. MÉTODOS.....	34
4.1. Manipulação de ácidos nucleicos.....	34
4.2. Montagem dos interatomos.....	36
4.3. Estratégia de clonagem da Hsp90 de cana-de-açúcar	36
4.4. Estratégia de clonagem da Hop D456G.....	40
4.5. Preparo de células competentes (<i>E. coli</i>).....	43
4.6. Transformação de células competentes (<i>E. coli</i>) e seleção dos transformantes.....	44
4.7. Preparo de células termocompetentes (<i>A. tumefaciens</i>)	45
4.8. Transformação de células termocompetentes (<i>A. tumefaciens</i>) e seleção dos transformantes	45
4.9. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida	45
4.10. Expressão de proteínas.....	46
4.11. Purificação de proteínas.....	46
4.13. Ensaio hidrodinâmico.....	49
4.14. Ensaio com <i>A. thaliana</i>	50
5. RESULTADOS	58
5.1. Parte A – Caracterização Funcional de uma <i>A. thaliana</i> transgênica.....	58
5.2. Parte B – Caracterização Biofísica da co-chaperona HOP.....	103
6. DISCUSSÃO.....	116
6.1. Parte A - Caracterização Funcional de uma <i>A. thaliana</i> transgênica.....	116
6.2. Parte B - Caracterização biofísica da co-chaperona Hop	121
7. CONCLUSÃO	124
7.1. A Hsp90 é uma proteína regulatória	124
7.2. A co-chaperona Hop pode ser regulada entre os estados monomérico e dimérico	124
8. REFERÊNCIAS	126
9. ANEXOS.....	136

Lista de Figuras

Figura 1: Participação das chaperonas em diferentes processos celulares	3
Figura 2: O sistema chaperona	4
Figura 3: Alinhamento múltiplo de sequencias de Hsp90 de <i>A. thaliana</i>	8
Figura 4: Hsp90 modula eventos nucleares	10
Figura 5: O ciclo ATPásico do sistema Hsp90	13
Figura 6: Arranjo estrutural da Hop e ligação do MEEVD	15
Figura 7: cDNA da Hsp82 de cana-de-açúcar	22
Figura 8: cDNA da Hop humana	23
Figura 9: Mapa do vetor pGEM-T Easy	37
Figura 10: Mapa do vetor pRT100.	38
Figura 11: Mapa do vetor pCAMBIA2300	40
Figura 12: Sistema pET de expressão	42
Figura 13: Mecanismo de infecção de <i>A. tumefaciens</i>	52
Figura 14: Alinhamento múltiplo de sequências de Hsp90 de diversos organismos	60
Figura 15: Alinhamento das sequências de Hsp90 de cana-de-açúcar, Hsp90-1, Hsp90-2, Hsp90-3 e Hsp90-4 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	62
Figura 16: Gel de agarose 1% da PCR do cDNA da Hsp90-3	63
Figura 17: Esquema da estratégia de clonagem da Hsp90-3 de cana-de-açúcar	64
Figura 18: Gel de agarose 1% da digestão pGEM-Hsp90-3 e pRT100 (<i>Xho</i> I e <i>Bam</i> HI)	65
Figura 19: Gel de agarose 1% da digestão pRT100-Hsp90-3 (<i>Pst</i> I, <i>Scal</i> e <i>Bam</i> HI) e pCAMBIA2300 (<i>Pst</i> I)	66
Figura 20: Gel de agarose 1% da digestão clones pCAMBIA2300-35S-Hsp90-3-poliA	67
Figura 21: Seleção dos transformantes de <i>A. thaliana</i>	69
Figura 22: Plantas da linhagem H90-5 (T1) com 20 dias após o plantio (DAP), apresentando alterações fenotípicas	70

Figura 23: Plantas da linhagem H90-5 (T1) com 40 dias após o plantio (DAP), apresentando alterações fenotípicas	71
Figura 24: Gel de agarose 1% da PCR do cDNA (RNA) de <i>Arabidopsis thaliana</i>	72
Figura 25: As 10 proteína mais expressas e as 10 menos expressas	89
Figura 26: Processos biológicos das proteínas diferencialmente expressas	90
Figura 27: Rede de interações da Hsp90 em <i>A. thaliana</i>	93
Figura 28: Rede de interações do ERF11 em <i>A. thaliana</i>	94
Figura 29: Western Blot de extratos protéicos de plantas transgênicas e controle	95
Figura 30: Tamanho das raízes em WT e H90-4.1	96
Figura 31: Germinação de WT e H0-4.1	97
Figura 32: Recuperação de estresse térmico (alta temperatura).	98
Figura 33: Plantas germinadas em 0,5xMS a 4°C/sem luz durante 9 dias	99
Figura 34: Germinação sob estresse salino	100
Figura 35: Comprimento das raízes sob estresse osmótico	101
Figura 36: Germinação sob estresse osmótico	102
Figura 37: Arranjo estrutural da Hop D456G	103
Figura 38: Indução da proteína	104
Figura 39: Purificação da Hop D456G	105
Figura 40: Hop D456G foi purificada enovelada	106
Figura 41: Desenovelamento térmico	107
Figura 42: Experimento de ultracentrifugação analítica – sedimentação em equilíbrio	108
Figura 43: Eletroforese em gel nativo	109
Figura 44: SEC-MALS	110
Figura 45: Experimento de gel filtração analítica	112
Figura 46: Gráfico do $D_{20,w}$ versus a concentração de proteína	113

Lista de Tabelas

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados	24
Tabela 2: Teste de qui-quadrado para a segregação em plantas T1 e linhagens T2 homozigotas selecionadas	69
Tabela 3: Sequenciamento de RNAm – transcritos mais expressos	73
Tabela 4: Sequenciamento de RNAm – transcritos menos expressos	82
Tabela 5: Medidas de diâmetro, comprimento da haste de inflorescência (altura) e massa fresca de plantas com 40 DAP	96
Tabela 6: Parâmetros espectroscópicos e de estabilidade	107
Tabela 7: Parâmetros hidrodinâmicos da HOP D456G	111
Tabela 8: Categorias de processos biológicos mais recorrentes	144
Tabela 9: Descrição das proteínas contidas na Figura 27	145
Tabela 10: Descrição das proteínas contidas na Figura 28	148

Abreviações

35S: promotor 35S

CD: Dicroísmo Circular (do termo em inglês *Circular Dichroism*)

DAP: dias após plantio

DLS: Espalhamento Dinâmico de Luz (do termo em inglês *Dinamic Light Scattering*)

FORESTs: Projeto Genoma do Eucalipto – FAPESP (do termo em inglês *Eucalyptus Genome Sequencing Project Consortium*)

FUNEP: Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia

H90-1: linhagem transgênica de Hsp90-3 (T0)

H90-2.15: linhagem transgênica de Hsp90-3 (T1)

H90-2: linhagem transgênica de Hsp90-3 (T0)

H90-3: linhagem transgênica de Hsp90-3 (T0)

H90-4.1: linhagem transgênica de Hsp90-3 (T1)

H90-4: linhagem transgênica de Hsp90-3 (T0)

H90-5: linhagem transgênica de Hsp90-3 (T0)

Hop: *Hsp70-Hsp90 organizing protein*

HSP: Proteína de choque térmico (do termo em inglês *Heat Shock Protein*)

Hsp100: *Heat Shock Protein* de 100 kDa

hsp104: gene de levedura homólogo a Hsp100

Hsp60: *Heat Shock Protein* de 60 kDa

Hsp70: *Heat Shock Protein* de 70 kDa

Hsp90: *Heat Shock Protein* de 90 kDa

Hsps: *Heat shock proteins*

HtpG: Hsp90 de bactéria

IPTG: isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo

PQC: Controle de qualidade proteico (do termo em inglês *Protein Quality Control*)

SE: Sedimentação em Equilíbrio

SEC-MALS: Cromatografia de exclusão molecular acoplada a espalhamento de luz multi-ângulo (do termo em inglês *Size-Exclusion Chromatography Multi-Angle Light Scattering*)

smHsp: chaperona de baixa massa molecular (do termo em inglês *small molecular heat shock protein*)

SUCEST: Projeto de sequenciamento de EST de cana-de-açúcar (do termo em inglês *Sugarcane EST Project*)

T0: transformantes primários

T1: primeira geração de transformantes

T-DNA: DNA de transferência

UCA: Ultracentrifugação Analítica

WT: tipo selvagem (do termo em inglês *wild type*)

RESUMO

RESUMO

Chaperonas moleculares (*Heat Shock proteins - HSPs*) são componentes chave do sistema de controle de qualidade de proteínas (*PQC – Protein Quality Control*), que é essencial para a vida, sendo responsável por manter a homeostase proteica e a adequada função de diversas vias. Problemas no processo de enovelamento estão relacionados a doenças degenerativas, amilóides e câncer. Em plantas, as chaperonas moleculares desempenham um papel crucial na proteção contra estresses bióticos e abióticos, pois como organismos sésseis, as plantas devem ser capazes de responder rapidamente a mudanças na temperatura, salinidade, déficit hídrico, entre outros.

A chaperona molecular Hsp90 (*Heat Shock protein 90 kDa*) compreende uma família ubíqua, considerada um ‘*hub*’ por interagir com chaperonas, co-chaperonas e ter como clientes proteínas regulatórias essenciais como fatores de transcrição, quinases, receptores de hormônios, entre outros. A Hsp90 age em conjunto com co-chaperonas, as quais modulam e direcionam sua função.

Uma destas co-chaperonas é a Hop (*Hsp70-Hsp90 organizing protein*), capaz de interagir simultaneamente com a Hsp90 e Hsp70, mediando a transferência de substratos. A Hop é composta por três domínios com repetições de tetratricopeptídeos (TPR) (TPR1, TPR2A e TPR2B), responsáveis pela interação com as chaperonas, porém a dinâmica desta interação não está bem entendida, uma vez que ainda não há estrutura da Hop inteira e o estado oligomérico desta co-chaperona ainda é controverso na literatura.

Neste trabalho apresentamos a classificação de um gene de Hsp90 de cana-de-açúcar, e o início de sua caracterização funcional através de transgenia em *Arabidopsis thaliana*. Apresentamos também a caracterização biofísica de uma importante co-chaperona da Hsp90, a Hop (*Hsp70-Hsp90 organizing protein*) humana.

Através da análise de sequências a Hsp90 de cana-de-açúcar foi classificada como Hsp90-3, uma isoforma citosólica. Plantas transgênicas de *A. thaliana*, produzidas a partir da inserção do gene da Hsp90-3 de cana-de-açúcar, apresentaram níveis reduzidos de Hsp90. Tal perturbação nos níveis de Hsp90 parece ter afetado a expressão de outras proteínas da rede de interações, relacionadas com processos diversos como resposta imune e fotossíntese. As plantas transgênicas também exibiram germinação mais rápida e raízes mais longas em relação ao controle. Sob estresse térmico, linhagens transgênicas apresentaram maior suscetibilidade à alta temperatura em relação ao controle. Tais resultados sugerem que a Hsp90 tem um importante papel na fisiologia celular e no desenvolvimento, e que os níveis de Hsp90 são críticos para a resposta frente a estresses.

A caracterização biofísica do mutante Hop D456G, uma mutação no domínio TPR2B, mostrou que esta proteína é uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros maiores, porém com prevalência do estado monomérico. O resíduo D456 pode ter uma participação na dinâmica de dimerização e é possível que o estado oligomérico da Hop seja regulado entre os estados monomérico e dimérico, com a finalidade de facilitar sua atividade adaptadora.

Palavras-chave: Chaperonas moleculares, Co-chaperonas, Proteína de choque térmico Hsp90, Plantas transgênicas, Interações proteína-proteína.

ABSTRACT

ABSTRACT

Molecular chaperones (heat shock proteins - HSPs) are key components of protein quality-control system (PQC - Protein Quality Control), which maintains protein homeostasis and the proper function of several pathways, being essential for life.

Defects in folding processes are related to degenerative diseases, amyloidosis and cancer. In plants, which as sessile organisms must be able to respond rapidly to changes in temperature, salinity, water deficit, and others, molecular chaperones play a crucial role in protecting against such biotic and abiotic stresses.

Molecular chaperone Hsp90 (Heat Shock Protein 90 kDa) comprise an ubiquitous family, considered a *hub* as it interacts with chaperones, co-chaperones, and have as clients key regulatory proteins such as transcription factors, kinases, hormone receptors, and others. The chaperone acts together with co-chaperones, which modulate and guide Hsp90 function.

The co-chaperone Hop (Hsp70-Hsp90 organizing protein), interacts simultaneously with Hsp90 and Hsp70, mediating substrate transfer. Hop has three TPR domains (TPR1, and TPR2A TPR2B) responsible for interaction with the chaperones, but this interaction dynamics remains unclear, since there is no structure of full length Hop and its oligomeric state is controversial in literature reports.

This work presents the classification of an Hsp90 gene from sugarcane, and primary functional characterization studies in *Arabidopsis thaliana* transgenic lines. We also present the biophysical characterization of the human Hsp90 co-chaperone Hop (*Hsp70-Hsp90 organizing protein*).

Through sequence analysis the Hsp90 from sugarcane has been classified as Hsp90-3, a cytosolic isoform. Transgenic *A. thaliana*, produced by Hsp90-3 insertion, exhibited reduced transcript levels of Hsp90. This disruption in Hsp90 levels seems to affect the expression of other proteins from the interaction network, which are related to various processes such as

immune response and photosynthesis. Transgenics also exhibited faster germination and longer roots than the control. Under heat stress, transgenic lines showed increased susceptibility to high temperature. These results suggest that Hsp90 has an important role in cellular physiology and development; in addition the levels of Hsp90 are critical for responses to stresses.

The biophysical characterization of the mutant D456G Hop, a mutation in domain TPR2B showed that this protein is a mixture of monomers, dimers and higher oligomers, but the monomeric state is majoritary. The residue D456 may be involved in dimerization dynamics, and it is possible that Hop is regulated between monomeric and dimeric species, to enable its adaptor functions.

Keywords: Molecular chaperones, Co-chaperones, Heat Shock Protein Hsp90, Transgenic plants, Protein-protein interactions.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Chaperonas moleculares e enovelamento protéico

As proteínas são biopolímeros de aminoácidos sintetizados nos ribossomos e são as macromoléculas biológicas mais versáteis e estruturalmente complexas, responsáveis por diversos processos celulares (Alberts et al, 2002). As cadeias polipeptídicas sintetizadas adotam uma estrutura tridimensional característica, que é essencial para a estabilidade e atividade biológica na célula. A estrutura tridimensional das proteínas é adquirida através do enovelamento protéico e mantida, principalmente, por interações não-covalentes entre cadeias laterais de aminoácidos (Wegele et al, 2004; Ramos & Ferreira, 2005). Estudos pioneiros realizados por Christian Anfinsen e colaboradores (Anfinsen et al, 1961; Anfinsen, 1973), demonstraram com experimentos *in vitro* que o processo de enovelamento de uma proteína é autônomo e não requer fatores adicionais para ocorrer. Foi sugerido então que a estrutura tridimensional característica de uma proteína poderia ser formada espontaneamente *in vivo* assim que a cadeia polipeptídica deixasse o ribossomo.

Sabe-se que nem todas as proteínas são capazes de alcançar ou manter sua estrutura nativa em condições de estresse, que algumas proteínas são intrinsecamente desenoveladas, e que o ambiente celular não favorece o enovelamento correto de proteínas multi-domínios (Ramos & Ferreira, 2005). Sabe-se também que as células possuem um elaborado sistema, capaz de prevenir o enovelamento incorreto e a agregação de proteínas, tornando e/ou mantendo-as estáveis e funcionais em condições nas quais estariam desenoveladas ou agregadas, por exemplo. Nesse elaborado sistema estão envolvidas proteínas denominadas genericamente de 'Chaperonas Moleculares' (Borges & Ramos, 2005; Tirolí-Cepeda & Ramos, 2011) que, como sugere o termo em inglês *Chaperone* ("dama de companhia"), assistem o enovelamento protéico e previnem interações indesejáveis (Walter & Buchner, 2002). As chaperonas, de uma maneira geral, ligam e estabilizam polipeptídeos, facilitando seu enovelamento correto sem causar modificações na estrutura primária. As chaperonas também participam da translocação de proteínas através de membranas e organelas (Hartl & Hayer-Hartl, 2002), na entrega de substratos para proteólise (Shimmer et al, 1996) e na recuperação de proteínas agregadas (Sanchez & Lindquist, 2000), como ilustrado na figura 1.

As chaperonas foram inicialmente descritas como proteínas de choque térmico (ou *Heat Shock Proteins - HSP*), pois sua síntese é aumentada em células submetidas ao estresse térmico. Porém, estudos posteriores mostraram que as chaperonas também respondem a outros tipos de estresses e possuem síntese constitutiva, sendo importantes na manutenção da homeostase

celular em condições ótimas e adversas (Lindquist & Craig, 1988). Hoje, sabe-se que algumas chaperonas não são HSP e vice-versa.

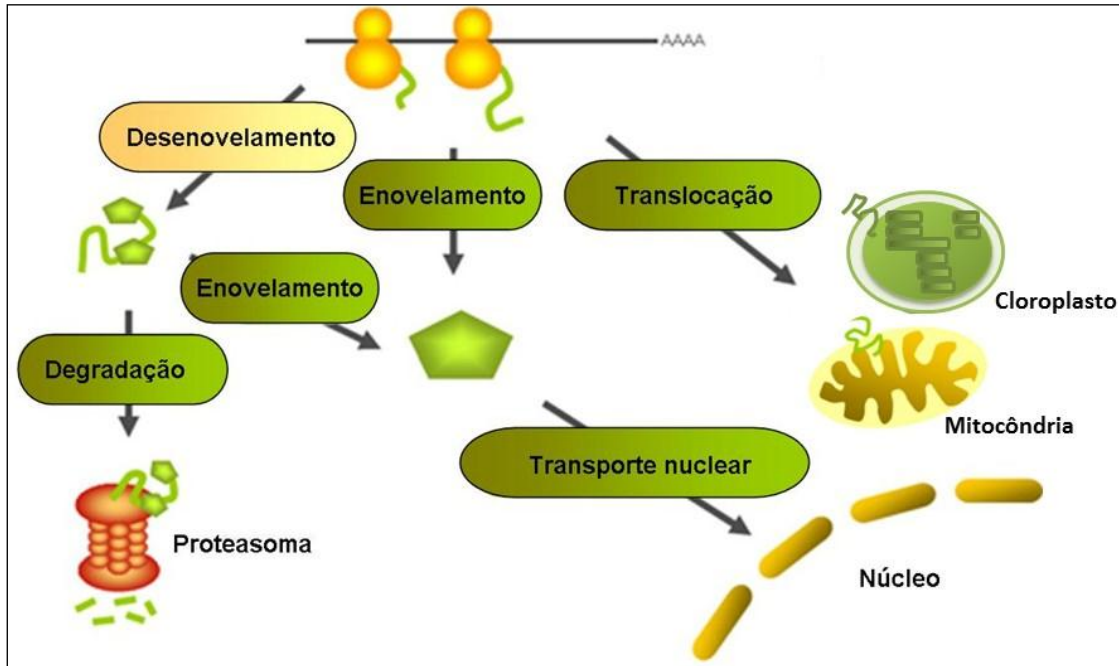


Figura 1: Participação das chaperonas em diferentes processos celulares. As chaperonas estão envolvidas em diversos processos celulares como vias de enovelamento, degradação (Hsp90, Hsp70, Hsp100), translocação para organelas (Hsp90, Hsp70) e transporte nuclear (Hsp90) (Adaptado de Ji-Sook Hahn, 2007 [<http://biomolecule.snu.ac.kr/research.html>] e Baniwal et al, 2004)

Adicionalmente, as chaperonas atuam como parte de um complexo sistema de “controle de qualidade protéico” (em inglês PQC), reconhecendo, mantendo e marcando proteínas desenoveladas para possível degradação (Welch & Brown, 1996; Tiroli-Cepeda & Ramos, 2011). Com um importante papel na transdução de sinal, as chaperonas co-evoluíram como componentes de redes de sinalização celular, e podem atuar na maturação e regulação da transição entre estados inativos e ativos de moléculas de sinalização tais como receptores, reguladores transcricionais e proteínas quinases (Gaestel, 2006).

As chaperonas são classificadas em famílias, de acordo com a sua massa molecular bem como pela análise da similaridade de sequencias, sendo as cinco principais: smHsp (*small molecular Hsp*), Hsp60, Hsp70, Hsp90 e Hsp100 (Borges & Ramos, 2005; Tiroli-Cepeda & Ramos, 2011), presentes tanto no citoplasma e organelas como núcleo, retículo endoplasmático, mitocôndria e cloroplastos (Waters et al, 1996). As principais classes de Hsps (representadas na figura 2) são conservadas em procaríotos e eucariotos (Borges & Ramos, 2005).

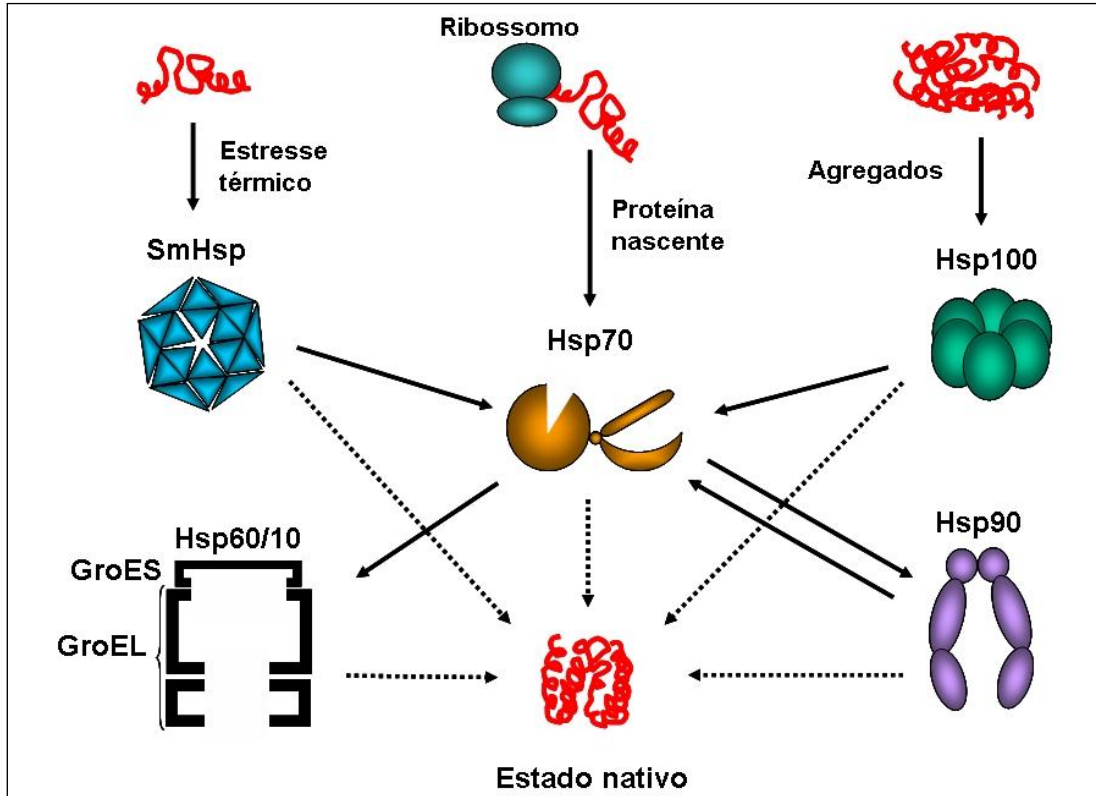


Figura 2: O sistema chaperona. As chaperonas também são conhecidas como *HSP* (*Heat Shock Protein*) e são classificadas de acordo com a massa molecular. As SmHsp (small molecular Hsp) são chaperonas de baixa massa molecular que ligam e estabilizam proteínas parcialmente enoveladas, protegendo-as de agregação ou desnaturação irreversíveis. A Hsp100 atua na desagregação proteica, mas não é capaz de reenovelar substratos, assim precisa colaborar com a maquinaria da Hsp70, que tem um papel central no enovelamento proteico, pois distribui substratos entre diferentes chaperonas além de prevenir a agregação e promover o enovelamento, translocação e degradação de polipeptídeos. A Hsp90 na manutenção da conformação, estabilidade e função de uma grande variedade de proteínas envolvidas em transdução de sinal, controle do ciclo celular e apoptose. O sistema Hsp60/Hsp10 é responsável por enovelar substratos parcialmente desenovelados (Adaptado de Borges & Ramos, 2005).

As chaperonas de baixa massa molecular (*small heat shock proteins – smHsps*) apresentam de 12 a 43 kDa e formam oligômeros de 9 a 50 subunidades. São proteínas ubíquas e diversas que em situações de estresse ligam proteínas parcialmente enoveladas e previnem a agregação e a desnaturação irreversíveis. SmHsps respondem a uma grande variedade de estresses ambientais, incluindo calor, frio, seca, salinidade e estresse oxidativo (Vierling, 1991).

No sistema Hsp60/Hsp10 as proteínas substrato parcialmente enoveladas entram na cavidade central da Hsp60 onde estão protegidas da agregação através de contatos hidrofóbicos. A ligação de ATP promove duplicação do volume da cavidade, dando origem a uma 'gaiola' com

um ambiente propício para o enovelamento para uma única molécula de proteína. A Hsp10 atua como uma ‘tampa’, responsável pelo fechamento e abertura da cavidade da Hsp60 (Horwich & Fenton, 2009). Adicionalmente, em células de mamíferos (mitocôndrias) foram encontradas como parte de complexos pré-apoptóticos (Samali et al, 1999).

O sistema Hsp70 tem um papel central no processo de enovelamento protéico, pois recebe e distribui substratos entre as demais famílias de chaperonas para que o estado nativo das proteínas substrato seja atingido (Borges e Ramos, 2005). A Hsp70 atua na prevenção da agregação e reenovelamento de proteínas em condições normais e de estresse (Frydman, 2001). Também está envolvida em processos de translocação e importação de proteínas, e na facilitação da degradação de proteínas instáveis, encaminhando-as para lisossomos ou proteassomos (Hartl, 1996).

A família Hsp100 atua na desagregação e degradação protéica, porém não é capaz de renovar substratos sem a cooperação com o sistema Hsp70 (Tiroli-Cepeda & Ramos, 2011). É essencial para a aquisição de termotolerância em *Arabidopsis* (Queitsch et al, 2000), e a deleção do gene *hsp104* em leveduras impede a recuperação de proteínas agregadas em células expostas a condições de estresse térmico (Glover & Lindquist, 1998).

A família Hsp90 está envolvida na manutenção da conformação, estabilidade e função de uma grande variedade de proteínas envolvidas em transdução de sinal, controle do ciclo celular e apoptose. Hsp70 e Hsp90 cooperam formando uma maquinaria com papel central na proteção dos organismos frente a estresses ambientais e genéticos, além do enovelamento de clientes. Na seção a seguir serão abordados detalhes da estrutura e função de Hsp90.

1.2. Hsp90

As Hsp90 (*Heat Shock Protein 90*) caracterizam uma família de chaperonas moleculares encontrada de bactérias a eucariotos, porém, aparentemente, ausente em *Archaea* (Wegele et al, 2004). A Hsp90 representa cerca de 1 a 2% do total de proteínas celulares na ausência de estresse (Welch & Feramisco, 1982), no entanto sua expressão é aumentada em temperaturas elevadas e outros estresses ambientais (Sangster & Queitsch, 2005). É indispensável para a sobrevivência de células eucarióticas, ao passo que a homóloga de bactérias (HtpG) parece desempenhar um papel acessório em condições de estresse. Em células humanas a proteína pode ser encontrada no citoplasma, núcleo, mitocôndria e retículo endoplasmático, e em plantas pode ser encontrada com distribuição semelhante, adicionalmente em cloroplastos (Sreedhar et al, 2004; Krishna & Gloor, 2001). Participa da ativação e estabilização de mais de 200 proteínas, chamadas de ‘clientes’ (Trepel et al, 2010; da Silva & Ramos, 2012).

Em eucariotos, a Hsp90 é codificada por uma família multigênica com proteínas estruturalmente relacionadas que variam de 80-180 kDa. Devido a ligeiras variações em suas massas moleculares, esses homólogos têm sido representados na literatura por diferentes nomes (Hsp80, Hsp81, Hsp82, Hsp83, Hsp84, Hsp90, etc.).

No genoma humano foram encontrados 16 genes com sequencia codificante de Hsp90, porém apenas 5 foram descritos como funcionais: Hsp90AA (Hsp90 α_1 e Hsp90 α_2 , citosólicas com expressão induzível), Hsp90AB (Hsp90 β , citosólica com expressão constitutiva), TRAP1 (mitocôndria) e Hsp90B (GRP94, retículo endoplasmático) (Chen et al, 2005; Chen et al, 2006)

A análise dos genomas de *Arabidopsis* permitiu a identificação de 7 genes de Hsp90, divididos em quatro grandes subgrupos, cada um com uma localização distinta: citosol, cloroplastos, mitocôndrias e retículo endoplasmático. Foram identificados 4 genes diferentes que codificam Hsp90 citosólica (Hsp90-1, Hsp90-2, Hsp90-3 e Hsp90-4), 1 gene de Hsp90 mitocondrial (Hsp90-5), 1 de cloroplasto (Hsp90-6) e 1 de retículo endoplasmático (Hsp90-7) (Krishna & Gloor, 2001), cujas sequencias estão representadas no alinhamento abaixo (Figura 3).

```
Hsp90.1 -----
Hsp90.2 -----
Hsp90.3 -----
Hsp90.4 -----
Hsp90.5 MIRLSKRSVSTLLRSGNQSFRIAAAASTSRSSPSATDVKRSDTESRWYSSLTNGQSKNSG
Hsp90.6 MAPALSRSLYTSPLTSVPITPVSSRSLSHLRSS-----FLPHGGALRTG
Hsp90.7 MAPALSRSLYTSPLTSVPITPVSSRSLSHLRSS-----FLPHGGALRTG
```

```
Hsp90.1 -----MADVQMADAETFAFQAEINQLLSLIINTFYSNKEI
Hsp90.2 -----MADAETFAFQAEINQLLSLIINTFYSNKEI
Hsp90.3 -----MADAETFAFQAEINQLLSLIINTFYSNKEI
Hsp90.4 -----MADAETFAFQAEINQLLSLIINTFYSNKEI
Hsp90.5 SFAQLNMKTNWFMGYRNESSAAASDSSSQAPPPAEKFEYQAEVSRLLMDLIVNSLYSNEK
Hsp90.6 VSCSWNLEKRCNR-FAVKCDAVAEKETTEEGSGEKFEYQAEVSRLLDLIVHSLYSHKEV
Hsp90.7 VSCSWNLEKRCNR-FAVKCDAVAEKETTEEGSGEKFEYQAEVSRLLDLIVHSLYSHKEV
      .*. * :***:.*:***:::***:**
```

```
Hsp90.1 FLRELISNSSD-----ALDKIRFESLTDKSKLDGQP
Hsp90.2 FLRELISNSSDVRSLSLSTLLYTCVSRLLIDLADGSDVLDLGLALDKIRFESLTDKSKLDGQP
Hsp90.3 FLRELISNSSD-----ALDKIRFESLTDKSKLDGQP
Hsp90.4 FLRELISNSSD-----ALDKIRFESLTDKSKLDGQP
Hsp90.5 FLRELISNASD-----ALDKLRYLSVTNPELSKDAP
Hsp90.6 FLRELVSNASD-----ALDKLRFLSVTEPSLLGDGG
Hsp90.7 FLRELVSNASD-----ALDKLRFLSVTEPSLLGDGG
****:*:****          *****:***:***: . . .
```

```
Hsp90.1 ELFIRLVDPKSNKTLSTIIDSGIGMTKADLVNNLGTIARSGTKEFMEALQ----AGADVSM
Hsp90.2 ELFIIHIPDKTNNTLTIIDSGIGMTKADLVNNLGTIARSGTKEFMEALA----AGADVSM
Hsp90.3 ELFIIHIPDKTNNTLTIIDSGIGMTKADLVNNLGTIARSGTKEFMEALA----AGADVSM
Hsp90.4 ELFIIHIPDKTNNTLTIIDSGIGMTKADLVNNLGTIARSGTKEFMEALA----AGADVSM
Hsp90.5 DLDIRIYADKENGIIITLTDGIGMTRQELVDCLGTIAQSGTAKFMKALKKDSKDGADNGL
Hsp90.6 DLEIRIKPDPDNGTITITDGTGIGMTEELIDCLGTIAQSGTSKFLKALKENKDLGADNGL
Hsp90.7 DLEIRIKPDPDNGTITITDGTGIGMTEELIDCLGTIAQSGTSKFLKALKENKDLGADNGL
:* *:: .* * ::: *:*:*:*: :*: *:*:*:*:* *:*:* *.* ..
```

Hsp90.1 IGQFGVGFYSAYLVAEKVVVTTKHN-DDEQYVWESQAGG-SFTVTRDGDGE-PLGRGTKI
Hsp90.2 IGQFGVGFYSAYLVADKVVVTTKHN-DDEQYVWESQAGG-SFTVTRDTSGE-TLGRGTGM
Hsp90.3 IGQFGVGFYSAYLVADKVVVTTKHN-DDEQYVWESQAGG-SFTVTRDTSGE-ALGRGTGM
Hsp90.4 IGQFGVGFYSAYLVADKVVVTTKHN-DDEQYVWESQAGG-SFTVTRDTSGE-ALGRGTGM
Hsp90.5 IGQFGVGFYSAYLVADRVIVSTKSPKSDKQYVWESQAGG-SFTVTRDTSGE-ALGRGTGM
Hsp90.6 IGQFGVGFYSAYLVADRVIVSTKSPKSDKQYVWESQAGG-SFTVTRDTSGE-ALGRGTGM
Hsp90.7 IGQFGVGFYSAYLVADRVIVSTKSPKSDKQYVWESQAGG-SFTVTRDTSGE-ALGRGTGM
*****:***::*:** .*:****. *.. * : : .. : : **:

Hsp90.1 TLFK-DDQLEYLEERRLKDLVKKHSEFISYPIYLWTEKTTEKEISDDEDEDEPKKENEG
Hsp90.2 VLYLK-EDQLEYLEERRLKDLVKKHSEFISYPIISLWIEKTIEKEISDDEEEEE-KKDEEG
Hsp90.3 VLYLK-EDQMEYIEERRLKDLVKKHSEFISYPIISLWIEKTIEKEISDDEEEEE-KKDEEG
Hsp90.4 ILYLK-EDQMEYIEERRLKDLVKKHSEFISYPIISLWIEKTIEKEISDDEEEEE-KKDEEG
Hsp90.5 TLHLKQEA-NFADPERIQKLVKNYSQFVSPFIYTWQEKGYTKEVEVEDDPTETKDDQ-
Hsp90.6 TLYLREDDKYEFAESTRIKLNLVKNYSQFVGFPIYTWQEK--SRTIEVEED--EPVKEGE-
Hsp90.7 TLYLREDDKYEFAESTRIKLNLVKNYSQFVGFPIYTWQEK--SRTIEVEED--EPVKEGE-
*. * : : : : * : . * : : * : : * * : : . * : : * * :

Hsp90.1 EVEEVDEEKEKDGKKKKIKEVSHAWELINKQKPIWLRKPEEITKEEYAAFYKSLTNDWE
Hsp90.2 KVEEVDEEKEKDKKKKKIKEVSHAWDLVKNQKPIWMRKPEEINKEEYAAFYKSLTNDWE
Hsp90.3 KVEEVDEEKEKDKKKKKIKEVSHAWDLVKNQKPIWMRKPEEINKEEYAAFYKSLTNDWE
Hsp90.4 KVEEIDEKEKDKKKKKIKEVTHEWDLVKNQKPIWMRKPEEINKEEYAAFYKSLTNDWE
Hsp90.5 -----DDQTEKKKKTKKVVVERVWDWELTNETQPIWLRNPKEVTTAEYNEFYKAFNEFL
Hsp90.6 -----EGEPKKKKTTK--TEKYWDWELANETKPLWMRNSKEVEKGEYNEFYKAFNEFL
Hsp90.7 -----EGEPKKKKTTK--TEKYWDWELANETKPLWMRNSKEVEKGEYNEFYKAFNEFL
: : . * . * * : * : * : * : * : * : . * * * : . * :

Hsp90.1 DHLAVKHFSVEGQLEFKAIFVPKRPFDFDTR-KKLNNIKLYVRRVIFMDNCE-ELIP
Hsp90.2 EHLAVKHFSVEGQLEFKAIFVPKRPFDFDTR-KKLNNIKLYVRRVIFMDNCE-DIIP
Hsp90.3 EHLAVKHFSVEGQLEFKAIFVPKRPFDFDTR-KKLNNIKLYVRRVIFMDNCE-DIIP
Hsp90.4 EHLAVKHFSVEGQLEFKAIFVPKRPFDFDTR-KKLNNIKLYVRRVIFMDNCE-DIIP
Hsp90.5 DPLASSHTTEGEVEFRSILYVPPVSPSGKDDIVNQTKNIRLYVVRVIFSDDFDGLFP
Hsp90.6 DPLAHTHTTEGEVEFRSILYIPGMGPLNNEVDVTPKTKNIRLYVVRVIFSDDFDGLFP
Hsp90.7 DPLAHTHTTEGEVEFRSILYIPGMGPLNNEVDVTPKTKNIRLYVVRVIFSDDFDGLFP
: * * . * : * : * : * : * : * . * . * * : * : * : * : * * : : : * :

Hsp90.1 EYLSFVKGVDSDDLPLNISRETLLQNKILKVIKKNLVKKCIEMFNEIA--ENKEDYTKF
Hsp90.2 EYLSFVKGIVDSEDLPLNISRETLLQNKILKVIKKNLVKKCLELFFEIA--ENKEDYNKF
Hsp90.3 EYLSFVKGIVDSEDLPLNISRETLLQNKILKVIKKNLVKKCLELFFEIA--ENKEDYNKF
Hsp90.4 DYLSFVKGIVDSEDLPLNISRETLLQNKILKVIKKNLVKKCLELFFEIA--ENKEDYNKF
Hsp90.5 RYLSFVKGVDSDDLPLNVSREILQESRIVRIMKRLVRKAFDMILGISLSENREDEYEF
Hsp90.6 RYLSFVKGVDSDDLPLNVSREILQESRIVRIMKRLVRKAFDMILQESISESENKE---KF
Hsp90.7 RYLSFVKGVDSDDLPLNVSREILQESRIVRIMKRLVRKAFDMILQESISESENKE---KF
* * . * : * : * : * : * : * * : : * : * : * : * : * : * : * : * * :

Hsp90.1 YEAFSKNLKLG IHEDSQNRGKIADLLRYHSTKSGDEMSTFKDYVTRMKEGQKDIFYITGE
Hsp90.2 YEAFSKNLKLG IHEDSQNRTKIAELLRYHSTKSGDELTSKDYVTRMKEGQNDIFYITGE
Hsp90.3 YEAFSKNLKLG IHEDSQNRTKIAELLRYHSTKSGDELTSKDYVTRMKEGQNDIFYITGE
Hsp90.4 YEAFSKNLKLG IHEDSQNRTKIAELLRYHSTKSGDELTSKDYVTRMKEGQNEIFYITGE
Hsp90.5 WDNFGKHLKLGCIEDRHNKRIAPLLRFFSSQSENDMISLDEYVENMKPEQKAIYFIASD
Hsp90.6 WENFGRFLKLGCIEDTGNHKRITPLLRFFSSKNEEELTSLDDYIENMGENQKAIYLLATD
Hsp90.7 WENFGRFLKLGCIEDTGNHKRITPLLRFFSSKNEEELTSLDDYIENMGENQKAIYLLATD
: : * . : * * * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

Hsp90.1 SKKAVENSPFLERLKKRGYEVLYMVAID EYAVGQLKEYDGKLV SATKEGLKLEDETEE
Hsp90.2 SKKAVENSPFLEKLKGGIEVLYMVAID EYAVGQLKEFEGKLV SATKEGLKLEDETEE
Hsp90.3 SKKAVENSPFLEKLKGGIEVLYMVAID EYAVGQLKEFEGKLV SATKEGLKLEDETEE
Hsp90.4 SKKAVENSPFLEKLKGGIEVLYMVAID EYAVGQLKEFEGKLV SATKEGLKLEDETEE
Hsp90.5 SITSAPNFLEKMLEKGLVLYLVEPIDEVAVQSLKAYKEKDFVDISKEDLDL---DK
Hsp90.6 SLKSAKAPFLEKLIQKDIEVLYLVEPIDEVAIQNLQTYKEKDFVDISKEDLELG---DE
Hsp90.7 SLKSAKAPFLEKLIQKDIEVLYLVEPIDEVAIQNLQTYKEKDFVDISKEDLELG---DE
* . : : : * * : : . * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

Hsp90.1      EKKKREEKKKSFENLCKTIKEILGDKVEKVVVSDRIVDSPCCLVTGEYGWTANMERIMKA
Hsp90.2      EKKKKEELKEKFEGGLCKVIKDVLDGDKVEKVIIVSDRVVDSPCCLVTGEYGWTANMERIMKA
Hsp90.3      EKKKKEELKEKFEGGLCKVIKDVLDGDKVEKVIIVSDRVVDSPCCLVTGEYGWTANMERIMKA
Hsp90.4      EKKKKEELKEKFEGGLCKVIKDVLDGDKVEKVIIVSDRVVDSPCCLVTGEYGWTANMERIMKA
Hsp90.5      NEEKEAAVKKEFGQTCDWIKKRLGDKVASVQISNRLSSSPCVLVSGKFGWSANMERLMKA
Hsp90.6      DEVKDREAKQEFNLLCDWIKQQLGDKVAKVQVSNRLSSSPCVLVSGKFGWSANMERLMKA
Hsp90.7      DEVKDREAKQEFNLLCDWIKQQLGDKVAKVQVSNRLSSSPCVLVSGKFGWSANMERLMKA
              :: *      *:. *      *.  **.  *****  .*  :*: *:  .***  **:*: :*: :*: :*: :*

Hsp90.1      QALRDSSMSGYMSKKTMEINPDNGIMEELRKRAEADKNDKSVKDLVMLLYETALLTSGF
Hsp90.2      QALRDSSMAGYMSKKTMEINPENSIMDELKRADADKNDKSVKDLVLLLFETALLTSGF
Hsp90.3      QALRDSSMGYMSKKTMEINPENSIMDELKRADADKNDKSVKDLVLLLFETALLTSGF
Hsp90.4      QALKDSNTGGYMSKKTMEINPENSIMDELKRRAEADKNDKSVKDLVLLLFETALLTSGF
Hsp90.5      QSTGDTISLDYMKGRRVFEINPDHSIIKNINAAYNSNPNDDEDAMRAIDLMYDAALVSSGF
Hsp90.6      QALGDTSSLEFMRGRRIILEINPDHPIIKDLNAACKNAPESTEATRVDLLYDTAIISSGF
Hsp90.7      QALGDTSSLEFMRGRRIILEINPDHPIIKDLNAACKNAPESTEATRVDLLYDTAIISSGF
              *:  *:      :*  .::  :*: :*:  *: :*: .  .  .  .  :  *::*: :*: :*

Hsp90.1      SLDEPNTFAARIHRMLKLGLS--IDEDENVEEDGDMPELEEDAAEE--SKMEEVD-----
Hsp90.2      SLDEPNTFGSRIHRMLKLGLS--IDDDDAVEADAEMPPLEDDADAEGSKMEEVD-----
Hsp90.3      SLDEPNTFGSRIHRMLKLGLS--IDDDVVEADADMPPLEDDADAEGSKMEEVD-----
Hsp90.4      SLDEPNTFGSRIHRMLKLGLS--IEEDDAVEADAEMPPLEDDADAEGSKMEEVD-----
Hsp90.5      TPDNPAELGGKIYEMMDVALSGKWSSEVQPPQQQMAHSHDAETFEAEVVEPEVVDGKK-
Hsp90.6      TPDSPAELGNKIYEMMAMAVGGRWGRVEEEE-EESSTVNEGDDKSGETEVEPEVSEVRAESD
Hsp90.7      TPDSPAELGNKIYEMMAMAVGGRWGRVEEEE-EESSTVNEGDDKSGETEVEPEVSEVRAESD
              :  *. *      :.  :*: :*  : :..      :      :      :      *  .  :*  :

Hsp90.1      ----
Hsp90.2      ----
Hsp90.3      ----
Hsp90.4      ----
Hsp90.5      ----
Hsp90.6      PWQD
Hsp90.7      PWQD

```

Figura 3: Alinhamento múltiplo de sequências de Hsp90 de *A. thaliana*. As isoformas Hsp90.1, 2, 3 e 4 são citosólicas, a Hsp90.5 é mitocondrial, a Hsp90.6 de cloroplasto e a Hsp90.7 de retículo endoplasmático. As isoformas organelares possuem uma região N-terminal maior, referentes às sequências de localização. As isoformas citosólicas possuem o pentapeptídeo MEEVD no final do domínio C-terminal, importante para interação com chaperonas. Sequências alinhadas com a ferramenta ClustalW.

Funções e algumas proteínas-clientes

Diferente das outras chaperonas, a Hsp90 exibe um particular grupo de proteínas clientes (ou substratos), que dependem dela para atingir e/ou manter sua conformação funcional em condições fisiológicas (Tirrolli-Cepeda & Ramos, 2011; da Silva & Ramos, 2012). Entre os substratos de Hsp90 estão proteínas estruturalmente e funcionalmente distintas como, por exemplo, a telomerase (Holt et al, 1999; Kepler et al, 2006), a organizadora de actina N-WASP (Park et al, 2005), a óxido nítrico sintetase – NOS (Garcia-Cardena et al, 1998), assim como uma série de receptores de hormônios esteróides (Pratt & Toft, 2003), fatores de transcrição e proteínas quinases (Pearl, 2005). Desta forma, a Hsp90 pode atuar na progressão do ciclo celular, apoptose,

transdução de sinal mitótico, transporte mediado por vesículas, imunidade inata e degradação de proteínas (Hartl et al, 2011).

As funções da Hsp90 vão além de homeostase proteica, culminando num papel essencial em muitos processos biológicos. É descrita como um capacitor para a evolução e aquisição de novas características, pois promove a estabilização de proteínas mutadas, as quais não seriam funcionais ou seguiriam para degradação na ausência ou atividade reduzida desta chaperona. Tal atividade permitiria variações na sequência, e até mesmo a divergência de genes (Queitsch et al, 2002; Sangster et al, 2008). Adicionalmente, Burga e colaboradores (2011) mostraram como variações randômicas na expressão de genes podem alterar o desenvolvimento de mutantes de *C. elegans*. Animais que naturalmente expressaram mais Hsp90 exibiram uma reduzida penetrância a mutações, porém ainda são desconhecidos os mecanismos que causam esta variabilidade na expressão de Hsp90 e quais outros genes são afetados por estas flutuações. Acredita-se que tais “ruídos” na expressão gênica permitem alternar entre os estados ‘ligado’ e ‘desligado’ de outros genes (Raser & O’Shea, 2005; Burga et al, 2011; El-Samad & Weissman, 2011).

Aproximadamente 3% das Hsp90 citossólicas se localizam no núcleo, e nesta organela participa da regulação de eventos nucleares e no remodelamento de cromatina (Figura 4). A Hsp90 regula a atividade de receptores de hormônios esteroides, incluindo os receptores de glicocorticóides, andrógeno e estrogênio. Tais receptores transitam entre citoplasma e núcleo e apresentam atividades distintas em cada compartimento, a regulação da distribuição subcelular e atividade transcricional são elementos-chave para a sua adequada função. Neste aspecto, a Hsp90 tem o papel crucial de integrar tais processos, regulando a localização dos receptores, bem como sua estabilidade, competência para ligação do hormônio e atividade transcricional (Trepel et al, 2011).

A Hsp90 também regula o fator de transcrição de choque térmico 1 (*HSF1 – Heat shock transcription factor 1*). Em células de mamíferos submetidas ao inibidor da Hsp90 geldanamicina, os monômeros de HSF1 se dissociam da Hsp90, trimerizam e aumentam a transcrição coordenada de HSPs (Trepel et al, 2010; Zou et al, 2009).

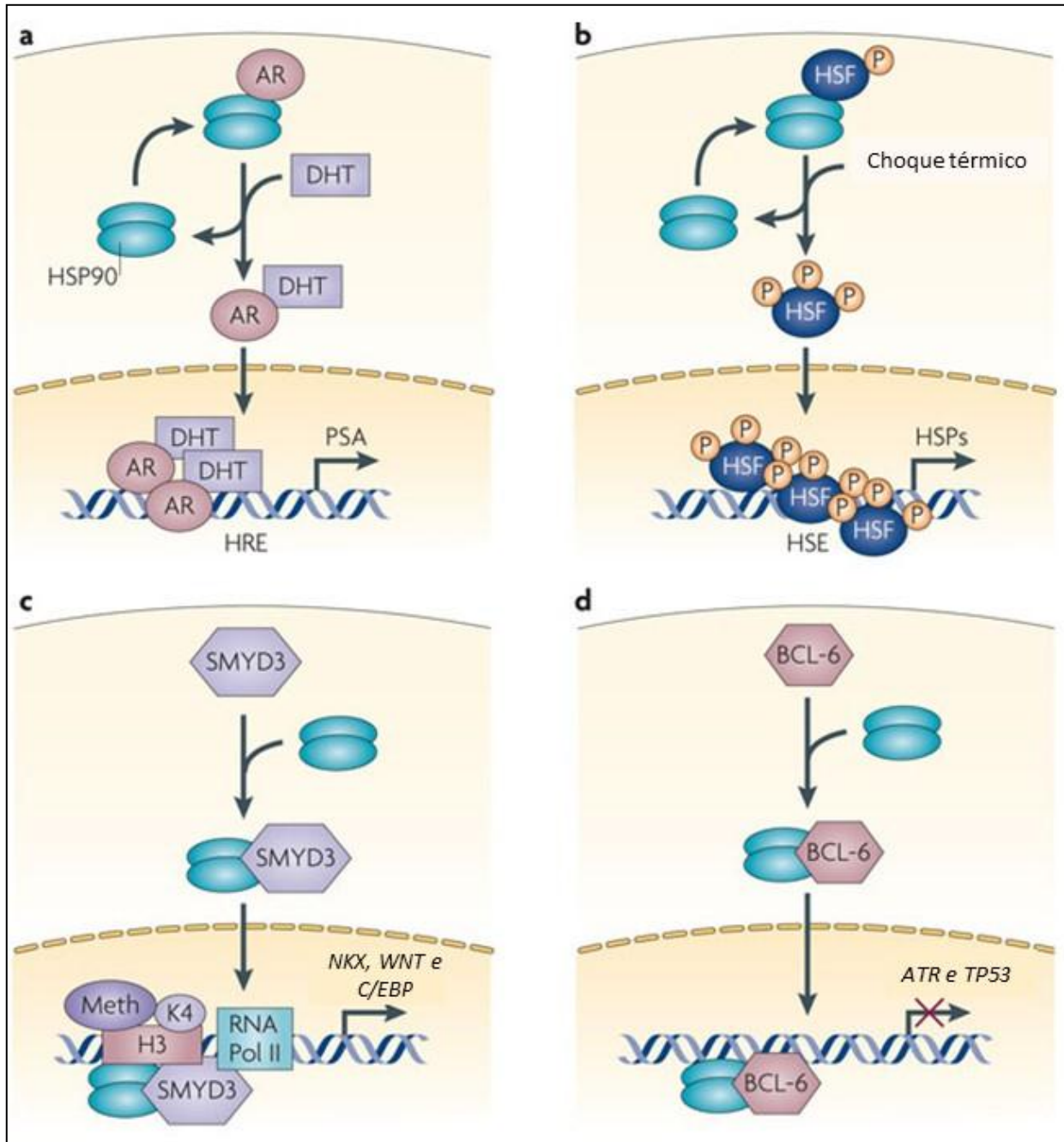


Figura 4: Hsp90 modula eventos nucleares. Quatro exemplos do efeito da Hsp90 em eventos nucleares: a) A importância da Hsp90 na função de um receptor de hormônio esteroide (AR – hormônio andrógeno). b) O papel da Hsp90 na regulação do fator de transcrição de choque térmico 1 (HSF1). c) O efeito da Hsp90 na metilação de histonas mediada por SMYD3 e o impacto na transcrição de genes associados a câncer como NKX, WNT e C/EBP. D) O complexo Hsp90-BCL6 suprime a transcrição de genes supressores tumorais, e contribui com a gênese de tumores. ATR, ‘ataxia telangiectasia and Rad3-related protein’, DHT, diidrotestosterona, PSA, antígeno prostático, RNA Pol II, RNA polimerase II (Modificado de Trepel et al, 2010).

A resposta imune, tanto em mamíferos como em plantas, também tem a participação da Hsp90. Em plantas a Hsp90 juntamente com a SGT e RAR1 formam um complexo envolvido em eventos de sinalização da resposta imune. Estas moléculas têm um importante papel na ativação de proteínas NLR (ou NB-LRR, *nucleotide binding site-leucine rich repeat*) (Seo et al, 2008). Proteínas NLR atuam como sensores imunes em plantas e animais, pois têm a habilidade de reconhecer, direta ou indiretamente, moléculas derivadas de patógenos e disparar a resposta imune. É interessante ressaltar que em mamíferos, proteínas com domínios Nod (*nucleotide-binding oligomerization domain*) também requerem Hsp90/SGT1/RAR1 para ativar e mediar a resposta imune, indicando que estas proteínas podem exercer funções similares em animais e plantas (Seo et al, 2008; Shirasu, 2009).

Outra importante atuação da Hsp90 é no transporte de pré-proteínas para mitocôndrias e cloroplastos, uma vez que a maioria destas proteínas é sintetizada no citoplasma e importadas para a organela pós-traducionalmente. Neste contexto a Hsp90 previne a agregação dos peptídeos recém-sintetizados, mantendo-os em um estado competente para serem importados. Em plantas, tal processo é especialmente importante para a montagem dos complexos fotossintéticos em cloroplastos (Fellerer et al, 2011). Adicionalmente, a Hsp90 responde a sinais mediados por plastídeos e faz parte do complexo proteico que regula a expressão de genes associados à fotossíntese (*PhANG – photosynthesis-associated nuclear genes*) (Kindgren et al, 2011).

Tais exemplos mostram como as funções da Hsp90 são diversificadas, assim como seus interatores. A Hsp90 é considerada um “*hub*”, ou seja, exerce papel essencial, com uma grande quantidade de parceiros de interação altamente conectados (Taipale et al, 2010; da Silva & Ramos, 2012). E a descoberta destas interações proteína-proteína é essencial para o entendimento da função e do contexto biológico desta chaperona.

Co-chaperonas

A Hsp90 atua em conjunto com uma maquinaria formada pela Hsp70, diversos reguladores e co-chaperonas. Muitas das co-chaperonas interagem através de motivos TPR (*tetratricopeptide repeat domain*) (Hartl et al, 2011). O TPR é caracterizado por exibir uma estrutura de hélice-volta-hélice, que compreende uma sequência consenso de 34 aminoácidos a qual pode estar presente em número variável de repetições (Blatch & Lässle, 1999; Smith, 2004; Das et al, 1998). (Figura 6 – ver seção 1.3). As co-chaperonas modulam a atividade da Hsp90 em eucariotos, afetando a atividade ATPásica, e a dinâmica conformacional da Hsp90 e seus clientes. Como exemplos de co-chaperonas com domínios TPR podem ser citadas a AHA1 (*activator of Hsp90 ATPase 1*), que

promove a hidrólise de ATP, Cdc37 (*cell division cycle 37 homologue*), responsável pela transferência de clientes com atividade quinase e a Hop (*Hsp70-Hsp90 organizing protein*). A Hop participa da transferência de substratos entre Hsp90 e Hsp70, interagindo simultaneamente com as duas chaperonas. Veja mais detalhes sobre esta proteína na seção seguinte (pág. 14).

A Hsp90 também atua na degradação de proteínas quando associada a co-chaperona E3 ubiquitina ligase CHIP (*C-terminus Hsp70 interacting protein*), que catalisa a ubiquitinação de clientes da Hsp90 e da Hsp70, direcionando-os ao proteassoma. A SGT1 (*supressor G2 allele of SKP1*) participa da formação do cinetocoro, PIH1 e TAH1 participam da síntese de ribossomos, replicação do DNA, manutenção dos telômeros, e da modulação epigenética da transcrição (Zhao & Houry, 2005).

Estrutura e ciclo ATPásico

A Hsp90 atua como um homodímero, e cada monômero possui 3 domínios (Pearl & Prodromou, 2006). Um domínio ATPase N-terminal altamente conservado, de aproximadamente 25 kDa, conectado a um domínio central (de aproximadamente 55 kDa), responsável pela ligação de substratos e interação com co-chaperonas. O domínio C-terminal tem aproximadamente 20 kDa e é responsável pela dimerização da Hsp90. A deleção de 200 resíduos na porção C-terminal impede a dimerização, e esta proteína truncada não é capaz de recuperar o fenótipo de leveduras mutantes de deleção para Hsp90, o que sugere que a dimerização é essencial para a atividade biológica da Hsp90 (Minami et al, 1994).

O sítio de ligação de ATP no domínio N-terminal (Prodromou et al, 1997) também pode ser ocupado por inibidores como geldanamicina (Stebbins et al, 1997) e radicicol (Soga et al, 1998; Schulte et al, 1999). Estudos também reportaram um segundo sítio de ligação de nucleotídeo no domínio C-terminal da Hsp90 (Marcu et al, 2000; Soti et al, 2002; Garnier et al, 2002), capaz de ligar inibidores como novobiocina e celastrol (Donnelly & Blagg, 2008; Zhang et al, 2009).

O ciclo ATPásico da Hsp90 é acompanhado por modificações estruturais (Figura 5). A ligação de ATP causa a dimerização das porções N-terminal, formando um grampo molecular. A aproximação destes domínios causa compactação da estrutura, na qual cada monômero sofre torção. Com a hidrólise do ATP, os domínios ATPase se afastam e a dimerização dos domínios N-terminal é desfeita. Diversos co-fatores regulam o ciclo: Cdc37 transporta substratos (quinases) para a Hsp90 e inibe a atividade ATPásica, a Hop inibe a dimerização do N-terminal, a AHA1 estimula a hidrólise de ATP e a p23 estabiliza a forma dimerizada antes da hidrólise do ATP.

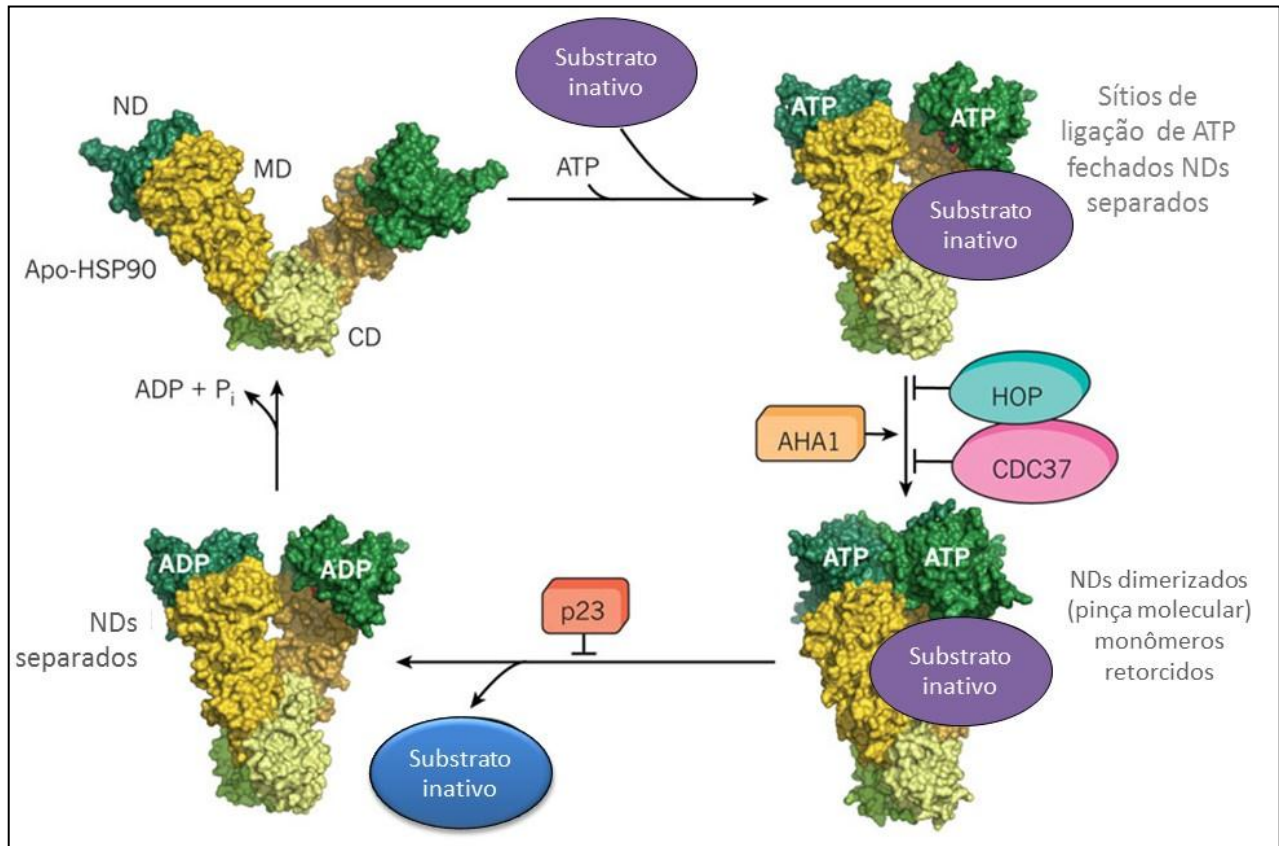


Figura 5: O ciclo ATPásico do sistema Hsp90. No sentido horário, da parte superior para inferior: A ligação de ATP no domínio N-terminal (ND) da Hsp90 apo induz uma mudança conformacional e o fechamento do bolsão de ligação de ATP no ND. Em seguida, ocorre a dimerização dos NDs, dando origem a uma conformação fechada do dímero de Hsp90 (grampo molecular), com as subunidades retorcidas. Neste estado ocorre a hidrólise do ATP, e depois disso os NDs se dissociam. Os substratos inativos interagem principalmente com o domínio central (MD), ativado pelo ciclo ATPásico da Hsp90. Co-chaperonas como Hop, Cdc37, Aha1 e p23 modulam passos específicos do ciclo (Modificado de Hartl et al, 2011).

1.3. Hop (*Hsp70-Hsp90 Organizing Protein*)

A co-chaperona Hop foi identificada pela primeira vez por Nicolet e Craig (1989) como Sti1 (Stress-inducible protein 1), uma proteína responsiva a choque térmico em leveduras. A Hop é capaz de interagir diretamente com a Hsp90 e Hsp70, fazendo parte de dos complexos de maturação de receptores de hormônios esteroides (Chen & Smith, 1998; Johnson et al, 1998). Ortólogos de Hop foram identificados em seres humanos (Honoré et al, 1992), camundongo (Blatch et al, 1997), rato (Demand et al, 1998), insetos (Carrigan et al, 2005), plantas (Zhang et al, 2003) e parasitas (Webb et al, 1997).

A estrutura da Hop é composta por 9 motivos formados por repetições de tetratricopeptídeos (*TPR – Tetratricopeptide Repeat*), que são agrupados em 3 domínios (TPR1, TPR2A e TPR3A) e tal característica define os ortólogos da Hop. Os domínios TPR1 e TPR2A, os quais possuem estrutura cristalográfica conhecida, consistem de hélices-alfa antiparalelas empilhadas de modo a formar um grande sulco ao longo da superfície do domínio (Carrigan et al, 2004; Odunuga et al, 2004; Song & Marison, 2005; Flom et al, 2007; Scheufler et al, 2000). O domínio TPR apresenta as cadeias laterais dos aminoácidos que o compõe projetadas para dentro deste sulco, o que facilita interações proteína-proteína específicas. Apesar da conservação, co-chaperonas TPR podem ligar motivos MEEVD com diferentes afinidades, como reportado para a co-chaperona Tom70 (Gava et al, 2011). Outros dois domínios contendo repetições de aspartato e prolina (DP) também fazem parte da Hop, de acordo com o arranjo TPR1-DP1-TPR2A-TPR2B-DP2 (Figura 6).

O domínio N-terminal da Hop (TPR1) é requerido para a ligação da Hsp70 e o domínio TPR central (TPR2A) é essencial para a ligação da Hsp90 (Onuoha et al, 2008), que é mediada pelo motivo MEEVD, presente no C-terminal da Hsp90 e da Hsp70 (Odunuga et al, 2003; Brinker et al, 2002).

A Hop interage com a Hsp90 (dimérica) na forma de dímero ao passo que sua associação com a Hsp70 se dá na forma de monômero. Adicionalmente, a afinidade de ligação entre Hsp70-Hop é aumentada em cerca de 5 vezes pela ligação da Hsp90 (Hernández et al, 2002). Desta forma, a Hsp90 poderia causar alterações na conformação da Hop para melhor acomodar as interações com a Hsp70, outra possibilidade é que a Hop causaria um rearranjo conformacional da Hsp90, promovendo sítios de contato para a Hsp70 (Hernández et al, 2002; Murphy et al, 2001). No entanto, ainda há a necessidade de mais estudos para comprovar e entender tais mecanismos, uma vez que o estado oligomérico da Hop é bastante controverso na literatura (Yi et al, 2010; Onuoha et al, 2008).

Embora a Hop seja capaz de interagir com a Hsp90 na presença e na ausência de ATP, há uma preferência pelo estado Hsp90-ATP. A Hop previne a troca de nucleotídeos, inibindo a atividade ATPásica e favorecendo uma conformação aberta da Hsp90 (Panaretou et al, 2002).

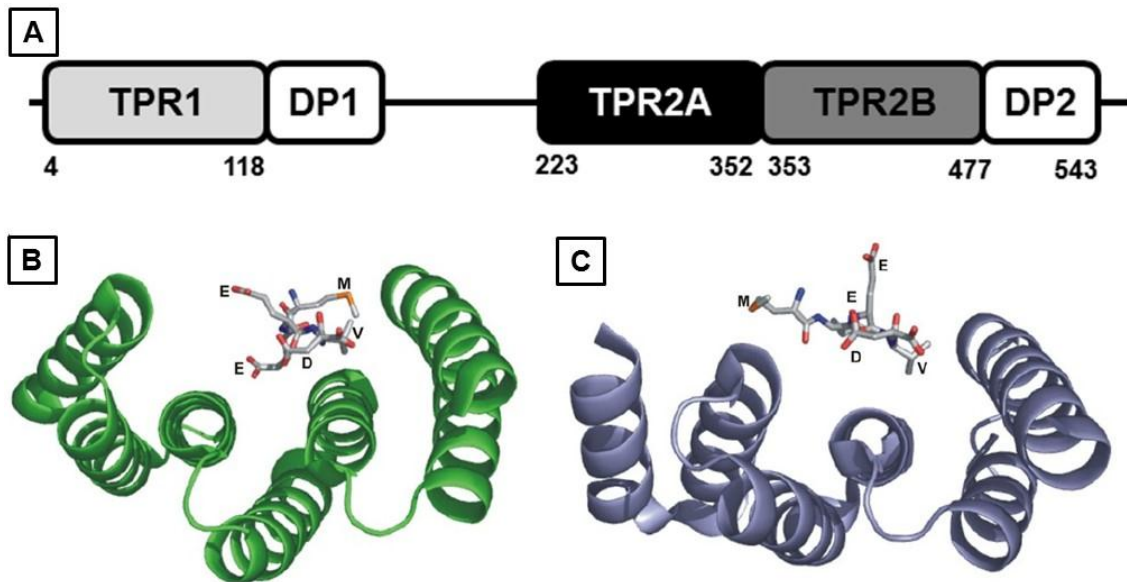


Figura 6: Arranjo estrutural da Hop e ligação do MEEVD. **A)** A Hop é composta por 3 domínios TPR e 2 domínios compostos por repetições de aspartato e prolina (DP). A ligação do motivo MEEVD **B)** na co-chaperona Hop e **C)** na co-chaperona Tom70. É possível verificar a estrutura característica do TPR, formada por hélices antiparalelas em sequência, formando um sulco no interior da estrutura. Algumas diferenças na interação TPR-MEEVD, que é de natureza eletrostática, podem ser notadas em B e C. O motivo MEEVD parece estar mais envolvido pelo TPR quando ligado a Hop, com interação mais organizada do que a Tom70. Adicionalmente, a conformação do MEEVD pode ser modificada em função da co-chaperona ligada. B e C modificado de Gava et al (2011).

Song e Masison (2005) demonstraram que a via de enovelamento dependente de Hsp70 é prejudicada com a deleção do domínio TPR1 da Hop em leveduras. Da mesma maneira, deleção do domínio TPR2A causa prejuízos a via dependente de Hsp90. Porém a presença de somente uma deleção (TPR1 ou TPR2A) causa prejuízos a clientes dependentes tanto de Hsp90 quanto de Hsp70, o que sugere o envolvimento da Hop na modulação das funções da Hsp70 e Hsp90 além da sua função adaptadora da interação ente estas duas chaperonas.

A Hop também é capaz de interagir com Prp^c (príon), exercendo um papel neuroprotetor (Zanata et al, 2002), e possui papel no desenvolvimento da fibrose cística (Marozkina et al, 2010), conferindo a Hop uma atuação que vai além do sistema Hsp70-Hsp90.

Muitas questões acerca estado oligomérico, mecanismo de mediação Hsp70-Hsp90, bem como diferentes parceiros, ainda precisam ser respondidas para uma visão global da atuação e importância da Hop em diferentes funções biológicas.

1.4. Chaperonas e o potencial biotecnológico em plantas

Como organismos sésseis, as plantas devem ser capazes de responder rapidamente a múltiplos estresses ambientais, como variações de temperaturas e salinidade, presença de metais pesados e deficiência hídrica. A presença de sistemas de resposta a estresses eficientes são pré-requisitos para a sobrevivência e produtividade das plantas (Neumann et al, 1989).

Estresses abióticos geralmente causam disfunções proteicas, portanto a manutenção destas proteínas em sua conformação funcional, bem como a prevenção da agregação de proteínas desenoveladas, é particularmente importante para a sobrevivência celular durante o estresse. Elucidar os mecanismos de resposta a estresses em plantas, assim como o papel destes mecanismos na aquisição de tolerância, é de grande importância prática. Muitos esforços têm sido empregados na investigação dos principais mecanismos de tolerância como, por exemplo, transportadores de ions, osmoprotetores, eliminadores de radicais livres entre outros (Wang et al, 2004).

As chaperonas desempenham importantes funções no desenvolvimento e resistência a estresses em plantas. Por exemplo, há uma forte correlação entre o acúmulo de smHsps e a tolerância a estresses em plantas (Wang et al, 2004). Acredita-se também que algumas smHsps induzidas por giberelina e metil jasmonato tenham um importante papel no crescimento e desenvolvimento da planta, bem como na produção de madeira, com forte atuação na diferenciação do câmbio vascular e desenvolvimento do xilema (Wang et al, 2009). A superexpressão de membros da Hsp70 está correlacionada a aquisição de termotolerância, e também resulta em tolerância aumentada a estresse salino e hídrico (Wang et al, 2004). Em cana-de-açúcar, a Hsp70 encontra-se mais expressa em plantas com maior teor de açúcares (Papini-Terzi et al, 2009).

Diferente das demais chaperonas, a Hsp90 parece desempenhar uma função reguladora, pois a concentração desta proteína é crucial para um adequado desenvolvimento da resposta a estresses, visto que a superexpressão das isoformas AtHsp90.2 (citossólica), AtHsp90.5

(mitocôndria) e AtHsp90.7 (retículo endoplasmático) em *A. thaliana* aumenta a sensibilidade a estresses salinos e osmóticos (Song et al, 2009). A redução dos níveis da Hsp90 em *N. bentamiana* ocasiona resposta imune deficiente (Lu et al, 2003). Ainda em *N. bentamiana*, o silenciamento da Hsp90 via RNAi provoca atrofia e resposta imune comprometida, características também observadas quando a Hsp70 é silenciada (Kanzaki et al, 2003).

Adicionalmente, acredita-se que a Hsp90 tenha um importante papel na manutenção da função dos receptores de brassinosteróides (hormônio esteróide vegetal), importante na tolerância a estresses abióticos, no crescimento do vegetal e desenvolvimento das raízes (Divi et al, 2010). Outra importante ação da Hsp90 em plantas está relacionada à resistência a pragas, visto que esta chaperona desempenha importantes funções quando associada a proteínas do sistema imune (Wang et al 2004).

Estudos do nosso grupo também apontam para as chaperonas como importantes moléculas para o desenvolvimento e homeostase vegetal, assim como alvos de importância biotecnológica. Análises de ESTs do consórcio FORESTs evidenciaram que as chaperonas moleculares apresentam um notável nível de expressão em células de *Eucalyptus* (1,6% das sequências), o que demonstra a importância destas nas espécies estudadas. Ainda, os perfis de expressão são espécie-dependentes e o tecido caulinar está entre as bibliotecas que apresentaram maior expressão de chaperonas (Cagliari et al, 2005). Ainda em *Eucalyptus*, tratamentos que promovem redução do conteúdo de ligninas no caule estão relacionados com uma expressão aumentada de chaperonas (Gonçalves et al, 2011). Em cana-de-açúcar, um total de 4702 ESTs de chaperonas foram anotadas, dentre as quais 9% foram referentes a ESTs de Hsp90. Os dados reportam a grande variabilidade e abundância de chaperonas moleculares em cana-de-açúcar e evidenciam sua importância nos processos de enovelamento de proteínas e tolerância a estresses na espécie (Borges et al, 2007).

O grupo de pesquisa do prof. Carlos Ramos tem investigado a estrutura e função da Hsp90 de diversos organismos, inclusive cana de açúcar com sequencias provenientes do projeto SUCEST. Dentre estes estudos cabe salientar a “Análise da expressão de chaperonas moleculares em plantas e clonagem, purificação e caracterização inicial das proteínas Hsp100 e Hsp90 de cana-de-açúcar” (ver tese Cagliari, T.C., 2009). Neste trabalho, o clone da Hsp90-3 (uma das proteínas alvo deste estudo) foi totalmente sequenciado, com a sequencia subclonada e expressa em *E.coli* (sistema pET28a). A proteína foi purificada de forma enovelada e como um dímero em solução (Cagliari, 2009).

Adicionalmente, Mendonça & Ramos (2012) fizeram a identificação, clonagem, caracterização biofísica e funcional de uma Hsp90 de *Citrus cinensis* (*rCsHsp90 – recombinant*

Citrus cinensis Hsp90). Neste trabalho a rCsHsp90 foi expressa em *E. coli* (sistema pET), purificada enovelada como um dímero em solução, e com atividade protetora contra agregação da proteína citrato sintase (substrato modelo). Também foi demonstrado através de *Western Blot* que a Hsp90 estudada apresenta expressão constitutiva em *Citrus cinensis*. Tais dados demonstram o quanto o grupo tem avançado e se especializado no estudo de proteínas da família Hsp90, especialmente em plantas. E também trazem a tona novas questões e perspectivas de investigação.

Dada a importância das chaperonas moleculares tanto no desenvolvimento de plantas quanto na tolerância a estresses, estas configuram importantes alvos de estudo, uma vez que o conhecimento acerca dos mecanismos de resposta e tolerância a estresses abióticos em plantas ainda é limitado (Wang et al, 2004). A compreensão da função das proteínas da família Hsp90 nos múltiplos processos regulatórios de resposta a estresses, plasticidade e desenvolvimento vegetal apresenta também uma importância biotecnológica, visando a introdução ou modulação de características úteis a produtividade e qualidade de cultivares.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Apesar da importância econômica da cana-de-açúcar para a economia brasileira, as informações sobre o genoma e proteínas presentes neste vegetal ainda são escassas. A cana-de-açúcar apresenta mecanismos bastante robustos de resposta a estresses, principalmente térmico e hídrico, que podem ser notados em campo mas ainda necessitam de investigação ao nível molecular. Tais fatores tornam interessante o estudo funcional de chaperonas moleculares de cana-de-açúcar, dentre elas a Hsp90.

A proposta deste trabalho foi produzir um transgênico através da inserção do gene da chaperona Hsp90 de cana-de-açúcar em planta-modelo (*Arabidopsis thaliana*) com a finalidade de verificar a influência desta proteína no desenvolvimento vegetal, fenótipo e resistência a estresses, bem como o impacto na expressão de outras proteínas, interatoras diretas ou não. Adicionalmente, caracterizamos um interator de Hsp90, a co-chaperona *Hsp70/Hsp90 Organizing Protein* (Hop) humana, com uma substituição de aspartato por glicina no domínio TPR2B.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Análise de sequências e subclonagem do cDNA da chaperona Hsp90 de cana-de-açúcar em vetor binário para transformação de *A. thaliana*.
- 2.2.2. Estudo dos efeitos da transgenia através de sequenciamento de RNAm, análises fenotípicas e de tolerância a estresses térmico, osmótico e salino.
- 2.2.3. Subclonagem do cDNA da co-chaperona Hop humana em pET28a.
- 2.2.4. Expressão e purificação da Hop humana recombinante em *E. coli*.
- 2.2.5. Caracterização da conformação da Hop humana recombinante.

MATERIAIS

3. MATERIAIS

3.1. cDNA plasmidial

O cDNA que codifica a Hsp90 de cana-de-açúcar foi comprado junto à FUNEP (Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia), instituição que comercializa cDNAs obtidos do projeto SUCEST. A sequência do cDNA pode ser conferida na figura 7.

O cDNA da proteína HOP humana foi adquirido do consórcio IMAGE (*Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression*), e a sequência pode ser conferida na figura 8.

```
1 ATGGCCCTCGG AGACGGAGAC GTTCGCCTTC CAGGCGGAGA TCAACCAGCT GCTCTCGCTC ATCATCAACA CCTTCTACTC
81 CAACAAGGAG ATCTTCCTCA GGGAGCTCAT CTCCAACCTC TCCGATGCCT TGGACAAGAT CAGGTTTCGAG AGCCTGACTG
161 ACAAGAGCAA GCTGGATGCC CAGCCAGAGC TGTTCATCCA CATGTACCT GACAAGGCCA ACAACACGCT GACCATCATT
241 GACAGTGCCA TTGGTATGAC CAAGTCGGAC CTTGTGAACA ACCTTGGTAC CATTGCCCGG TCCGGCACGA AGGAGTTCAT
321 GGAGGCCGCTG GCTGCCGGTG CTGACGTGTC CATGATTGGC CAGTTTGGTG TCGGTTTCTA CTCGGCCTAT CTTGTGCTG
401 AGAGGGTCGT TGTGACCACC AAGCACAACG ATGATGAGCA GTACGTGTGG GAGTCTCAGG CTGGTGGCTC CTTCACTGTC
481 ACACGTGATA CCTCTGGGGA GCAGCTTGGC AGGGGTACCA AGATGACCCT CTACCTCAAG GATGATCAGT TGGAGTACCT
561 TGAGGAGCGC CGCCTCAAGG ATCTGATCAA GAAGCACTCA GAGTTCATCA GCTACCCAAT CTCTCTCTGG ATTGAGAAGA
641 CCACTGAGAA GGAGATTCTT GATGATGAAG ATGAGGAAGA TAAGAAGGAT GAGGAGGGCA AGGTTGAGGA TGTGTATGAG
721 GAGAAGGAAG AAAAGGAGAA GAAAAGAAG AAGATCAAGG AGGTTTCTCA TGAGTGGCAG TTGGTCAACA AGCAGAAGCC
801 AATCTGGATG AGGAAGCCTG AGGAGATCAC CAAGGAAGAG TATGCTGCTT TCTACAAGAG CTTGACCAAT GACTGGGAGG
881 AGCATCTTGC TGTGAAGCAC TTCTCTGTTG AGGGTCAGCT TGAGTTCAAG GCTGTCTCTT TTGTGCCAAA GAGGGCCCCC
961 FTTGACCTCT TTGACACCAG GAAGAAGCTG AACAACTCA AGCTCTATGT GCGCCGTGTC TTCATCATGG ACAACTGCGA
1041 GGAGCTTATC CCTGAGTGGC TGAGCTTTGT CAAGGGCATT GTTACTCTG AGGATCTCCC CCTCAACATC TCCCCTGAGA
1121 CCCTCCAGCA GAACAAGATC CTCAAGGTCA TCCGCAAGAA CCTTGTCAAG AAGTGCATCG AGCTGTTCTT TGAGATTGCT
1201 GAGAACAAGG AGGACTACAA CAAGTCTTAT GAGGCCTTCT CCAAGAACCT CAAGCTTGGC ATCCACGAGG ACTCCACCAA
1281 CAGGACCAAG ATTGCTGAGC TCTTGAGGTA CCACTCCACC AAGAGTGGAG ATGAGCTGAC CAGCCTGAAG GACTATGTGA
1361 CGAGGATGAA GGAGGGCCAG AATGACATCT ACTACATCAC TGGTGAAGC AAGAAGGCTG TGGAGAATC TCCGTTCTT
1441 GAGAAGCTGA AGAAGAAGGG CTACGAAGTT CTGTACATGG TGATGCCAT TGATGAGTAT GCTATTGGCC AGCTGAAGGA
1521 GTTTGAAGGC AAGAAGCTCG TCTCTGCCAC CAAGGAGGGC CTGAAGCTTG ATGAGAGCGA GGATGAGAAG AAGAAAAGG
1601 AGGAGCTCAA GGAGAAGTTC GAGGGCCTCT GCAAGGTGAT CAAGGAGGTG CTGGGCGACA AGGTGGAGAA GGTGTTGGTC
1681 TCTGACCGTG TGGTGGACTC CCCCTGCTGC CTCGTACCGG GTGAGTACGG CTGGACTGCT AACATGGAGA GGATCATGAA
1761 GGCCACGGCG CTCAGGGACT CCAGCATGTC TGGGTACATG TCCTCCAAGA AGACGATGGA GATCAACCCG GAGAACGCCA
1841 TCATGGAGGA GCTGCGCAAG CGTGCGGAGG CCGACAAGAA CGACAAGTCT GTCAGGACC TTGTCATGCT GCTGTTCCGAG
1921 ACGGCCGCTG TCACCTCTGG TTTCAGCCTC GACGACCCCA ACACCTTCGG CAGCCGCATC CACCGCATGC TCAAGCTGGG
2001 CCTGAGCATT GATGAGGACG AGGCCCTGA GGTGACACT GACATGCCCC CTCTGGAGGA CGACCTGGC GAGAGCAAGA
2081 TGGAGGAGGT CGACTAA
```

Figura 7: cDNA da Hsp82 de cana-de-açúcar. Sequência da Hsp90 de cana-de-açúcar, obtido através do projeto SUCEST. SCQGLR1062C04.g LR1 cultivar híbrido SP80-3280 clone SCQGLR1062C04 5-, sequência do RNAm.

1	ATGGAGCAGG	TCAATGAGCT	GAAGGAGAAA	GGCAACAAGG	CCCTGAGCGT	GGGTAAACATC	GATGATGCCT	TACAGTGCTA
81	CTCCGAAGCT	ATTAAGCTGG	ATCCCCACAA	CCACGTGCTG	TACAGCAACC	GTTCTGCTGC	CTATGCCAAG	AAAGGAGACT
161	ACCAGAAGGC	TTATGAGGAT	GGCTGCAAGA	CTGTGACCT	AAAGCCTGAC	TGGGGCAAGG	GCTATTACAG	AAAAGCAGCA
241	GCTCTAGAGT	TCTTAAACCG	CTTTGAAGAA	GCCAAGCGAA	CCTATGAGGA	GGGCTTAAAA	CACGAGGCAA	ATAACCCTCA
321	ACTGAAAGAG	GGTTTACAGA	ATATGGAGGC	CAGGTGGCA	GAGAGAAAAT	TCATGAACCC	TTTCAACATG	CCTAATCTGT
401	ATCAGAAGTT	GGAGAGTGAT	CCCAGGACAA	GGACACTACT	CAGTGATCCT	ACCTACCGGG	AGCTGATAGA	GCAGCTACGA
481	AACAAGCCTT	CTGACCTGGG	CACGAAACTA	CAAGATPCCC	GGATCATGAC	CACTCTCAGC	GTCTCTCTTG	GGGTGATCT
561	GGGCAGTATG	GATGAGGAGG	AAGAGATTGC	AACACCTCCA	CCACCACCCC	CTCCCAAAAA	GGAGACCAAG	CCAGAGCCAA
641	TGGAAGAAGA	TCTTCCAGAG	AATAAGAAGC	AGGCACTGAA	AGAAAAAGAG	CTGGGGAACG	ATGCCTACAA	GAAGAAGAC
721	TTTGACACAG	CCTTGAAGCA	TTACGACAAA	GCCAAGGAGC	TGGACCCAC	TAACATGACT	TACATTACCA	ATCAAGCAGC
801	GGTATACTTT	GAAAAGGGCG	ACTACAATAA	GTGCCGGGAG	CTTTGTGAGA	AGGCCATTGA	AGTGGGGAGA	GAAAACCGAG
881	AAGACTATCG	ACAGATTGCC	AAAGCATATG	CTCGAATTGG	CAACTCCTAC	TTCAAGAAG	AAAAGTACAA	GGATGCCATC
961	CATTTCTATA	ACAAGTCTCT	GGCAGAGCAC	CGAACCCAG	ATGTGCTCAA	GAAATGCCAG	CAGGCAGAGA	AAATCCTGAA
1041	GGAGCAAGAG	CGGCTGGCCT	ACATAAACCC	CGACCTGGCT	TTGGAGGAGA	AGAACAAGG	CAACGAGTGT	TTTCAGAAAG
1121	GGGACTATCC	CCAGGCCATG	AAGCATTATA	CAGAAGCCAT	CAAAAGGAAC	CCGAAAGATG	CCAAATTATA	CAGCAATCGA
1201	GCTGCCCTGCT	ACACCAAACCT	CCTGGAGTTC	CAGCTGGCAC	TCAAGGACTG	TGAGGAATGT	ATCCAGCTGG	AGCCGACCTT
1281	CATCAAGGGT	TATACACGGA	AAGCCGCTGC	GCTGGAAGCG	ATGAAGGACT	ACACCAAAGC	CATGGATGTG	TACCAGAAGG
1361	CGCTAGACCT	GGACTCCAGC	TGTAAGGAGG	CGGCAGACGG	CTACCAGCGC	TGTATGATGG	CGCAGTACAA	CCGGCAGGAC
1441	AGCCCCGAAG	ATGTGAAGCG	ACGAGCCATG	GCCGACCCTG	AGGTGCAGCA	GATCATGAGT	GACCCAGCCA	TGCGCCTTAT
1521	CCTGGAACAG	ATGCAGAAGG	ACCCCCAGGC	ACTCAGCGAA	CACTTAAAGA	ATCCTGTAAT	AGCACAGAAG	ATCCAGAAGC
1601	TGATGGATGT	GGTCTGATT	GCAATTCGGT	GA				

Figura 8: cDNA da Hop humana. Sequência do cDNA da Hop humana, clone do consócio IMAGE gi|110225356:148-1779 *Homo sapiens* stress-induced-phosphoprotein 1 (STIP1), sequência do RNAm.

3.2. Oligonucleotídeos e enzimas

Os oligonucleotídeos iniciadores, construídos a partir da sequência do cDNA de interesse, foram adquiridos comercialmente da empresa IDT e as enzimas de restrição, para os experimentos de biologia molecular, das empresas Promega, New England Biolabs e Fermentas. Os oligonucleotídeos construídos para clonagem e sequenciamento estão listados no quadro a seguir.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados.

Clonagem e sequenciamento			
Oligonucleotídeo	Sequência (5' – 3')	Amplicon (pb)	Tm (°C)
F_Hsp82_XhoI - Clonagem em pRT100 (Direto)	GGCCTCGAGATGGCCTC	2109	60
R_Hsp82_BamHI - Clonagem em pRT100 (Reverso)	GAGCTCGGATCCTTAGTCG		62
H82CAN1-S – Sequenciamento (5')	TCAAGGATGATCAGTTG	-	45
H82CAN2-S – Sequenciamento (5')	AGAACAAGATCCTCAAG	-	42
H82CAN3-S – Sequenciamento (5')	AAGGTGATCAAGGAGGT	-	47
NPTII_F	CATGTGTCACGACGAGATCC	100	54
NPTII_R	GATGATCTGGACGAAGAGCA		54
HOP_F – Clonagem em pET28a (Direto) e sequenciamento (5')	ATGAATTCATGGAGCAGGTCAATGAGCT	1630	64
HOP_R– Clonagem em pET28a (Reverso) e sequenciamento (5')	ATAAGCTTTCACCGAATTGCAATCAGACC		60

3.3. Vetores para clonagem e expressão

Para clonagem foi utilizado o vetor pGEM-T Easy (Promega) e para subclonagem da Hsp90 de cana-de-açúcar foram utilizados os vetores pRT100, pCAMBIA 2300 (www.cambia.org). Para a expressão da co-chaperona Hop D456G foi utilizado o vetor pET28a (Novagen).

3.4. Cepa de *A. tumefaciens*

3.4.1. Cepa GV3101

Gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Michel Vincentz (CBMEG – Unicamp). Utilizada para transformação de *A. thaliana*.

3.5. Cepas de *E. coli*

3.5.1. DH10B

Utilizada para propagação e manutenção de vetores plasmidiais.

3.5.2. DH5 α

Utilizada para propagação e manutenção de vetores plasmidiais.

3.5.3. BL21(DE3)

Utilizada para a expressão de proteínas. Essa linhagem possui baixos níveis de produção de proteases, que poderiam degradar a proteína de interesse, e possui ainda o gene (DE3), responsável pela síntese da enzima T7 RNA polimerase, importante para expressão em sistema pET.

3.6. Cultivo e transformação de *A. thaliana*

3.6.1. Solução de micronutrientes (para sol. nutriente)

2860 mg/L de H_3BO_3

1810 mg/L de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$

100 mg/L de $ZnCl_2$

20 mg/L $H_2MoO_4 \cdot H_2O$

40 mg/L $CuCl_2$

3.6.2. Solução de Fe-EDTA (para sol. nutriente)

24,9 g/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

26,1 g/L de EDTA

3.6.3. Solução nutriente (10X)

50 mmol/L KNO_3

25 mmol/L KH_2PO_4

40 mmol/L $MgSO_4$

20 mmol/L $Ca(NO_3)_2$

Diluir para 1X e adicionar 1mL/L de Solução de Micronutrientes e 1mL/L Solução de Fe-EDTA.

3.6.4. Solução de transformação

5% Sacarose

0,03% Silwet-L77

O Silwet-L77 é um surfactante siliconado (promove uma penetração da solução contendo *A. tumefaciens*); deve se manusear em cabine de fluxo laminar (vertical) e não entrar em contato direto com o produto, devido a sua toxicidade.

3.7. Soluções e meios de cultura

3.7.1. Tampão de extração de RNA

50 mM Tris-HCl pH 9

100 mM NaCl

2% SDS

10 mM EDTA

20 mM β -mercaptoetanol

3.7.2. Tampão tris-borato-EDTA: TBE (10x concentrado)

890 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0

890 mmol/L de ácido bórico

20 mmol/L de EDTA

3.7.3. Tampão de amostra para DNA (6x concentrado)

0,25% de azul de bromofenol (Massa/Volume: m/v)

0,25% de xileno cianol FF (m/v)

40% de sacarose (m/v)

3.7.4. Tampão de corrida SDS-PAGE

25 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0

250 mmol/L de glicina

0,1% SDS (sódio dodecil sulfato) (m/v)

3.7.5. Tampão de amostra para proteína (2x concentrado)

50 mmol/L de Tris-HCl pH 6,8

100 mmol/L DTT (Ditioneitol)

2% SDS (m/v)

0,1% de azul de bromofenol (m/v)

10% glicerol (v/v)

3.7.6. Solução corante – gel de poliacrilamida

2,5 g/L de comassie brilliant blue R250

Etanol absoluto: água (MilliQ®) (Proporção 1:2 v/v)

Ácido acético glacial (50 mL em 1 L)

3.7.7. Solução descorante – gel de poliacrilamida

Etanol absoluto: água (MilliQ®) (Proporção 1:2 v/v)

Ácido acético glacial (50 mL em 1 L)

3.7.8. BN-PAGE Ânodo

50 mmol/L Bis-Tris pH 7,0

3.7.9. BN-PAGE Cátodo blue

15 mmol/L Bis-Tris pH 7,0

50 mmol/L Tricina

Coomassie-Blue G250 0,02%

3.7.10. BNG 3X

150 mmol/L Bis-Tris pH 7,0

200 mM Ácido aminocapróico

3.7.11. BN-PAGE Acrilamida-Bisacrilamida mix

480g/L de acrilamida

15g/L de bisacrilamida

3.7.12. Tampão de lise

50 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0

100 mmol/L de KCl

1 mmol/L de EDTA

3.7.13. Tampão de extração de proteínas – *A. thaliana*

25 mmol/L Tris-HCl pH 7,5

150 mmol/L NaCl

3.7.14. Tampão TBS-T

20 mmol/L de Tris-HCl pH 7,6

140 mmol/L de NaCl

0,03% de Tween-20

3.7.15. Tampão de transferência

48 mmol/L de Tris-HCl

39 mmol/L de glicina

0,037% de SDS

20% de metanol

3.7.16. Soluções tampão – purificação da proteína Hop

Tampão A: Cromatografia de afinidade – lavagem/equilíbrio da coluna

20 mmol/L de fosfato de sódio pH 7,4

500 mmol/L de NaCl

20 mmol/L de imidazol

Tampão B: Cromatografia de afinidade – eluição

20 mmol/L de fosfato de sódio pH 7,4

500 mmol/L de NaCl

500 mmol/L de imidazol

Tampão C: Cromatografia de troca iônica – diálise preparatória, lavagem/equilíbrio da coluna

25 mmol/L Tris-HCl pH 7,5

10 mmol/L NaCl

2 mmol/L EDTA

Tampão D: Cromatografia de troca iônica – eluição

25 mmol/L Tris-HCl pH 7,5

1 mol/L NaCl

2 mmol/L EDTA.

Tampão E: Cromatografia de Gel filtração e ensaios biofísicos

25 mmol/L Tris-HCl pH 7,5

200 mmol/L NaCl

2 mmol/L EDTA.

Tampão F: Gel filtração analítica

25 mmol/L Tris-HCl pH 7,5

150 mmol/L NaCl

2 mmol/L EDTA.

3.7.17. Tampão de transformação I pH 5,8 (para preparação de células termocompetentes)

30 mmol/L de hidróxido de sódio (KOH)

30 mmol/L de ácido acético

50 mmol/L de cloreto de magnésio (MgCl₂)

20 mmol/L de cloreto de rubídio (RbCl)

2 mmol/L de cloreto de cálcio (CaCl₂)

15% de glicerol 90% (v/v)

3.7.18. Tampão de transformação II pH 7,0 (para preparação de células termocompetentes)

2 mmol/L de MoPs (ácido 4-morfolino propano sulfônico)

2 mmol/L de RbCl

15 mmol/L de CaCl₂

15% de glicerol 90% (v/v)

3.7.19. Meio de cultura Luria-Bertani pH 7,0 (LB)

10 g/L de peptona

5 g/L de extrato de levedura

10 g/L de NaCl

3.7.20. Meio de cultura LB/Ágar (1,5%)

1,5 % de ágar em 1 L de LB (m/v)

3.7.21. Meio de cultura SOB pH 7,0

20 g/L de peptona

5 g/L de extrato de levedura

0,5 g/L de NaCl

2,5 mmol/L de KCl (cloreto de potássio)

3.7.22. Meio de cultura SOC pH 7,0

Meio SOB

0,01 mmol/L de MgCl₂

0,02 mmol/L de glicose

3.7.23. Meio de cultura PSI – pH 7,6

16 g/L de peptona

10 g/L de extrato de levedura

5 g/L de NaCl

0,4 g/L KH_2PO_4 fosfato de potássio monobásico

0,5 g/L Na_2HPO_4 fosfato de sódio dibásico

3.7.24. Meio Murashige & Skoog pH 5,7(MS)

Macronutrientes

1650 mg/L de NH_4NO_3

440 mg/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

1900 mg/L de KNO_3

370 mg/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

170 mg/L de KH_2PO_4

Micronutrientes

6200 mg/L de H_3BO_3

16900 mg/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

8600 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

830 mg/L de KI

250 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

25 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

25 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

Fe-EDTA

1390 mg/L de FeSO_4

1862 mg/L de EDTA

Vitaminas de Gamborg.

25 mg/L de sacarose

Para *A. thaliana* utilizar as quantidades reduzidas pela metade (0,5x meio MS)

3.7.25. Meio Murashige & Skoog ágar (MS ágar)

Meio MS com adição de:

8 g/L de ágar

pH 5,7

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1. Manipulação de ácidos nucleicos

4.1.1. Reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)

O cDNA da Hsp90 de cana-de-açúcar foi amplificado a partir do clone em vetor pET28a, e a Hop foi amplificada a partir do clone IMAGE. A reação foi realizada com *Taq DNA Polimerase High Fidelity* (Invitrogen), e o programa utilizado para a PCR foi constituído pelas seguintes etapas: 1) desenovelamento inicial do cDNA molde a 94°C por 5 min; 2) mantida a temperatura o desenovelamento continua por mais 1 min; 3) mudança da temperatura para a respectiva T_m (ver quadro 1) para anelamento dos oligonucleotídeos durante 40 s; 4) para polimerização a temperatura foi alterada para 72°C, mantida por 2 min (média de 1min/1000pb). 5) Para a amplificação do cDNA os passos 2 a 4 foram repetidos por 30 vezes e foi finalizada com o armazenamento a 4°C. A reação foi realizada em um termociclador (Mastercycler Personal - Eppendorf).

4.1.2. Extração de DNA plasmidial

A preparação ou extração do DNA plasmidial de interesse foi realizada segundo o método de lise alcalina em pequena escala como descrito em Sambrook et al. (1989). No intuito de obter maior rendimento na extração de DNA plasmidial e com um grau de pureza mais elevado, essencialmente para as PCR e para o sequenciamento de DNA, o método de lise alcalina foi realizado com o auxílio de kit de extração de DNA plasmidial, QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen), de acordo com o protocolo do fabricante.

4.1.3. Eletroforese em gel de agarose

Foi empregada eletroforese em gel de agarose para análise do DNA proveniente de preparações plasmidiais, reações de restrição e PCR. Utilizou-se o sistema *BIOAHS Electrophoresis Cell* (Bio América) e gel de agarose a 1% em tampão TBE. Após a aplicação do DNA no gel, este foi submetido a uma corrente elétrica de 100 V, por aproximadamente uma h. Em seguida o gel foi incubado em tampão TBE, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, por 30 min. Para visualização foi utilizado o transluminador 3UV™ Benchtop (UVP), para registro dos géis foi utilizada câmera digital Kodak™ Easy Share C763.

4.1.4. Purificação de fragmento de DNA de gel de agarose

A extração de fragmentos de DNA de gel de agarose foi empregada para purificação de reações de restrição, para a devida separação do fragmento de interesse. Foi utilizado o kit QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen), segundo as instruções do fabricante.

4.1.5. Extração de RNA

Para a extração do RNA total, amostras de *A. thaliana* com 30 dias após o plantio foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C . O RNA foi extraído, separadamente, de duas linhagens transgênicas (H90-2.15 e H90-4.1) e do controle não transformado (WT), com o tecido de um *pool* de 5 plantas maceradas.

O tecido macerado foi transferido para um tubo cônico com 5mL de tampão de extração de RNA por g de tecido, e igual volume de fenol (pH 8,0). As amostras foram homogeneizadas durante 1 min em vortex, e em seguida foi adicionado igual volume de clorofórmio e mais uma vez a mistura foi homogeneizada em vortex por 1 min. As amostras foram centrifugadas (4°C / 8000xg / 10 min), e a fase aquosa foi removida para um novo tubo. Uma nova extração fenol e clorofórmio foi realizada, e novamente as amostras foram centrifugadas (4°C / 8000xg / 10 min). A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, com a adição de 2x o volume de clorofórmio, e a mistura foi homogeneizada em vórtex por 1 min. Após centrifugação (4°C / 8000xg / 10 min), a fase aquosa foi removida para um novo tubo, com a adição de 1/10 do volume de NaOAc 3M (pH 5,2) e 3 volumes de etanol 100% (gelado). A amostra foi incubada a -80°C durante 1 h para precipitação e em seguida foi centrifugada (4°C / 8000xg / 10 min). O sobrenadante foi removido, o precipitado foi lavado com etanol 70% e novamente centrifugado por 10 min. Em seguida, o etanol foi removido e o precipitado seco (5-10 min na bancada) foi ressuscitado em água livre de RNase e quantificado em NanoDrop (Thermo).

4.1.6. Sequenciamento de RNA mensageiro

O sequenciamento de RNAm foi realizado na *Facility* de sequenciamento de alto desempenho da Universidade da Carolina do Norte (*High Throughput Sequencing Facility at the Center for Genome Sciences, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, USA*). Para cada amostra, 10 μg do RNA total foram utilizados para o preparo das bibliotecas de acordo com o protocolo da Illumina. Foi realizado o sequenciamento de 1 amostra de cada transgênico (H90-4.1 e H90-2.15) e 1 do controle (WT). Os fragmentos sequenciados foram alinhados contra o genoma de *A. thaliana*, com o uso do programa Exonerate, permitindo 2 *mismatches* (Slater & Birney,

2005). A anotação das sequências foi realizada com o programa Autofact (Koski et al, 2005), com base nos bancos de dados NR do NCBI (*non-redundant database – NCBI*) e KEEG (banco de dados de vias metabólicas) (Kanehisa & Goto, 2000). A anotação funcional foi realizada com o BLAST2GO (Conesa et al, 2005). O valor de expressão foi determinado usando o FPKM (*Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped*), que foi utilizado para determinar a razão da expressão transgênico (H90-2.15):selvagem (WT) e transgênico (H90-4.1):selvagem (WT) (Mortazavi et al, 2008). Para comparar os valores de FPKM entre selvagem e transgênico foi utilizado Teste-T (valor de corte $p=0,01$). Na comparação entre transgênico e selvagem foram considerados com expressão diferencial os transcritos com *fold change* maior que 1,0 e menor que -1,0.

4.2. Montagem dos interatomos

Para facilitar a análise das relações de Hsp90 e os transcritos diferencialmente expressos (detectados por sequenciamento de RNA), redes de interações foram construídas com o uso da ferramenta String 9.0 (<http://string-db.org/>).

4.3. Estratégia de clonagem da Hsp90 de cana-de-açúcar

4.3.1. Clonagem em vetor de transferência

Antes da subclonagem em no vetor de destino o produto de PCR obtido do cDNA de interesse foi clonado em vetor de transferência, no intuito de facilitar a restrição com as enzimas adequadas para a posterior subclonagem em vetor de expressão. O vetor de transferência utilizado foi o pGEM-T Easy (Figura 9), um vetor linearizado adequado para a clonagem de produtos de PCR. Este apresenta timidinas adicionadas às suas extremidades 3', permitindo uma melhor compatibilidade de tais extremidades com o produto de PCR gerado pela *Taq DNA polimerase*, já que esta enzima adiciona desoxiriboadenosina ao terminal 3' dos fragmentos amplificados na PCR. Adicionalmente, a presença das timidinas aprimora a eficiência de ligação dos produtos de PCR, pois previne a recircularização do vetor. O pGEM-T Easy também apresenta sítios para enzimas de restrição convenientemente presentes na sequência codificante da enzima β -galactosidase, o que possibilita a identificação dos clones recombinantes através da diferente coloração das colônias na presença e ausência desta enzima e de compostos análogos à galactose (www.promega.com).

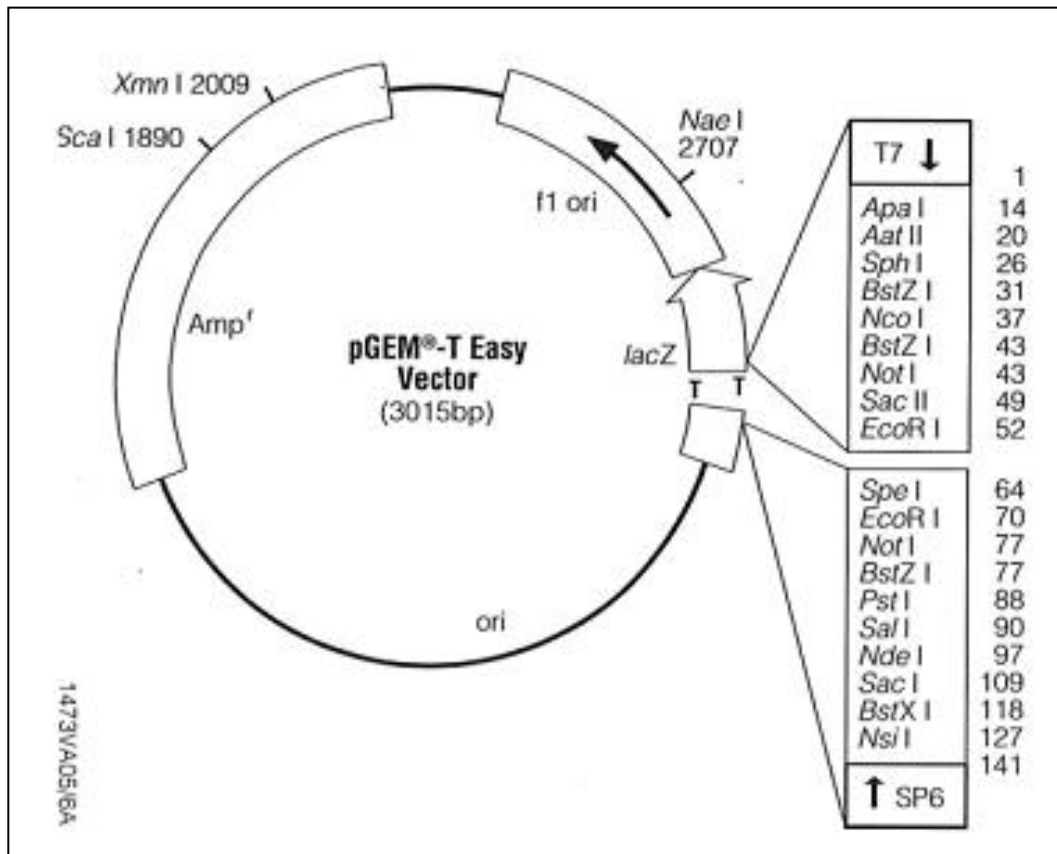


Figura 9: Mapa do vetor pGEM-T Easy. Extraído de *pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems – Technical Manual*. O vetor contém gene de resistência a ampicilina (Amp), sequência codificante da proteína β-galactosidase (contida no operon lacZ), com múltiplos sítios de clonagem. Os insertos podem ser sequenciados pelos oligonucleotídeos T7 e Sp6.

4.3.2. Inserção do promotor constitutivo e sinal de poliadenilação

Em eucariotos, cada gene possui seu próprio promotor bem como elementos regulatórios proximais. A regulação da expressão gênica por fatores de transcrição é dita combinatorial, uma vez que requer a coordenada expressão e interação de múltiplas proteínas (em procariotos, usualmente uma única proteína é requerida) (Nelson & Cox, 2008; Phillips, 2008). Quando a transcrição é finalizada, inicia-se o processamento do RNA com a remoção de íntrons e poliadenilação. A poliadenilação é um importante passo para garantir a estabilidade do RNAm além do transporte nuclear e tradução.

Desta forma, para a expressão de uma dada proteína em sistema eucariótico, se faz necessário a inserção de uma região promotora bem como uma sequência sinal de poliadenilação. O vetor pRT100 possui a sequência do promotor 35S e sinal de poliadenilação provenientes do

vírus do mosaico da couve flor (CaMV 35S e CaMV poliA), com múltiplos sítios de clonagem localizados entre estas regiões, e sequência iniciadora ATG incorporada a sequência consenso para ótima iniciação da transcrição (ligação do ribossomo) em eucariotos (figura 10). O 35S é um promotor constitutivo, amplamente utilizado em engenharia genética. Confere expressão constitutiva de genes heterólogos na maioria dos vegetais, com altos níveis de expressão em dicotiledôneas (Benfey & Chua, 1990).

A estratégia baseou-se na subclonagem em vetor pRT100 para inserção da sequência promotora e poliA, seguida da remoção desta construção com as enzimas adequadas, para posterior inserção no vetor binário pCAMBIA2300 (figura 11).

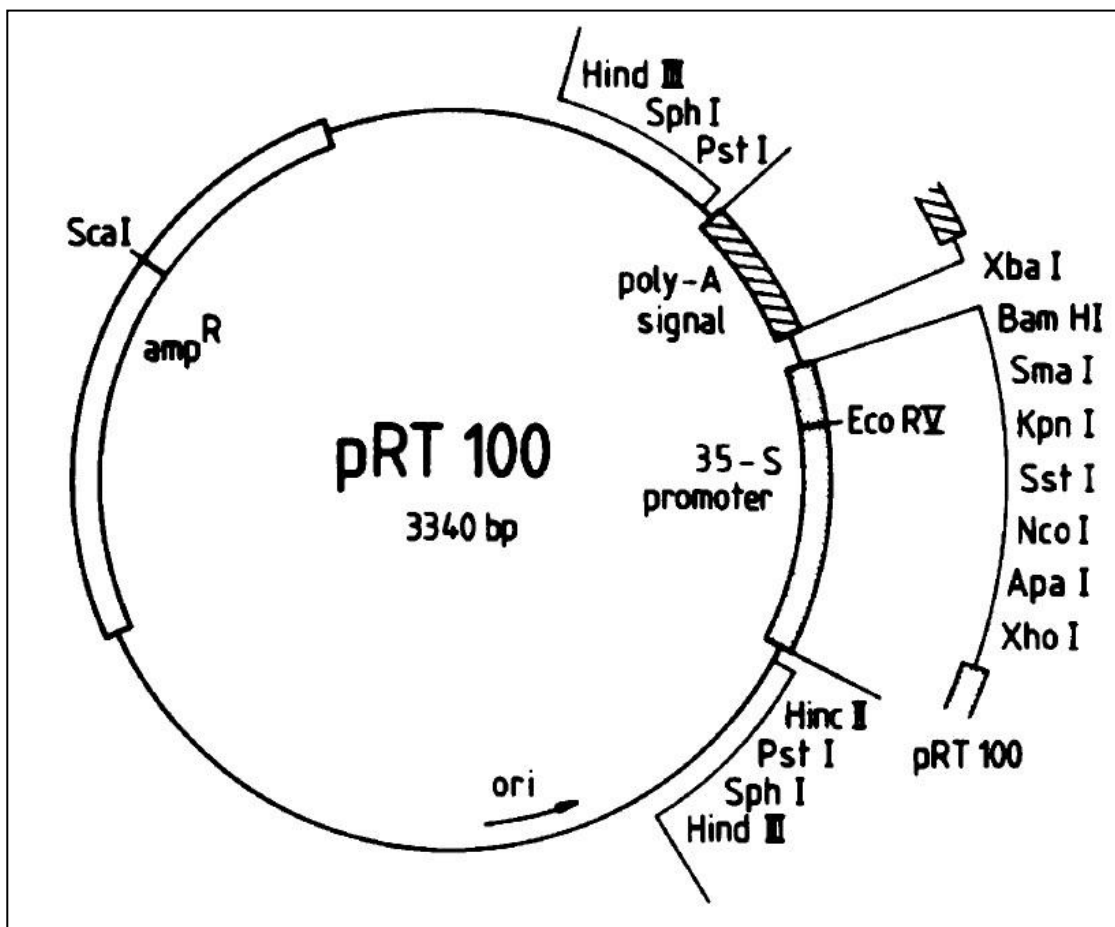


Figura 10: Mapa do vetor pRT100. Extraído de Töpfer et al, 1987. O vetor contém gene de resistência a ampicilina (Amp), origem de replicação em bactérias (ori), sequência promotora 35S (35S promoter) e sinal de poliadenilação (poly-A signal), com múltiplos sítios de clonagem entre estas regiões e flanqueando as mesmas.

4.3.3. Subclonagem em vetor de expressão – sistema binário

A descoberta de que os genes de virulência e a região do T-DNA não necessitam residir no mesmo plasmídeo levou a construção de um sistema binário de transformação de plantas no qual o T-DNA e a região *vir* estão em plasmídeos separados:

- **vetor com ampla gama de hospedeiros** – possui origem de replicação (*ori*) que permite a manutenção numa ampla gama de bactérias incluindo *E. coli* e *Agrobacterium*. Geralmente contém: bordas direita e esquerda do T-DNA com múltiplos sítios de clonagem e marcas de seleção para *E. coli*, *Agrobacterium* e plantas. O plasmídeo é dito “desarmado” uma vez que os genes de virulência foram removidos.

- **vetor *Ti* auxiliar** – vetor abrigado em *A. tumefaciens*, com região contendo os genes *vir* intacta, porém sem a região do T-DNA.

Com esta abordagem os plasmídeos contendo o T-DNA podem ser manipulados geneticamente (tendo *E. coli* como bactéria hospedeira) com maior facilidade em função do tamanho reduzido. A transferência deste plasmídeo a uma linhagem de *A. tumefaciens* que abriga o plasmídeo com os genes *vir* permite a eficiente introdução do T-DNA manipulado em uma célula vegetal (Hoekema et al, 1983).

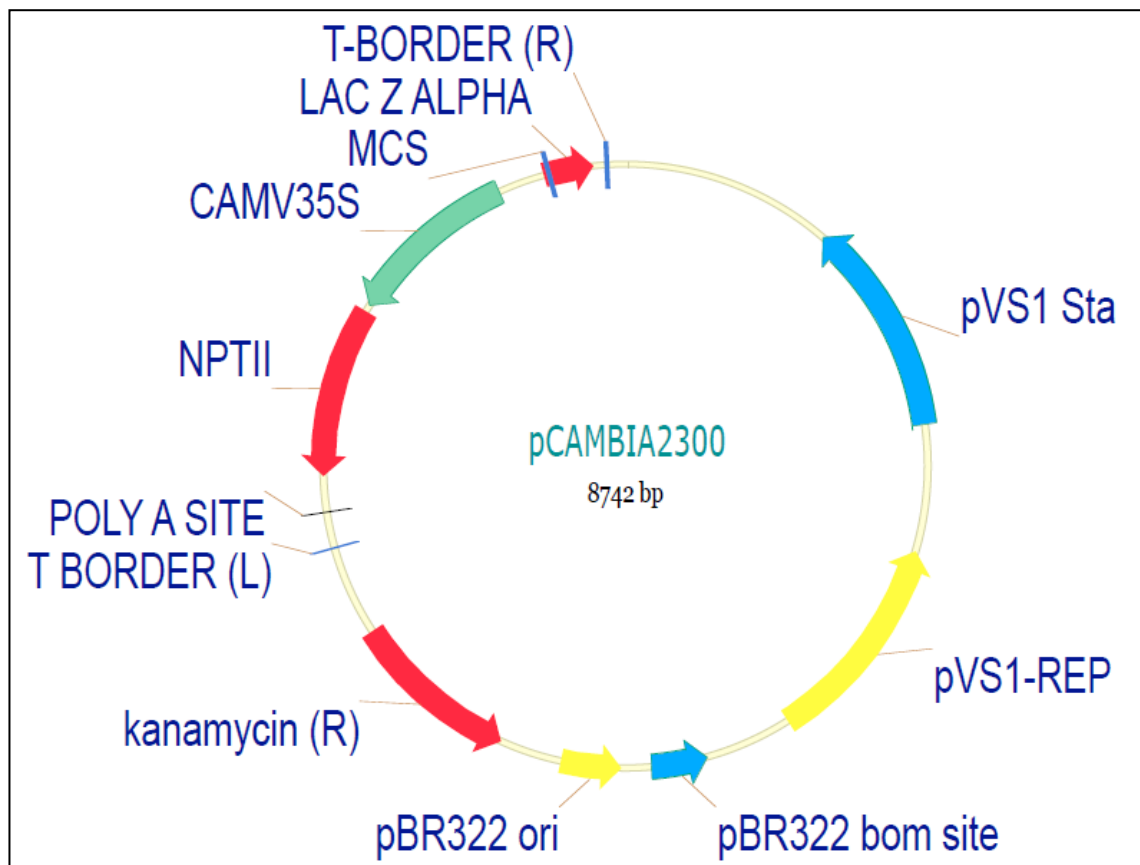


Figura 11: Mapa do vetor pCAMBIA2300. Extraído de <<http://www.cambia.org>>. O vetor contém origem de replicação em bactérias (pBR322 ori), região de replicação pVS1 (pVS1-REP) e estabilidade pVS1 (pVS1 Sta) para replicação em *Agrobacterium*. As bordas esquerda (T-Border(L)) e direita (T-Border(R)) compreendem a porção de DNA que será transferida e integrada no genoma da planta. Também possui gene de resistência a canamicina em bactérias (kanamycin (R)) e plantas (NPTII), sendo o último controlado por CAMV35S. No lacZ possui múltiplos sítios de clonagem.

4.4. Estratégia de clonagem da Hop D456G

A estratégia de clonagem da Hop D456G foi iniciada com a amplificação do clone IMAGE via PCR com os oligonucleotídeos HOP_F e HOP_R. Em seguida o produto de PCR foi ligado ao vetor pGEM T Easy, e após a seleção dos clones positivos, o fragmento correspondente a sequência da proteína foi removido através de restrição e ligado no vetor pET28a, originando o vetor pET28a-HopD456G.

A expressão do cDNA clonado no sistema de expressão pET ocorre apenas na presença da RNA polimerase do vírus T7, devido à especificidade do promotor (Studier et al, 1990). As cepas de *E. coli* BL21(DE3) possuem, integrado ao seu genoma, o prófago do bacteriófago T7, nas quais

o promotor lacUV5 controla a expressão da T7 RNA polimerase (Figura 12). A repressão do promotor lacUV5 é mantida na presença de glicose e na ausência de seu indutor natural, a 1,6-aldolactose, um derivado da galactose (Studier et al, 1990). O produto do gene *lac I* atua como repressor quando ligado ao operador O (presente no prófago T7), sendo capaz de impedir a expressão da T7 RNA polimerase, não ocorrendo a transcrição do cDNA de interesse. Porém, na presença de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo), um análogo do indutor natural (1,6-aldolactose), o repressor é desligado do operador liberando a expressão da T7 RNA polimerase do bacteriófago T7, que por conseguinte, irá atuar na transcrição do gene de interesse (Sambrook et al, 1989).

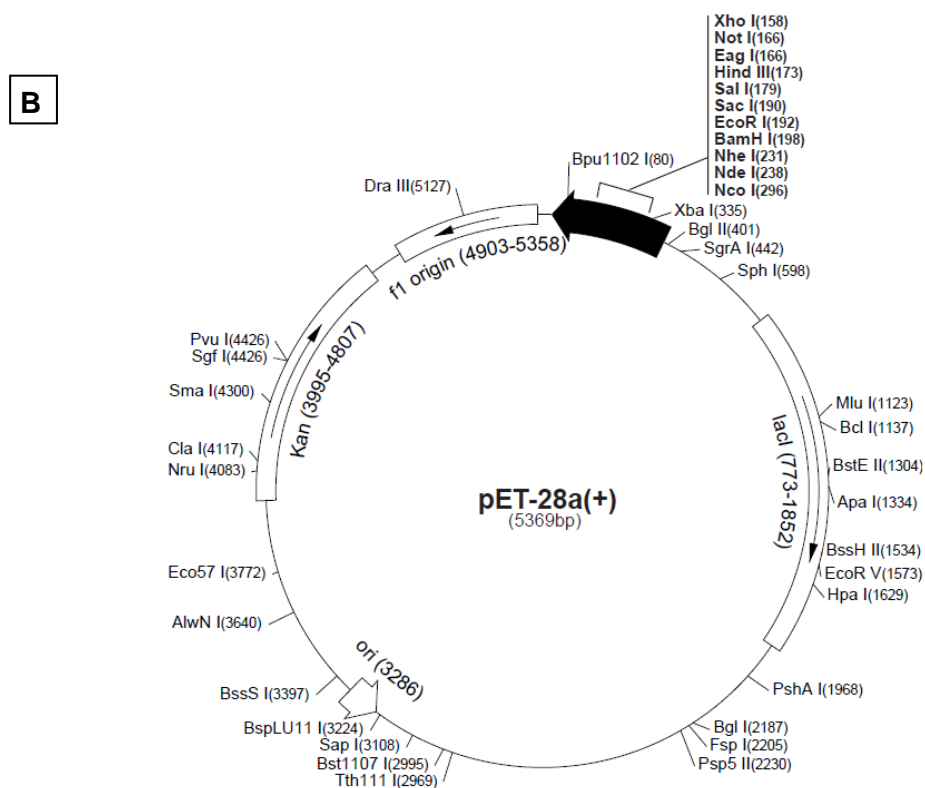
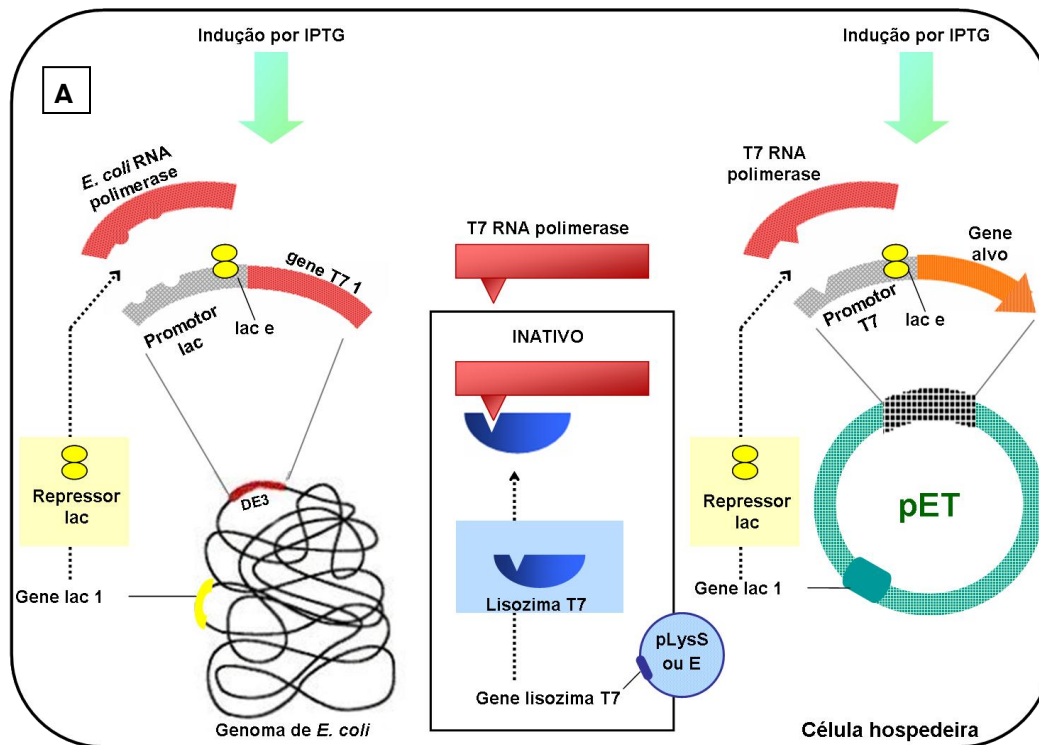


Figura 12: Sistema pET de expressão. Extraído e modificado do catálogo da Novagen (www.novagen.com/vector). **A)** Esquema da maquinaria de expressão. **B)** Mapa do vetor. O vetor contém gene de resistência a canamicina (Kan), origem de replicação em bactérias (ori), sequência que codifica proteína repressora do *lacUV5*.

4.5. Preparo de células competentes (*E. coli*)

4.5.1. Termocompetentes

Para a preparação de bactérias termocompetentes, foi preparado um pré-inóculo em meio PSI, na presença do antibiótico necessário de acordo com a cepa, o meio foi inoculado com uma colônia de bactérias retirada de meio sólido. Esse pré-inóculo após incubação de 16 horas (37°C / 200 rpm) foi diluído 10x em meio PSI e incubado em estufa com agitação (37°C / 200 rpm). Foram retiradas amostras desse inóculo para medição da absortividade em 600 nm (A_{600}) para monitoramento do crescimento bacteriano, e, ao detectar o valor de A_{600} entre 0,5 e 0,7 o inóculo foi retirado da incubadora e levado ao gelo. Em seguida, foi centrifugado a 3000xg, 4°C por 10 min, e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado foram adicionados 25 mL de tampão de transformação I estéril, após repouso de 15 min no gelo foi levado à centrifugação novamente (3000xg, 4°C por 10 min). O precipitado obtido foi ressuscitado em 8 mL tampão de transformação II estéril, fracionado em amostras de 150 μ L, e armazenados a -80°C.

4.5.2. Eletrocompetentes

Para o preparo de bactérias eletrocompetentes, foi preparado um pré-inóculo em meio LB ou SOB, na presença do antibiótico necessário de acordo com a cepa, o meio foi inoculado com uma colônia de bactérias retirada de meio sólido. Esse pré-inóculo após incubação de 16 horas (37°C em 200 rpm) foi diluído 100x em meio LB ou SOB e incubado em estufa com agitação (37°C em 200 rpm) por cerca de 4 h. Foram retiradas amostras desse inóculo para medidas de absortividade em 600 nm (A_{600}) para monitoramento do crescimento bacteriano, e ao detectar o valor de A_{600} entre 0,5 e 0,8 o inóculo foi retirado da incubadora e levado ao gelo. Em seguida, foi centrifugado a 3000xg, 4°C por 10 min, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 250 mL de água estéril (gelada) e centrifugado (3000xg/4°C/10 min), e este procedimento foi repetido mais uma vez. Em seguida o sobrenadante foi descartado, e o precipitado contendo as células foi ressuscitado em solução de glicerol 15% estéril (gelada) e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuscitadas com o que restou da solução descartada. Em seguida foram separadas em amostras de 40 μ L e armazenadas a -80 °C.

4.6. Transformação de células competentes (*E. coli*) e seleção dos transformantes

4.6.1. Choque térmico

Para a transformação das bactérias competentes por choque térmico o plasmídeo de interesse foi adicionado a um tubo contendo 150 μ L de solução contendo as bactérias competentes da cepa selecionada, e foi levado a incubação no gelo por 30 min. Em seguida, o tubo com o plasmídeo e as bactérias foi levado ao aquecimento, em um banho térmico (42°C) por 1 min e 30 s e então novamente colocado no gelo. Após o choque térmico, foi adicionado 1 mL de meio SOC ao tubo, e levado à incubadora com agitação (37°C, 200 rpm) por 1 h. Decorrido esse tempo, foi levado à centrifugação (4000xg) por 3 min, o precipitado obtido foi ressuspenso em pequeno volume de meio SOC e espalhado em uma placa de petri contendo meio LB sólido na presença do antibiótico adequado.

Para transformação de ligações contendo produto de PCR e vetor de transferência pGEM-T Easy (Promega), foram utilizadas placas contendo meio sólido na presença de 0,5 mM de IPTG, 80 μ g/mL de X-gal (5-bromo-4-cloro-indolil-beta-galactopiranosídeo) e 100 μ g/mL de ampicilina. Nesse caso, a seleção dos clones foi feita através da coloração diferenciada das colônias crescidas na placa, branca e azul, esta última devida à clivagem do X-gal pela enzima β -galactosidase. Esta enzima não é expressa no caso da ligação de um inserto no vetor, pois isso ocorre no meio do gene que codifica a β -galactosidase, assim as colônias brancas são positivas para a ligação do inserto de interesse no vetor (Sambrook, 1989), o antibiótico foi utilizado para seleção das células que contêm o plasmídeo. A seleção dos clones transformantes foi feita através de PCR de colônia e análise de restrição com as enzimas utilizadas para a subclonagem em vetor de expressão.

4.6.2. Eletroporação

Para transformação das bactérias eletrocompetentes, o plasmídeo de interesse foi colocado em um tubo com 40 μ L de solução contendo as bactérias competentes da cepa selecionada, e foi levado a incubação no gelo por 2 min. Em seguida, o conteúdo do tubo foi transferido para uma cubeta de eletroporação (gelada) e a esta foi aplicado um pulso de 1,5 kV/cm por 5 min e imediatamente depois foi adicionado meio SOC ou LB, e este conteúdo foi transferido novamente para o tubo. Em seguida o tubo foi levado à incubadora com agitação (37°C, 200 rpm) por 1 h. Decorrido esse tempo, foi levado à centrifugação (4.000xg) por 3 min, o precipitado obtido foi ressuspenso em pequeno volume de meio SOC e espalhado em uma placa de petri contendo

meio LB sólido na presença do antibiótico adequado. A seleção de transformantes em pGEM-T Easy foi feita de maneira semelhante a transformação por choque térmico.

4.7. Preparo de células termocompetentes (*A. tumefaciens*)

Para o preparo de células de *A. tumefaciens* termocompetentes, foi preparado um pré-inóculo em meio LB, na presença do antibiótico gentamicina (a 25µg/mL) para a cepa GV3101, o meio foi inoculado com uma colônia de bactérias retirada de meio sólido. Esse pré-inóculo após incubação de 16 h (28°C em 150 rpm) foi diluído 25x em meio LB e incubado em estufa com agitação (28°C em 150 rpm) por cerca de 16 horas. A absortividade em 600 nm (A_{600}) foi monitorada até a cultura atingir a A_{600} entre 0,5 e 1,0, em seguida o inóculo foi retirado da incubadora e levado ao banho de gelo por 15 min. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 3000xg, 4°C por 15 min, e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuscitado em solução de CaCl_2 20 mM e glicerol 15% estéril (gelada). A suspensão de células foi separada em alíquotas de 100 µL e armazenadas a -80 °C.

4.8. Transformação de células termocompetentes (*A. tumefaciens*) e seleção dos transformantes

Para a transformação de *A. tumefaciens* cepa GV0131, o plasmídeo de interesse foi adicionado a um tubo contendo 100 µL de suspensão de bactérias competentes, e foi levado a incubação no gelo por 30 min. Em seguida, as células foram incubadas em nitrogênio líquido até total solidificação e imediatamente transferidas para incubação a 37 °C por 5 min. Decorrido este tempo, foi adicionado 1 mL meio LB e este material foi incubado por 2 horas a 28 °C. Após o crescimento, cerca de 500 µL da suspensão de células foi plaqueado em LB ágar contendo o antibiótico apropriado para a seleção do vetor.

4.9. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) é usada para a separação de moléculas, através da migração das mesmas pelo gel pela aplicação de uma diferença de potencial. A presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) causa desnaturação da proteína além de atribuir a esta cargas negativas, proporcionando a separação das moléculas segundo a relação massa/carga (Voet et al, 2000). O gel foi preparado de acordo com Sambrook et al (1989). As amostras de proteína foram diluídas em tampão de amostra para eletroforese, e foram submetidas à eletroforese, juntamente com um padrão de massa molecular

(Low e High Range - Bio-Rad). A eletroforese foi conduzida em gel com 12% de acrilamida, voltagem constante de 200 V por cerca de 40 min. O gel foi imerso em solução corante e descorado em solução descorante.

A técnica de eletroforese BN-PAGE (*Blue Native Polyacrylamide Gel*) pode ser aplicada ao estudo das espécies oligoméricas, uma vez que a migração das proteínas ocorre em função da carga conferida pelo corante Coomassie-Blue G250. O gradiente de poliacrilamida gel (5,5-16%) funciona como uma peneira molecular que retém os complexos de acordo com o tamanho do poro, fazendo com que haja um 'ponto final' de migração. O gel foi preparado de acordo com Schägger et al (1994) e Schägger e von Jagow (1987). As amostras foram aplicadas diretamente nas canaletas, sem o uso de tampão de amostra, e a eletroforese foi conduzida a 4 °C, com a aplicação de 80V até a fronteira de migração atingir o gel de separação. Em seguida, a voltagem foi aumentada para 200V e o tampão 'cátodo *blue*' foi trocado por um tampão cátodo sem corante, e a eletroforese foi terminada quando a fronteira de migração atingiu o limite inferior do gel.

4.10. Expressão de proteínas

Bactérias da linhagem de expressão BL21(DE3) previamente transformadas com o plasmídeo pET28a-HopD456G foram cultivadas sob agitação constante de 200 rpm, a 37 °C, em meio de cultura LB com 30 µg/mL de canamicina. A absorção a 600 nm foi monitorada até $A_{600} = 0,8$. Em seguida, foi adicionado IPTG (Isopropiltiol-β-D-galactosídeo) na concentração final de 500 µM, para induzir a expressão da proteína de interesse (Sambrook et al, 1989), seguida da incubação por 4 horas.

Depois de induzida, a cultura foi centrifugada a 4000xg por 15 min, a 4°C, e o sedimento bacteriano armazenado à -20°C, para posterior lise e purificação das proteínas.

4.11. Purificação de proteínas

4.11.1. Lise

Ao sedimento bacteriano contendo proteínas recombinantes foi adicionado: tampão de lise (10 mL por litro de cultura), 100 µM de PMSF e 6 µg de lisozima. Após 1 hora de incubação em gelo, o conteúdo foi levado ao sonicador (Sonifier 450 - Branson), que pela aplicação do ultrassom promove o rompimento das células. Para a lise do sedimento da indução da Hop D456G foram utilizados 10 pulsos de 20 s com 10 min. de intervalo. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 12000xg por 20 min., a 4°C, o sobrenadante separado e então centrifugado novamente por mais 15 min.

4.11.2. Cromatografia de afinidade

O vetor pET28a possui uma seqüência anterior a região dos sítios múltiplos de clonagem, que codifica uma série de 6 histidinas. Esta cauda de poli-histidina tem como função facilitar o processo de purificação da proteína através da cromatografia de afinidade. Para isso, é utilizada uma resina contendo um íon metálico imobilizado, no caso o níquel. Os anéis imidazólicos das histidinas são capazes de interagir com o níquel, ficando retidas na coluna. A eluição foi feita com gradiente de imidazol, que compete com as histidinas pela interação com o níquel (Porath, 1975; Zhao et al, 1991).

Para purificação, foi utilizada a coluna de afinidade HiTrap Chelating 5 ml (GE), previamente carregada com níquel. A coluna de afinidade, assim como as demais colunas, foi acoplada ao sistema de cromatografia líquida por pressão (FPLC) ÄKTA FPLC (GE), e foi utilizado o fluxo de 2,5 mL/min. Primeiramente, a coluna foi equilibrada com Tampão A. Em seguida, a amostra foi injetada e a coluna foi lavada com cerca de 7 VC (Volumes de Coluna) do mesmo tampão, para eluição de possíveis contaminantes, que interagem fracamente com a resina. Em seguida, foi aplicado inicialmente 5 VC de 15% de Tampão B, e posteriormente, um gradiente linear de 15-100% (20 VC) de Tampão B.

4.11.3. Cromatografia de troca iônica

Este método cromatográfico promove a separação de proteínas de acordo com as cargas apresentadas em um dado pH, sendo este valor acima ou abaixo do pI (Nelson & Cox, 2008). A coluna utilizada foi a DEAE 26/20 45 mL (GE), trocadora de ânions. Desta forma, Hop D456G em pH 7,5, interage com as cargas positivas da coluna. Após 10 VC de Tampão C, foi aplicado um gradiente linear de Tampão D (20 VC) para a eluição da proteína. Uma diálise preparatória em 4 L de Tampão C foi realizada para a diluição do sal, proveniente do tampão da cromatografia de afinidade.

4.11.4. Cromatografia de gel filtração

Nesta técnica as moléculas são separadas de acordo com as suas dimensões (volume hidrodinâmico), pois a fase estacionária (matriz) possui poros que regulam o fluxo destas ao longo da coluna (Voet et al, 2000; Bollag et al, 1996; Uversky, 1993). A etapa final da purificação da Hop D456G foi feita por cromatografia de exclusão molecular (gel filtração), utilizando a coluna HiLoad Superdex™ 200 pg 26/60 (GE). A coluna foi previamente equilibrada com 320 mL de Tampão E e após a injeção da amostra a eluição foi feita com volume de tampão correspondente a 1 VC.

4.12. Ensaios espectroscópicos

4.12.1. Medida da concentração

A concentração da Hop D456G foi determinada espectroscopicamente segundo Pace, et al 1967, e segundo Edelhoich, 1967.

O valor de absorção obtido (após subtração da absorção do tampão) foi inserido na equação de Beer-Lambert, para o cálculo da concentração:

$$A = C \cdot l \cdot \varepsilon \text{ (Equação 1)}$$

Sendo, A a absorbância, l o comprimento do caminho óptico (cm), ε a absorvidade molar, e C é a concentração em mol/L. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV/VIS (Jasco), com cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

4.12.2. Dicroísmo circular

A técnica de dicroísmo circular (CD) foi utilizada para verificar e estimar a quantidade de estrutura secundária da Hop D456G, através da análise de sinais característicos nos espectros, assim como para detectar e avaliar modificações conformacionais causadas pela variação da temperatura. Esta técnica se baseia na diferença de absorção de luz circularmente polarizada à esquerda e à direita pelas moléculas quirais (Correa & Ramos, 2009).

Os experimentos de CD foram realizados em espectropolarímetro (Jasco), acoplado a um sistema de controle de temperatura (sistema Peltier). Foi utilizada concentração protéica 2,5 μM em Tampão E, cubeta de quartzo com 0,1 cm de caminho óptico e o espectro da proteína foi medido de 200 a 260 nm. Os valores obtidos na leitura de CD (mdeg) foram convertidos para elipsidade molar residual ($[\theta]$):

$$[\theta] = \theta / (l \cdot C \cdot n) \cdot 10 \text{ (Equação 2)}$$

Sendo, θ a elipsidade em miligráus (mdeg), C a concentração da proteína (mol/L), l o caminho óptico (cm) e n o número de aminoácidos contidos na proteína.

Os ensaios de desnaturação térmica (222 nm) foram realizados em cubeta de 0,1 cm, na concentração 2,5 μM (Tampão E), com velocidade de aquecimento de 1°C por min. Foram medidas as curvas de desenovelamento e reenovelamento térmico de 20 a 80°C para as duas proteínas, e adicionalmente de 20-60°C.

4.12.3. Fluorescência do triptofano

A medida da fluorescência de emissão do triptofano foi empregada para acessar informações acerca do ambiente no qual este resíduo está localizado, em função deste apresentar diferentes características de fluorescência segundo o grau de exposição ao meio hidrofílico ou hidrofóbico (Lakowicz, 1983). A Hop D456G possui um único triptofano, desta forma a excitação foi feita em 295nm, na concentração de 3 µg/mL (Tampão E), em fluorímetro K2™ ISS (Multifrequency Cross-Correlation Phase and Modulation Fluorometer) e cubeta de quartzo de 1 x 1 cm de caminho óptico.

4.13. Ensaio hidrodinâmicos

4.13.1. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A técnica de DLS foi aplicada para a obtenção de parâmetros hidrodinâmicos da Hop D456G, que são importantes na investigação de algumas propriedades, como tamanho e forma de moléculas em solução, e na obtenção de dados acerca da homogeneidade do sistema (presença de agregados, oligômeros). Estas informações estão relacionadas ao coeficiente de difusão (D), que por sua vez está ligado ao movimento Browniano das moléculas em solução (Santos & Castanho, 1996). As medidas foram realizadas em equipamento DynaPro-MS800 (Protein Solutions). As amostras de proteína foram centrifugadas por 12000 rpm por 20 min, à 20°C. Os coeficientes de difusão foram medidos nas concentrações de 0,5, 0,8, 1,0, 1,6 e 1,9 mg/mL (Tampão E), a 20°C, pelo monitoramento do espalhamento de luz. Para a análise dos resultados obtidos experimentalmente, os valores teóricos do coeficiente de difusão (D) e do raio de Stokes (R_s) foram calculados, através das equações 3 e 4. Assim pode-se ter o conhecimento acerca da irregularidade desta partícula (Tiroli & Ramos, 2007).

$$R_s = \left(\frac{3MV_{bar}}{4\pi N} \right)^{1/3} \quad (\text{Equação 3}) \quad D = \left(\frac{K_b T}{6\pi\eta R_s} \right) \quad (\text{Equação 4})$$

Sendo, V_{bar} o volume parcial específico (0,7283 cm³/g), N o número de Avogadro, K_b a constante de Boltzmann (J/K), M a massa molecular (Da), T a temperatura (298 K) e η a viscosidade do tampão (0,001029 Pa.s).

4.13.2. Gel filtração analítica

A gel filtração analítica foi utilizada para obtenção do raio de Stokes (R_s), ou raio hidrodinâmico da Hop D456G, através da comparação com padrões protéicos de parâmetros conhecidos. Para este experimento, utilizou-se a coluna Superdex™ 200 3/30 GL (GE), Tampão F e fluxo de 2,5 mL/min. O volume de amostra e solução de padrões foi fixado em 100 µL. Os dados foram analisados aplicando-se a equação 5.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0} \text{ (Equação 5)}$$

Sendo K_{av} , o coeficiente de distribuição gel-fase, V_e o volume de eluição do pico, V_0 o 'volume de vazio' e V_c o volume da coluna.

4.13.3. Ultracentrifugação analítica

Através desta técnica é possível determinar a massa molecular de uma macromolécula, assim como obter informações sobre a homogeneidade do sistema em relação à sua massa (presença de oligômeros) (Borges & Ramos, 2011). Baseia-se em princípios bem fundamentados da física de movimentos, e através do monitoramento da molécula no campo de ultracentrifugação é possível determinar características hidrodinâmicas e termodinâmicas sem a interação com quaisquer matrizes ou superfícies (Lebowitz et al, 2002). O experimento de sedimentação em equilíbrio foi realizado em um equipamento Beckman Optima XL-A analytical ultracentrifuge (Beckman Coulter), em temperatura constante de 20°C, velocidades de 4000, 5000, 9000 e 10000 rpm, concentrações de 800, 1000 e 1200 µg/mL da proteína Hop D456G e absorvância monitorada a 279 nm. Os dados foram analisados com o programa Origin, método 'Self-Association'.

4.14. Ensaio com *A. thaliana*

4.14.1. Cultivo

Plantas de *A. thaliana* foram mantidas em uma casa de vegetação (LGE – IB/UNICAMP) com temperatura controlada (21-24 °C). O cultivo de plantas para transformação foi conduzido sem fotoperíodo (luz constante), com uma intensidade luminosa de 40 µmol/m²/s.

O plantio foi realizado em substrato e argila expandida (vermiculita) na proporção de 1:1, com a inoculação de cerca de 6 sementes por vaso. Antes do plantio conduziu-se o preparo das sementes, embebendo-as em água deionizada por 15 min. Em seguida adicionou-se 0,3% de

hipoclorito de sódio, com incubação durante 8 min. Decorrido este tempo, realizou-se lavagens sucessivas (cerca de 10 vezes) com água deionizada e com o auxílio de uma micropipeta de 1000 µL as sementes foram distribuídas nos vasos previamente regados com solução nutritiva. A solução nutritiva foi utilizada para regar as plantas, na frequência de 3 vezes por semana, até antes da transformação. Após borrifar a solução de transformação pela primeira vez, a rega seguiu com a mesma frequência, porém com água destilada.

4.14.2. Transformação *in planta*

A *Agrobacterium tumefaciens* é rotineiramente utilizada para transformação de plantas, pela sua habilidade de transferir horizontalmente genes para vegetais. Esta bactéria causa o que é conhecido como *doença da galha*, na qual uma planta infectada produz crescimentos descontrolados (tumores), normalmente na base do caule da planta. A chave para a produção de tumor é um DNA plasmidial (plasmídeo Ti, - indutor de tumor). Quando a bactéria infecta uma célula vegetal, uma parte do plasmídeo Ti, a região do T-DNA (transferência de DNA – compreendida entre as bordas T direita e esquerda), é transferida e inserida aleatoriamente no genoma da planta hospedeira (figura 13). Os genes de virulência e que catalisam a transferência do T-DNA residem em uma região do plasmídeo Ti separada da região do T-DNA (Griffiths et al, 2006).

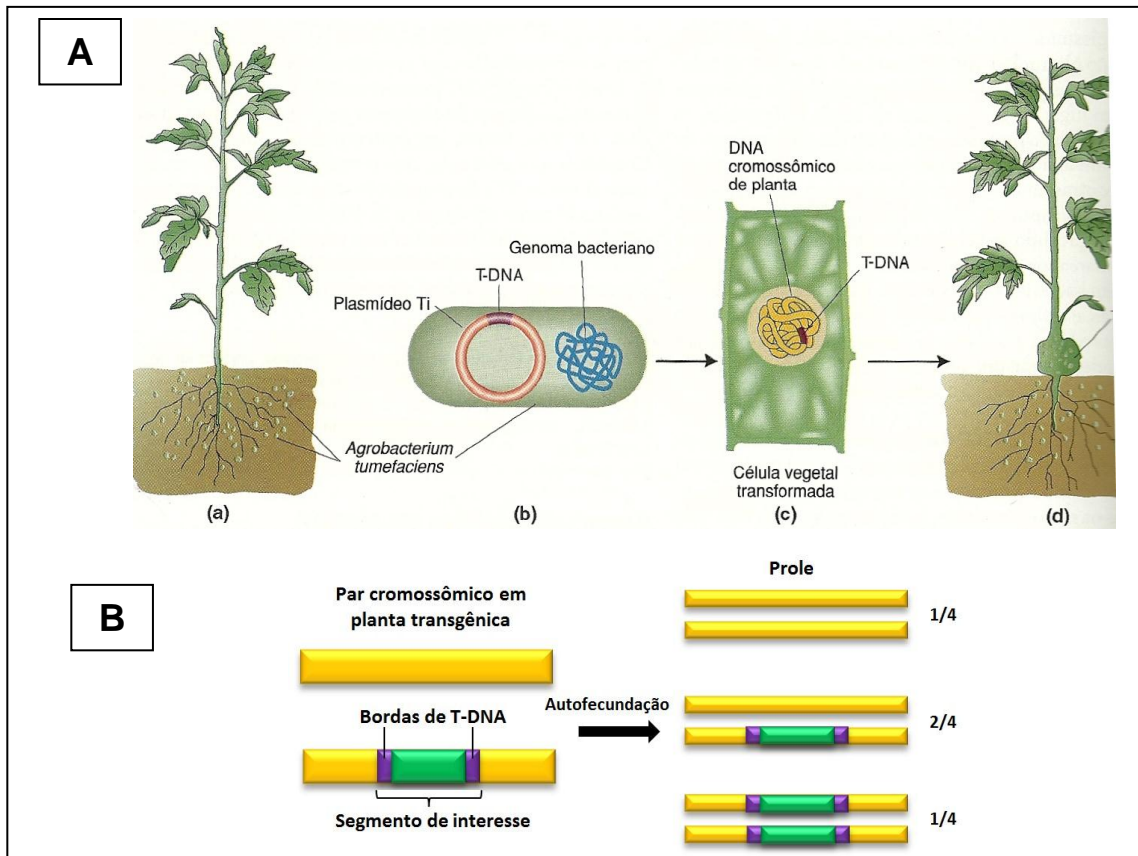


Figura 13: Mecanismo de infecção de *A. tumefaciens*. **A)** Infecção por plasmídeos Ti. No processo causador do tumor de galha, a bactéria *A. tumefaciens* insere uma parte de seu plasmídeo Ti, uma região chamada de T-DNA, no cromossomo da planta hospedeira. **B)** O fragmento inserido no genoma é transmitido com herança mendeliana. Adaptado de Griffiths et al, 2006.

O T-DNA codifica proteínas como enzimas (que contribuem para a produção do tumor) e proteínas que dirigem a síntese de compostos chamados opinas (importantes substratos para o crescimento bacteriano). Tais proteínas executam várias funções que contribuem para a habilidade da bactéria em crescer e se dividir dentro da célula vegetal. O comportamento natural deste plasmídeo o tornou bastante adequado para engenharia genética de plantas. Tipicamente, uma única cópia da região T-DNA se insere em um local aleatório no genoma da planta, onde ele segrega na meiose, como um alelo mendeliano comum (Griffiths et al, 2006) (figura 13).

A metodologia de transformação *in planta* descrita por Bechtold et al (1993) e modificada (Clough & Bent, 1998), apresenta uma grande vantagem sobre os métodos de transformação tradicionais, pelo fato de não requerer a regeneração de transformantes a partir de cultura de

tecidos. Nesta metodologia, uma solução contendo *A. tumefaciens* carregando o vetor de interesse é borrifada sobre plantas em estágios iniciais do florescimento.

As plantas de *A. thaliana* foram cultivadas até o início do florescimento (cerca de 30 dias após o plantio), para então a transformação ser conduzida. O preparo da suspensão de *A. tumefaciens* (previamente transformada com o gene de interesse) iniciou-se com uma pré-cultura em LB líquido com os antibióticos adequados por 16 horas (28 °C / 150 rpm), a partir de cultura em placa ou glicerol. Em seguida, a pré-cultura foi inoculada novamente em meio LB (fator de diluição 100x) com os respectivos antibióticos, até a A_{600} entre 0,8 e 1,0 ser atingida (28 °C / 150 rpm). O inóculo foi então retirado da incubadora e centrifugado a 3000 rpm, 4°C por 40 min, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuscitado em solução de transformação, com 1/3 do volume inicial da cultura, e Silwet L-77 foi adicionado imediatamente antes de borrifar a suspensão de agrobactéria. Este procedimento foi repetido por duas semanas.

Para verificação da existência de um *locus* para o transgene, realizou-se o teste estatístico qui-quadrado (equação 6).

$$x^2 = \sum \frac{(o - e)^2}{e} \quad (\text{Equação 6})$$

Sendo, *o* os valores observados, *e* e os valores esperados.

4.14.3. Extração de proteínas e *Western blot*

O tecido vegetal de *A. thaliana* foi macerado em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó. Em seguida o tecido macerado foi misturado ao tampão de extração de proteínas (volume de tecido = volume de tampão) com a adição de PMSF na concentração final de 1 mM e 5u de DNase. O material foi incubado em gelo por 15 min e centrifugado a 3000xg / 4°C durante 30 min. O sobrenadante contendo proteínas solúveis foi reservado, e uma nova extração foi realizada com o mesmo tecido vegetal (precipitado). O sobrenadante da primeira e da segunda extração foram misturados, filtrados em 0,45µm e armazenados a -20 °C.

A técnica de *Western Blot* permite a detecção de determinada proteína através do uso de anticorpos específicos (Nelson & Cox, 2008). Os experimentos de *Western Blot* foram realizados a partir de SDS-PAGE 12%. As proteínas separadas pelo gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Whatman), através do sistema de transferência 'molhado' (BioRad), em tampão de transferência a 350 mA por 1 hora. Em seguida a membrana foi incubada em TBS-T com BSA 2% durante 1 hora, sob agitação branda a temperatura ambiente. Após o bloqueio a membrana foi lavada 3 vezes com TBS-T (15 minutos cada sob agitação branda) e incubada com o anticorpo

primário (anti-Hsp90-3 coelho; dil. 1:500) em solução de bloqueio durante 1 hora a temperatura ambiente sob agitação branda. A membrana foi lavadas 3 vezes e incubada com o anticorpo secundário (Fosfatase alcalina, anti-coelho; dil. 1:1000) durante 1 hora, e então lavada por mais 3 vezes. A detecção foi realizada com substrato cromogênico AP Conjugate Substrate kit (Bio-Rad).

4.14.4. Plantio em meio MS

O plantio em meio MS foi iniciado com a esterilização das sementes. Em microtubos estéreis contendo as sementes a serem esterilizadas, foi adicionado etanol 70%, deixando-o agir por 5 min. As sementes foram decantadas (gravidade), o etanol descartado para a adição de 1mL de hipoclorito de sódio 40%, com incubação por 40 min. As sementes foram novamente decantadas e o hipoclorito de sódio foi descartado. As semente foram lavadas por 4 vezes com água ultra pura (MilliQ) estéril e distribuídas em placas com meio MS ágar. O material foi incubado por 2-3 dias em geladeira e após o período de estratificação (incubação em geladeira) as placas foram transferidas para a casa de vegetação.

4.14.5. Ensaios de germinação e comprimento de raízes

Os ensaios de germinação foram realizados através do monitoramento de amostras de sementes plantadas em MS ágar. As placas foram monitoradas e fotografadas (câmera Kodak Easy Share C763) todos os dias, até 5 dias após a incubação a 21-23°C/luz constante.

As medidas do comprimento das raízes foram realizadas também através do plantio em MS agar. As sementes foram distribuídas no meio de cultura lado a lado e, após o período de estratificação, as placas foram incubadas a 90° (posição vertical) a 21-23°C/luz constante, para permitir que as raízes cresçam paralelamente a superfície do meio de cultura. Após 7 dias de incubação, as raízes foram mensuradas e fotografadas.

4.14.6. Ensaios de estresse

Todos os ensaios foram adaptados e realizados com base em referências da literatura (Queitsch et al, 2000; Jiang et al, 2009; Song et al, 2009). A avaliação da tolerância e resistência a alta temperatura foi realizada com plantas germinadas em meio MS ágar com 4 dias de incubação 21-23°C/luz constante. A aplicação de alta temperatura, 45°C por 1 hora, foi realizada em estufa (Thermo) e em seguida as plantas foram retornadas para as condições iniciais. A recuperação do estresse térmico foi observada 5, 10 e 18 dias depois do choque térmico. A tolerância a baixa

temperatura foi verificada através de plantio em meio MS líquido e incubação a 4 °C (geladeira, sem luz). A germinação destas amostras foi monitorada durante 9 dias.

Os ensaios de estresse osmótico foram realizados em meio MS ágar com manitol 150 mM, nas quais foram avaliados os parâmetros de germinação e comprimento de raízes. A tolerância a estresse salino foi avaliada em plantas germinadas em meio MS ágar com NaCl 50 mM e 100 mM. A germinação e o comprimento das raízes foram monitorados durante 7 dias.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Parte A – Caracterização Funcional de uma *A. thaliana* transgênica

Nesta seção apresentamos os dados da classificação de uma EST correspondente a Hsp90 de cana-de-açúcar e o início de sua caracterização funcional através de transgenia em *A. thaliana*.

5.1.1. Classificação da Hsp90-3 da cana

A fim de se obter dados de identidade entre os ortólogos, a sequência da Hsp90 de cana-de-açúcar foi comparada com sequências de Hsp90 de *H. sapiens* (que apresenta a divisão dos domínios bem determinada na literatura), *M. musculus*, *A. thaliana* e *S. cerevisiae* (Figura 14). Informações sobre expressão (constitutiva ou induzível) localização subcelular, e classificação da sequência da Hsp90 de cana, foram obtidas através da comparação com isoformas de *Arabidopsis thaliana*, já bem estudadas, caracterizadas e classificadas (Figura 15).

O alinhamento a seguir revela que a Hsp90 de cana-de-açúcar possui todos os domínios descritos para a Hsp90, com altos níveis de identidade global. Na porção N-terminal, apesar de os 12 primeiros aminoácidos presentes na Hsp90 humana estarem ausentes na Hsp90 de cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*), o restante do domínio é conservado, bem como os domínios central e C-terminal, com destaque para os últimos 4 aminoácidos do motivo MEEVD, responsável pela interação com co-chaperonas portadoras de domínios TPR. O linker carregado possui tamanho variável, exibindo menor tamanho nas Hsp90 de cana-de-açúcar e de *A. thaliana*.

A

H. sapiens	MPEETQTQDQPMEEEEVETFAFQAEIAQLMSLIINTFYNSKEIFLRELISNSSDALDKIR
M. musculus	MPEETQTQDQPMEEEEVETFAFQAEIAQLMSLIINTFYNSKEIFLRELISNSSDALDKIR
A. thaliana	-----MADAETFAFQAEINQLLSLIINTFYNSKEIFLRELISNSSDALDKIR
Saccharum sp	-----MASETETFAFQAEINQLLSLIINTFYNSKEIFLRELISNSSDALDKIR
S. cerevisiae	-----MASETFEFQAEITQLMSLIINTVYSNKEIFLRELISNASDALDKIR *** ***** **:*****.*****:*****
H. sapiens	YESLTDPSKLDGKELHINLIPNKQDRTLTIVDTGIGMTKADLNNLGTIAKSGTKAFME
M. musculus	YESLTDPSKLDGKELHINLIPSKQDRTLTIVDTGIGMTKADLNNLGTIAKSGTKAFME
A. thaliana	FESLTDKSKLDGQPELFIHIIPDKTNNTLTIIDSGIGMTKADLVNNLGTIARSGTKEFME
Saccharum sp	FESLTDKSKLDAQPELFIHIVDPKANNTLTIIDSGIGMTKSDLVNNLGTIARSGTKEFME
S. cerevisiae	YKSLSDPKQLETEPDLFIRITPKPEQVLEIRDSGIGMTKAELNNLGTIAKSGTKAFME ::**:* .:* :*.*. : * . :..* * *:*****:*:*****:**** **

H. sapiens	ALQAGADISMIQFGVGFYSAYLVAEKVTVITKHNDDEQYAWESSAGGSFTVVRTDT-GEP
M. musculus	ALQAGADISMIQFGVGFYSAYLVAEKVTVITKHNDDEQYAWESSAGGSFTVVRTDT-GEP
A. thaliana	ALAAGADVSMIGQFGVGFYSAYLVADKVVVTTKHNDDEQYVWESQAGGSFTVTRDTSGEA
Saccharum sp	ALAAGADVSMIGQFGVGFYSAYLVAERVVVTTKHNDDEQYVWESQAGGSFTVTRDTSGEQ
S. cerevisiae	ALSAGADVSMIGQFGVGFYSLFLVADRVQVISKSNDDDEQYIWESNAGGSFTVTLDEVNER ** *****:***** :***:* * :* ***** ** .***** * .*

H. sapiens	MGRGTVILHLKEDQTEYLEERRIKEIVKKSQFIGYPITLFEKERDKEVSDDEAE---
M. musculus	MGRGTVILHLKEDQTEYLEERRIKEIVKKSQFIGYPITLFEKERDKEVSDDEAE---
A. thaliana	LGRGTVILHLKEDQMEYIEERRLKDLVKKHSEFISYPISLWIEKTEIEKESDDEEE---
Saccharum sp	LGRGTVILHLKEDQMEYIEERRLKDLVKKHSEFISYPISLWTEKTEIEKESDDEDE---
S. cerevisiae	IGRTILRLFLKDDQLEYLEEKRIKEVIKRHSEFVAYPIQLVVTKEVEKEVPIPEEEKKD :**** : *.**:* **:*:*:*:*:*:*:*:*:*:* * * :*:* . * *

H. sapiens	EKEDKEEEKEKEEKESEDKPEIEDVGSDEEEE-KKDGDKKKKKKIKEYIDQEELNKTTP
M. musculus	EKEEKEEKEKEEKESEDKPEIEDVGSDEEEEEKKDGDKKKKKKIKEYIDQEELNKTTP
A. thaliana	EKKKDEEGK-----VEEVDEEKEKE-----EKKKKKIKEYSHEWDLVVKQKP
Saccharum sp	EDKKDEEGK-----VEDVDEEKEEK-----EKKKKKIKEYSHEWQLVVKQKP
S. cerevisiae	EKKKDEEKDDEDDK----KPKLEEVDEEEKK-----PKTKKVKEEVQEI EELNKTTP *:.** * :*:*.:.:***: * **:*:* : : :*: **

H. sapiens	IWTRNPDDITNEEYGEFYKSLTNDWEDHLAVKHFVVEGQLEFRALLFVPRRAPFDLFENR
M. musculus	IWTRNPDDITNEEYGEFYKSLTNDWEEHLAVKHFVVEGQLEFRALLFVPRRAPFDLFENR
A. thaliana	IWMRKPEEINKEEYAAFYKSLTNDWEEHLAVKHFVVEGQLEFKAILFVPRRAPFDLFDTK
Saccharum sp	IWMRKPEEITKEEYAAFYKSLTNDWEEHLAVKHFVVEGQLEFKAVLFPKRAPFDLFDTR
S. cerevisiae	LWTRNPSDITQEEYNAFYKSLTNDWEDPLYVKHFVVEGQLEFRALFIPKRAPFDLFESK :* *:*:*:*:*:* * **:*:*:*:* * *****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:..

H. sapiens	KKKNNIKLYVRRVFIMDNCEELIPEYLNFI RGVVDSDELPLNISREMLQQSKILKVIKRN
M. musculus	KKKNNIKLYVRRVFIMDNCEELIPEYLNFI RGVVDSDELPLNISREMLQQSKILKVIKRN
A. thaliana	KKPNNIKLYVRRVFIMDNCEELIPEYLG FVKGIVDSDELPLNISRET LQQNKILKVIKRN
Saccharum sp	KKLNNIKLYVRRVFIMDNCEELIPEWLSFVKGIVDSDELPLNISRET LQQNKILKVIKRN
S. cerevisiae	KKKNNIKLYVRRVFITDEAEDLIPWLSFVKGVVDSDELPLNLSREMLQQNKIMKVIKRN ** ***** * :*.:*:*:*:* * :*.:*:*:*:* * *****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

H. sapiens	LVKKCLELFTELAEDKENYKFFYEQFSKNIKLG IHEDSQNRKLSSELLRYTSASGDEM
M. musculus	LVKKCLELFTELAEDKENYKFFYEQFSKNIKLG IHEDSQNRKLSSELLRYTSASGDEM
A. thaliana	LVKKCLELFFEIAENKEDYNKFFYEAFSKNLKLG IHEDSQNRKIAELLRYHSTKSGDELT
Saccharum sp	LVKKCIELFFEIAENKEDYNKFFYEAFSKNLKLG IHEDSTNRKIAELLRYHSTKSGDELT
S. cerevisiae	IVKKLIEAFNEIAEDSEQFEKFFYSAFSKNIKLG VHDTONRAALAKLLRYNSTKSVDEL :*:* * * *:*:*:*:*:* * ** :*:*** : : * **:.:

H. sapiens	SLKDYCTRMKENQKHIYYITGETKDQVANS AFVERLRKHGLEVIYMI EPIDEYCVQQLKE
M. musculus	SLKDYCTRMKENQKHIYFITGETKDQVANS AFVERLRKHGLEVIYMI EPIDEYCVQQLKE
A. thaliana	SLKDYVTRMKEGQNDIFYITGESKAVENSPFLEK LKKKGIEVLYMVDAIDEYAIGQLKE
Saccharum sp	SLKDYVTRMKEGQNDIYYITGESKAVENSPFLEK LKKKGIEVLYMVDAIDEYAIGQLKE
S. cerevisiae	SLTDYVTRMPEHQKNIYYITGESLKAVEKSPFLDALKAKNFVFLTDPIDEYAFTQLKE **.* * * * * :*.:*:*:*:* : * :*.:*:*:* * :. * * : : :.***** . * **

H. sapiens	FEGKTLVSVTKEGLELPEDEEEKKKQEEKTKFENLCKIMKDILEKKVEKVVVSNRLVTS
M. musculus	FEGKTLVSVTKEGLELPEDEEEKKKQEEKTKFENLCKIMKDILEKKVEKVVVSNRLVTS
A. thaliana	FEGKTLVSVTKEGLELPEDEEKKKKEELKEKFEGLCKVIKDVLDGKVEKVVVSDRVVDS
Saccharum sp	FEGKTLVSVTKEGLELPEDEEKKKKEELKEKFEGLCKVIKDVLDGKVEKVVVSDRVVDS
S. cerevisiae	FEGKTLVDITKD-FELEETDEEKAEREKEIKEYEPLTKALKEILGDQVEKVVVSYKLLDA *****. ** . ** : : * * : : * * : : * * : : * * * : : * * : : * * : : *

H. sapiens	PCCIVTSTYGWTANMERIMKAQALRDNSTMGYMAAKKHLEINPDHSIIETLRQKAEAD-K
M. musculus	PCCIVTSTYGWTANMERIMKAQALRDNSTMGYMAAKKHLEINPDHSIIETLRQKAEAD-K
A. thaliana	PCCLVTGEYGWTANMERIMKAQALRDSSMGGYMSSKKTMEINPENSIMDELKRADAD-K
Saccharum sp	PCCLVTGEYGWTANMERIMKAQALRDSSMSGYMSSKKTMEINPENAIMHEELRKRAEAD-K
S. cerevisiae	PAAIRTGQFGWSANMERIMKAQALRDSSMSSYMSSKKTFEISPKSPIIKELKKRVDEGGA *..: *. :**:*:*:*:*:*:*:*:*:*:* ..**:*:* :**.*. *. : *::: .

H. sapiens	NDKSVKDLVILLYETALLSSGFSLEDPQTHANRIYRMIKLGLGIDEDDPTADDTSAAVTE
M. musculus	NDKSVKDLVILLYETALLSSGFSLEDPQTHANRIYRMIKLGLGIDEDDPTVDDTSAAVTE
A. thaliana	NDKSVKDLVLLLFETALLTSGFSLDEPNFTGSRHRMLKLGLSIDDDDVVEADA-----
Saccharum sp	NDKSVKDLVMLLFETALLTSGFSLDDPNFTGSPHRMLKLGLSIDEDEAPEADT-----
S. cerevisiae	QDKTVKDLTKLLYETALLTSGFSLDEPTSFASRINRLISLGLNIDEEETETAPEAS--- :**:*:*.. **:*:*:*:*:*:*:*:* :... * *:::***.**:*: .

H. sapiens	EMPPLEGDDDT--SRMEEVD
M. musculus	EMPPLEGDDDT--SRMEEVD
A. thaliana	DMPPLEDDADAEGSKMEEVD
Saccharum sp	DMPPLEDDAGE--SKMEEVD
S. cerevisiae	TAAPVEEVPAD--TEMEEVD . *:* . :*****

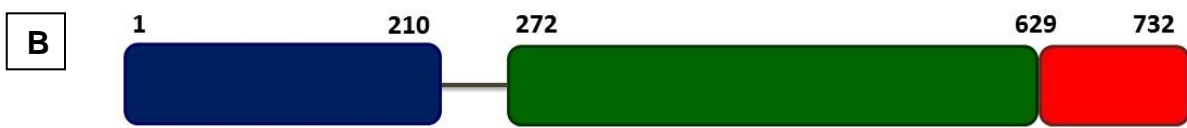


Figura 14: Alinhamento múltiplo de seqüências de Hsp90 de diversos organismos. **A)** Alinhamento das seqüências de Hsp90 de cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*), *H. sapiens*, *M. musculus*, *A. thaliana* e *S. cerevisiae*. Os valores de identidade são: **Saccharum sp. x H. sapiens** 62,2%; **Saccharum sp. x M. musculus** 69,2%; **Saccharum sp. x A. thaliana** 91,9%; **Saccharum sp. x S. cerevisiae** 65,2%; Em destaque, a seqüência de *H. sapiens* com o padrão de coloração referente aos domínios, ilustrados na figura B. A Hsp90 humana foi utilizada como referência para a divisão dos domínios em função da maior disponibilidade de dados na literatura. **B)** Ilustração dos domínios da Hsp90 humana: em azul o domínio N-terminal, em cinza o *linker* carregado, em verde o domínio central e em vermelho o domínio C-terminal (Withesell & Lindquist, 2005). Seqüência de cana-de-açúcar obtida do projeto SUCEST, cultivar híbrido SP80-3280. Seqüências alinhadas com a ferramenta ClustalW.

O alinhamento a seguir (Figura 15) evidencia as similaridades entre as isoformas citosólicas de Hsp90 1, 2, 3 e 4 de *Arabidopsis thaliana* e isoforma de cana-de-açúcar abordada neste estudo. Em função dos valores de identidade, a Hsp90 de cana-de-açúcar foi classificada como mais similar a Hsp90-3, que em *Arabidopsis* tem expressão constitutiva (Krishna & Gloor, 2001).

```

Hsp90.2      -----MADAETFAFQAEINQLLSLIINTFYSNKEIFLRELISNSSDVRSLSLSTLLYTCV
Hsp90.3      -----MADAETFAFQAEINQLLSLIINTFYSNKEIFLRELISNSS-----
Hsp90.4      -----MADAETFAFQAEINQLLSLIINTFYSNKEIFLRELISNSS-----
Hsp90_cana   -----MASETETFAFQAEINQLLSLIINTFYSNKEIFLRELISNSS-----
Hsp90.1      MADVQMADAETFAFQAEINQLLSLIINTFYSNKEIFLRELISNSS-----
              :::*****

Hsp90.2      SRLIDLADGSVDLGLALDKIRFESLTDKSKLDGQPELFIHIIPDKTNNTLTIIDSGIGMT
Hsp90.3      -----DALDKIRFESLTDKSKLDGQPELFIHIIPDKTNNTLTIIDSGIGMT
Hsp90.4      -----DALDKIRFESLTDKSKLDGQPELFIHIIPDKTNNTLTIIDSGIGMT
Hsp90_cana   -----DALDKIRFESLTDKSKLDAQPELFIHIVPKANNTLTIIDSGIGMT
Hsp90.1      -----DALDKIRFESLTDKSKLDGQPELFIHIVPKANSKTLTIIDSGIGMT
              *****.*****:::***:*:*:*****

Hsp90.2      KADLVNNLGTIARSGTKEFMEALAAGADVSMIGQFGVGFYSAYLVADKVVVTTKHNDDQ
Hsp90.3      KADLVNNLGTIARSGTKEFMEALAAGADVSMIGQFGVGFYSAYLVADKVVVTTKHNDDQ
Hsp90.4      KADLVNNLGTIARSGTKEFMEALAAGADVSMIGQFGVGFYSAYLVADKVVVTTKHNDDQ
Hsp90_cana   KSDLVNNLGTIARSGTKEFMEALAAGADVSMIGQFGVGFYSAYLVAERVVTTKHNDDQ
Hsp90.1      KADLVNNLGTIARSGTKEFMEALQAGADVSMIGQFGVGFYSAYLVAEKVVVTTKHNDDQ
              *:***** *****:*****

Hsp90.2      YVWESQAGGSFTVTRDTSGETLGRGTKMVLVLYLKEDQLEYLEERRLKDVLKHHSEFISYPI
Hsp90.3      YVWESQAGGSFTVTRDTSGEALGRGTKMVLVLYLKEDQMEYIEERRLKDVLKHHSEFISYPI
Hsp90.4      YVWESQAGGSFTVTRDTSGEALGRGTKMILVLYLKEDQMEYIEERRLKDVLKHHSEFISYPI
Hsp90_cana   YVWESQAGGSFTVTRDTSGEQLGRGTKVTLVLYLKEDQLEYLEERRLKDVLKHHSEFISYPI
Hsp90.1      YVWESQAGGSFTVTRDVGPELGRGTKITLFLKDDQLEYLEERRLKDVLKHHSEFISYPI
              *****.* *****: *:*:*:*:*:*****:*****

Hsp90.2      SLWIEKTIEKEISDDEEEEE-KKDEEGKVEEVDEEKEKEEKKKKKIKEVSHEWDLVNKQK
Hsp90.3      SLWIEKTIEKEISDDEEEEE-KKDEEGKVEEVDEEKEKEEKKKKKIKEVSHEWDLVNKQK
Hsp90.4      SLWIEKTIEKEISDDEEEEE-KKDEEGKVEEIDEEKEKEEKKKKKIKEVTHEWDLVNKQK
Hsp90_cana   SLWTEKTTEKEISDDEDEED-KKDEEGKVEDVDEEKEKEEKKKKKIKEVSHEWQLVDKQK
Hsp90.1      YLWTEKTTEKEISDDEDEDEPKKENEVEEVDEEKEKDGKKKKKIKEVSHEWELINKQK
              ** ** *****:.*:.*:*:*:*:*****: *****:***:*:*:***

Hsp90.2      PIWMRKPEEINKEEYAAFYKSLSDWEEHLAVKHFSVEGQLEFKAILFVFKRAPFDLFD
Hsp90.3      PIWMRKPEEINKEEYAAFYKSLSDWEEHLAVKHFSVEGQLEFKAILFVFKRAPFDLFD
Hsp90.4      PIWMRKPEEINKEEYAAFYKSLSDWEEHLAVKHFSVEGQLEFKAILFVFKRAPFDLFD
Hsp90_cana   PIWMRKPEEITKEEYAAFYKSLTNDWEEHLAVKHFSVEGQLEFKAVLFVFKRAPFDLFD
Hsp90.1      PIWLRKPEEITKEEYAAFYKSLTNDWEDHLAVKHFSVEGQLEFKAILFVFKRAPFDLFD
              ***:*****.*****:*****:*****:*****:*****

Hsp90.2      KKKPNNIKLYVRRVFIMDNCEDIIPYLGFKVKGIVDSEDPLNISRETQQNKILKVIK
Hsp90.3      KKKPNNIKLYVRRVFIMDNCEDIIPYLGFKVKGIVDSEDPLNISRETQQNKILKVIK
Hsp90.4      KKKPNNIKLYVRRVFIMDNCEDIIPDYLGFKVKGIVDSEDPLNISRETQQNKILKVIK
Hsp90_cana   RKKLNNIKLYVRRVFIMDNCIELIPEWLSFVKGVVSDSEDPLNISRETQQNKILKVIK
Hsp90.1      RKKLNNIKLYVRRVFIMDNCIELIPEYLSFVKGVVSDDDLPLNISRETQQNKILKVIK
              :** *****:.*:*:*:*:*:*****:*****:*****

Hsp90.2      NLVKKCLELFFEIAENKEDYNKFYEAFSKNLKLGIEDSQNRTKIAELLRYHSTKSGDEL
Hsp90.3      NLVKKCLELFFEIAENKEDYNKFYEAFSKNLKLGIEDSQNRTKIAELLRYHSTKSGDEL
Hsp90.4      NLVKKCLELFFEIAENKEDYNKFYEAFSKNLKLGIEDSQNRTKIAELLRYHSTKSGDEL
Hsp90_cana   NLVKKCIELFFEIAENKEDYNKFYEAFSKNLKLGIEDSTNRTKIAELLRYHSTKSGDEL
Hsp90.1      NLVKKCIEMFNEIAENKEDYTKFYEAFSKNLKLGIEDSQNRGKIADLLRYHSTKSGDEM
              *****:*:* *****.***** ** ***:*****:

```

```

Hsp90.2      TSLKDYVTRMKEGQNDIFYITGESKKAVENSPFLEKLKKKGIEVLYMVDIDAIDEYAIGQLK
Hsp90.3      TSLKDYVTRMKEGQNDIFYITGESKKAVENSPFLEKLKKKGIEVLYMVDIDAIDEYAIGQLK
Hsp90.4      TSLKDYVTRMKEGQNEIFYITGESKKAVENSPFLEKLKKKGIEVLYMVDIDAIDEYAIGQLK
Hsp90_cana   TSLKDYVTRMKEGQNDIYYITGESKKAVENSPFLEKLKKKGIEVLYMVDIDAIDEYAIGQLK
Hsp90.1      TSFKDYVTRMKEGQKDIIFYITGESKKAVENSPFLERLKKRGYEVLYMVDIDAIDEYAVGQLK
              **:*****:*:*****:***:* *****:***:
              *

Hsp90.2      EFEGKLVSATKEGLKLD-ETEDEKKKKEELKEKFEGLCVKIKDVLGDKVEKVIIVSDRVV
Hsp90.3      EFEGKLVSATKEGLKLD-ETEDEKKKKEELKEKFEGLCVKIKDVLGDKVEKVIIVSDRVV
Hsp90.4      EFEGKLVSATKEGLKLE-ETDDEKKKKEELKEKFEGLCVKIKDVLGDKVEKVIIVSDRVV
Hsp90_cana   EFEGKLVSATKEGLKLD-ESEDEKKKKEELKEKFEGLCVKIKEVLGDKVEKVVVSDRVV
Hsp90.1      EYDGKLVSATKEGLKLEDETEEEKKREKKKSFENLCKTIKEILGDKVEKVVVSDRIV
              *::*****: *::*:** *:.**.***.**:*****:***:*
              *

Hsp90.2      DSPCCLVTGEYGWTANMERIMKAQALRDS SMAGYMSSKKTMEINPENSIMDELKRKADAD
Hsp90.3      DSPCCLVTGEYGWTANMERIMKAQALRDS SMGGYMSSKKTMEINPENSIMDELKRKADAD
Hsp90.4      DSPCCLVTGEYGWTANMERIMKAQALKDSNTGGYMSSKKTMEINPENSIMDELKRKAEAD
Hsp90_cana   DSPCCLVTGEYGWTANMERIMKAQALRDS SMSGYMSSKKTMEINPENAIMDELKRKAEAD
Hsp90.1      DSPCCLVTGEYGWTANMERIMKAQALRDS SMSGYMSSKKTMEINPDNGIMEELKRKAEAD
              *****:*. .*****:*.**:*:***:*
              *

Hsp90.2      KNDKSVKDLVLLLFETALLTSGFSLDEPNTFGSRIHRMLKLGLSIDDDDAVEADAEMPPL
Hsp90.3      KNDKSVKDLVLLLFETALLTSGFSLDEPNTFGSRIHRMLKLGLSIDDDVVEADADMPPL
Hsp90.4      KNDKSVKDLVLLLFETALLTSGFSLDEPNTFGSRIHRMLKLGLSIEEDDAVEADAEMPPL
Hsp90_cana   KNDKSVKDLVLLLFETALLTSGFSLDDPNTFGSPIHRMLKLGLS IDEDEAPEADTDMPPPL
Hsp90.1      KNDKSVKDLVLLLYETALLTSGFSLDEPNTFAARIHRMLKLGLS IDEDENVEEDGDMPEL
              *****:*.*****:***.: *****:*. * * :** *
              *

Hsp90.2      EDDADAEGSKMEEVD
Hsp90.3      EDDADAEGSKMEEVD
Hsp90.4      EDDADAEGSKMEEVD
Hsp90_cana   EDDAGE--SKMEEVD
Hsp90.1      EEDAAEE-SKMEEVD
              *:**      *

```

Figura 15: Alinhamento múltiplo das seqüências de Hsp90 de cana-de-açúcar, Hsp90-1, Hsp90-2, Hsp90-3 e Hsp90-4 de *Arabidopsis thaliana*. com a finalidade de se obter mais informações sobre a proteína a Hsp90 de cana-de-açúcar foi alinhada com as isoformas citosólicas de *A. thaliana*, bem estudadas e com informações disponíveis na literatura. Os valores de identidade são: **Hsp90_cana x Hsp90-1** 88,4%; **Hsp90_cana x Hsp90-2** 88,5%; **Hsp90_cana x Hsp90-3** 91,9%; **Hsp90_cana x Hsp90-4** 90,4%; Em função dos valores de identidade a Hsp90 de cana foi classificada como Hsp90-3, que em *Arabidopsis* tem localização citosólica e expressão constitutiva. Sequência de cana-de-açúcar obtida do projeto SUCEST, cultivar híbrido SP80-3280. Sequências alinhadas com a ferramenta ClustalW.

5.1.2. Clonagem da Hsp90-3 de cana-de-açúcar em vetor binário

Para a clonagem da Hsp90-3, inicialmente foi realizado uma PCR a partir do cDNA (clone SUCEST) em vetor pET28a, seguida de purificação do fragmento de tamanho esperado (2109 pb, indicado com seta) do gel de agarose (Figura 16).

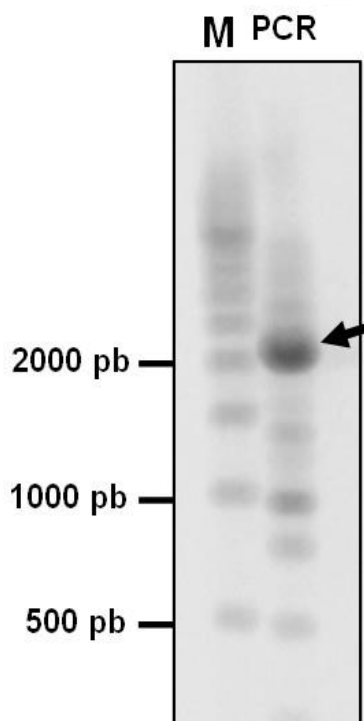


Figura 16: Gel de agarose 1% da PCR do cDNA da Hsp90-3. A clonagem foi iniciada com a amplificação da sequência da Hsp90-3 de cana-de-açúcar via PCR, a partir do cDNA já clonado em vetor pET28a. O fragmento correspondente a Hsp90-3 (seta) foi purificado do gel de agarose. **M** – Marcador 500 pb (Bio Rad); **PCR** – Produto da reação em cadeia da polimerase do cDNA da Hsp90-3.

O fragmento, depois de purificado foi ligado em vetor de transferência pGEM-T Easy, originando o vetor denominado pGEM-Hsp90-3, segundo a sequência ilustrada no esquema (Figura 17). Após o sequenciamento completo e seleção de clones sem mutações, o fragmento correspondente a Hsp90-3 foi removido do pGEM-Hsp90-3 através de restrição dupla com *Xho*I e *Bam*HI e ligado direcionalmente no vetor pRT100, digerido com as mesmas enzimas (Figura 18). Esta etapa foi necessária para a inserção do promotor 35S e do sinal de poliadenilação (PoliA).

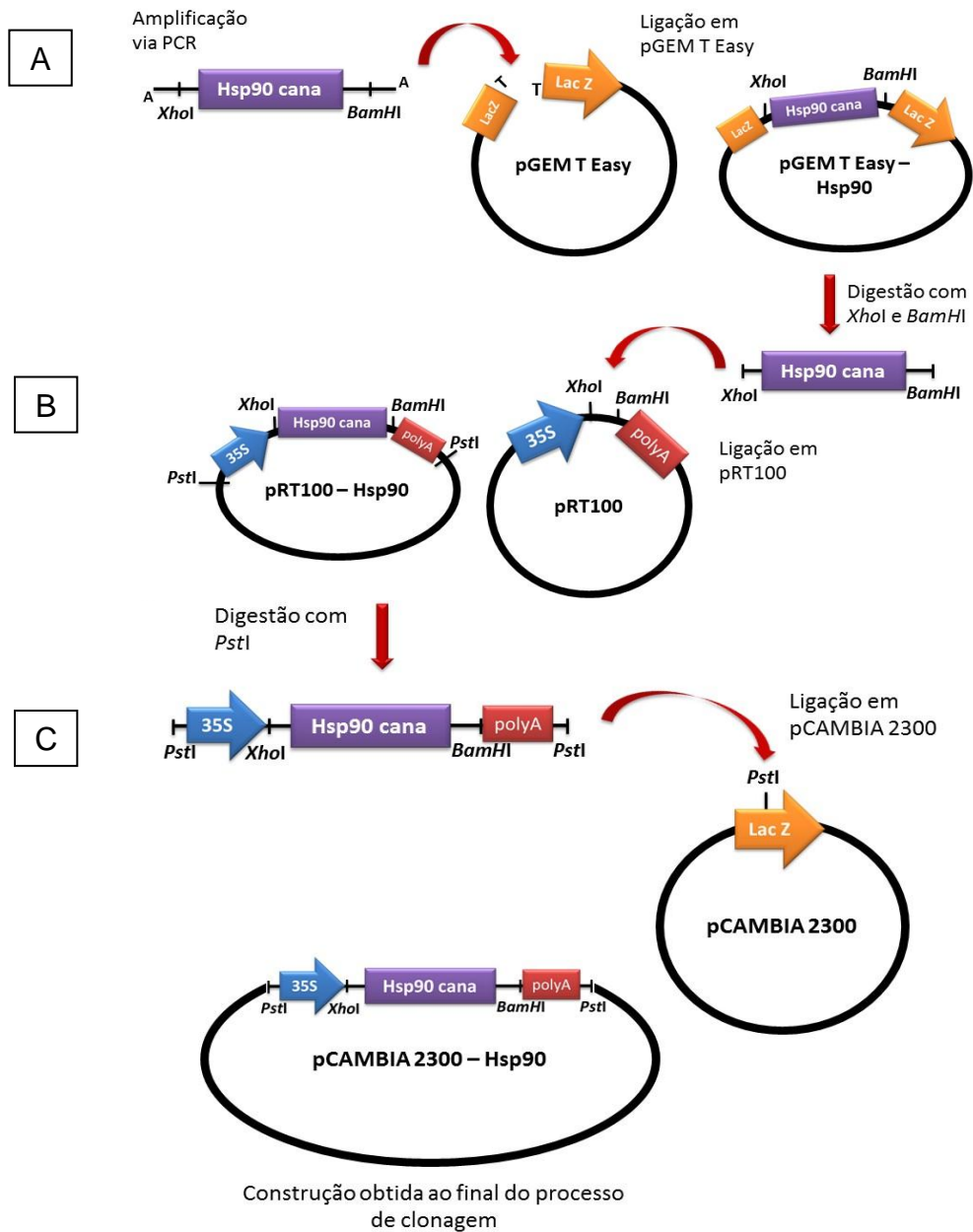


Figura 17: Esquema da estratégia de clonagem da Hsp90-3 de cana-de-açúcar. A estratégia de clonagem da Hsp90-3 de cana-de-açúcar em vetor para transformação de *A. thaliana* (pCAMBIA 2300) foi composta de 3 etapas: **A) Ligação em pGEM T Easy.** A sequência da Hsp90 foi amplificada via PCR a partir do cDNA, já clonado em vetor de expressão pET28a, e em seguida o produto de PCR foi ligado em vetor pGEM T Easy. **B) Ligação em pRT100.** O vetor pGEM T Easy-Hsp90 foi digerido com as enzimas *XhoI* e *BamHI*, para ligação direcional no vetor pRT100, também digerido com as mesmas enzimas, com a finalidade de se inserir o promotor 35S e o sinal poliA. **C) Ligação em pCAMBIA 2300.** O vetor pRT100-Hsp90 foi digerido com a enzima *PstI* para a remoção da construção 35S-Hsp90-poliA e posterior ligação no vetor pCAMBIA 2300, também digerido com *PstI*. O vetor pCAMBIA 2300-35S-Hsp90-poliA foi utilizado para a transformação de *A. thaliana* mediada por *A. tumefaciens*.

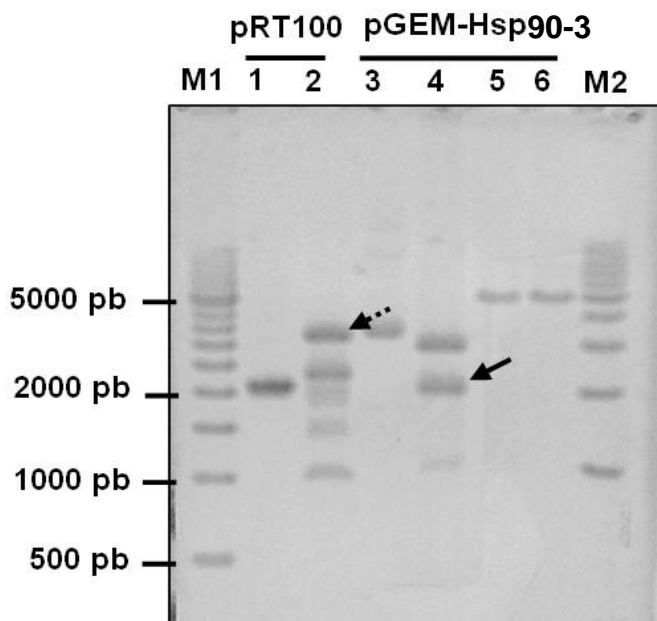


Figura 18: Gel de agarose 1% da digestão pGEM-Hsp90-3 e pRT100 (*XhoI* e *BamHI*). **M1** – Marcador 500 pb (Bio Rad); **M2** – Marcador 1000 pb (Bio Rad); **1**- pRT100 não digerido; **2** – pRT100 digerido com *XhoI* e *BamHI*; **3** – pGEM-Hsp90-3 não digerido; **4** - pGEM-Hsp90-3 digerido com *XhoI* e *BamHI*; **5** - pGEM-Hsp90-3 digerido com *XhoI*; **6** - pGEM-Hsp90-3 digerido com *BamHI*. Os fragmentos correspondentes ao pRT100 (seta pontilhada) e Hsp90-3 (seta cheia) foram purificados do gel de agarose.

Após a inserção do promotor 35S e do sítio de poliadenilação (PoliA), esta construção foi removida através de restrição dupla com as enzimas *PstI* e *Scal*, e ligada no vetor pCAMBIA2300 digerido com *PstI*. A enzima *Scal* foi utilizada para cortar somente o vetor, para que os fragmentos de inserto e vetor fossem diferenciados em gel de agarose (vetor: ~ 1000 pb e ~ 1700; inserto: ~ 2800), para posterior purificação (figura 19).

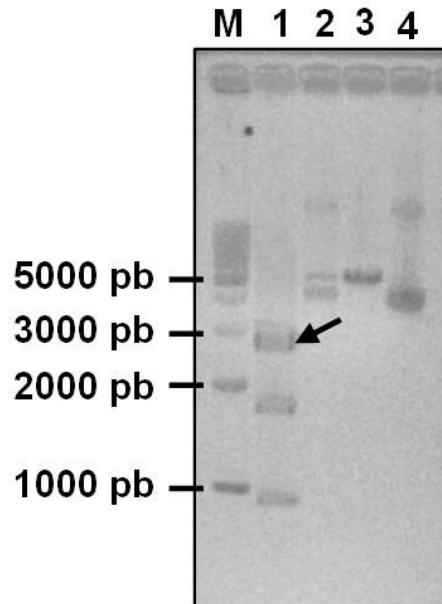


Figura 19: Gel de agarose 1% da digestão pRT100-Hsp90-3 (*PstI*, *Scal* e *BamHI*) e pCAMBIA2300 (*PstI*). M – Marcador 1000 pb (Bio Rad); 1 – pRT100-Hsp90-3 digerido com *PstI* e *Scal*; 2 - pRT100-Hsp90-3 digerido com *Scal*; 3 - pRT100-Hsp90-3 digerido com *BamHI*; 4 - pRT100-Hsp90-3 não digerido. O fragmento correspondente a construção 35S-Hsp90-3-poliA (seta) foi purificado do gel de agarose.

Os clones positivos foram confirmados por digestão com *PstI*, e os com orientação direta foram selecionados por digestão com a enzima *XhoI* (figura 20). No caso de orientação direta, a restrição com *XhoI* libera os fragmentos de tamanho 878, 1498 e 9124 pb.

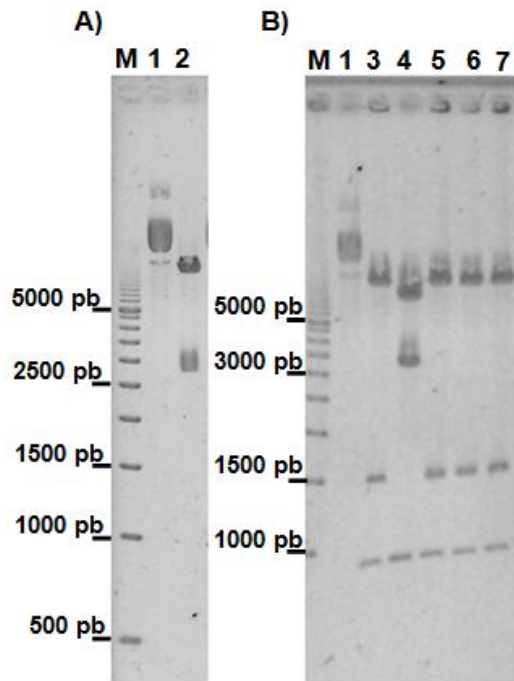


Figura 20: Gel de agarose 1% da digestão clones pCAMBIA2300-35S-Hsp90-3-poliA. Digestão com **A)** *Pst*I e **B)** *Xho*I. **M** – Marcador 500 pb; **1** – pCAMBIA2300-35S-Hsp90-3-poliA não digerido; **2** - pCAMBIA2300-35S-Hsp90-3-poliA digerido com *Pst*I; **3, 4, 5, 6, 7** – pCAMBIA2300-35S-Hsp90-3-poliA digerido com *Xho*I.

Um dos clones positivos foi selecionado para a transformação de *A. tumefaciens*, utilizada como vetor para a transformação de *A. thaliana*.

5.1.3. Transformação de *A. thaliana* e seleção dos transformantes

Plantas *A. thaliana* com aproximadamente 30 dias de cultivo foram borrifadas com suspensão de *A. tumefaciens*, previamente transformada com o vetor pCAMBIA2300-35S-Hsp82-poliA. Os transformantes primários (T0) selecionados em meio MS com canamicina foram posteriormente transferidos para vaso com substrato e vermiculita (figura 21). As sementes foram coletadas de forma individualizada para cada planta, e novamente selecionadas em meio MS (T1). Neste ponto, a proporção de segregação 3:1 de resistência versus sensibilidade a canamicina, respectivamente, foi verificada via teste estatístico chi-quadrado (Tabela 2), tal proporção sugere a existência de um locus do transgene.

Sementes resistentes a canamicina, provenientes de plantas com segregação 3:1 (**1 inserção – H90-2, H90-4 e H90-5; tabela 2**), foram transferidas para vasos com substrato e vermiculita, para a seleção da T2 (obtenção do homocigoto). Foram obtidas duas linhagens homocigotas para a resistência a canamicina (**H90-4.1 e H90-2.15; fenótipo de 100% de resistência a canamicina**).

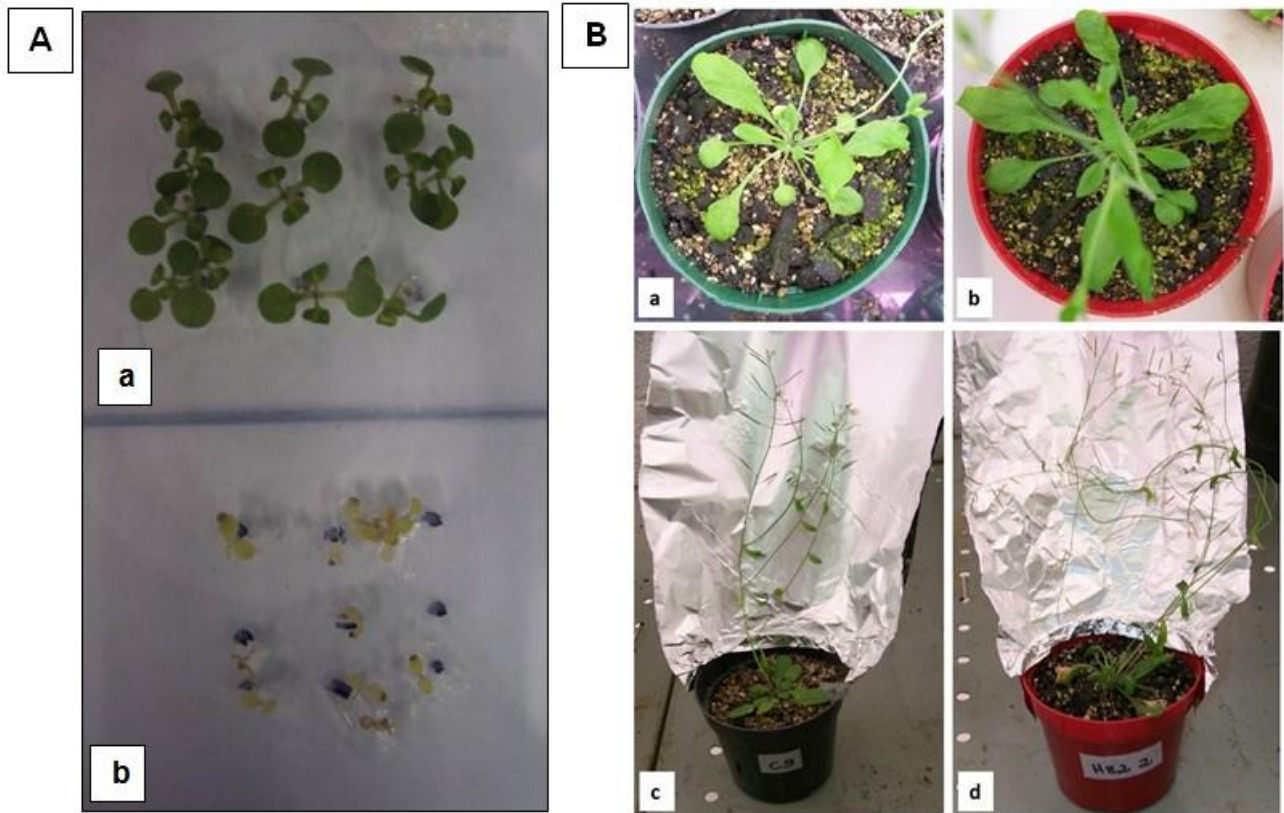


Figura 21: Seleção dos transformantes de *A. thaliana*. As sementes transformadas foram selecionadas com base na resistência a canamicina, conferida pela inserção da construção contendo o transgene. **A)** Meio MS com 100 µg/mL de canamicina contendo **a)** sementes transformadas e **b)** sementes não transformadas (WT); **B)** Plantas resistentes a canamicina transferidas para substrato e vermiculita, **a)** e **c)** correspondem a plantas WT e **b)** e **d)** correspondem aos transgênicos.

Tabela 2: Teste de qui-quadrado da segregação em plantas T1 e linhagens T2 homocigotas selecionadas. Plantas com segregação 3:1 (resistência:sensibilidade a canamicina) estão destacadas em cinza. **H90-1, 2, 3, 4 e 5** se referem a plantas transgênicas resultantes de diferentes eventos na transformação da *A. thaliana* com a Hsp90-3. Na geração seguinte (T2) foram selecionadas 2 linhagens com fenótipo de 100% de resistência (**H90-2.15 e H90-4.1**).

Geração	Planta	Resistentes	Sensíveis	Total	χ^2
T1	H90 - 1	195	104	299	14,7
	H90 - 2	274	77	351	1,6
	H90 - 3	195	37	232	9,7
	H90 - 4	153	44	197	0
	H90 - 5	109	33	142	0,2
T2	H90 - 2.15	80	0	80	-
	H90 - 4.1	78	0	78	-

Algumas alterações fenotípicas na formação das folhas, roseta e inflorescências foram encontradas em plantas T1 (*H90-5*), o que não permitiu avançar geração com esta linhagem (figura 22 e 23).

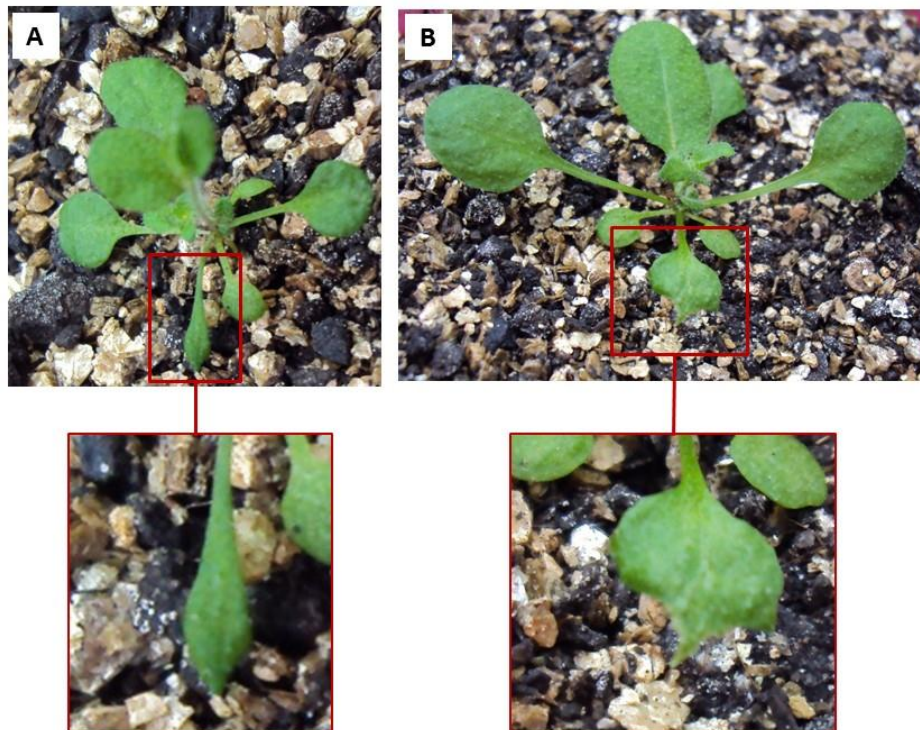


Figura 22: Plantas da linhagem H90-5 (T1) com 20 dias após o plantio (DAP), apresentando alterações fenotípicas. A) folha afilada e em B) folha recortada. Não foi possível avançar geração com estas plantas uma vez que apresentaram deficiência na formação de flores e não houve formação de sementes.

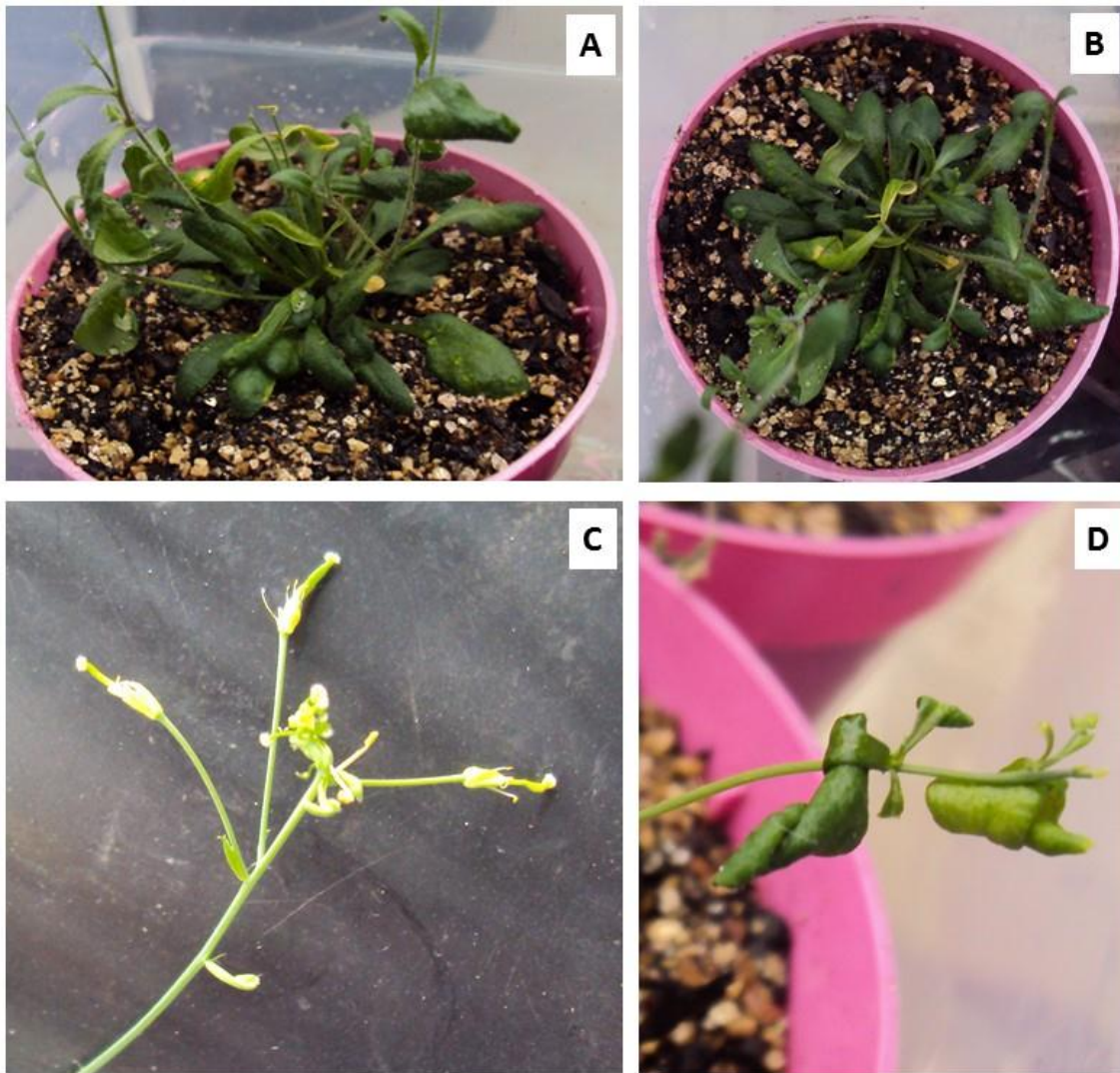


Figura 23: Plantas da linhagem H90-5 (T1) com 40 dias após o plantio (DAP), apresentando alterações fenotípicas. **A)** e **B)** Formação da roseta. **C)** Formação das flores. **D)** Folhas enroladas. Não foi possível avançar geração com estas plantas uma vez que apresentaram deficiência na formação de flores e não houve formação de sementes.

5.1.4. Caracterização dos transgênicos de Hsp90-3

5.1.4.1. Confirmação e efeitos da transgenia

Com o objetivo de confirmar a inserção da construção (T-DNA) no genoma, foi realizada uma PCR com cDNA, sintetizado a partir de RNA de *A. thaliana*, com oligonucleotídeos específicos para o gene NPTII (resistência a canamicina – oligonucleotídeos ver tabela 1). Foi observada uma amplificação de banda única e do tamanho esperado (aproximadamente 100 pb; Figura 24).

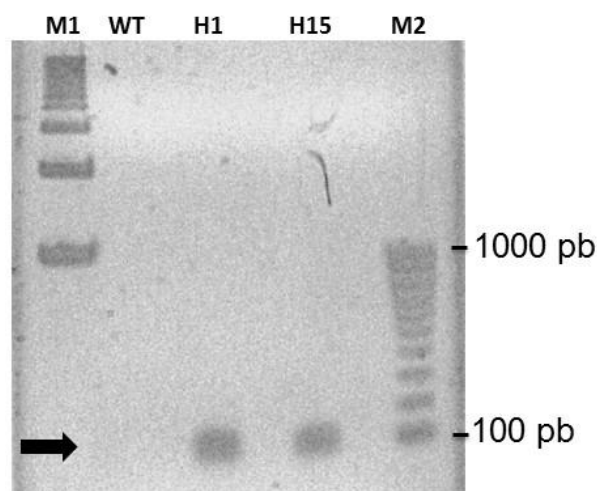


Figura 24: Gel de agarose 1% da PCR do cDNA (RNA) de *Arabidopsis thaliana*. A partir de cDNA de *A. thaliana* WT e transgênicas foi realizado uma PCR com oligonucleotídeos para o NPTII. Foi observado um amplicon de cerca de 100 pb, tamanho esperado de acordo com os oligonucleotídeos utilizados. **WT** – tipo selvagem (controle negativo), **H1** - linhagem transgênica H90-4.1, **H15** - linhagem transgênica H90-2.15, **M1** – Marcador 500 pb (Bio Rad), **M2** – Marcador 100 pb (Bio Rad).

Os níveis de expressão de Hsp90 e outros transcritos em plantas transgênicas H90-4.1 e H90-2.15, foram acessados através de sequenciamento de RNA mensageiro. Os dados (tabelas 3 e 4) revelam que os níveis globais de RNAm de Hsp90 estão cerca de 37% (*fold-change* de -1,6) menores em relação ao controle, assim como outras proteínas tiveram sua expressão alterada. Dentre elas, a chaperona Hsp70, que apresentou níveis reduzidos em 41% (Tabela 4).

A expressão do gene de resistência a canamicina (NPTII) nas plantas transgênicas foi 9 vezes maior em relação ao controle. As tabelas 3 e 4 a seguir reportam os transcritos diferencialmente expressos (*fold-change* acima de 1,0 e abaixo de -1,0) nas duas linhagens transgênicas em relação ao controle.

Tabela 3: Sequenciamento de RNAm – transcritos mais expressos. Genes mais expressos (47) nos transgênicos em relação ao tipo selvagem. **H1:** linhagem transgênica H90-4.1; **H15:** linhagem transgênica H90-2.15.

Gene	Fold-change H15/WT	Fold-change H1/WT	Anotação NR	Anotação KEEG
AT5G38160.1	93,0	119,9	Inibidor bifuncional/proteína transportadora de lipídeo/ proteína de estocagem 2S semelhante à albumina. <i>ref</i> [NP_198632.1] <i>bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin-like protein</i> [Arabidopsis thaliana]dbj BAB11283.1 <i>unnamed protein product</i> [Arabidopsis thaliana]dbj BAC42756.1 <i>lipid transfer like protein</i> [Arabidopsis thaliana]gb AAO64032.1 <i>putative lipid transfer protein</i> [Arabidopsis thaliana]gb AED94274.1 <i>bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin-like protein</i> [Arabidopsis thaliana]	Inibidor de protease/estocagem em semente/família de proteínas transportadoras de lipídeo (LTP). <i>ath</i> :AT5G38160 <i>protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein</i>
AT1G28370.1	5.1	7,6	<i>gb</i> AAF16756.1 AC010155_9 F3M18.20 [Arabidopsis thaliana]	Proteína com domínio ERF; Ligação de DNA/fator de transcrição/repressão da transcrição <i>ath</i> :AT1G28370 <i>ERF11; ERF11 (ERF DOMAIN PROTEIN 11); DNA binding / transcription factor/ transcription repressor</i>
AT2G24600.3	3,8	5,2	Proteína com repetições de anquirina <i>ref</i> [NP_973528.1] <i>ankyrin repeat-containing protein</i> [Arabidopsis thaliana] <i>ref</i> [NP_001189592.1] <i>ankyrin repeat-containing protein</i> [Arabidopsis thaliana]gb AEC07597.1 <i>ankyrin repeat-containing protein</i> [Arabidopsis thaliana]gb AEC07600.1 <i>ankyrin repeat-containing protein</i> [Arabidopsis thaliana]	Família de proteínas com repetição de anquirina <i>ath</i> :AT2G24600 <i>ankyrin repeat family protein</i>
AT5G24240.1	3,9	4,9	Família de proteínas quinase fosfatidilinositol 3 e 4 / família ubiquitina <i>ref</i> [NP_197812.1] <i>phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein / ubiquitin family protein</i> [Arabidopsis thaliana]dbj BAB10389.1 <i>ubiquitin</i> [Arabidopsis thaliana]dbj BAE98733.1 <i>ubiquitin</i> [Arabidopsis thaliana]gb AED93274.1 <i>phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein / ubiquitin family protein</i> [Arabidopsis thaliana]	Família de proteínas quinase fosfatidilinositol 3 e 4 / família ubiquitina <i>ath</i> :AT5G24240 <i>phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein / ubiquitin family protein</i>
AT2G20870.1	2,7	4,0	Proteína hipotética de parede celular <i>gb</i> AAM63440.1 <i>putative cell wall protein</i> [Arabidopsis thaliana]	Precursora de parede celular, hipotética <i>ath</i> :AT2G20870 <i>cell wall protein precursor, putative</i>
AT1G07135.1	7,7	3,9	Proteína hipotética <i>ref</i> [XP_002892382.1] <i>hypothetical protein ARALYDRAFT_470734</i> [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]gb EFH68641.1 <i>hypothetical protein ARALYDRAFT_470734</i> [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	Proteína rica em glicina <i>ath</i> :AT1G07135 <i>glycine-rich protein</i>
AT2G38470.1	4,4	3,4	Fator de transcrição com domínio WRKY 33, hipotético <i>ref</i> [NP_181381.2] <i>putative WRKY transcription factor 33</i> [Arabidopsis thaliana]sp Q8S8P5 WRK33_ARATH RecName: Full=Probable WRKY transcription factor 33; AltName: Full=WRKY DNA-binding protein 33dbj BAE98456.1 <i>putative WRKY-type DNA binding protein</i> [Arabidopsis thaliana]gb ACE74719.1 At2g38470 [Arabidopsis thaliana]gb AEC09541.1 <i>putative WRKY transcription factor 33</i> [Arabidopsis thaliana]	Fator de transcrição WRKY 33 <i>ath</i> :AT2G38470 <i>WRKY33; WRKY33; transcription factor; K13424 WRKY transcription factor 33</i>

AT1G80840.1	4,1	3,4	Fator de transcrição com domínio WRKY 40, hipotético <i>ref</i> [NP_178199.1] putative WRKY transcription factor 40 [Arabidopsis thaliana]sp Q9SAH7 WRK40_ARATH RecName: Full=Probable WRKY transcription factor 40; AltName: Full=WRKY DNA-binding protein 40gb AAF14671.1 AC011713_19 Similar to gb Z48431 DNA-binding protein from Avena fatua [Arabidopsis thaliana]gb AAL85879.1 AF480149_1 WRKY transcription factor 40 [Arabidopsis thaliana]gb AAN71913.1 putative WRKY family transcription factor [Arabidopsis thaliana]dbj BAH30380.1 hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]gb AEE36457.1 putative WRKY transcription factor 40 [Arabidopsis thaliana]	Fator de transcrição WRKY 40 <i>ath</i> :AT1G80840 WRKY40; WRKY40; transcription factor
AT1G27730.1	3,8	3,2	gb AAF24959.1 AC012375_22 T22C5.18 [Arabidopsis thaliana]	Proteína de tolerância a sal com estrutura 'dedo de zinco'; ligação de ácido nucleico/fator de transcrição/repressor de transcrição/ligação de ion zinco <i>ath</i> :AT1G27730 STZ; STZ (salt tolerance zinc finger); nucleic acid binding / transcription factor/ transcription repressor/ zinc ion binding
AT2G22500.1	2,8	3,2	Proteína desacopladora 5/carreador (mitocondrial) de dicarboxilatos, hipotética <i>ref</i> [NP_179836.1] uncoupling protein 5 [Arabidopsis thaliana]gb AAK43907.1 AF370588_1 putative mitochondrial dicarboxylate carrier protein [Arabidopsis thaliana]gb AAD22351.1 putative mitochondrial dicarboxylate carrier protein [Arabidopsis thaliana]gb AAN13106.1 putative mitochondrial dicarboxylate carrier protein [Arabidopsis thaliana]emb CAJ86454.1 mitochondrial dicarboxylate carrier [Arabidopsis thaliana]gb AEC07315.1 uncoupling protein 5 [Arabidopsis thaliana]	Proteína desacopladora 5; ligação <i>ath</i> :AT2G22500 UCP5; UCP5 (UNCOUPLING PROTEIN 5); binding
AT1G23710.1	3,0	3,2	Proteína não caracterizada <i>ref</i> [NP_564201.1] uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana]gb AAK17167.1 AF325099_1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]gb AAC98026.1 EST gb AA597511 comes from this gene [Arabidopsis thaliana]gb AAO64800.1 At1g23710 [Arabidopsis thaliana]dbj BAF00209.1 hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]gb AEE30423.1 uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana]	Proteína hipotética <i>ath</i> :AT1G23710 hypothetical protein
AT3G55980.1	6,4	2,8	Proteína com estrutura 'dedo de zinco' com domínio CCCH 47 <i>ref</i> [NP_567030.1] zinc finger CCCH domain-containing protein 47 [Arabidopsis thaliana]sp Q93ZS9 C3H47_ARATH RecName: Full=Zinc finger CCCH domain-containing protein 47; Short=AtC3H47; AltName: Full=AtSZF1gb AAL07131.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]gb AAP40446.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]dbj BAE98950.1 hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]gb AEE79463.1 zinc finger CCCH domain-containing protein 47 [Arabidopsis thaliana]	Proteína com estrutura 'dedo de zinco' induzida por sal (SZF1); fator de transcrição <i>ath</i> :AT3G55980 SZF1; SZF1 (SALT-INDUCIBLE ZINC FINGER 1); transcription factor
AT5G54190.1	2,4	2,8	NADPH:fotoclorofilídeo oxidoreductase A gb AAC49043.1 NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase A [Arabidopsis thaliana]prf 2120441A protochlorophyllide oxidoreductase	Protochlorofilídeo oxidoreductase B (PORB) <i>ath</i> :AT4G27440 PORB; PORB (PROTOCHLOROPHYLLIDE OXIDOREDUCTASE B); oxidoreductase/ protochlorophyllide reductase (EC:1.3.1.33); K00218 protochlorophyllide reductase [EC:1.3.1.33]

AT5G33370.1	2,2	2,7	Esterase/lipase GDLS <i>ref</i> [NP_198322.1] GDLS esterase/lipase [Arabidopsis thaliana]sp Q8LB81 GDL79_ARATH RecName: Full=GDLS esterase/lipase At5g33370; AltName: Full=Extracellular lipase At5g33370; Flags: Precursor AAM64916.1 putative GDLS-motif lipase/acylhydrolase [Arabidopsis thaliana]gb AAO42146.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]gb AAO50514.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]gb AED93898.1 GDLS esterase/lipase [Arabidopsis thaliana]	Lipase com motive GDLS/familia das hidrolases <i>ath</i> :AT5G33370 GDLS-motif lipase/hydrolase family protein
AT3G52400.1	2,5	2,7	Sintaxina-122, hipotética <i>ref</i> [NP_190808.1] syntaxin-122 [Arabidopsis thaliana]sp Q9SVC2 SY122_ARATH RecName: Full=Syntaxin-122; Short=AtSYP122; AltName: Full=Synt4emb CAB43444.1 syntaxin-like protein synt4 [Arabidopsis thaliana]gb AAK93584.1 putative syntaxin protein synt4 [Arabidopsis thaliana]gb AAM14349.1 putative syntaxin synt4 protein [Arabidopsis thaliana]gb AAN60366.1 unknown [Arabidopsis thaliana]gb AEE78943.1 syntaxin-122 [Arabidopsis thaliana]	Sintaxina de plantas (SYP122) <i>ath</i> :AT3G52400 SYP122; SYP122 (SYNTAXIN OF PLANTS 122); SNAP receptor; K08486 syntaxin 1B/2/3
AT3G56880.1	2,6	2,6	Proteína com motivo VQ, hipotética <i>ref</i> [NP_191247.1] VQ motif-containing protein [Arabidopsis thaliana]emb CAC00751.1 putative protein [Arabidopsis thaliana]gb AAK76654.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]gb AAN41377.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]gb AEE79581.1 VQ motif-containing protein [Arabidopsis thaliana]	Proteína com motivo VQ <i>ath</i> :AT3G56880 VQ motif-containing protein
AT5G19240.1	1,8	2,4	Precursor de glicoproteína de membrana ancorada em GPI <i>ref</i> [NP_197425.1] GPI-anchored glycoprotein membrane precursor [Arabidopsis thaliana]sp Q84VZ5 UGPI2_ARATH RecName: Full=Uncharacterized GPI-anchored protein At5g19240; Flags: Precursor AED92674.1 GPI-anchored glycoprotein membrane precursor [Arabidopsis thaliana]	Proteína hipotética <i>ath</i> :AT5G19240 hypothetical protein
AT4G34150.1	1,8	2,4	Proteína com domínio de ligação de lípido, dependente de cálcio <i>ref</i> [NP_567956.1] calcium-dependent lipid-binding domain-containing protein [Arabidopsis thaliana]gb AAL06551.1 AF412098_1 AT4g34150/F28A23_90 [Arabidopsis thaliana]gb AAN31905.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]gb AAT41866.1 At4g34150 [Arabidopsis thaliana]gb AEE86334.1 calcium-dependent lipid-binding domain-containing protein [Arabidopsis thaliana]	Proteína com domínio C2 <i>ath</i> :AT4G34150 C2 domain-containing protein
AT3G15210.1	1,5	2,3	Fator de transcrição responsivo a etileno 4 (ERF 4) <i>ref</i> [NP_188139.1] ethylene-responsive transcription factor 4 [Arabidopsis thaliana]sp O80340 ERF78_ARATH RecName: Full=Ethylene-responsive transcription factor 4; Short=AtERF4; AltName: Full=Ethylene-responsive element-binding factor 4; Short=EREBP-4; AltName: Full=Protein RELATED TO APETALA2 5dbj BAA32421.1 ethylene responsive element binding factor 4 [Arabidopsis thaliana]dbj BAB02150.1 ethylene responsive element binding factor 4-like protein [Arabidopsis thaliana]gb AAM64308.1 ethylene responsive element binding factor AtERF4 [Arabidopsis thaliana]gb AAM98171.1 ethylene responsive element binding factor 4 (AtERF4) [Arabidopsis thaliana]gb AAQ55276.1 At3g15210 [Arabidopsis thaliana]gb AEE75632.1 ethylene-responsive transcription factor 4 [Arabidopsis thaliana]	Fator de transcrição responsivo a etileno 4 (ERF 4)/ ligação de DNA/ ligação de proteína/fator de transcrição/repressor de transcrição <i>ath</i> :AT3G15210 ERF4; ERF4 (ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 4); DNA binding / protein binding / transcription factor/ transcription repressor; K09286 EREBP-like factor
AT2G46600.1	1,6	2,2	Proteína de ligação de cálcio, com domínio 'EF hand' <i>ref</i> [NP_566082.1] calcium-binding EF-hand-containing protein [Arabidopsis thaliana]sp Q9ZPX9 KIC_ARATH RecName: Full=Calcium-binding protein KIC; AltName: Full=KCBP-interacting	Proteína de ligação a calico, hipotética <i>ath</i> :AT2G46600 calcium-binding

			calcium-binding proteinpdb 3H4S E Chain E, Structure Of The Complex Of A Mitotic Kinesin With Its Calcium Binding Regulatorgb AAK95299.1 AF410313.1 At2g46600/F13A10.13 [Arabidopsis thaliana]gb AAM10349.1 At2g46600/F13A10.13 [Arabidopsis thaliana]gb AAD20170.2 putative caltractin [Arabidopsis thaliana]gb AAR17001.1 KCBP interacting Ca2+-binding protein [Arabidopsis thaliana]gb AEC10727.1 calcium-binding EF-hand-containing protein [Arabidopsis thaliana]	protein, putative
AT5G24780.1	2,2	2,2	Proteína de estocagem vegetativa 1 (VSP1) ref NP_568455.1 vegetative storage protein 1 [Arabidopsis thaliana]sp O49195 VSP1_ARATH RecName: Full=Vegetative storage protein 1; Flags: Precursorgb AAK62375.1 AF386930_1 vegetative storage protein Vsp1 [Arabidopsis thaliana]dbj BAA33446.1 vegetative storage protein [Arabidopsis thaliana]emb CAC08252.1 vegetative storage protein Vsp1 [Arabidopsis thaliana]gb AAK73269.1 vegetative storage protein Vsp1 [Arabidopsis thaliana]gb AAL66921.1 vegetative storage protein Vsp1 [Arabidopsis thaliana]gb AED93360.1 vegetative storage protein 1 [Arabidopsis thaliana]	Proteína de estocagem vegetativa 1 (VSP1); fosfatase ácida/fator de transcrição ath:AT5G24780 VSP1; VSP1 (VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 1); acid phosphatase/transcription factor binding
AT5G06320.1	1,8	2,1	Proteína semelhante a NDR/HIN1 3 ref NP_196250.1 NDR1/HIN1-Like protein 3 [Arabidopsis thaliana]dbj BAB08954.1 harpin-induced protein-like [Arabidopsis thaliana]gb AAN41271.1 putative harpin-induced protein [Arabidopsis thaliana]gb AED91002.1 NDR1/HIN1-Like protein 3 [Arabidopsis thaliana]	Proteína semelhante a NDR/HIN1 3 ath:AT5G06320 NHL3; NHL3
ATCG00480.1	1,9	2,0	ATP sintase CF1 subunidade beta ref NP_051066.1 ATP synthase CF1 beta subunit [Arabidopsis thaliana]sp P19366 ATPB_ARATH RecName: Full=ATP synthase subunit beta, chloroplastic; AltName: Full=ATP synthase F1 sector subunit beta; AltName: Full=F-ATPase subunit betadbj BAA84392.1 ATPase beta subunit [Arabidopsis thaliana]	ATP sintase CF1 subunidade beta ath:ArthCp029 atpB; ATPase beta chain; K02112 F-type H+-transporting ATPase subunit beta [EC:3.6.3.14]
AT2G21660.1	1,8	1,9	dbj BAH56965.1 AT2G21660 [Arabidopsis thaliana]	Proteína de frio, ritmo circadiano, e ligação de RNA 2 (CCR2); ligação de RNA/ligação de DNA dupla fita/ligação de DNA simples fita ath:AT2G21660 CCR2; CCR2 (COLD, CIRCADIAN RHYTHM, AND RNA BINDING 2); RNA binding / double-stranded DNA binding / single-stranded DNA binding
AT1G09070.1	1,5	1,8	Proteína não caracterizada ref NP_563835.1 uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana]gb AAB70401.1 Similar to Glycine SRC2 (gb AB000130). ESTs gb H76869.gb T21700.gb ATTS5089 come from this gene [Arabidopsis thaliana]gb AAK73938.1 At1g09070/F7G19_6 [Arabidopsis thaliana]gb AAM98291.1 At1g09070/F7G19_6 [Arabidopsis thaliana]gb AEE28391.1 uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana]	Gene de soja regulado por frio 2 (SRC2); ligação de proteína ath:AT1G09070 SRC2; SRC2 (SOYBEAN GENE REGULATED BY COLD-2); protein binding
ATCG00470.1	2,0	1,8	ATP sintase CF1 subunidade epsilon ref NP_051065.1 ATP synthase CF1 epsilon subunit [Arabidopsis thaliana]sp P09468 ATPE_ARATH RecName: Full=ATP synthase epsilon chain, chloroplastic; AltName: Full=ATP synthase F1 sector epsilon subunit; AltName: Full=F-ATPase epsilon subunitdbj BAA84391.1 ATPase epsilon subunit [Arabidopsis thaliana]	ATP sintase CF1 subunidade epsilon ath:ArthCp028 atpE; ATP synthase epsilon chain; K02114 F-type H+-transporting ATPase subunit epsilon [EC:3.6.3.14]

AT1G19770.1	1,9	1,7	<p>Permease de purina 14</p> <p><i>ref NP_173407.1 purine permease 14 [Arabidopsis thaliana]sp Q9FXH5 PUP14_ARATH RecName: Full=Probable purine permease 14; Short=AtPUP14gb AAG12553.1 AC007797_13 Unknown Protein [Arabidopsis thaliana]gb AEE29895.1 purine permease 14 [Arabidopsis thaliana]</i></p>	<p>Transportador de purina, proteína transmembrana</p> <p><i>ath:AT1G19770 ATPUP14; purine transmembrane transporter</i></p>
AT2G23810.1	2,1	1,6	<p>Tetraspanina 8, hipotética</p> <p><i>ref NP_850045.2 tetraspanin8 [Arabidopsis thaliana]gb AAM14957.1 hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]gb AEC07493.1 tetraspanin8 [Arabidopsis thaliana]</i></p>	<p>Tetraspanina 8</p> <p><i>ath:AT2G23810 TET8; TET8 (TETRASPANIN8)</i></p>
AT2G15960.1	1,4	1,6	<p>Proteína não caracterizada</p> <p><i>ref NP_565384.1 uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana]gb AAD41972.1 expressed protein [Arabidopsis thaliana]gb AAK76622.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]gb AAL85039.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]dbj BAF02136.1 hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]gb AEC06450.1 uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana]</i></p>	<p>Proteína hipotética</p> <p><i>ath:AT2G15960 hypothetical protein</i></p>
AT2G06050.2	1,4	1,6	<p>12-oxofitodienoato redutase 3</p> <p><i>ref NP_178662.1 12-oxophytodienoate reductase 3 [Arabidopsis thaliana]ref NP_973431.1 12-oxophytodienoate reductase 3 [Arabidopsis thaliana]ref NP_001077884.1 12-oxophytodienoate reductase 3 [Arabidopsis thaliana]sp Q9FUP0 OPR3_ARATH RecName: Full=12-oxophytodienoate reductase 3; AltName: Full=12-oxophytodienoate-10,11-reductase 3; Short=AtOPR3; Short=OPDA-reductase 3; AltName: Full=Delayed dehiscence 1pdb 1Q45 A Chain A, 12-Oxo-Phytodienoate Reductase Isoform 3pdb 1Q45 B Chain B, 12-Oxo-Phytodienoate Reductase Isoform 3pdb 2G5W A Chain A, X-Ray Crystal Structure Of Arabidopsis Thaliana 12- Oxophytodienoate Reductase Isoform 3 (Atopr3) In Complex With 8-Iso Prostaglandin A1 And Its Cofactor, Flavin Mononucleotide.pdb 2G5W B Chain B, X-Ray Crystal Structure Of Arabidopsis Thaliana 12- Oxophytodienoate Reductase Isoform 3 (Atopr3) In Complex With 8-Iso Prostaglandin A1 And Its Cofactor, Flavin Mononucleotide.pdb 2Q30 A Chain A, Ensemble Refinement Of The Protein Crystal Structure Of 12- Oxo-Phytodienoate Reductase Isoform 3pdb 2Q30 B Chain B, Ensemble Refinement Of The Protein Crystal Structure Of 12- Oxo-Phytodienoate Reductase Isoform 3gb AAK43901.1 AF370582_1 12-oxophytodienoate-10,11-reductase [Arabidopsis thaliana]gb AAK95308.1 AF410322_1 At2g06050/F5K7.19 [Arabidopsis thaliana]gb AAD19764.1 12-oxophytodienoate-10,11-reductase [Arabidopsis thaliana]gb AAM19883.1 At2g06050/F5K7.19 [Arabidopsis thaliana]dbj BAH19929.1 AT2G06050 [Arabidopsis thaliana]gb AEC05998.1 12-oxophytodienoate reductase 3 [Arabidopsis thaliana]gb AEC05999.1 12-oxophytodienoate reductase 3 [Arabidopsis thaliana]gb AEC06000.1 12-oxophytodienoate reductase 3 [Arabidopsis thaliana]</i></p>	<p>12 oxofitodienoato redutase 3</p> <p><i>ath:AT2G06050 OPR3; OPR3 (OPDA-REDUCTASE 3); 12-oxophytodienoate reductase (EC:1.3.1.42); K05894 12-oxophytodienoic acid reductase [EC:1.3.1.42]</i></p>
AT4G21650.1	1,5	1,6	<p>Proteína da família subtilase</p> <p><i>ref NP_567633.2 Subtilase family protein [Arabidopsis thaliana]gb AAO00797.1 subtilisin proteinase - like [Arabidopsis thaliana]gb AEE84485.1 Subtilase family protein [Arabidopsis thaliana]</i></p>	<p>Proteína da família subtilase</p> <p><i>ath:AT4G21650 subtilase family protein</i></p>
AT3G15450.1	1,6	1,5	<p>Proteína com domínios YGL e LRDR, induzida por alumínio</p> <p><i>ref NP_566513.1 aluminum induced protein with YGL and LRDR motif [Arabidopsis thaliana]gb AAF35411.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]gb AAK59823.1 AT3g15450/MJK13_11 [Arabidopsis thaliana]dbj BAB02374.1 unnamed protein product [Arabidopsis thaliana]gb AAN18070.1 At3g15450/MJK13_11</i></p>	<p>Proteína hipotética</p> <p><i>ath:AT3G15450 hypothetical protein</i></p>

			[<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AEE75676.1 aluminum induced protein with YGL and LRDR motif [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	
AT5G02160.1	1,3	1,5	Proteína não caracterizada ref NP_195836.5 uncharacterized protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAG40386.1 AF325034_1 AT5g02160 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]db BAC43232.1 unknown protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAX22275.1 At5g02160 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AED90438.1 uncharacterized protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	Proteína hipotética ath:AT5G02160 hypothetical protein
AT4G27440.1	1,3	1,5	Fotoclorofilídeo oxidoreductase B (PORB) ref NP_194474.1 protochlorophyllide reductase B [<i>Arabidopsis thaliana</i>]ref NP_001031731.1 protochlorophyllide reductase B [<i>Arabidopsis thaliana</i>]sp P21218 PORB_ARATH RecName: Full=Protochlorophyllide reductase B, chloroplastic; Short=PCR B; AltName: Full=NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase B; Short=POR B; Flags: Precursorgb AAC49044.1 NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase B [<i>Arabidopsis thaliana</i>]emb CAB43876.1 protochlorophyllide reductase precursor [<i>Arabidopsis thaliana</i>]emb CAB81394.1 protochlorophyllide reductase precursor [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAK68823.1 protochlorophyllide reductase precursor [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAL06867.1 AT4g27440/F27G19_40 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAM10027.1 protochlorophyllide reductase precursor [<i>Arabidopsis thaliana</i>]db BAH19703.1 AT4G27440 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AEE85342.1 protochlorophyllide reductase B [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AEE85343.1 protochlorophyllide reductase B [<i>Arabidopsis thaliana</i>]prf 2120441B protochlorophyllide oxidoreductase	Fotoclorofilídeo oxidoreductase B (PORB) ath:AT4G27440 PORB; PORB (PROTOCHLOROPHYLLIDE OXIDOREDUCTASE B); oxidoreductase/ protochlorophyllide reductase (EC:1.3.1.33); K00218 protochlorophyllide reductase [EC:1.3.1.33]
AT4G38770.1	1,3	1,4	Proteína rica em prolina 4 gb AAF64551.1 AF110988_1 proline-rich protein 4 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	Proteína rica em prolina 4 (PRP4) ath:AT4G38770 PRP4; PRP4 (PROLINE-RICH PROTEIN 4)
AT3G27690.1	1,2	1,3	Proteína coletora de luz, fotossistema II (LHCB 2.3) ref NP_189406.1 photosystem II light harvesting complex protein 2.3 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAD28772.1 AF134125_1 Lhcb2 protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAK48984.1 AF370557_1 light harvesting chlorophyll a/b-binding protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]db BAB02693.1 light harvesting chlorophyll a/b-binding protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAP13406.1 At3g27700 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AEE77352.1 photosystem II light harvesting complex protein 2.3 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	Proteína coletora de luz, fotossistema II (LHCB 2.3) ath:AT3G27690 LHCB2.3; chlorophyll binding; K08913 light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein 2
AT5G26000.1	1,4	1,2	Mirosinase 1; Beta-glicosidase ref NP_851077.1 myrosinase 1 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]sp P37702 BGL38_ARATH RecName: Full=Myrosinase 1; AltName: Full=Beta-glicosidase 38; Short=AtBGLU38; AltName: Full=Sinigrinase 1; AltName: Full=Thioglicosidase 1; Flags: Precursorgb AAD40143.1 AF149413_24 Arabidopsis thaliana thioglicosidase (SW:P37702); Pfam PF00232, Score=666.9, E=1e-196, N=1gb AAC18869.1 thioglicosidase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]emb CAA55786.1 thioglicosidase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAK74039.1 AT5g26000/T1N24_7 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAL91284.1 AT5g26000/T1N24_7 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AED93512.1 myrosinase 1 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	Tioglicosídeo glicohidrolase 1 (TGG1) ath:AT5G26000 TGG1; TGG1 (THIOGLUCOSIDE GLUCOHYDROLASE 1); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds / thioglicosidase
AT4G01850.1	1,3	1,2	S-adenosilmetionina sintase 2 (SAM2) ref NP_192094.1 S-adenosylmethionine synthase 2 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]ref NP_001078345.1 S-adenosylmethionine synthase 2 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]sp P17562 METK2_ARATH RecName: Full=S-adenosylmethionine synthase 2; Short=AdoMet synthase 2; AltName: Full=Methionine adenosyltransferase 2; Short=MAT	S-adenosilmetionina sintase 2 (SAM 2) ath:AT4G01850 SAM-2; SAM-2 (S-ADENOSYLMETHIONINE SYNTHETASE 2); copper ion binding / methionine

			2gb AAD22647.1 AC007138_11 S-adenosylmethionine synthase 2 [Arabidopsis thaliana]gb AAA32869.1 S-adenosylmethionine synthetase (sam-2) [Arabidopsis thaliana]emb CAB80678.1 S-adenosylmethionine synthase 2 [Arabidopsis thaliana]gb AAL61934.1 S-adenosylmethionine synthase 2 [Arabidopsis thaliana]gb AAM19825.1 AT4g01850/T7B11_11 [Arabidopsis thaliana]gb AAN18144.1 At4g01850/T7B11_11 [Arabidopsis thaliana]gb AEE82084.1 S-adenosylmethionine synthase 2 [Arabidopsis thaliana]gb AEE82085.1 S-adenosylmethionine synthase 2 [Arabidopsis thaliana]	adenosyltransferase (EC:2.5.1.6)
AT4G02770.1	1,1	1,2	Centro de reação do fotossistema I, subunidade II ref NP_192186.1 photosystem I reaction center subunit II-1 [Arabidopsis thaliana]sp Q9S7H1 PSAD1_ARATH RecName: Full=Photosystem I reaction center subunit II-1, chloroplastic; AltName: Full=Photosystem I 20 kDa subunit 1; Short=PSI-D1; Flags: Precursor AAG40026.1 AF324675_1 AT4g02770 [Arabidopsis thaliana]gb AAG41469.1 AF326887_1 putative photosystem I reaction center subunit II precursor [Arabidopsis thaliana]gb AAK63862.1 AF389290_1 AT4g02770/T5J8_7 [Arabidopsis thaliana]gb AAD15351.1 putative photosystem I reaction center subunit II precursor [Arabidopsis thaliana]emb CAB52676.1 photosystem I subunit II precursor [Arabidopsis thaliana]emb CAB77762.1 putative photosystem I reaction center subunit II precursor [Arabidopsis thaliana]gb AAL32590.1 Unknown protein [Arabidopsis thaliana]gb AAM10233.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]gb AAM26726.1 AT4g02770/T5J8_7 [Arabidopsis thaliana]gb AAM44987.1 putative photosystem I reaction center subunit II precursor [Arabidopsis thaliana]gb AEE82228.1 photosystem I reaction center subunit II-1 [Arabidopsis thaliana]	Centro de reação do fotossistema I, subunidade II (PSAD-1) ath:AT4G02770 PSAD-1; PSAD-1 (photosystem I subunit D-1); K02692 photosystem I subunit II
AT3G08940.2	1,1	1,2	Proteína ligadora de clorofila a-b (CP29.2) ref NP_187506.1 chlorophyll a-b binding protein CP29.2 [Arabidopsis thaliana]sp Q9XF88 CB4B_ARATH RecName: Full=Chlorophyll a-b binding protein CP29.2, chloroplastic; AltName: Full=LHCB4.2; AltName: Full=LHCII protein 4.2; Flags: Precursor AAD28774.1 AF134127_1 Lhcb4.2 protein [Arabidopsis thaliana]gb AAF07831.1 AC010871_7 putative chlorophyll a/b-binding protein [Arabidopsis thaliana]gb AAL38316.1 putative chlorophyll a/b-binding protein [Arabidopsis thaliana]gb AAM10170.1 putative chlorophyll a/b-binding protein [Arabidopsis thaliana]gb AEE74698.1 chlorophyll a-b binding protein CP29.2 [Arabidopsis thaliana]	Proteína coletora de luz, fotossistema II (LHCB4.2); proteína ligadora de clorofila a-b 4 ath:AT3G08940 LHCB4.2 (light harvesting complex PSII); chlorophyll binding; K08915 light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein 4
AT1G31330.1	1,1	1,2	Centro de reação do fotossistema I, subunidade III (PSAF) ref NP_174418.1 photosystem I reaction center subunit III [Arabidopsis thaliana]sp Q9SHE8 PSAF_ARATH RecName: Full=Photosystem I reaction center subunit III, chloroplastic; AltName: Full=Light-harvesting complex I 17 kDa protein; AltName: Full=PSI-F; Flags: Precursor AAF24595.1 AC007654_11 T19E23.12 [Arabidopsis thaliana]gb AAK25961.1 AF360251_1 putative photosystem I subunit III precursor [Arabidopsis thaliana]gb AAL11558.1 AF424564_1 At1g31330/T19E23_1 [Arabidopsis thaliana]gb AAK82483.1 At1g31330/T19E23_1 [Arabidopsis thaliana]gb AAK93698.1 putative photosystem I subunit III precursor [Arabidopsis thaliana]gb AAL32790.1 similar to photosystem I reaction centre subunit III precursor [Arabidopsis thaliana]gb AAM16171.1 At1g31330/T19E23_1 [Arabidopsis thaliana]gb AAN31826.1 putative photosystem I reaction centre subunit III precursor [Arabidopsis thaliana]gb AAN72110.1 similar to photosystem I reaction centre subunit III precursor [Arabidopsis thaliana]gb AEE31342.1 photosystem I reaction center subunit III [Arabidopsis thaliana]	Centro de reação do fotossistema I, subunidade III (PSAF) ath:AT1G31330 PSAF; PSAF (photosystem I subunit F); K02694 photosystem I subunit III
AT5G28450.1	1,2	1,2	Complexo coletor de luz I, proteína ligadora de clorofila a-b 2 ref NP_198197.1 light-harvesting complex I chlorophyll a/b binding	Proteína ligadora de clorofila a-b 2, cloroplasto, hipotética; LHCI tipo II

			<p>protein 2 [Arabidopsis thaliana]gb AED93800.1 light-harvesting complex I chlorophyll a/b binding protein 2 [Arabidopsis thaliana]</p>	<p>CAB hipotética</p> <p>ath:AT5G28450 chlorophyll A-B binding protein, chloroplast, putative / LHCI type II CAB, putative; K08908 light-harvesting complex I chlorophyll a/b binding protein 2</p>
AT1G64720.1	1,2	1,1	<p>Policetídeo ciclase/hidrolase e semelhante a proteína transportadora de lipídeo</p> <p>ref NP_176653.1 Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport-like protein [Arabidopsis thaliana]gb AAD38248.1 AC006193_4 Putative membrane related protein [Arabidopsis thaliana]gb AEE34278.1 Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport-like protein [Arabidopsis thaliana]</p>	<p>ath:AT1G64720 CP5; CP5</p>
AT3G54890.1	1,1	1,1	<p>Complexo coletor de luz I, proteína ligadora de clorofila a-b 1 (LHCII tipo III CAB 6)</p> <p>ref NP_191049.1 light-harvesting complex I chlorophyll a/b binding protein 1 [Arabidopsis thaliana]sp Q01667 CAB6_ARATH RecName: Full=Chlorophyll a-b binding protein 6, chloroplastic; AltName: Full=LHCI-730; AltName: Full=LHCII type III CAB-6; AltName: Full=Light-harvesting complex protein Lhca1; Flags: Precursor pdb 2WSC 1 Chain 1, Improved Model Of Plant Photosystem I pdb 2WSE 1 Chain 1, Improved Model Of Plant Photosystem I pdb 2WSF 1 Chain 1, Improved Model Of Plant Photosystem I gb AAG40368.1 AF325016_1 AT3g54890 [Arabidopsis thaliana]gb AAG41448.1 AF326866_1 putative chlorophyll a/b-binding protein [Arabidopsis thaliana]gb AAK00370.1 AF339688_1 putative chlorophyll a/b-binding protein [Arabidopsis thaliana]gb AAK32859.1 AF361847_1 AT3g54890/F28P10_130 [Arabidopsis thaliana]emb CAA39534.1 chlorophyll A/B-binding protein [Arabidopsis thaliana]gb AAA32759.1 chlorophyll a/b-binding protein [Arabidopsis thaliana]emb CAB41095.1 chlorophyll a/b-binding protein [Arabidopsis thaliana]gb AAL49939.1 AT3g54890/F28P10_130 [Arabidopsis thaliana]gb AAM19809.1 AT3g54890/F28P10_130 [Arabidopsis thaliana]gb AAN38689.1 AT3g54890/F28P10_130 [Arabidopsis thaliana]gb AEE79306.1 light-harvesting complex I chlorophyll a/b binding protein 1 [Arabidopsis thaliana]</p>	<p>Proteína ligadora de clorofila a-b, hipotética; complexo coletor de luz</p> <p>rcu:RCOM_0333020 chlorophyll A/B binding protein, putative; K08907 light-harvesting complex I chlorophyll a/b binding protein 1</p>
AT4G21960.1	1,1	1,1	<p>Peroxidase 42</p> <p>ref NP_567641.1 peroxidase 42 [Arabidopsis thaliana]sp Q9SB81 PER42_ARATH RecName: Full=Peroxidase 42; Short=Atperox P42; AltName: Full=ATP1a/ATP1b; AltName: Full=PRXR1; Flags: Precursor gb AAG40367.1 AF325015_1 AT4g21960 [Arabidopsis thaliana]gb AAL16147.1 AF428379_1 AT4g21960/T8O5_170 [Arabidopsis thaliana]emb CAA66957.1 peroxidase [Arabidopsis thaliana]gb AAL10500.1 AT4g21960/T8O5_170 [Arabidopsis thaliana]gb AAL24179.1 AT4g21960/T8O5_170 [Arabidopsis thaliana]gb AAL24292.1 peroxidase prxr1 [Arabidopsis thaliana]gb AAM91042.1 AT4g21960/T8O5_170 [Arabidopsis thaliana]gb AEE84535.1 peroxidase 42 [Arabidopsis thaliana]</p>	<p>Peroxidase (PRXR1) carreadora de elétrons/ligação de grupo heme</p> <p>ath:AT4G21960 PRXR1; PRXR1; electron carrier/ heme binding / peroxidase; K00430 peroxidase [EC:1.11.1.7]</p>
AT3G47470.1	1,1	1,1	<p>Proteína ligadora de clorofila a-b 4 (CAB 4);</p> <p>ref NP_190331.3 chlorophyll a-b binding protein 4 [Arabidopsis thaliana]sp P27521 CA4_ARATH RecName: Full=Chlorophyll a-b binding protein 4, chloroplastic; AltName: Full=LHCI type III CAB-4; Flags: Precursor gb AAA32760.1 light-harvesting chlorophyll a/b binding protein [Arabidopsis thaliana]emb CAB61973.1 CHLOROPHYLL A-B BINDING PROTEIN 4 PRECURSOR homolog [Arabidopsis thaliana]gb AAM13079.1 chlorophyll A-B binding protein 4 precursor homolog [Arabidopsis thaliana]gb AAM63472.1 chlorophyll a-b binding protein 4 precursor homolog [Arabidopsis</p>	<p>Complexo coletor de luz I, proteína ligadora de clorofila a-b 4 (LHCA4)</p> <p>ath:AT3G47470 LHCA4; LHCA4 (LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL-PROTEIN COMPLEX I SUBUNIT A4); chlorophyll binding; K08910 light-harvesting complex I chlorophyll a/b binding protein 4</p>

			<i>thaliana</i>]gb AAN15412.1 chlorophyll A-B binding protein 4 precursor homolog [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AEE78285.1 chlorophyll a-b binding protein 4 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	
AT4G10340.1	1,1	1,1	Proteína semelhante à ligadora de clorofila a-b <i>gb</i> AAM65487.1 chlorophyll a/b-binding protein-like [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	Complexo coletor de luz, fotossistema II 5 (LHCB5) <i>ath</i> :AT4G10340 LHCB5; LHCB5 (LIGHT HARVESTING COMPLEX OF PHOTOSYSTEM II 5); chlorophyll binding; K08916 light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein 5

Tabela 4: Sequenciamento de RNAm – transcritos menos expressos. Genes menos expressos (38) nos transgênicos em relação ao tipo selvagem. **H1:** linhagem transgênica H90-4.1; **H15:** linhagem transgênica H90-2.15.

Gene	Fold-change H15/WT	Fold-change H1/WT	Anotação NR	Anotação KEEG
AT3G30720.1	-6,0	-8,1	Proteína envolvida na biossíntese de amido ('Qua-quine starch QQS) <i>ref</i> [NP_189695.1] <i>qua-quine starch</i> [Arabidopsis thaliana]gb ACE80938.1 <i>qua-quine starch</i> [Arabidopsis thaliana]gb AEE77653.1 <i>qua-quine starch</i> [Arabidopsis thaliana]	<i>ath</i> :AT3G30720 QQS; QQS (QUA-QUINE STARCH)
AT1G02820.1	-3,5	-2,9	Semelhante à proteína abundante durante o final da embriogênese 3 <i>ref</i> [NP_171781.1] <i>late embryogenesis abundant 3-like protein</i> [Arabidopsis thaliana]gb AAF02884.1 AC009525_18 <i>Similar to late embryogenesis abundant protein 5</i> [Arabidopsis thaliana]gb AAM67133.1 <i>late embryogenesis abundant protein, putative</i> [Arabidopsis thaliana]dbj BAD44510.1 <i>unknown protein</i> [Arabidopsis thaliana]gb ABD57466.1 At1g02820 [Arabidopsis thaliana]gb AEE27475.1 <i>late embryogenesis abundant 3-like protein</i> [Arabidopsis thaliana]	Proteína abundante durante o final da embriogênese 3 (LEA3) <i>ath</i> :AT1G02820 <i>late embryogenesis abundant 3 family protein / LEA3 family protein</i>
AT1G01060.1	-1,9	-2,6	Proteína de alongação tardia de hipocótilo (LHY); Fator de transcrição MYB <i>ref</i> [NP_171614.1] <i>protein late elongated hypocotyl</i> [Arabidopsis thaliana] <i>ref</i> [NP_849568.1] <i>protein late elongated hypocotyl</i> [Arabidopsis thaliana] <i>ref</i> [NP_001030924.1] <i>protein late elongated hypocotyl</i> [Arabidopsis thaliana]sp Q6R0H1 LHY_ARATH RecName: Full=Protein LHY; AltName: Full=MYB-related transcription factor LHY; AltName: Full=Protein LATE ELONGATED HYPOCOTYLdbj BAH19454.1 AT1G01060 [Arabidopsis thaliana]gb AEE27223.1 <i>protein late elongated hypocotyl</i> [Arabidopsis thaliana]gb AEE27224.1 <i>protein late elongated hypocotyl</i> [Arabidopsis thaliana]gb AEE27225.1 <i>protein late elongated hypocotyl</i> [Arabidopsis thaliana]	Proteína de alongação tardia de hipocótilo (LHY); ligação de DNA/fator de transcrição <i>ath</i> :AT1G01060 LHY; LHY (LATE ELONGATED HYPOCOTYL); DNA binding / transcription factor; K12133 LATE ELONGATED HYPOCOTYL
AT3G46130.1	-1,8	-2,2	Fator de transcrição MYB 48 <i>ref</i> [NP_190199.1] <i>transcription factor MYB48</i> [Arabidopsis thaliana]sp Q9LX82 MYB48_ARATH RecName: Full=Transcription factor MYB48; AltName: Full=Myb-related protein 48; Short=AtMYB48gb AAG01294.1 AF272733_1 <i>putative transcription factor</i> [Arabidopsis thaliana]emb CAB90940.1 <i>Myb DNA binding protein-like</i> [Arabidopsis thaliana]gb AAS10064.1 <i>MYB transcription factor</i> [Arabidopsis thaliana]gb AEE78117.1 <i>transcription factor MYB48</i> [Arabidopsis thaliana]	Proteína com domínio MYB 59; Ligação de DNA/fator de transcrição <i>ath</i> :AT5G59780 MYB59; MYB59 (MYB DOMAIN PROTEIN 59); DNA binding / transcription factor; K09422 <i>myb proto-oncogene protein, plant</i>
AT3G56290.1	-2,1	-2,2	Proteína não caracterizada <i>ref</i> [NP_191188.1] <i>uncharacterized protein</i> [Arabidopsis thaliana]emb CAB87428.1 <i>putative protein</i> [Arabidopsis thaliana]gb AAL32581.1 <i>putative protein</i> [Arabidopsis thaliana]gb AAM10237.1 <i>putative protein</i> [Arabidopsis thaliana]dbj BAF00005.1 <i>hypothetical protein</i> [Arabidopsis thaliana]gb AEE79505.1 <i>uncharacterized protein</i> [Arabidopsis thaliana]	Proteína hipotética <i>ath</i> :AT3G56290 <i>hypothetical protein</i>
AT1G55960.1	-1,9	-2,1	Policetídeo ciclase/hidrolase e semelhante a proteína transportadora de lipídeo <i>ref</i> [NP_564705.1] <i>putative polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport-like protein</i> [Arabidopsis thaliana]gb AAL24103.1 <i>putative membrane related protein CP5</i> [Arabidopsis thaliana]gb AAM67527.1 <i>putative membrane related protein CP5</i> [Arabidopsis thaliana]gb AEE33325.1 <i>putative polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport-like protein</i> [Arabidopsis thaliana]	Proteína hipotética <i>ath</i> :AT1G55960 <i>hypothetical protein</i>
AT1G32900.1	-1,8	-2,1	Amido sintase ligada ao grânulo <i>ref</i> [NP_174566.1] <i>granule-bound starch synthase</i> [Arabidopsis	Amido sintase ligada ao grânulo

			<i>thaliana</i>]sp Q9MAQ0 SSG1_ARATH RecName: Full=Probable granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic; AltName: Full=Granule-bound starch synthase I; Short=GBSS-I; Flags: Precursorgb AAF31273.1 AC006424_2 granule-bound starch synthase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAM19783.1 At1g32900/F9L11_8 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAM66076.1 starch synthase, putative [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAM74496.1 At1g32900/F9L11_8 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAN31102.1 At1g32900/F9L11_8 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AEE31537.1 granule-bound starch synthase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	<i>ath</i> :AT1G32900 starch synthase, putative; K13679 granule-bound starch synthase [EC:2.4.1.242]
AT1G75750.1	-1,4	-2,0	gb AAF87108.1 AC006434_4 F10A5.6 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	Proteína homóloga a GAST1) <i>ath</i> :AT1G75750 GASA1; GASA1 (GAST1 PROTEIN HOMOLOG 1)
AT3G54500.3	-1,5	-1,9	Proteína não caracterizada ref NP_001190088.1 uncharacterized protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AEE79241.1 uncharacterized protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	Proteína hipotética <i>ath</i> :AT3G54500 hypothetical protein
AT4G19420.1	-1,5	-1,8	Pectina acetilesterase, hipotética ref NP_193677.2 putative Pectinacetylesterase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAT70429.1 At4g19420 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAU45212.1 At4g19420 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AEE84180.1 putative Pectinacetylesterase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	Proteína da família da pectina acetilesterase <i>ath</i> :AT4G19420 pectinacetylesterase family protein
AT3G13520.1	-1,4	-1,7	Proteína arabinogalactano 12 ref NP_566458.1 arabinogalactan protein 12 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]sp Q9LJD9 AGP12_ARATH RecName: Full=Arabinogalactan peptide 12; Short=AG-peptide 12; Flags: Precursorgb AAG24280.1 AF195893_1 arabinogalactan protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]db BAB01759.1 unnamed protein product [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAL24406.1 Unknown protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAM10160.1 unknown protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAM63249.1 unknown [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AEE75367.1 arabinogalactan protein 12 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	Proteína arabinogalactano 12 (AGP12) <i>ath</i> :AT3G13520 AGP12; AGP12 (ARABINOGALACTAN PROTEIN 12)
AT2G01850.1	-1,5	-1,7	Xiloglucano:xiloglucosil transferase ref NP_178294.1 xyloglucan:xyloglucosyl transferase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]sp Q8LDS2 XTH27_ARATH RecName: Full=Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 27; Short=At-XTH27; Short=XTH-27; Flags: Precursordb BAA20289.1 endoxyloglucan transferase related protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAD21783.1 xyloglucan endotransglycosylase (EXGT-A3) [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAL24392.1 putative xyloglucan-specific glucanase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAP68259.1 At2g01850 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AEC05508.1 xyloglucan:xyloglucosyl transferase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	Xiloglucano:xiloglucosil transferase (EXGT-A3); Hydrolase, age em ligações glicosídicas <i>ath</i> :AT2G01850 EXGT-A3; hydrolase, acting on glycosyl bonds / xyloglucan:xyloglucosyl transferase; K08235 xyloglucan:xyloglucosyl transferase [EC:2.4.1.207]
AT3G09440.1	-1,4	-1,7	Proteína de choque térmico 70-3 (Hsc70) ref NP_187555.1 protein heat shock protein 70-3 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]ref NP_001189847.1 protein heat shock protein 70-3 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]sp O65719 HSP73_ARATH RecName: Full=Heat shock cognate 70 kDa protein 3; Short=Hsc70.3gb AAF14038.1 AC011436_22 heat-shock protein (At-hsc70-3) [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAF23276.1 AC016661_1 heat shock cognate 70kD protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]emb CAA76606.1 At-hsc70-3 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAK92833.1 putative heat-shock protein At-hsc70-3 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAM20310.1 putative heat-shock protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAM26685.1 At3g09440/F11F8.1 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AAN46823.1 At3g09440/F11F8.1 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AEE74767.1 protein heat shock protein 70-3 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gb AEE74768.1 protein heat shock protein 70-3 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	Proteína de choque térmico 70-3 (Hsc70) <i>ath</i> :AT3G09440 heat shock cognate 70 kDa protein 3 (HSC70-3) (HSP70-3); K03283 heat shock 70kDa protein 1/8

AT5G56010.1	-1,3	-1,6	<p>Proteína de choque térmico 81-3 (Hsp90-3)</p> <p><i>ref</i>[NP_200412.1] <i>heat shock protein 81-3</i> [Arabidopsis thaliana]sp P51818 HS903_ARATH RecName: Full=Heat shock protein 90-3; Short=AtHSP90.3; AltName: Full=HSP81.2; AltName: Full=Heat shock protein 81-3; Short=HSP81-3dbj BAB09283.1] <i>heat shock protein 90</i> [Arabidopsis thaliana]gb AAL32910.1] <i>heat shock protein 90</i> [Arabidopsis thaliana]gb AAL91191.1] <i>heat shock protein 90</i> [Arabidopsis thaliana]gb AED96709.1] <i>heat shock protein 81-3</i> [Arabidopsis thaliana]</p>	<p>Proteína de choque térmico 81-3 (Hsp81-3); ligação de ATP/ligação de proteínas desenoveladas</p> <p><i>ath</i>:AT5G56010 HSP81-3; ATP binding / unfolded protein binding; K04079 molecular chaperone HtpG</p>
AT3G16770.1	-1,3	-1,6	<p>Fator de transcrição responsivo a etileno RAP2-3</p> <p><i>ref</i>[NP_188299.1] <i>ethylene-responsive transcription factor RAP2-3</i> [Arabidopsis thaliana]sp P42736 RAP23_ARATH RecName: Full=Ethylene-responsive transcription factor RAP2-3; AltName: Full=Cadmium-induced protein AS30; AltName: Full=Ethylene response factor 72; Short=ERF72; AltName: Full=Ethylene-responsive element binding protein; Short=AtEBP; AltName: Full=Protein RELATED TO APETALA2 3; Short=Related to AP2 3gb AAC49769.1] AP2 domain containing protein RAP2.3 [Arabidopsis thaliana]dbj BAB02769.1] AP2 domain transcription factor RAP2.3 [Arabidopsis thaliana]gb AAK59605.1] putative AP2 domain containing protein RAP2.3 [Arabidopsis thaliana]gb AAL24399.1] AP2 domain transcription factor RAP2.3 [Arabidopsis thaliana]gb AAM65031.1] AP2 domain containing protein RAP2.3 [Arabidopsis thaliana]gb AAN13131.1] putative AP2 domain containing protein RAP2.3 [Arabidopsis thaliana]gb AEE75863.1] <i>ethylene-responsive transcription factor RAP2-3</i> [Arabidopsis thaliana]</p>	<p>Proteína responsiva a etileno; ligação de DNA/ligação de proteína/ativador de transcrição/fator de transcrição</p> <p><i>ath</i>:AT3G16770 ATEBP; ATEBP (ETHYLENE-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN); DNA binding / protein binding / transcription activator/transcription factor; K09286 EREBP-like factor</p>
AT5G19190.1	-1,6	-1,5	<p>Proteína não caracterizada</p> <p><i>ref</i>[NP_197420.1] <i>uncharacterized protein</i> [Arabidopsis thaliana]dbj BAC42092.1] <i>unknown protein</i> [Arabidopsis thaliana]gb AAO63819.1] <i>unknown protein</i> [Arabidopsis thaliana]gb AED92668.1] <i>uncharacterized protein</i> [Arabidopsis thaliana]</p>	<p>Proteína hipotética</p> <p><i>ath</i>:AT5G19190 hypothetical protein</p>
AT4G23400.1	-1,5	-1,5	<p>Aquaporina PIP1-5, hipotética</p> <p><i>ref</i>[NP_194071.1] <i>putative aquaporin PIP1-5</i> [Arabidopsis thaliana]sp Q8LAA6 PIP15_ARATH RecName: Full=Probable aquaporin PIP1-5; Short=AtPIP1;5; AltName: Full=Plasma membrane intrinsic protein 1d; Short=PIP1demb CAA20461.1] <i>water channel-like protein</i> [Arabidopsis thaliana]emb CAB79295.1] <i>water channel-like protein</i> [Arabidopsis thaliana]gb AAL24430.1] <i>water channel - like protein</i> [Arabidopsis thaliana]gb AAM10155.1] <i>water channel-like protein</i> [Arabidopsis thaliana]gb AEE84748.1] <i>putative aquaporin PIP1-5</i> [Arabidopsis thaliana]</p>	<p>Proteína intrínseca a membrana plasmática (PIP1-5); canal de água; aquaporina PIP</p> <p><i>ath</i>:AT4G23400 PIP1;5; PIP1;5 (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1;5); water channel; K09872 aquaporin PIP</p>
AT2G46830.1	-1,7	-1,5	<p>Proteína associada ao ritmo circadiano 1 (CCA1); Fator de transcrição com domínio MYB</p> <p><i>ref</i>[NP_850460.1] <i>protein CCA1</i> [Arabidopsis thaliana]sp P92973 CCA1_ARATH RecName: Full=Protein CCA1; AltName: Full=MYB-related transcription factor CCA1; AltName: Full=Protein CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1gb AAB40525.1] CCA1 [Arabidopsis thaliana]gb AAC33507.1] MYB-related transcription factor (CCA1); supported by cDNA: gi:1777442 [Arabidopsis thaliana]gb AAC98813.1] CCA1 [Arabidopsis thaliana]gb AAS09981.1] MYB transcription factor [Arabidopsis thaliana]gb AEC10760.1] <i>protein CCA1</i> [Arabidopsis thaliana]</p>	<p>Proteína associada ao ritmo circadiano 1 (CCA1); ligação de DNA/ativador de transcrição/fator de transcrição/repressor de transcrição</p> <p><i>ath</i>:AT2G46830 CCA1; CCA1 (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1); DNA binding / transcription activator/ transcription factor/transcription repressor; K12134 circadian clock associated 1</p>
AT4G34881.1	-1,3	-1,5	<p>Proteína não caracterizada</p> <p><i>ref</i>[NP_001119117.1] <i>uncharacterized protein</i> [Arabidopsis thaliana]dbj BAF00725.1] <i>hypothetical protein</i> [Arabidopsis thaliana]gb AEE86433.1] <i>uncharacterized protein</i> [Arabidopsis thaliana]</p>	<p>Proteína hipotética</p> <p><i>ath</i>:AT4G34881 hypothetical protein</p>
AT2G38230.1	-1,3	-1,5	<p>Proteína envolvida na biossíntese de piridoxal (PDX1.1)</p> <p><i>ref</i>[NP_181358.1] <i>Pyridoxal biosynthesis protein PDX1.1</i> [Arabidopsis thaliana]sp O80448 PDX11_ARATH RecName: Full=Pyridoxal biosynthesis</p>	<p>Proteína envolvida na biossíntese de piridoxina (PDX1.1)</p>

			<p>protein PDX1.1; AltName: Full=HEVER-like protein; Short=AtPDX1.1; Short=AtPDX1;2gb AAK44111.1 AF370296_1 putative SOR1 from the fungus <i>Cercospora nicotianae</i> protein [Arabidopsis thaliana]gb AAK60287.1 AF385694_1 At2g38230/F16M14.16 [Arabidopsis thaliana]gb AAC27172.1 similar to SOR1 from the fungus <i>Cercospora nicotianae</i> [Arabidopsis thaliana]gb AAL34217.1 putative SOR1 from the fungus <i>Cercospora nicotianae</i> protein [Arabidopsis thaliana]gb AEC09511.1 Pyridoxal biosynthesis protein PDX1.1 [Arabidopsis thaliana]</p>	<p>ath:AT2G38230 ATPDX1.1 (pyridoxine biosynthesis 1.1); protein heterodimerization; K06215 pyridoxine biosynthesis protein [EC:4.-.-.]</p>
AT5G38980.1	-1,4	-1,5	<p>Proteína não caracterizada</p> <p>ref NP_198714.1 uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana]dbj BAC42597.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]gb AAO42924.1 At5g38980 [Arabidopsis thaliana]gb AED94383.1 uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana]</p>	<p>Proteína hipotética</p> <p>ath:AT5G38980 hypothetical protein</p>
AT4G29905.1	-1,4	-1,5	<p>Proteína não caracterizada</p> <p>ref NP_680750.1 uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana]gb AAK96800.1 Unknown protein [Arabidopsis thaliana]gb AAL66914.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]gb AEE85691.1 uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana]</p>	<p>Proteína hipotética</p> <p>ath:AT4G29905 hypothetical protein</p>
AT1G24996.1	-1,2	-1,4	<p>Proteína não caracterizada</p> <p>ref NP_173882.1 uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana]gb AAG03111.1 AC004133_5 F5A9.10 [Arabidopsis thaliana]gb AEE30575.1 uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana]</p>	<p>Proteína hipotética</p> <p>ath:AT1G24996 hypothetical protein</p>
AT3G45160.1	-1,4	-1,4	<p>Lipoproteína de membrana, hipotética</p> <p>ref NP_190102.1 Putative membrane lipoprotein [Arabidopsis thaliana]emb CAB72154.1 hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]gb AAP21196.1 At3g45160 [Arabidopsis thaliana]dbj BAE99679.1 hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]gb AEE77999.1 Putative membrane lipoprotein [Arabidopsis thaliana]</p>	<p>Proteína hipotética</p> <p>ath:AT3G45160 hypothetical protein</p>
AT5G01410.1	-1,4	-1,4	<p>Proteína envolvida na biossíntese de piridoxal (PDX1.3)</p> <p>ref NP_195761.1 Pyridoxal biosynthesis protein PDX1.3 [Arabidopsis thaliana]ref XP_002870922.1 hypothetical protein ARALYDRAFT_908014 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]sp Q8L940 PDX13_ARATH RecName: Full=Pyridoxal biosynthesis protein PDX1.3; Short=AtPDX1.3; Short=AtPDX1;1gb AAL16130.1 AF428298_1 AT5g01410/T1008_120 [Arabidopsis thaliana]gb AAL48227.1 AF446352_1 AT5g01410/T1008_120 [Arabidopsis thaliana]emb CAB81924.1 pyridoxine biosynthesis protein-like [Arabidopsis thaliana]gb AAM19944.1 AT5g01410/T1008_120 [Arabidopsis thaliana]gb AAAY42123.1 pyridoxine biosynthesis protein [Arabidopsis thaliana]dbj BAE99236.1 pyridoxine biosynthesis protein - like [Arabidopsis thaliana]gb EFH47181.1 hypothetical protein ARALYDRAFT_908014 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]gb AED90340.1 Pyridoxal biosynthesis protein PDX1.3 [Arabidopsis thaliana]gb AEF15886.1 pyridoxine biosynthesis protein [Arabidopsis thaliana]</p>	<p>Resposta reduzida ao açúcar 4 (RSR4); heterodimerização de proteína/biossíntese de piridoxina</p> <p>ath:AT5G01410 RSR4; RSR4 (REDUCED SUGAR RESPONSE 4); protein heterodimerization/ protein homodimerization; K06215 pyridoxine biosynthesis protein [EC:4.-.-.]</p>
AT5G20700.1	-1,4	-1,4	<p>Proteína não caracterizada</p> <p>ref NP_197570.1 uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana]dbj BAC42009.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]gb AAP37699.1 At5g20700 [Arabidopsis thaliana]gb AED92879.1 uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana]</p>	<p>Proteína associada à senescência</p> <p>ath:AT5G20700 senescence-associated protein-related</p>
AT5G66040.1	-1,2	-1,3	<p>Proteína tiosulfato sulfurtransferase</p> <p>ref NP_851278.1 thiosulfate sulfurtransferase [Arabidopsis thaliana]sp Q39129 STR16_ARATH RecName: Full=Thiosulfate sulfurtransferase, chloroplastic; AltName: Full=Rhodanese; AltName: Full=Senescence-associated protein; AltName: Full=Sulfurtransferase</p>	<p>Proteína associada a senescência DIN1, hipotética</p> <p>rcu:RCOM_0017290 Senescence-associated protein DIN1, putative</p>

			<i>protein 16; Short=AtStr16dbj BAB10409.1 senescence-associated protein sen1-like protein; ketoconazole resistance protein-like [Arabidopsis thaliana]gb AAK83644.1 AT5g66040/K2A18_11 [Arabidopsis thaliana]gb AAM61332.1 senescence-associated protein [Arabidopsis thaliana]gb AAN38701.1 At5g66040/K2A18_11 [Arabidopsis thaliana]gb AED98146.1 thiosulfate sulfurtransferase [Arabidopsis thaliana]</i>	
AT3G44310.1	-1,2	-1,3	Nitrilase 1 <i>ref NP_851011.1 nitrilase 1 [Arabidopsis thaliana]ref NP_001078234.1 nitrilase 1 [Arabidopsis thaliana]sp P32961 NRL1_ARATH RecName: Full=Nitrilase 1gb AAB05221.1 nitrilase 1 [Arabidopsis thaliana]emb CAA68935.2 nitrilase 1 [Arabidopsis thaliana]emb CAB88999.1 nitrilase 1 [Arabidopsis thaliana]gb AAK68787.1 nitrilase 1 [Arabidopsis thaliana]gb AAN15359.1 nitrilase 1 [Arabidopsis thaliana]gb ABE65989.1 nitrilase 1 [Arabidopsis thaliana]gb BAH30476.1 hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]gb AEE77887.1 nitrilase 1 [Arabidopsis thaliana]gb AEE77889.1 nitrilase 1 [Arabidopsis thaliana]</i>	Nitrilase (NIT1) <i>ath:AT3G44310 NIT1; NIT1; indole-3-acetonitrile nitrilase/ indole-3-acetonitrile nitrile hydratase/ nitrilase (EC:3.5.5.1); K01501 nitrilase [EC:3.5.5.1]</i>
AT2G21330.1	-1,4	-1,3	Frutose bifosfato aldolase, classe 1 <i>ref NP_565508.1 fructose-bisphosphate aldolase, class I [Arabidopsis thaliana]sp Q9SJU4 ALFC1_ARATH RecName: Full=Probable fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic; Flags: Precursorgb AAL16176.1 AF428408_1 At2g21330/F3K23.9 [Arabidopsis thaliana]gb AAL31921.1 AF419589_1 At2g21330/F3K23.9 [Arabidopsis thaliana]gb AAK83624.1 At2g21330/F3K23.9 [Arabidopsis thaliana]gb AAK83628.1 At2g21330/F3K23.9 [Arabidopsis thaliana]gb AAL32660.1 putative fructose bisphosphate aldolase [Arabidopsis thaliana]gb AAL90952.1 At2g21330/F3K23.9 [Arabidopsis thaliana]gb AAD23681.2 putative fructose bisphosphate aldolase [Arabidopsis thaliana]gb AAM91583.1 putative fructose bisphosphate aldolase [Arabidopsis thaliana]gb AAM91184.1 putative fructose bisphosphate aldolase [Arabidopsis thaliana]gb AAN15425.1 putative fructose bisphosphate aldolase [Arabidopsis thaliana]gb AAN13091.1 putative fructose bisphosphate aldolase [Arabidopsis thaliana]</i>	Frutose bifosfato aldolase, hipotética <i>ath:AT4G38970 fructose-bisphosphate aldolase, putative; K01623 fructose-bisphosphate aldolase, class I [EC:4.1.2.13]</i>
AT1G48300.1	-1,5	-1,3	<i>gb AAD49767.1 AC007932_15 ESTs gb N97074, gb T13943 and gb R89965 come from this gene [Arabidopsis thaliana]</i>	Proteína hipotética <i>ath:AT1G48300 hypothetical protein</i>
AT3G02470.1	-1,2	-1,3	S-adenosilmetionina descarboxilase 1, cadeia beta <i>ref NP_186896.1 S-adenosylmethionine decarboxylase 1 beta chain [Arabidopsis thaliana]ref NP_001078093.1 S-adenosylmethionine decarboxylase 1 beta chain [Arabidopsis thaliana]ref NP_001154585.1 S-adenosylmethionine decarboxylase 1 beta chain [Arabidopsis thaliana]sp Q96286 DCAM1_ARATH RecName: Full=S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme 1; Short=AdoMetDC 1; Short=SAMDC 1; Contains: RecName: Full=S-adenosylmethionine decarboxylase 1 alpha chain; Contains: RecName: Full=S-adenosylmethionine decarboxylase 1 beta chain; Flags: Precursorgb AAL16237.1 AF428468_1 AT3g02470/F16B3_10 [Arabidopsis thaliana]gb AAF32454.1 S-adenosylmethionine decarboxylase [Arabidopsis thaliana]gb AAK68764.1 S-adenosylmethionine decarboxylase [Arabidopsis thaliana]gb AAM10008.1 S-adenosylmethionine decarboxylase [Arabidopsis thaliana]dbj BAH19598.1 AT3G02470 [Arabidopsis thaliana]gb AEE73812.1 S-adenosylmethionine decarboxylase 1 beta chain [Arabidopsis thaliana]gb AEE73813.1 S-adenosylmethionine decarboxylase 1 beta chain [Arabidopsis thaliana]gb AEE73814.1 S-adenosylmethionine decarboxylase 1 beta chain [Arabidopsis thaliana]</i>	S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC) <i>ath:AT3G02470 SAMDC; SAMDC (S-ADENOSYLMETHIONINE DECARBOXYLASE); adenosylmethionine decarboxylase (EC:4.1.1.50); K01611 S-adenosylmethionine decarboxylase [EC:4.1.1.50]</i>
AT2G25450.1	-1,2	-1,2	Oxigenase dependente de oxoácido <i>ref NP_180115.1 putative 2-oxoacid dependent dioxygenase [Arabidopsis thaliana]sp Q9SKK4 GSL_ARATH RecName: Full=Probable 2-oxoacid dependent dioxygenasegb AAD20704.1 putative dioxygenase [Arabidopsis thaliana]gb AAK92722.1 putative dioxygenase [Arabidopsis</i>	Oxigenase dependente de oxoglutarato, hipotética <i>ath:AT2G25450 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative</i>

			<i>thaliana</i>][gb AAM45103.1 putative dioxygenase [Arabidopsis thaliana][gb AEC07703.1 putative 2-oxoacid dependent dioxygenase [Arabidopsis thaliana]	
AT3G02468.1	-1,2	-1,2	Proteína hipotética <i>gb ABD96953.1 hypothetical protein [Cleome spinosa]</i>	S-adenosilmetionina descarboxilase <i>vvi:100254666 hypothetical protein LOC100254666; K01611 S-adenosylmethionine decarboxylase [EC:4.1.1.50]</i>
AT3G53420.1	-1,2	-1,2	Aquaporina PIP2-1 <i>ref NP_190910.1 aquaporin PIP2-1 [Arabidopsis thaliana]ref NP_001030851.1 aquaporin PIP2-1 [Arabidopsis thaliana]sp P43286 PIP21_ARATH RecName: Full=Aquaporin PIP2-1; AltName: Full=Plasma membrane intrinsic protein 2-1; Short=AtPIP2;1; AltName: Full=Plasma membrane intrinsic protein 2a; Short=PIP2agb AAL16195.1 AF428426_1 AT3g53420/F4P12_120 [Arabidopsis thaliana]emb CAA53477.1 plasma membrane intrinsic protein 2a [Arabidopsis thaliana]emb CAB67649.1 plasma membrane intrinsic protein 2a [Arabidopsis thaliana]gb AAK62634.1 AT3g53420/F4P12_120 [Arabidopsis thaliana]gb AAK73268.1 plasma membrane intrinsic protein 2a [Arabidopsis thaliana]gb AAL06973.1 AT3g53420/F4P12_120 [Arabidopsis thaliana]gb AAL62366.1 plasma membrane intrinsic protein 2a [Arabidopsis thaliana]gb AAM65406.1 plasma membrane intrinsic protein 2a [Arabidopsis thaliana]gb AEE79083.1 aquaporin PIP2-1 [Arabidopsis thaliana]gb AEE79084.1 aquaporin PIP2-1 [Arabidopsis thaliana]</i>	Proteína intrínseca a membrana plasmática; canal de água <i>ath:AT3G53420 PIP2A; PIP2A (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2A); water channel; K09872 aquaporin PIP</i>
AT4G05320.2	-1,2	-1,2	Proteína hexaubiquitina <i>ref XP_002888394.1 hexaubiquitin protein [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]gb EFH64653.1 hexaubiquitin protein [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]</i>	Proteína semelhante a poliubiquitina C <i>ssc:100521156 polyubiquitin-C-like</i>
AT2G45960.3	-1,2	-1,2	Aquaporina PIP1-2 <i>ref NP_001078067.1 aquaporin PIP1-2 [Arabidopsis thaliana]gb AEC10624.1 aquaporin PIP1-2 [Arabidopsis thaliana]</i>	Proteína intrínseca a membrana plasmática (1B) <i>ath:AT2G45960 PIP1B; PIP1B (NAMED PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1B); water channel; K09872 aquaporin PIP</i>
AT2G39730.1	-1,1	-1,1	Ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase ativase <i>ref NP_565913.1 ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase [Arabidopsis thaliana]sp P10896 RCA_ARATH RecName: Full=Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic; Short=RA; Short=RuBisCO activase; Flags: Precursorgb AAG40401.1 AF325049_1 At2g39730 [Arabidopsis thaliana]gb AAA20202.1 ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase [Arabidopsis thaliana]gb AAB87122.1 expressed protein [Arabidopsis thaliana]gb AAL06995.1 At2g39730/T517.3_ [Arabidopsis thaliana]gb AAM66023.1 unknown [Arabidopsis thaliana]gb AEC09714.1 ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase [Arabidopsis thaliana]</i>	Rubisco ativase (RCA); ligação de ADP/ligação de ATP/regulador de enzima <i>ath:AT2G39730 RCA; RCA (RUBISCO ACTIVASE); ADP binding / ATP binding / enzyme regulator/ ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase activator</i>

Com a anotação das proteínas diferencialmente expressas, é possível avaliar quais processos metabólicos foram alterados pela transgenia. As tabelas 3 e 4 contém a anotação das proteínas ordenadas por nível de expressão (*fold change*) e as 10 primeiras posições das duas tabelas

(expressão aumentada ou diminuída) estão reportadas na figura 25, com destaque para a proteína LPT (*lipid transfer protein* – proteína transportadora de lipídeo), que apresentou expressão 119 vezes maior. A QQS (*Qua-quine Starch* – proteína envolvida na biossíntese de amido) foi a menos expressa, com uma redução de 87% na expressão (8 vezes menor). As categorias de processos biológicos mais recorrentes das proteínas contidas nas tabelas 1 e 2 estão reportadas na figura 26.

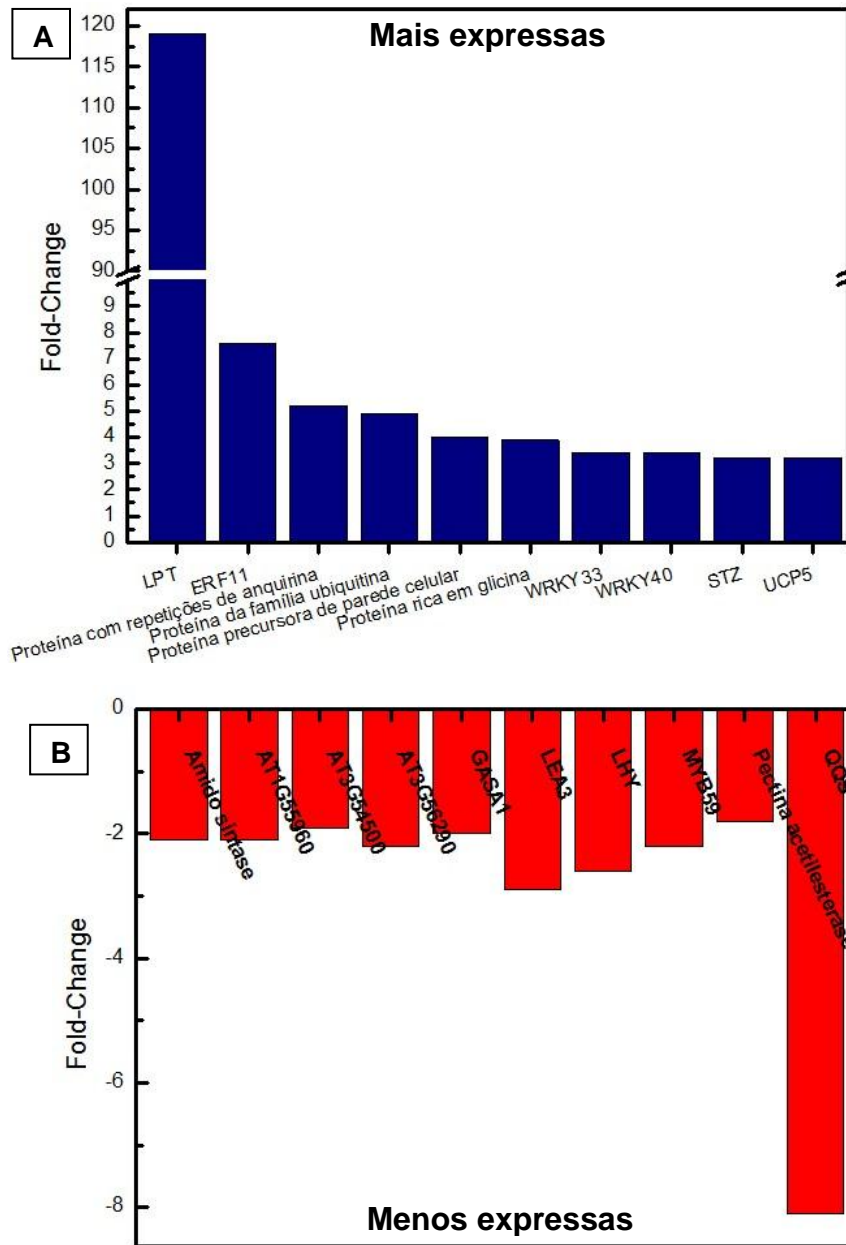


Figura 25: As 10 proteínas mais expressas e as 10 menos expressas. A) Dentre as 10 proteínas mais expressas estão LTP, ERF11, Proteína com repetições de anquirina (*ankyrin repeat family protein*), Proteína da família ubiquitina (*ubiquitin family protein*, Proteína precursora de parede celular (*cell wall protein precursor*), Proteína rica em glicina (*glycine-rich protein*), WRKY33, WRKY40, STZ e UCP5 com destaque para a LTP que exibiu expressão 119 vezes maior em plantas transgênicas; **B)** Dentre as 10 proteínas menos expressas estão QQS, LEA3, LHY, MYB59, AT3G56290, Amido sintase, GASA1, AT3G54500 e Pectina acetilesterase, com destaque para QQS que apresentou expressão 8 vezes menor (redução de 87%, aproximadamente).

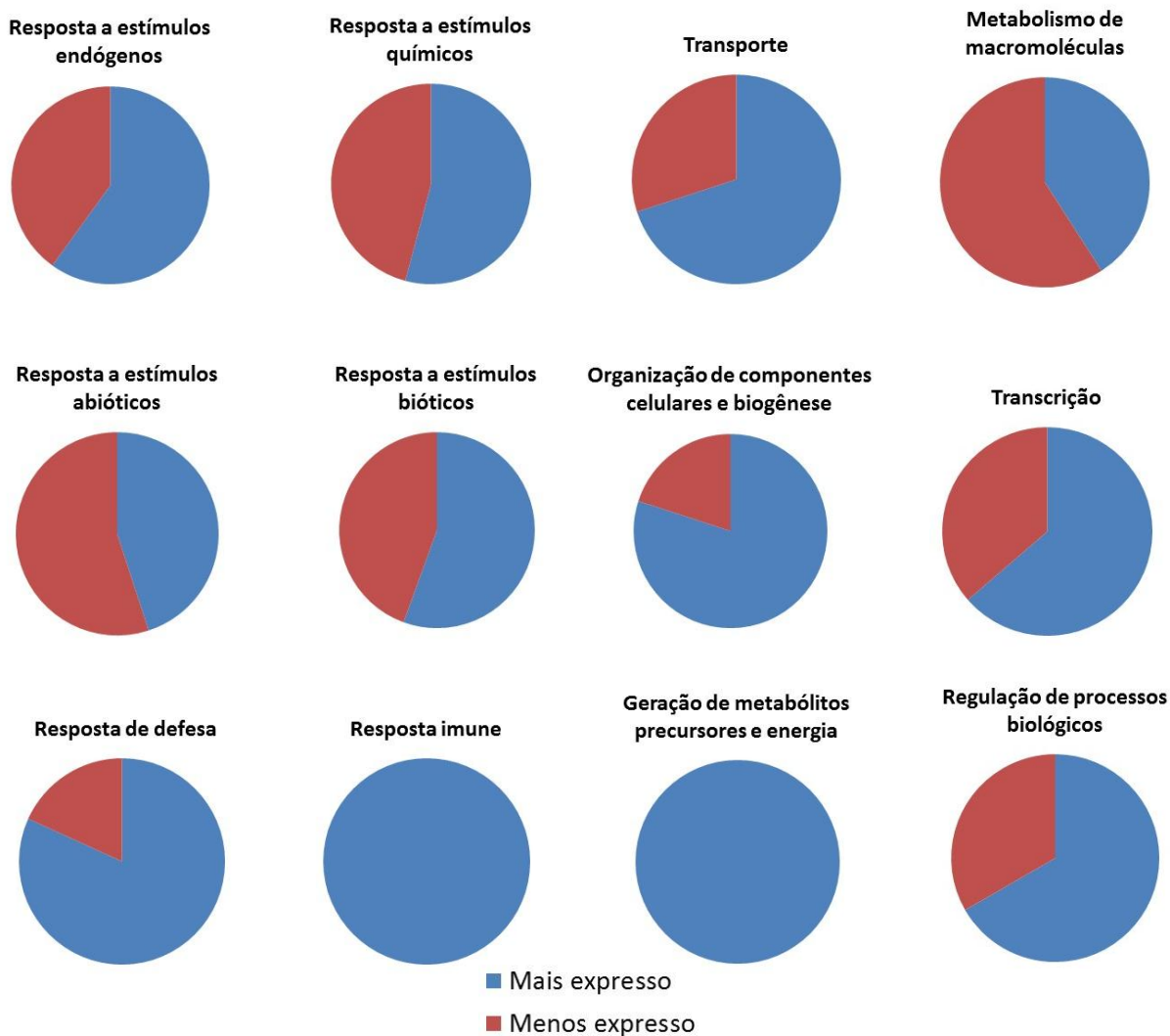


Figura 26: Processos biológicos das proteínas diferencialmente expressas. As seções azuis indicam o número de ocorrências relacionadas a genes mais expressos, e as vermelhas indicam as ocorrências ligadas a genes menos expressos. As categorias “Metabolismo de macromoléculas” e “Resposta a estímulos abióticos” apresentaram maior ocorrência de genes menos expressos, e nas demais categorias há maior ocorrência de genes mais expressos, com destaque para “Resposta imune” e “Geração de metabólitos precursores de energia” que apresentam ocorrências ligadas somente a genes mais expressos. O anexo 2 contém a tabela com a relação de proteínas contidas em cada categoria de processo biológico.

As plantas transgênicas analisadas apresentaram maior expressão de genes relacionados à defesa, sistema imune, resposta à estímulos (endógenos, químicos e bióticos), caracterizando a maior atividade de vias relacionadas a defesa contra patógenos. Categorias ligadas aos processos de transporte, biogênese, produção de energia, regulação de processos biológicos e transcrição também apresentaram mais ocorrências ligadas a genes mais expressos. Em contrapartida, genes relacionados a vias de **“metabolismo de macromoléculas”** e **“resposta a estímulos abióticos”** apresentaram maior número de ocorrências relacionadas a genes menos expressos.

Transcritos pertencentes à categoria **“geração de metabólitos precursores e energia”** e **“resposta imune”** apresentaram ocorrência somente de transcritos mais expressos. Fazem parte do primeiro grupo as proteínas PSAD1 (*photosystem I reaction center D1*), PSFA (*photosystem reaction center F*), e LHC (*light harvesting chlorophyll complex* – também conhecidas como CAB, *chlorophyll a/b binding protein*), que estão presentes na tabelas 3. Dentre as proteínas relacionadas à resposta imune estão ERFs (*ethylene responsive factors*), WRKYs (fatores de transcrição) e NHL3 (*NDR1/HIN1 like protein 3*). Com o intuito de facilitar o entendimento e visualização das relações entre Hsp90 e as proteínas diferencialmente expressas, foram construídos dois interatomas com o uso da ferramenta String 9.0. A figura 27 reporta o interatoma da Hsp90, com destaque para um grupo de proteínas envolvidas em fotossíntese, componentes da categoria de **“geração de metabólitos precursores e energia”**. Dentro deste grupo estão algumas proteínas contidas na tabela 3. A figura 28 mostra o interatoma do fator de transcrição ERF, no qual podem ser visualizadas outras proteínas detectadas como diferencialmente expressas neste estudo, principalmente relacionadas à categoria **“resposta imune”** e **“transcrição”**.

Na categoria **“transcrição”**, foram encontrados ERFs, WRKY, STZ (*salt tolerance zinc finger*), SZF1 (*salt inducible zinc finger 1*), VSP1 (*vegetative storage protein 1*) com maior expressão, e LHY (*late elongated hypocotill*), MYB59, RAP2-3 (*ethylene responsive fator*), CCA1 (*circadian clock associated 1*) com menor expressão. As proteínas ERFs, WRKY, SZF1, VSP1 também estão incluídos nas categorias **“resposta de defesa”**, **“resposta a estímulos endógenos”** e **“resposta a estímulos químicos”**. As proteínas LHY, MYB, RAP2-3, CCA1 são também componentes das categorias **“resposta a estímulos endógenos”** e **“resposta a estímulos químicos”**.

Adicionalmente, as plantas transgênicas apresentaram uma menor expressão de aquaporinas (categoria **“transporte”**) PIP1, PIP2A e PIP1B, e de proteínas relacionadas ao metabolismo de amido e outros açúcares (categoria **“metabolismo de macromoléculas”**) como QQS (*qua-quine starch*), Amido sintase (*starch syntase*), Frutose bifosfato aldolase (*fructose bisphosphate aldolase*), SAMDC (*S-adenosylmethionine decarboxylase 1*), PDX (*pyridoxal biosynthesis protein*), Pectina

acetil esterase (*pectinacetyl esterase protein*) e xilogucano:xilogucosil transferase (*xyloglucan:xyloglucosyl transferase*).

Apesar da reduzida quantia de RNAm de Hsp90 em plantas transgênicas (segundo dados de sequenciamento de RNAm) tais diferenças não foram passíveis de serem detectadas nos níveis de Hsp90 em extratos protéicos. Tais níveis foram equivalentes, dentro do erro, aos das plantas controle, como mostrado pelo *Western Blot* na figura 29.

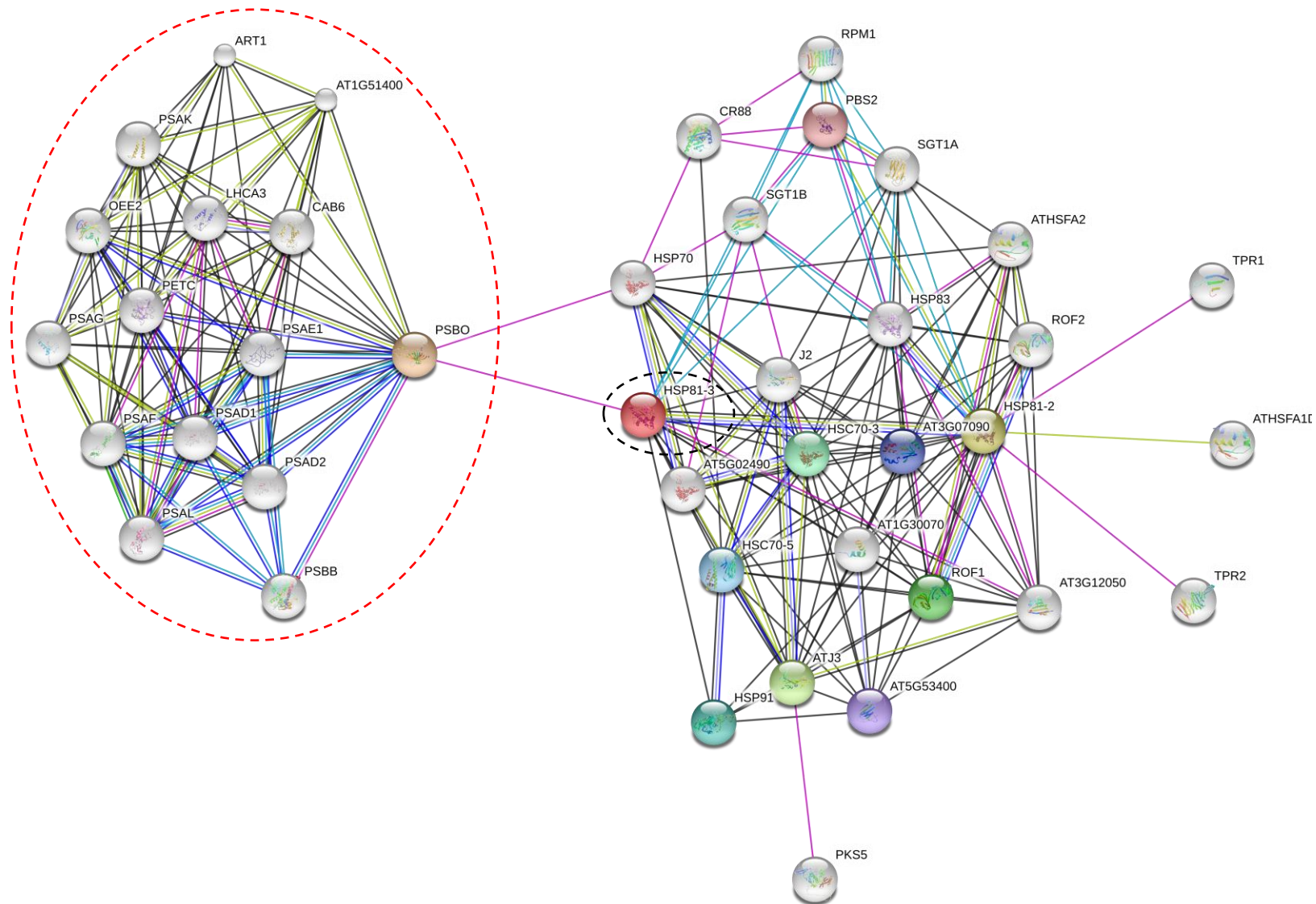


Figura 27: Rede de interações da Hsp90 em *A. thaliana*. Dentre os principais interatores diretos da Hsp90 estão SGT, RPM1, ROF1, chaperonas como Hsp70 e isoformas da Hsp90, co-chaperonas e HSFs (*Heat-shock transcription factors*). Em destaque estão a Hsp90-3 (linha pontilhada preta) e o grupo de proteínas envolvidas no processo de fotossíntese, categoria “geração de metabólitos precursores de energia” (linha pontilhada vermelha). Interatoma construído a partir do banco de dados String 9.0. A tabela com a descrição completa das proteínas deste interatoma encontra-se na seção Anexos (Anexo 3).

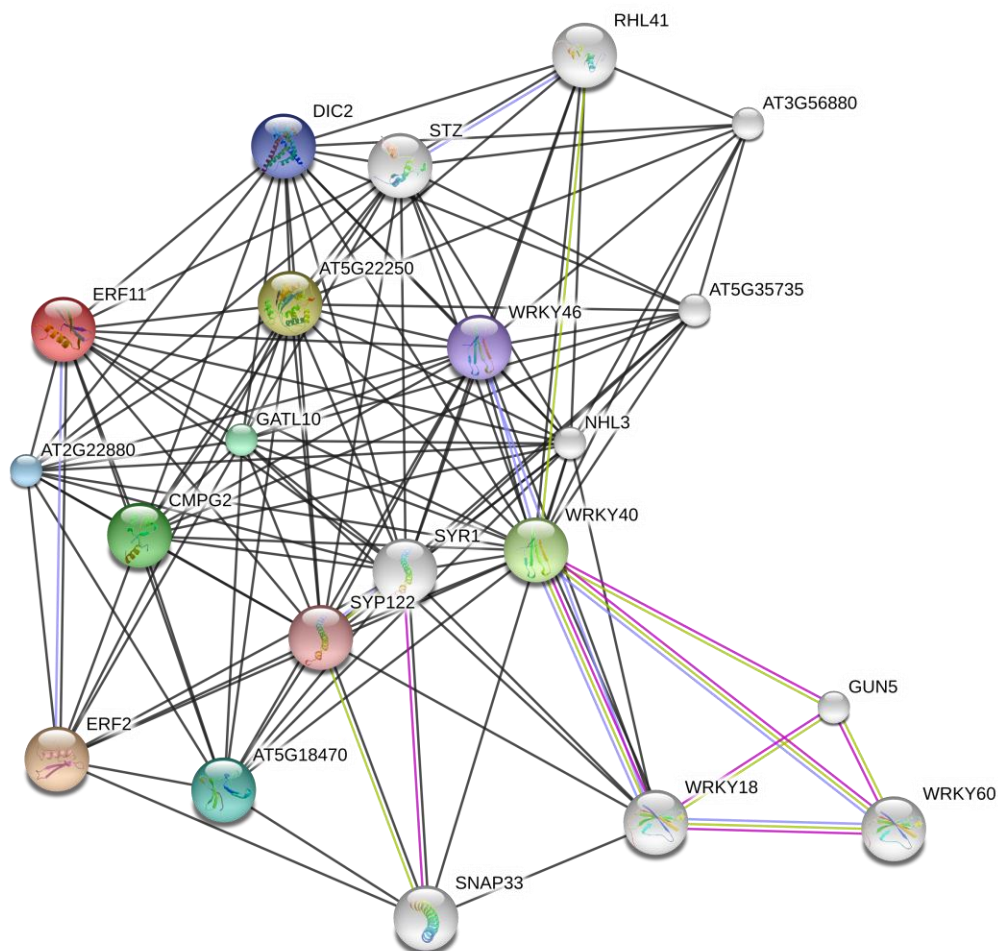


Figura 28: Rede de interações do ERF11 em *A. thaliana*. A rede evidenciou a interação com outras proteínas diferencialmente expressas como STZ, WRKYs, NHL3, SYP122, Proteína com motivo VQ e CCR. Interatoma construído a partir do banco de dados String 9.0. A tabela com a descrição completa das proteínas deste interatoma encontra-se na seção Anexos (Anexo 4).

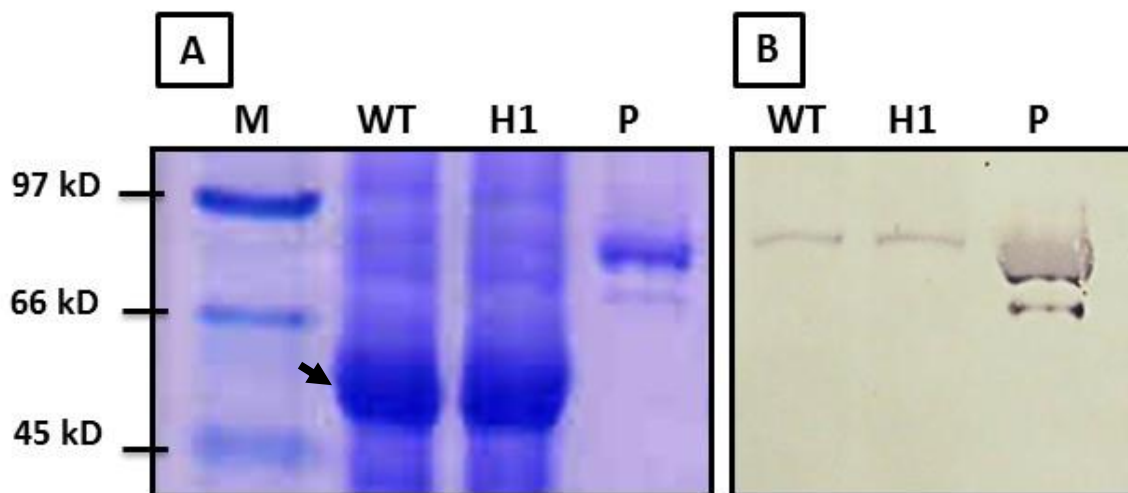


Figura 29: Western Blot de extratos protéicos de plantas transgênicas e controle. A partir de extratos proteicos de plantas WT e transgênicas foi realizado um *Western Blot* com anticorpo anti-Hsp90, com a finalidade de se observar as diferenças no nível desta proteína. Porém, as diferenças não foram detectáveis pela metodologia. **A)** SDS-PAGE 10% corado com Coomassie Blue. As bandas da proteína RuBisCO, seta, podem ser observadas como controle da massa de extrato aplicada. **B)** *Western Blot*, revelado através de reação com fosfatase alcalina, evidenciando as bandas de Hsp90. **M** - Marcador de massa molecular (High Range - Bio Rad); **WT** - Extrato proteico de plantas controle 900 µg; **H1** - Extrato protéico de plantas transgênicas H90-4.1 900 µg; **P** - Hsp90.3 de cana-de-açúcar purificada.

5.1.4.2. Análises fenotípicas

A análise fenotípica das plantas transgênicas e tipo selvagem (controle negativo) não revelou diferenças significativas no peso fresco, no diâmetro da roseta e no comprimento da haste da inflorescência (Tabela 5).

Tabela 5: Medidas de diâmetro, comprimento da haste de inflorescência (altura) e massa fresca de plantas com 40 DAP. **WT:** plantas controle (tipo selvagem); **H90-4.1 e H90-2.15:** linhagens transgênicas homozigotas.

	Diâmetro (cm)	Altura (cm)	Massa (g)
WT	8,0 ± 0,9	17,0 ± 3,0	0,8 ± 0,1
H90-4.1	8,6 ± 0,8	19,0 ± 2,0	0,8 ± 0,2
H90-2.15	8,5 ± 1,0	17,0 ± 3,0	0,8 ± 0,2

Porém, uma análise mais detalhada acerca do comprimento das raízes nos primeiros 7 dias de germinação revelou que as linhagens transgênicas **H90-4.1** e **H90-2.15** apresentaram diferenças significativas no comprimento de raiz em relação ao tipo selvagem (Figura 30; **WT** – 19 ± 2 mm; **H90-4.1** – 23 ± 2 mm; **H90-2.15** – 29 ± 2 mm).

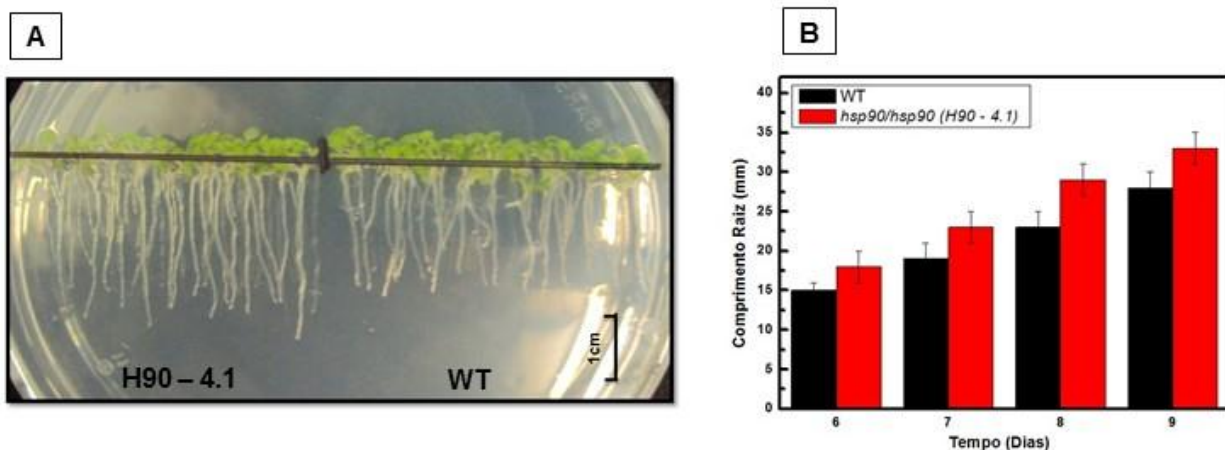


Figura 30: Tamanho das raízes em WT e H90-4.1. Diferenças no desenvolvimento foram observadas para o crescimento de raízes em meio 0,5xMS ágar verticalmente incubado. As raízes foram mensuradas após 6, 7, 8 e 9 dias de incubação 21-23°C/luz constante. **A)** Meio 0,5xMS ágar com 7 dias de incubação 21-23°C/luz constante. **B)** Comprimento das raízes versus tempo (**WT** – 19 ± 2 mm; **H90-4.1** – 23 ± 2 mm). **WT** – controle negativo (tipo selvagem), **H90** – 4.1 – linhagem transgênica homozigota. Após 7 dias as diferenças entre o comprimento das raízes é evidente, sendo estas mais longas nas plantas transgênicas para a Hsp90-3.

Adicionalmente, as plantas transgênicas também apresentaram germinação mais rápida em relação ao controle (Figura 31).

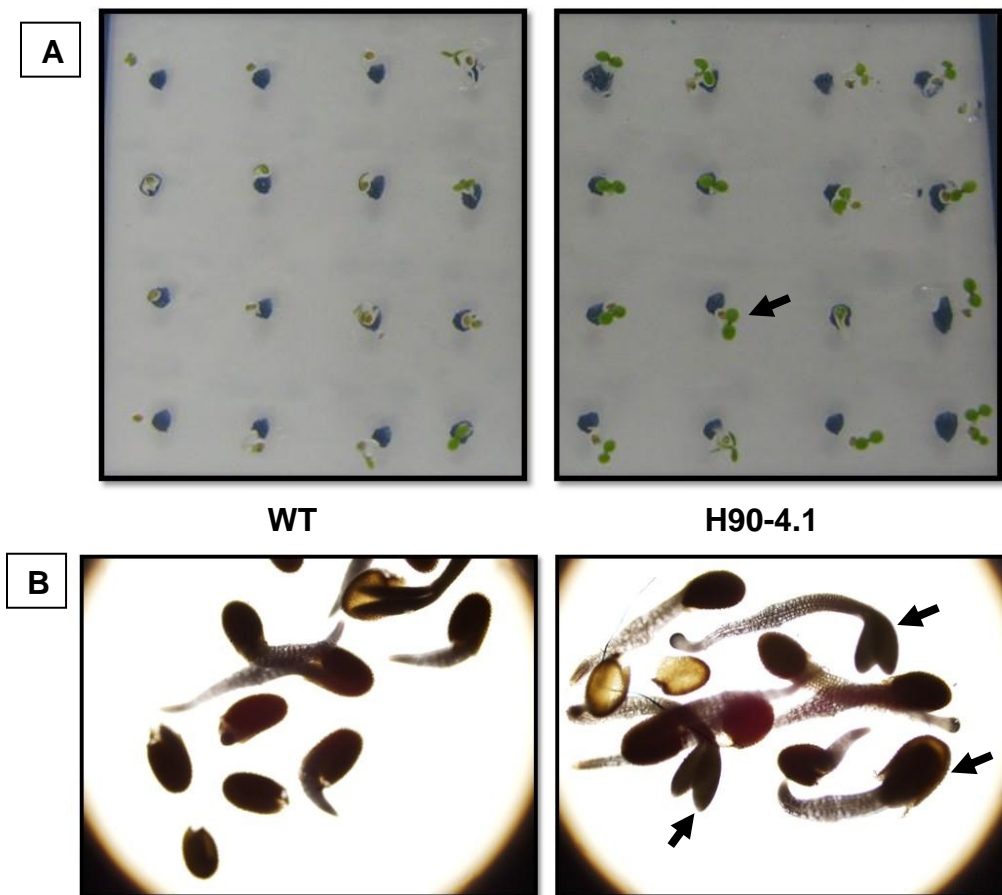


Figura 31: Germinação de WT e H0-4.1. Diferenças no desenvolvimento com relação a germinação foram observadas em 0,5xMS ágar e líquido incubadas a 21-23°C/luz constante. A germinação foi inspecionada nos dias 1, 2, 3 e 4 de incubação. **A)** 0,5xMS ágar e **B)** 0,5xMS líquido, incubação por 3 dias 21-23°C/luz constante. É possível notar em **H90-4.1** que a maioria dos cotilédones estão completamente desenvolvidos, com radículas emergentes, e em **WT** os cotilédones estão em desenvolvimento. **WT** – controle negativo (tipo selvagem), **H90-4.1** – linhagem transgênica homocigota. As setas cheias indicam exemplares de cotilédones desenvolvidos.

5.1.4.3. Tolerância a estresses

5.1.4.3.1. Estresse térmico – alta temperatura

Visto que as chaperonas têm um importante papel tanto na manutenção da homeostase protéica quanto no desenvolvimento do vegetal em condições normais quanto de estresse, também foi investigada a tolerância das linhagens transgênicas frente os estresses térmico, osmótico e salino.

As plantas transgênicas foram menos tolerantes ao aumento de temperatura, exibindo uma recuperação pós-estresse inferior em relação as plantas controle (WT) após o período de 18 dias de recuperação (Figura 32).

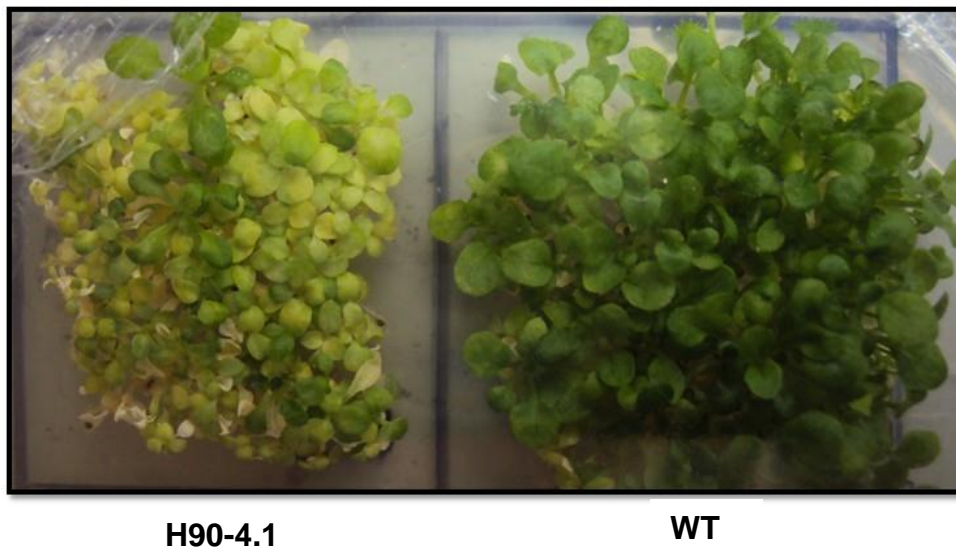


Figura 32: Recuperação de estresse térmico (alta temperatura). Com a finalidade de verificar a tolerância a estresse térmico (alta temperatura), sementes WT e transgênicas foram germinadas em meio 0,5x MS ágar, e com 3 dias de incubação (21-23°C/luz constante) foram submetidas a temperatura de 45°C durante 1 h. Em seguida as placas foram retornadas as condições iniciais para recuperação por mais 18 dias. **WT** – controle negativo (tipo selvagem), **H90-4.1** – linhagem transgênica homozigota.

5.1.4.3.2. Estresse térmico – baixa temperatura

A germinação frente a baixas temperaturas também foi investigada, a fim de verificar se o padrão de desenvolvimento detectado na ausência de estresse é mantido.

Quando submetidas a baixas temperaturas (4°C/sem luz, por 9 dias), exibem mais uma vez germinação acelerada em relação as plantas tipo selvagem (Figura 33).

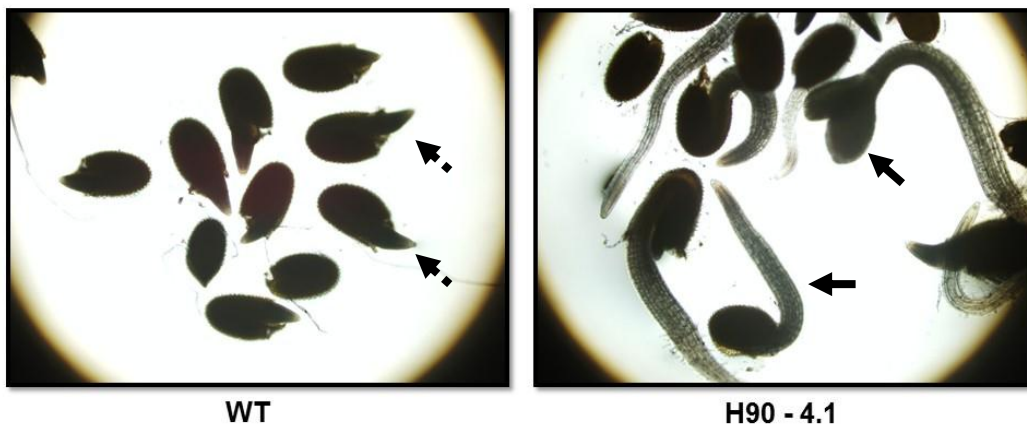


Figura 33: Plantas germinadas em 0,5xMS a 4°C/sem luz durante 9 dias. A germinação sob estresse térmico (baixa temperatura) foi verificada em meio 0,5xMS líquido incubado a 4°C/sem luz, a germinação foi inspecionada durante 9 dias. É possível notar que em **WT** as radículas estão emergindo, e na linhagem transgênica **H90-4.1** as radículas já emergiram e os cotilédones estão em desenvolvimento. **WT** – controle negativo (tipo selvagem), **H90-4.1** – linhagem transgênica homozigota. As setas pontilhadas indicam em WT as radículas emergentes, e as setas cheias indicam em H90-4.1 as raízes desenvolvidas e os cotilédones desenvolvidos.

5.1.4.3.3. Estresse salino - NaCl

Frente a estresse salino (NaCl 50 e 100 mM), as plantas transgênicas mantêm a germinação mais rápida, porém as diferenças com relação ao desenvolvimento das radículas e cotilédones são menos marcantes (Figura 34), e não se observa diferenças no comprimento das raízes (dados não mostrados).

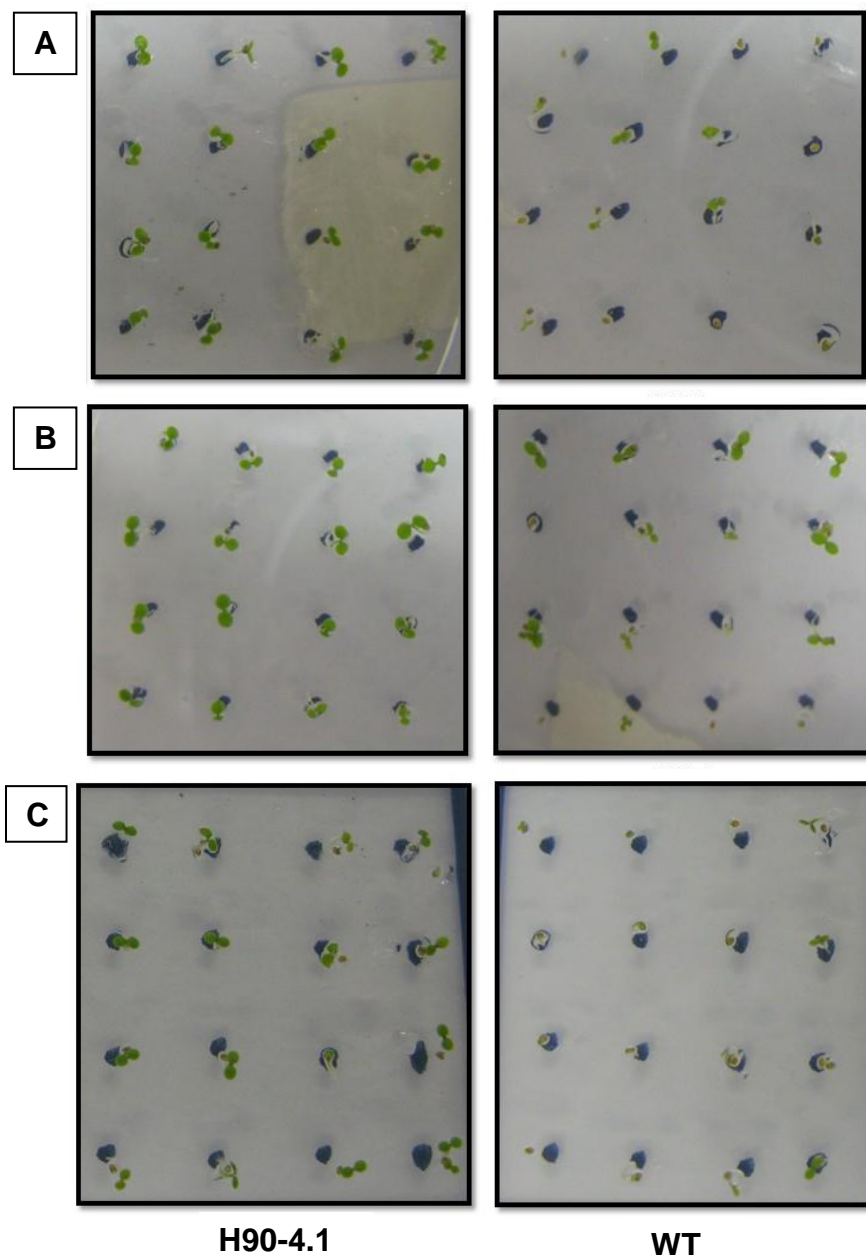


Figura 34: Germinação sob estresse salino. Plantas germinadas durante 3 dias 21-23°C/luz constante em 0,5xMS ágar com adição de **A)** NaCl 100 mM, **B)** NaCl 50 mM e **C)** sem aditivos. É possível notar que em **H90-4.1** os cotilédones estão completamente desenvolvidos, e em **WT** alguns indivíduos em **B)** apresentaram cotilédones totalmente abertos e/ou emergindo. **WT** – controle negativo (tipo selvagem), **H90-4.1** – linhagem transgênica homocigota.

5.1.4.3.4. Estresse osmótico

As linhagens transgênicas também foram investigadas com relação à tolerância a estresse osmótico produzido por manitol. Verificou-se que plantas transgênicas submetidas a estresse osmótico também exibiram raízes maiores do que a planta tipo selvagem (Figura 35), porém com diferenças menos marcantes na germinação (Figura 36).

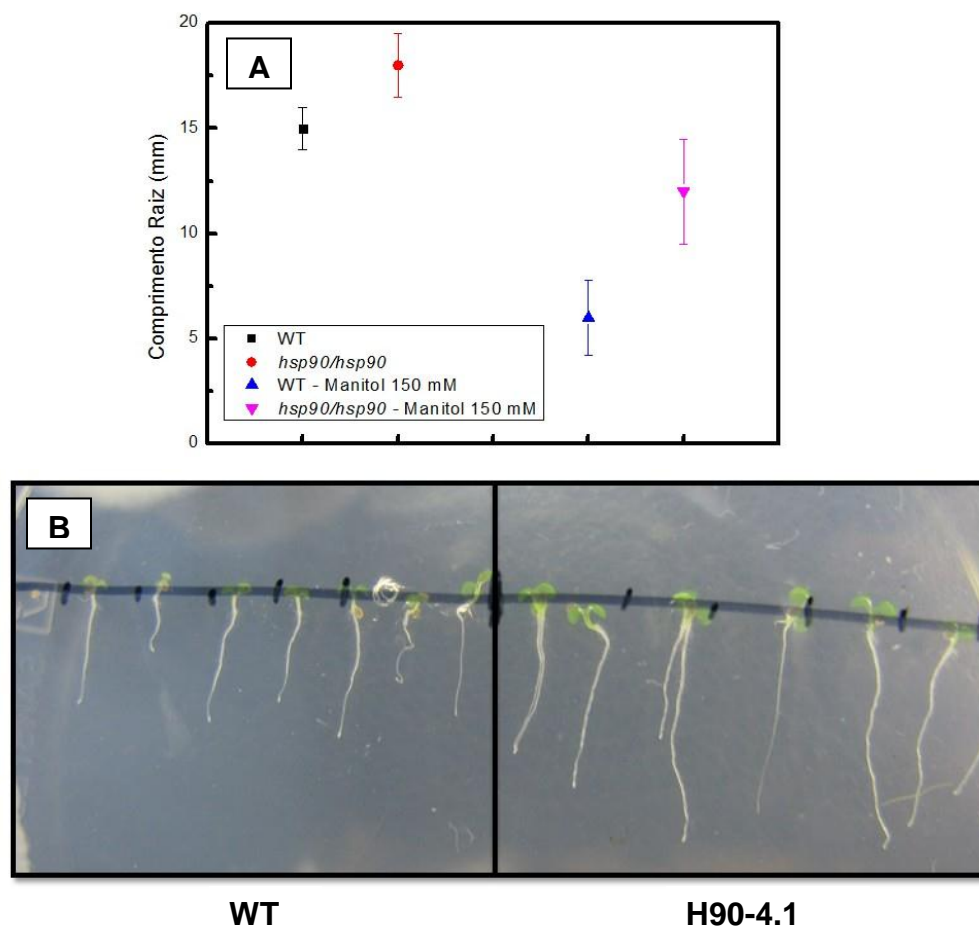


Figura 35: Comprimento das raízes sob estresse osmótico. As plantas foram germinadas durante 7 dias 21-23°C/luz constante em 0,5xMS ágar com adição de manitol 150 mM para a verificação da resposta a estresse osmótico. **A)** Comprimento das raízes *versus* condições de crescimento. **B)** Germinação a 90° para a medida do comprimento das raízes. **WT** – controle negativo (tipo selvagem), **H90-4.1** – linhagem transgênica homozigota. É possível notar que as raízes da linhagem transgênica possuem comprimento maior em relação ao controle.

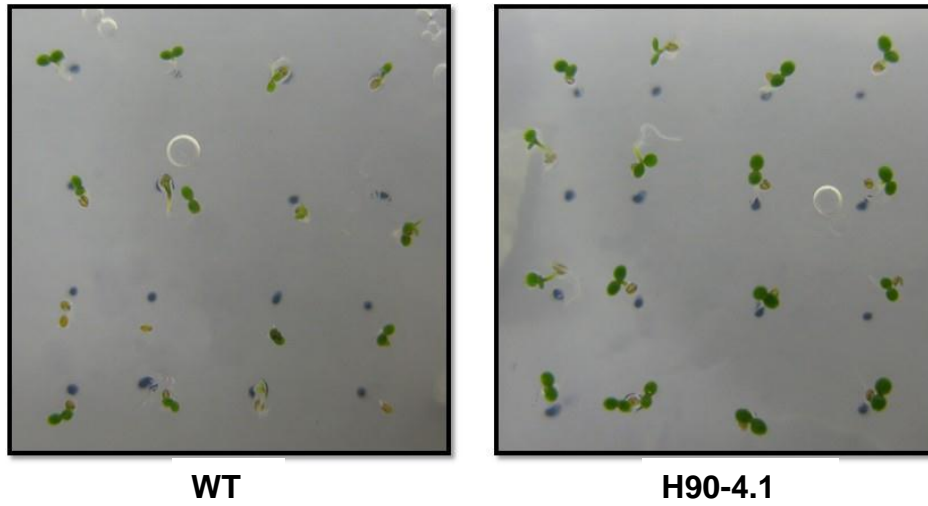


Figura 36: Germinação sob estresse osmótico. Plantas germinadas durante 3 dias 21-23°C/luz constante em 0,5xMS ágar com adição de manitol 150 mM. As diferenças com relação a germinação são menos evidentes se comparadas aos controles na ausência de estresse (ver Figura 34). **WT** – controle negativo (tipo selvagem), **H90-4.1** – linhagem transgênica homozigota.

5.2. Parte B – Caracterização Biofísica da co-chaperona HOP.

Nesta seção apresentamos os resultados da caracterização biofísica da co-chaperona Hop humana, com uma substituição do aminoácido aspartato (D) por glicina (G) no domínio TPR2B, a qual denominamos Hop D456G. O trabalho deu origem a publicação: *Human Hsp70/Hsp90 organizing protein (Hop) D456G is a mixture of monomeric and dimeric species.* (2010) Gonçalves, DC, Gava, LM & Ramos, CHI. *Protein and Peptide Letters*, (17) 492-498 (Anexo 1).

5.2.1. Expressão, purificação e caracterização inicial

A sequência da proteína clonada está representada na figura a seguir (Figura 37). O resíduo D456 corresponde ao resíduo 12 da hélice 3B do TPR2B trocado por glicina está destacado em negrito.

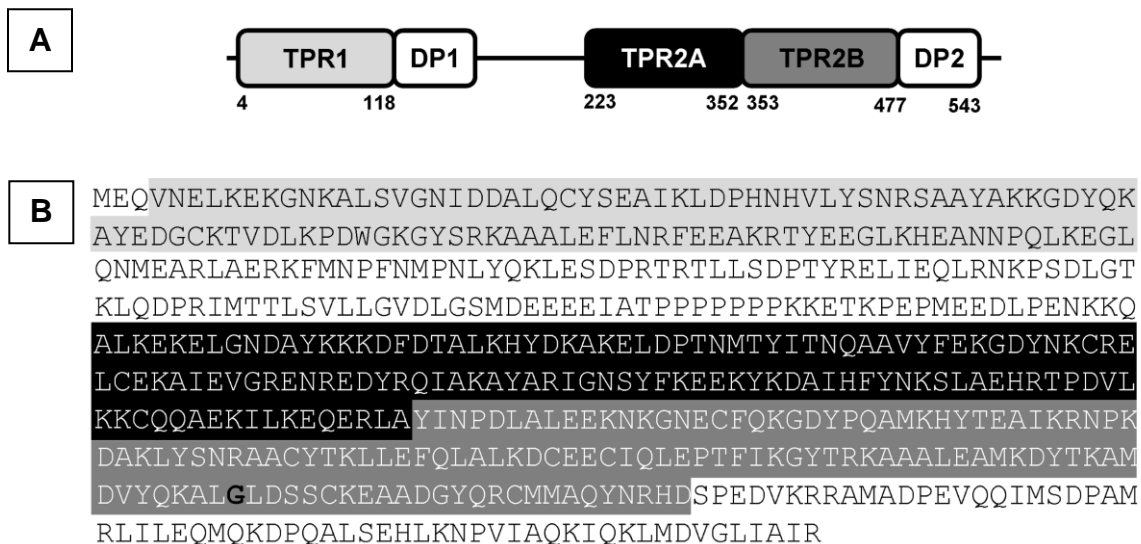


Figura 37: Arranjo estrutural da Hop D456G. **A)** A Hop é composta por 3 domínios TPR e dois domínios contendo repetições de aspartato e prolina (DP) com o seguinte arranjo: TPR1-TPR2A-DP1-TPR2B-DP2. **B)** A sequência de aminoácidos com as cores representativas dos domínios ilustrados em A. O resíduo G456 encontra-se destacado em negrito.

A sequência ilustrada na figura 37 foi clonada em vetor pET28a, contendo uma cauda de histidina para facilitar a purificação, e então sequenciada completamente com os oligonucleotídeos

utilizados para a clonagem HOP_F e HOP_R. A proteína clonada em vetor de pET28a foi expressa em *E. coli*, com bom rendimento nas condições de expressão a 37 °C, durante 3 horas (Figura 38).

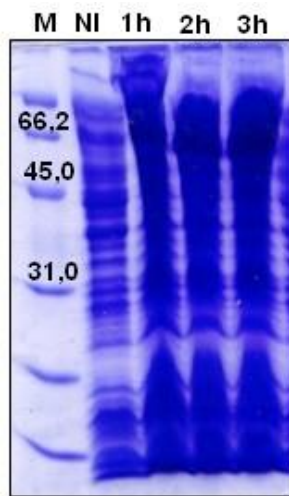


Figura 38: Indução da proteína. SDS-PAGE 12% da indução nas condições de 37 °C e 200 rpm, com alíquotas colhidas 1h, 2h e 3h após a adição do indutor IPTG. **M** - Marcador de massa molecular (Bio-Rad High range), **NI** - cultura não-induzida, antes da adição de IPTG.

A proteína Hop D456G foi obtida pura após 3 passos cromatográficos (afinidade em coluna de níquel, troca aniônica, gel filtração), como ilustrado na figura 39.

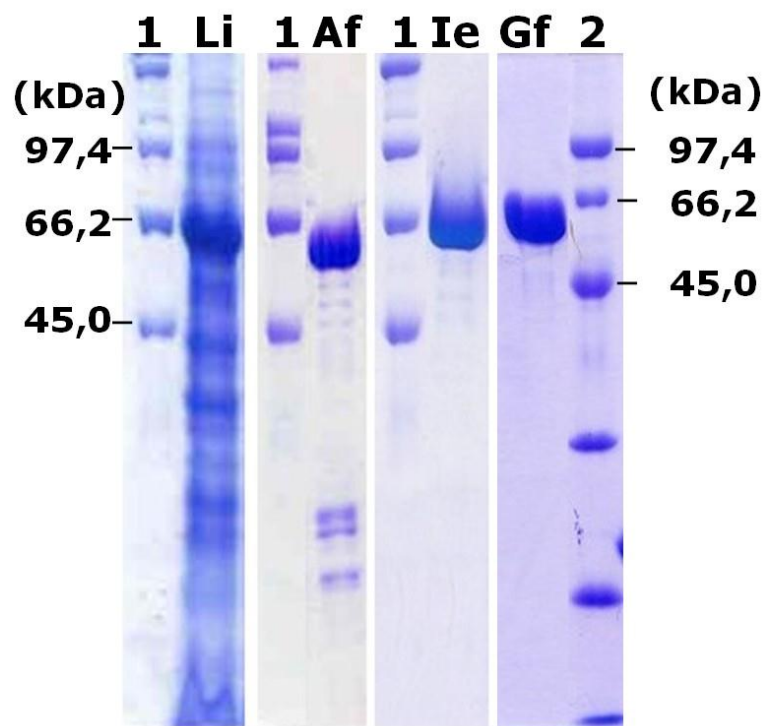


Figura 39: Purificação da Hop D456G. SDS-PAGE 12% dos passos cromatográficos, após os quais a proteína foi obtida pura. **1** - Padrão de massa molecular (BioRad High range), **2** - Padrão de massa molecular (BioRad Broad range), **Li** - fração solúvel, após lise bacteriana, **Af** - após cromatografia de afinidade, **Ie** - após cromatografia de troca iônica, **Gf** - após cromatografia por gel filtração.

Experimentos de dicroísmo circular e fluorescência do triptofano mostraram que a proteína Hop D456G foi purificada enovelada, com estrutura formada predominantemente por hélice-alfa (Figura 40 A), com conteúdo desta estrutura estimado em $64 \pm 4\%$ (Tabela 6). O espectro de dicroísmo circular exibiu mínimos em 210 e 221 nm, com sinais de -24800 e $-28100 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$, respectivamente (tabela 6). A proteína tem um triptofano localizado no domínio TPR1, e o espectro de emissão de fluorescência exibiu máximo de fluorescência a $339 \pm 1 \text{ nm}$ e centro de massa espectral de $345 \pm 1 \text{ nm}$ (Figura 40 B), indicando que o triptofano está localizado em meio hidrofóbico, protegido pela estrutura da proteína.

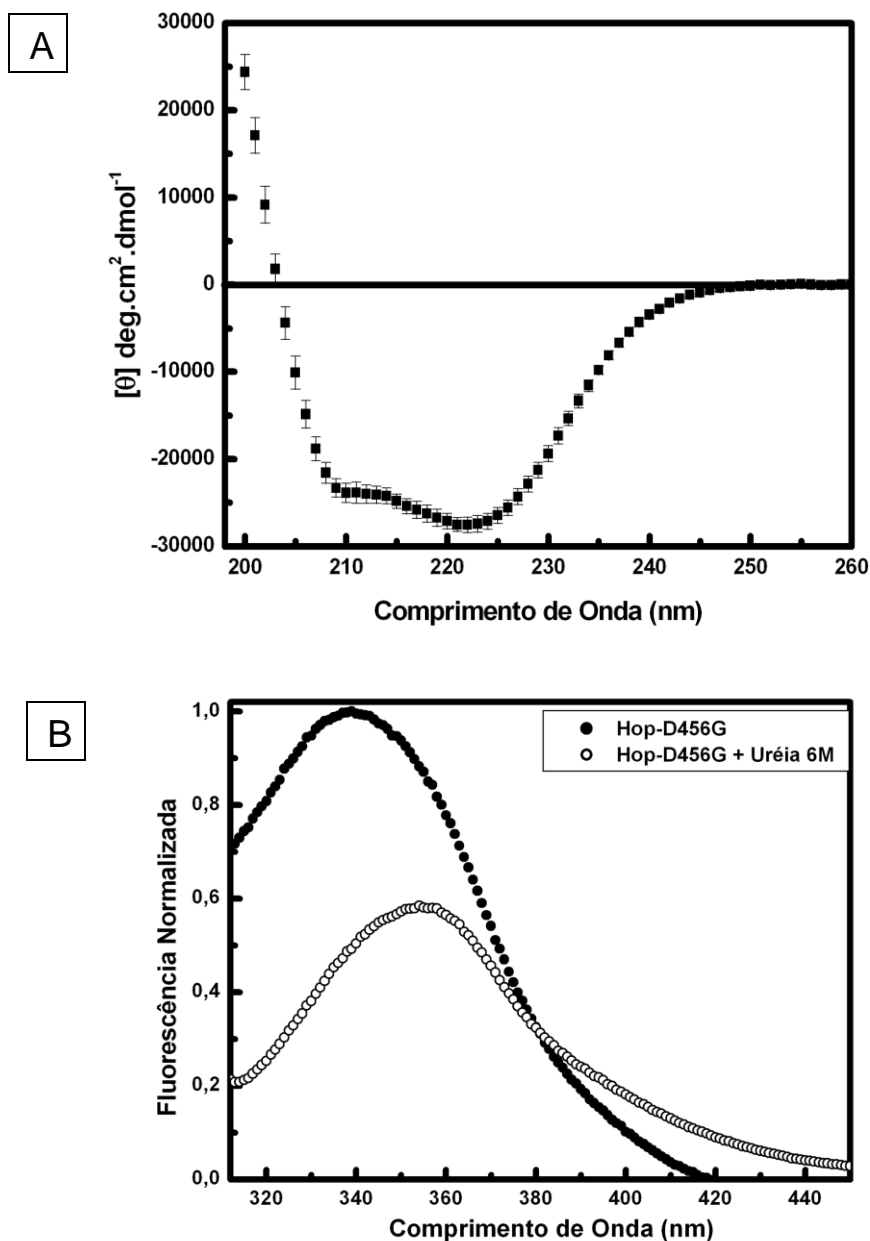


Figura 40: Hop D456G foi purificada enovelada. A) Espectro de dicroísmo circular. A elipsidade residual molar foi medida de 200 a 260 nm, proteína em tampão 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) 200 mM NaCl e 2 mM de EDTA. O perfil do espectro é característico de proteínas ricas em hélice-alfa. **B)** Espectro de emissão de fluorescência. Excitação a 295 nm e espectro de emissão analisado de 300 a 450 nm em tampão 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) 200 mM NaCl e 2 mM de EDTA, na ausência ou na presença de 6 M de uréia. Os espectros de fluorescência revelam que o triptofano encontra-se em meio hidrofóbico, protegido pela estrutura da proteína. O λ_{max} foi de 339 ± 1 nm e centro de massa espectral de 345 ± 1 nm. Na presença de 6 M de uréia o λ_{max} foi de 354 ± 1 nm e centro de massa espectral de 361 ± 1 nm.

Experimentos de desenovelamento térmico monitorado por dicroísmo circular mostraram que a Hop D456G possui desenovelamento reversível através de uma curva de transição sigmoide, com T_m de 53 ± 1 °C (Tabela 6 e Figura 41).

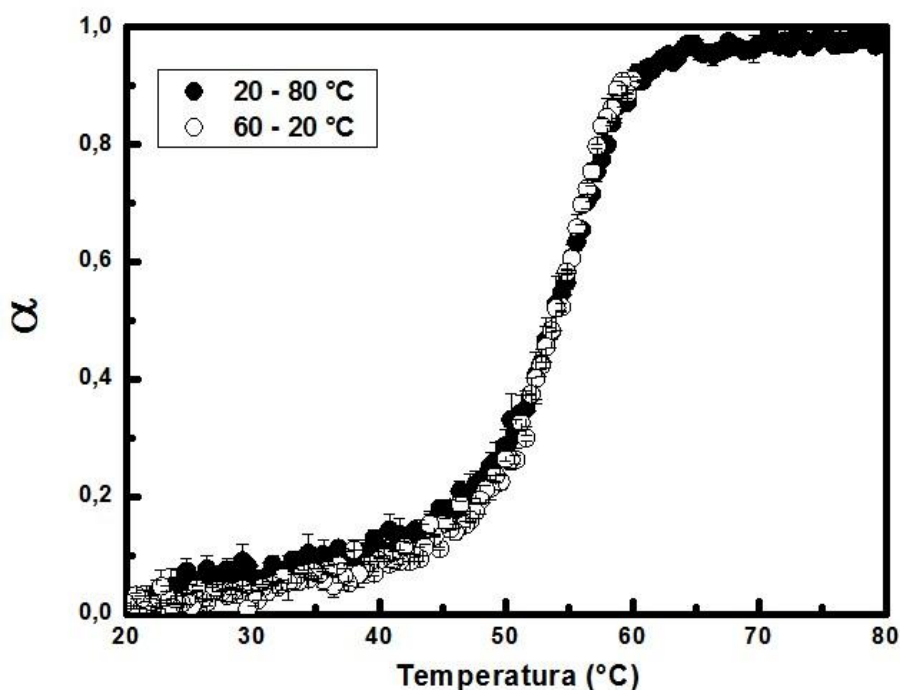


Figura 41: Desenovelamento térmico. O desenovelamento térmico foi monitorado a 222 nm em tampão 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) 200 mM NaCl e 2 mM de EDTA. Os valores foram transformados em fração (α) com base nos valores de maior e menor valor. Hop D456G possui desenovelamento reversível através de uma curva de transição sigmoide, com T_m de 53 ± 1 °C. Os pontos pretos mostram o aquecimento da proteína de 20-80 °C, e os pontos brancos mostram o resfriamento de 60 a 20 °C após aquecimento até 60 °C.

Tabela 6: Parâmetros espectroscópicos e de estabilidade.

	Dicroísmo circular a 210 (deg.cm ² .dmol ⁻¹)	Dicroísmo circular a 221 (deg.cm ² .dmol ⁻¹)	Conteúdo estimado de hélice-alfa	T_m de desenovelamento (°C)
Hop	-25000 ± 600^a	-29000 ± 600	$65 \pm 6\%$	54 ± 2^a
Hop D456G	-24800 ± 400	-28100 ± 300	$64 \pm 4\%$	53 ± 1

a, de Prodromou et al, 1999.

5.2.2. Determinação do estado oligomérico e propriedades hidrodinâmicas

Para investigar o estado oligomérico e massa molecular, a Hop D456G foi submetida a experimentos de ultracentrifugação analítica (UCA) por sedimentação em equilíbrio (SE), no qual a proteína foi detectada com espécie única com massa molecular de 66 ± 2 kDa (Figura 42 e Tabela 7), similar ao valor predito para o monômero (66,4 kDa) com base na sequência de aminoácidos. A distribuição randômica do residual (Figura 42, painel superior) indica a qualidade do ajuste, de acordo com uma espécie única.

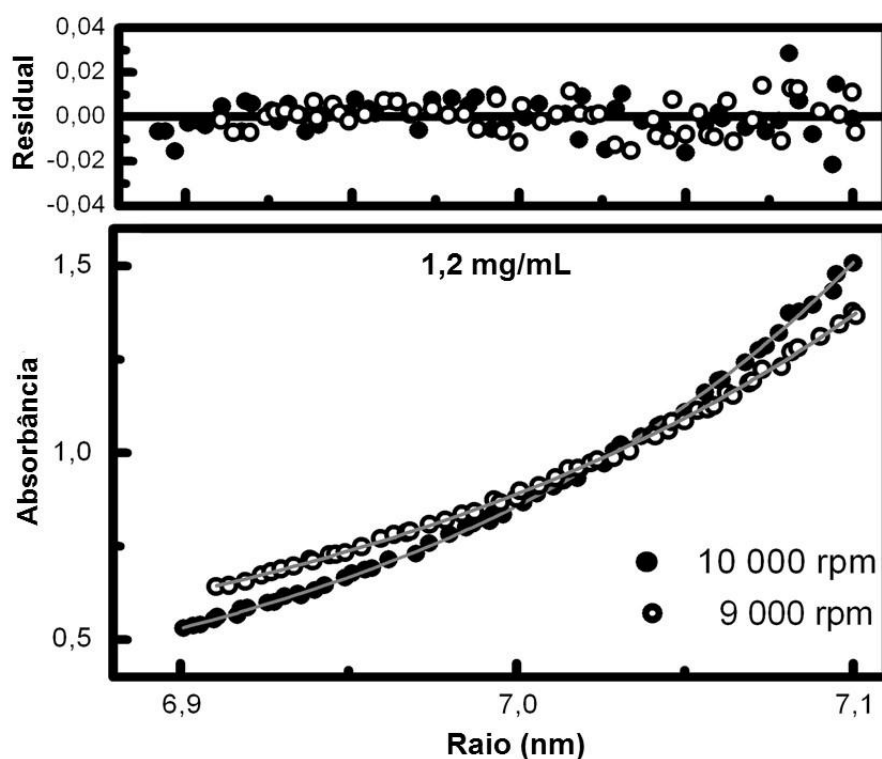


Figura 42: Experimento ultracentrifugação analítica – sedimentação em equilíbrio. A análise dos dados envolve o ajuste dos mesmos a um modelo de absorbância *versus* raio com o uso de regressão linear, feito através do software Origin (Microcal). O melhor ajuste foi determinado pela distribuição aleatória do residual e minimização da variância (5×10^{-5}), a distribuição randômica do residual (painel superior) indica a boa qualidade de ajuste, de acordo com uma espécie única com massa molecular de 66 ± 2 kDa. Os experimentos foram conduzidos nas velocidades de 4000 a 10000 rpm a 20 °C, com leitura e aquisição dos dados a 279 nm. O gráfico mostra os melhores ajustes dos dados experimentais para 1,2 mg/mL a 9000 e 10000 rpm.

Eletroforese em gel nativo (BN-PAGE) é também um método utilizado para acessar o estado oligomérico, massa molecular e homogeneidade de proteínas nativas (Schägger et al, 1994). Neste experimento a Hop D456G nativa exibiu migração principalmente como monômero se comparada aos padrões: Hop D456G desenovelada (por calor e uréia) como um padrão de migração do monômero, BSA uma proteína com migração na forma de dímero e monômero (66 e 132 kDa, respectivamente), e Conalbumina com 78 kDa (Figura 43). Além do monômero, Hop D456G apresentou também espécies oligoméricas.

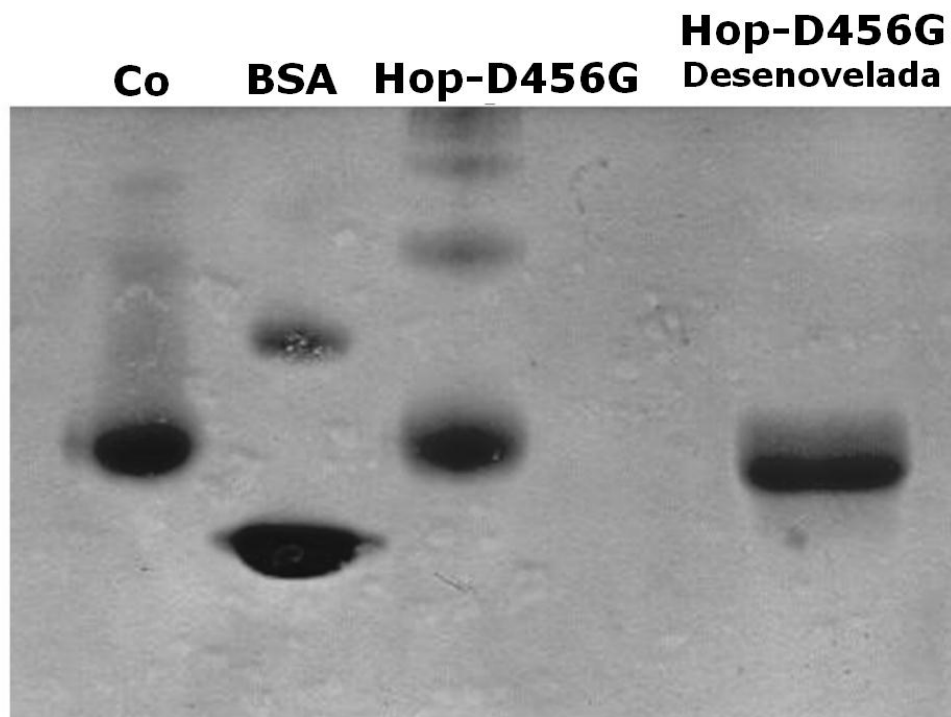


Figura 43: Eletroforese em gel nativo. BN-PAGE é um método que permite acessar o estado oligomérico, massa molecular e homogeneidade de proteínas nativas. A mobilidade eletroforética das proteínas é determinada principalmente pela carga negativa do corante *Coomassie Blue* ligado as mesmas. Hop D456G (monômero 66,4 kDa; pI 6,9), Albumina bovina (BSA, 66 e 132 kDa, monômero e dímero respectivamente, pI 4,9), Conalbumina (Co, 78 kDa; pI 5,9), e a Hop D456G desenovelada (como padrão de migração do monômero; uréia 4 M, 90 °C, 15 min).

Experimentos de cromatografia de exclusão molecular acoplado a espalhamento de luz (SEC-MALS: Size Exclusion Chromatography – Multi-angle Light Scattering) também corroboram com os dados de ultracentrifugação analítica e gel nativo. SEC-MALS é uma técnica robusta, que fornece a massa molecular absoluta, sem a necessidade de calibração com proteínas padrão, como a

exclusão molecular tradicional (Li et al 2009). A proteína apresenta eluição homogênea, e os picos de detecção da UV e do espalhamento de luz a 90° estão bem alinhados, indicando que a proteína foi detectada por ambos os métodos (Figura 44). O pico contém a maioria da população com massa molecular de 65 kDa aproximadamente.

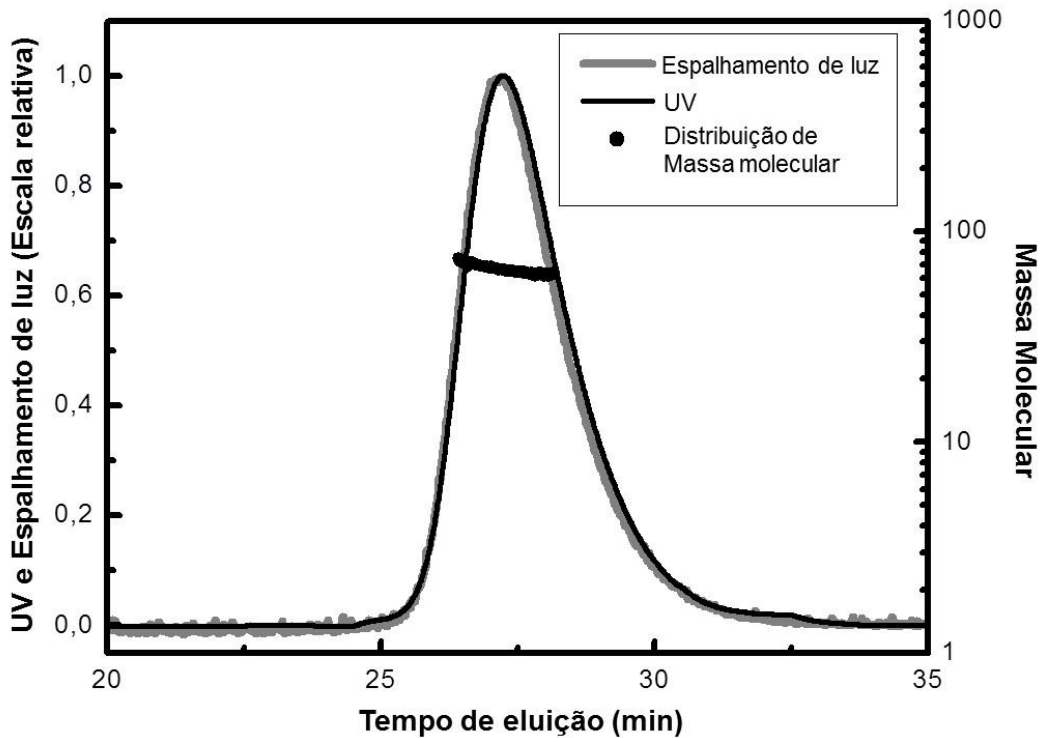


Figura 44: SEC-MALS. A cromatografia de exclusão molecular é uma técnica robusta para a detecção da massa absoluta de uma proteína, sem a necessidade de padrões de massa molecular. A proteína apresentou eluição homogênea, simultaneamente detectada por UV (linha preta) e pelo detector de espalhamento de luz (linha cinza). O Momento de massa molecular foi de $66,45 \pm 1,0$ kDa (2%), com polidispersão de 1%.

As propriedades hidrodinâmicas foram investigadas para a obtenção informações iniciais sobre a forma da molécula. Experimentos de gel filtração analíticas foram utilizados para o cálculo do raio de Stokes (R_s), também conhecido como raio hidrodinâmico (R_h). Os resultados mostraram que a Hop D456G elui como uma espécie homogênea (Figura 45), com raio de Stokes de 44 ± 2 Å (Figura 45 e Tabela 7).

O valor de R_s foi utilizado para o cálculo do fator de Perrin (F) (Cantor & Schimmel, 1980), o qual é um informativo da forma da molécula. O fator de Perrin é a razão entre coeficiente friccional medido f e o coeficiente friccional calculado f_0 para uma esfera de raio hipotético, calculado com base em na massa molecular. Como as moléculas são tratadas como globulares (com raios

equatorial, a , e polar, b , iguais) para os cálculos teóricos, a razão f/f_0 proporciona informações sobre forma, pois quanto mais próximo de 1 o valor de F , mais próximo de uma esfera é a forma. Hop D456G foi detectada como uma molécula assimétrica, com F de 1,6.

Adicionalmente, experimentos de espalhamento dinâmico de luz foram utilizados para medir o coeficiente de difusão D de acordo com as concentrações de proteína. Os coeficientes padrão de difusão ($D_{20,w}$) foram determinados para cada concentração de proteína e plotados para a obtenção do valor de $D_{20,w}$ a concentração de 0 mg/mL ($D_{20,w}^0$) por extrapolação (Figura 46). As medidas revelaram um $D_{20,w}^0$ de $6,2 \times 10^{-7} \pm 0,2$ cm²/s (Figura 46 e Tabela 7). O fator de Perrin também pode ser calculado pela razão entre $D_{esfera}/D_{20,w}^0$, desta forma uma esfera com a massa do monômero da Hop D456G teria um raio de Stokes de 27 Å, e $D_{20,w}^0$ teórico de $8,0 \times 10^{-7}$ cm²/s, com um fator de Perrin de 1,3.

Tabela 7: Parâmetros hidrodinâmicos da HOP D456G.

Massa molecular ultracentrifugação analítica (kDa)	Raio de Stokes por cromatografia de gel filtração analítica (Å)	Coeficiente de difusão ($D_{20,w}^0$) por espalhamento dinâmico de luz (cm ² /s)
66 ± 2	44 ± 2 ^a	6,2 x 10 ⁻⁷ ± 0,2 ^b

a, Fator de Perrin = 1,3; b, Fator de Perrin = 1,6;

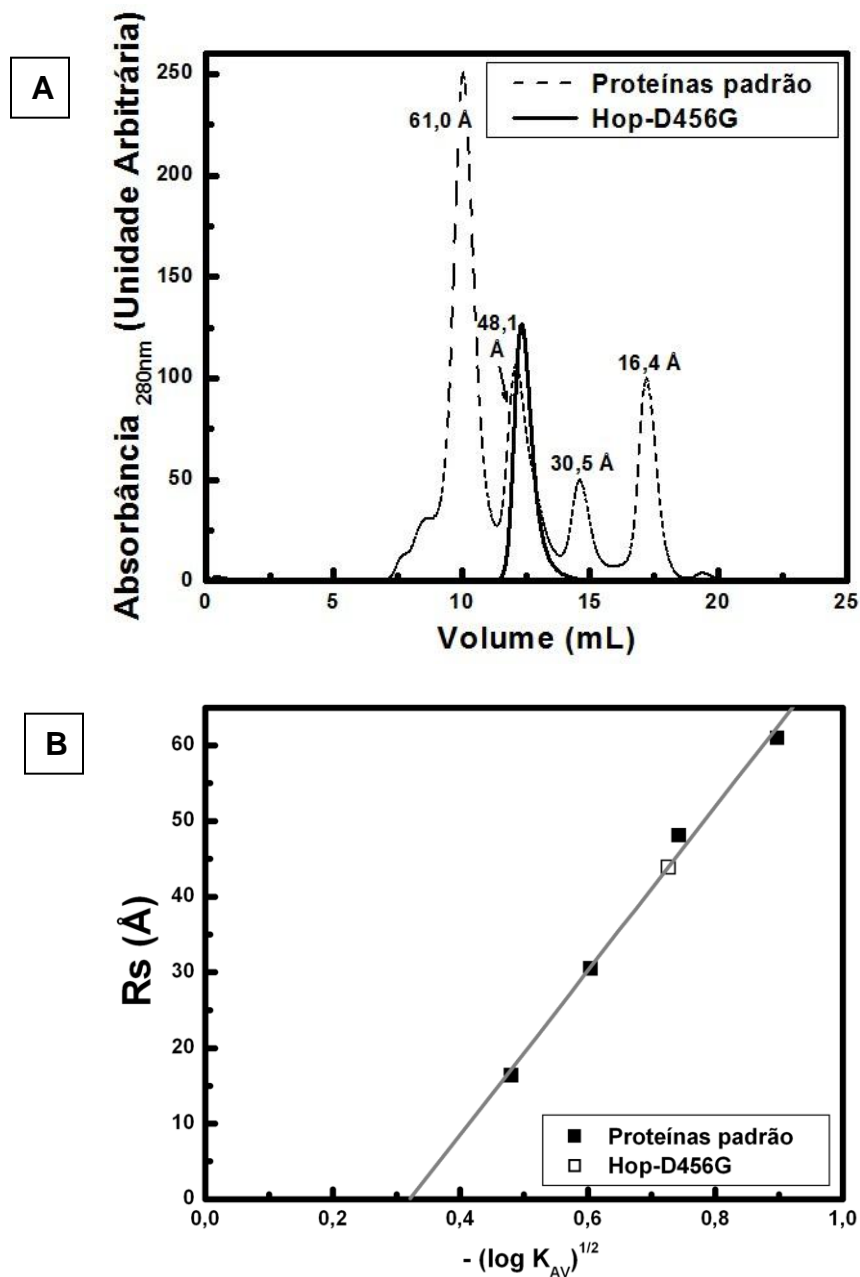


Figura 45: Experimento de gel filtração analítica. A cromatografia de gel filtração analítica foi utilizada para o cálculo do Raio de Stokes (R_s), também conhecido como raio hidrodinâmico (R_h). **A)** Cromatografia. Proteínas padrão, com R_s conhecidos (linha pontilhada) e a Hop D456G (linha sólida) foram aplicadas em uma coluna de gel filtração. **B)** Análise dos dados. Os volumes de eluição dos padrões ($-\sqrt{\log K_{AV}}$) foram calculados para a construção do gráfico volume de eluição versus R_s . O volume de eluição da Hop D456G foi inserido na equação (quadrado branco), sendo correspondente ao Raio de Stokes de $44 \pm 2 \text{ \AA}$.

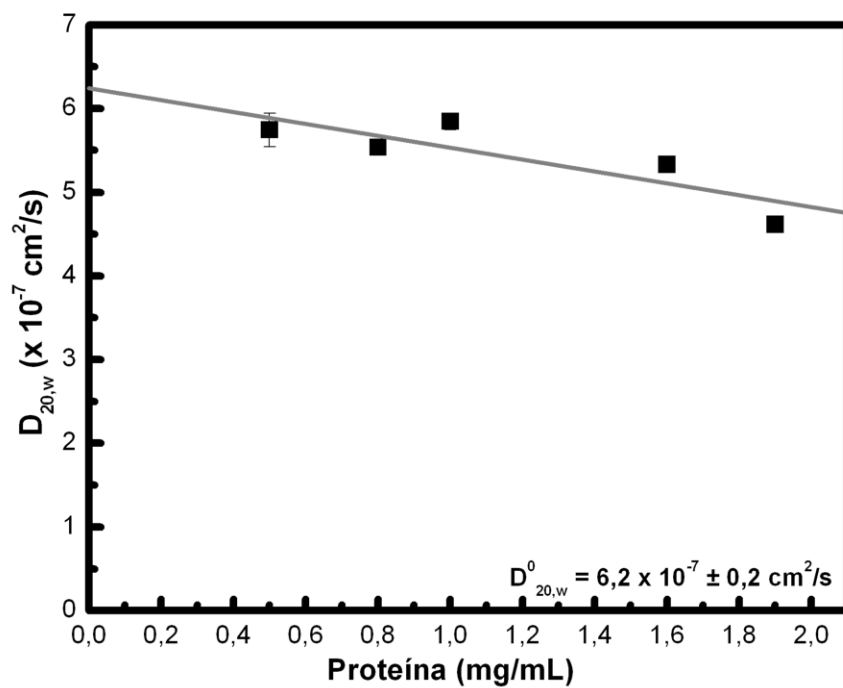


Figura 46: Gráfico do $D_{20,w}$ versus a concentração de proteína. Os valores de coeficiente de difusão $D_{20,w}$ foram calculados através de dados de espalhamento dinâmico de luz e então utilizados para o cálculo do $D^0_{20,w}$ através de regressão linear. A Hop D456G apresentou $D^0_{20,w}$ de $6,2 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1. Parte A - Caracterização Funcional de uma *A. thaliana* transgênica

A Hsp90 de cana-de-açúcar foi classificada através de comparação com sequências de Hsp90 de *Arabidopsis*, relativamente mais estudadas e caracterizadas em relação a sequência de cana-de-açúcar. A Hsp90 de cana apresentou maior valor de identidade com a isoforma Hsp90-3 de *Arabidopsis*, que tem localização citosólica e expressão constitutiva (Krishna & Gloor, 2001). Adicionalmente, esta isoforma é expressa em todos os tecidos, porém mais abundante no meristema apical de raízes e em pólen. É induzida por ácido indol acético (auxina) e por NaCl, e a superexpressão desta isoforma aumenta a tolerância ao cálcio (Song et al, 2009).

A transformação de *A. thaliana* com a chaperona Hsp90-3 de cana-de-açúcar (Hsp82) foi realizada com sucesso, gerando plantas resistentes a marca de seleção do vetor (canamicina). Duas linhagens homozigotas foram selecionadas (**H90-4.1 e H90-2.15**) e estas exibiram resultados semelhantes com relação a expressão gênica, germinação, desenvolvimento de raízes e resistência a estresses.

Plantas transgênicas exibiram fenótipo semelhante em relação às plantas controle (plantas tipo selvagem – WT), sugerindo que a transgenia não ocasionou mudanças drásticas na estrutura e desenvolvimento destas plantas. Song e colaboradores produziram *A. thaliana* transgênicas com três isoformas da Hsp90 (2, 5 e 9) e não reportaram alterações fenotípicas decorrentes da superexpressão. Em *N. bentamiana*, porém, o silenciamento da Hsp90 via RNAi ocasionou atrofia além de outras alterações (Kanzaki et al, 2003).

A avaliação da expressão revelou uma redução de aproximadamente 37% nos níveis de Hsp90 nas plantas transgênicas. Apesar do uso de um promotor constitutivo como o 35S, o silenciamento pode ocorrer quando o nível de transcritos ultrapassa um limiar específico, como um mecanismo de defesa contra infecção por vírus, por exemplo. Desta forma, tanto o gene como a sequência promotora podem sofrer metilação, o que compromete a expressão (Mishiba et al, 2010). Tais fatores podem explicar a não superexpressão da proteína, como inicialmente planejado.

Uma vez que pequenas alterações na expressão gênica podem causar grandes impactos, o transcriptoma das plantas transgênicas foi avaliado via sequenciamento de RNAm. Os dados mostram que a perturbação dos níveis da Hsp90 (redução dos níveis), causou impactos na transcrição de outros genes. Os transcritos diferencialmente expressos foram avaliados e

classificados de acordo com a participação em um ou mais processos biológicos. Dentre os processos biológicos mais recorrentes, temos as categorias **“geração de metabólitos precursores e energia”** e **“resposta imune”**, que apresentaram apenas transcritos mais expressos. Adicionalmente, as categorias **“transporte”**, **“organização de componentes celulares e biogênese”**, **“regulação de processos biológicos”**, **“resposta de defesa”**, **“resposta a estímulos (endógenos, químicos e bióticos)”** e **“transcrição”** apresentaram uma maioria de transcritos mais expressos, ao passo que **“metabolismo de macromoléculas”** e **“resposta a estímulos abióticos”** apresentaram maioria de transcritos menos expressos. Tal perfil de expressão revela que as plantas transgênicas estão com vias de resposta imune e de resposta a estresses (principalmente biótico) ativadas, como se a planta estivesse infectada por patógenos, fato que não foi observado.

Variações na expressão gênica são recorrentes até mesmo em organismos de patrimônio genético idêntico, desta forma tais variações podem ser fonte de plasticidade, com consequências fisiológicas e fenotípicas sutis ou drásticas. Uma vez que os genes estão organizados em circuitos regulatórios, os níveis de expressão de um determinado gene podem influenciar outros (Raser & O’Shea, 2005; El-Samad & Weissman, 2011).

Com a finalidade de evidenciar algumas das relações entre a Hsp90 e as proteínas diferencialmente expressas, buscas na literatura bem como em bancos de dados públicos como o *HSP90Int* (<http://www.picard.ch/Hsp90Int/>) (Echeverria et al, 2011), *IntAct* (<http://www.ebi.ac.uk/intact/>), *String* 9.0 (<http://string-db.org/>) e *CCSB* (<http://interactome.dfci.harvard.edu/>) foram executadas, com a evidência de interações diretas e indiretas. Um dos interatomos construídos com a ferramenta *String* 9.0 evidenciou a interação da Hsp90 com um grupo de proteínas envolvidas na fotossíntese, componentes da categoria de **“geração de metabólitos precursores e energia”**. A interação com tais proteínas ocorre de forma indireta, através da PSBO1 (*photosystem II oxygen evolving complex*), que é uma subunidade do fotossistema II, responsável pela estabilização do grupo managanês e turnover de proteínas do fotossistema (de las Rivas & Barber, 2004).

De fato, as Hsp90 citosólicas são importantes não somente para o enovelamento de proteínas do cloroplasto, mas também no transporte para esta organela, uma vez que estas proteínas são codificadas por genes nucleares e são importadas pós-traducionalmente. E esta função é executada com o auxílio da Hsp70 e da Hop (Fellerer et al, 2011). Ainda, a Hsp90 regula a expressão de genes relacionados à fotossíntese (*PhANG* - *photosynthesis-associated nuclear genes*) em resposta a sinais do cloroplasto (Kindgren et al, 2011).

Outro grupo de interatores de Hsp90 a ser destacado envolve proteínas importantes para a resposta imune, como por exemplo, SGT1, RPM1, RAR1 (Seo et al., 2008; Hubert et al., 2003, Noël et al., 2007) presentes no interatoma da Hsp90. No presente estudo foram encontradas com maior expressão nas plantas transgênicas as proteínas ERFs (*ethylene responsive factors*), WRKYs (fatores de transcrição) e NHL3 (*NDR1/HIN1 like protein 3*), relacionadas à categoria **“resposta imune”**.

A Hsp90 participa de eventos de resposta imune, ativando proteínas NLR (ou NB-LRR, *nucleotide binding site-leucine rich repeat*) as quais reconhecem antígenos e disparam a sinalização da resposta (Seo et al, 2008). A proteína NHL3 está envolvida na defesa, responsável por conferir resistência a certos patógenos (Varet et al, 2003). Proteínas com motivo WRKY fazem parte da maior família de reguladores transcricionais em plantas, os quais podem atuar como ativadores ou repressores de processos diversos, dentre eles a resposta imune (Rushton et al, 2010). O hormônio vegetal etileno tem um papel conhecido na resposta de defesa, e tanto ERFs como WRKYs podem ser alvo de quinases ativadas por resposta de defesa (Nimchuk et al, 2003). Adicionalmente, ERFs e proteínas com domínio WRKY interagem com a Hsp90 e com HSF (*heat shock transcription factors*) (Xu et al, 2011; Shirasu et al, 2009).

Dentre as proteínas com expressão diferencial (*fold-change* maior que 1,0 e menor que -1,0), a mais expressa foi uma LTP, que participa da biogênese de membranas, embriogênese, reações de defesa contra fitopatógenos e adaptação a diversas condições ambientais (Kader, 1996). A QQS (*Qua-quine Starch*), proteína envolvida na biossíntese de amido (Li et al, 2009) foi a menos expressa. Não existem dados na literatura que relacionam, indireta ou diretamente, estas proteínas com a Hsp90. É possível que haja uma relação indireta, e que as perturbações nos níveis de Hsp90 tenham desencadeado respostas que culminaram na alteração dos níveis destas proteínas.

É interessante salientar que muitas interações reportadas na literatura ainda não constam nos bancos de dados acima citados, principalmente quando se trata de plantas. Tais fatores dificultam o estabelecimento das relações quando não há vias ortólogas em mamíferos. Adicionalmente, há muito ainda por se explorar sobre o interatoma de Hsp90 em plantas.

O sequenciamento de RNAm é uma ferramenta bastante útil para a avaliação do transcriptoma e das respostas desencadeadas frente diferentes tratamentos e até mesmo na comparação entre diferentes espécies (Wang et al, 2009). Neste estudo foi possível destacar genes diferencialmente expressos frente a perturbações nos níveis de Hsp90, porém mais estudos são necessários para corroborar os dados, através de análises proteômicas dos transgênicos por exemplo. Visto que ainda não é possível responder se tais mudanças na expressão gênica global

são resultado apenas da redução dos níveis de Hsp90, ou se há influência do processo de transgenia e inserção do 35S.

A avaliação de eventos do desenvolvimento como germinação e comprimento de raízes, evidenciou que as plantas transgênicas exibem germinação mais rápida e raízes de maior comprimento. Múltiplos fatores estão envolvidos na germinação e desenvolvimento de raízes em plantas, como hormônios vegetais, redes específicas de sinalização, expressão gênica diferencial (espaço e tempo), entre outros fatores. Em *Brassica napus*, a análise da expressão de Hsp90 em sementes em desenvolvimento mostrou que a proteína é expressa em altos níveis durante todos os estágios de desenvolvimento de sementes avaliados. E a expressão de Hsp90 foi também detectada em sementes em germinação, meristema radicular e durante os processos de alongamento dos eixos e desenvolvimento dos cotilédones. Os altos níveis de expressão de Hsp90 em sementes (em desenvolvimento e em germinação) sugerem o envolvimento destas proteínas durante tais processos (Krishna et al 1998), porém ainda não se sabe o exato papel da Hsp90 neste processo. Hormônios vegetais esteróides como os brassinosteróides atuam no desenvolvimento de raízes (Müssig et al, 2003). Há informações sobre o envolvimento da Hsp90 nos complexos de maturação dos receptores de hormônios esteróides em mamíferos (Pratt & Toft, 2003), porém esta atuação ainda não foi descrita em plantas.

Dado o notável papel das chaperonas em condições de estresse, foram avaliados também os impactos de estresses osmótico, térmico e salino nas plantas transgênicas. Submetidas estresse salino e osmótico, as plantas transgênicas ainda exibiram germinação mais rápida, porém as diferenças de germinação entre transgênico e controle (tipo selvagem) foram menos drásticas sob estresse, se comparadas a germinação na ausência de estresse. Imai & Yahara (2000) verificaram que um aumento de 20 vezes na expressão da Hsp90 em leveduras causa sensibilidade a altas concentrações de NaCl, o que também ocorre quando os níveis de Hsp90 estão abaixo de 30%. E a Hsp90 também é requerida para a resposta a estresse osmótico em leveduras (Yang et al, 2006). Tais exemplos ilustram a importância dos níveis de Hsp90 para a resposta a estresses.

Quando submetidas a choque térmico 45°C/1h, as plantas transgênicas exibiram uma recuperação pós-estresse inferior ao controle, revelando que a transgenia prejudicou a resposta ao estresse térmico. Em *A. thaliana* foi reportado que a ROF1 (co-chaperona) participa da modulação da termotolerância (Meiri & Breiman, 2009) e o tratamento com brassinosteróide é capaz de conferir termotolerância em *Brassica napus* e tomate (Dhaubhadel et al, 1999). Chaperonas como a Hsp100 tem papel bem descrito na termotolerância (Queitsch et al, 2000), portanto é provável que haja um envolvimento indireto da chaperona Hsp90, possivelmente através de suas co-

chaperonas e outras chaperonas, ou até mesmo no nível transcricional, uma vez que a Hsp90 interage com HSFs (Yamada et al, 2007; Yamada & Nishmura, 2008).

As chaperonas moleculares são componentes chave do sistema de controle de qualidade proteico (*protein quality control system – PQC*), com um papel essencial no enovelamento, manutenção da atividade, estabilidade e degradação de polipeptídeos. Assim, as chaperonas ou Hsps (*Heat shock proteins*) tem uma atuação que vai além da proteção contra estresses, configurando um papel regulatório, o que é corroborado pelos resultados deste trabalho.

Os resultados sugerem que a Hsp90 tem um importante papel na regulação da germinação e desenvolvimento das raízes, e que os níveis de Hsp90 são críticos para a resposta a estresses e para a homeostase protéica celular. Os dados deste estudo ajudam a elucidar alguns aspectos do papel das chaperonas moleculares, em especial da Hsp90, na resposta imune, no desenvolvimento, plasticidade e resposta a estresses em vegetais.

6.2. Parte B - Caracterização biofísica da co-chaperona Hop

A Hop é uma co-chaperona de estrutura composta majoritariamente por domínios TPR e a interação com chaperonas como a Hsp70 e Hsp90, acontecem com o envolvimento de diferentes domínios TPR da Hop, o que permite a interação simultânea com ambas chaperonas (Carrigan et al, 2004). Embora não existam dados da estrutura completa da Hop, Carrigan e colaboradores (2004) mostraram que a Hop se liga a Hsp90 como um dímero. Em função de sua propriedade de interagir simultaneamente com Hsp70 e Hsp90, se faz importante conhecer o estado oligomérico da Hop, pois tal fato pode ditar a formação de complexos em função da disponibilidade de um ou dois sítios para a ligação das chaperonas Hsp70 e Hsp90.

Para responder se o resíduo D456 tem importância na dimerização do TPR2B a proteína Hop D456G foi estudada. Longshaw e colaboradores (2009) já haviam mostrado duas regiões degeneradas no alinhamento do domínio TPR2B, com TPR1 e TPR2A, e uma destas regiões corresponde ao resíduo D456 (posição 12 da hélice 3B do TPR2B).

A proteína clonada em pET28a foi obtida pura e com bom rendimento através de 3 passos cromatográficos, e enovelada como mostrado pelos espectros de dicroísmo circular e fluorescência. Os mínimos do espectro de dicroísmo circular (Tabela 6), assim como o valor T_m (desenovelamento térmico) estão dentro da margem de erro dos dados reportados para a proteína tipo selvagem (Carrigan et al, 2006), indicando que a Hop D456G tem estrutura secundária e estabilidade térmica similares a proteína tipo selvagem.

Acerca do estado oligomérico, a Hop D456G foi detectado como monômero através das técnicas de ultracentrifugação analítica (UAC), SEC-MALS, e gel nativo. No experimento utilizando gel nativo foi possível observar que a proteína enovelada possui outros estados oligoméricos, provavelmente dímeros e oligômeros maiores. A participação do domínio TPR2B na dimerização tem sido sugerida na literatura. Onuhoua e colaboradores (2008) mostraram que a proteína Hop com deleção do domínio DP2 (1-477) é um dímero, com deleção do domínio TPR2B (1-352) há um equilíbrio monômero-dímero e a deleção do TPR2A (1-211) converteu a proteína em um monômero. Adicionalmente, Onuhoua et al mostraram a Hop com o domínio TPR2B deletado é um monômero a 5 μ M, concentração similar a utilizada nos experimentos de UAC, e dímero a 50 μ M, concentração similar a utilizada nos experimentos de BN-PAGE. Nossos resultados sugerem que a a Hop D456G foi convertida em um equilíbrio monômero-dímero, o que também foi verificado para mutantes de deleção do domínio TPR2B (Scheufler et al, 2000). Ainda, estudos com mutações de ponto no TPR2B da Hop inteira (K429E, K429A, R433E, R433A (Carrigan et al, 2004), K364A-N368A a K429A-R433A (Longshaw et al, 2009) não mostraram efeitos na dimerização.

Com o valor dos parâmetros hidrodinâmicos R_s e $D_{20,w}^0$ foi possível calcular o Fator de Perrin, o qual diz respeito a forma da molécula. O Fator de Perrin calculado do R_s e $D_{20,w}^0$ foi de 1,6 e 1,3 respectivamente, e esta divergência de valores estimado por dois experimentos independentes pode ser explicada pelo efeito da hidratação, que pode aumentar o volume efetivo de proteínas e conseqüentemente alterar os dados de R_s . Mesmo com tal divergência, os resultados indicam que a Hop D456G é monomérica, hidratada e com forma alongada, o que é corroborado por experimentos de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) (Onuoha et al, 2008).

A Hop é uma proteína versátil, capaz de ligar Hsp70 e Hsp90, assim como outras chaperonas. Está envolvida em muitos processos celulares, em diversos compartimentos e possivelmente com diversos parceiros de interação. Para cumprir tais funções, a proteína precisa ser promíscua, uma propriedade que é facilitada pelo alto conteúdo de domínios TPR. Entretanto, a promiscuidade da Hop pode também ser facilitada pela habilidade de conversão monômero-dímero, do acordo com o parceiro ou outro algum fator. E de fato, a interação com a Hsp70 foi proposta como sendo monômero-monômero (Prodromou et al, 1999; van der Spuy et al, 2000). Nossos resultados indicam que a conversão de monômero para dímero pode ser mediada com intervenção do domínio TPR2B. Porém, mais experimentos são necessários para mostrar se este resíduo está realmente envolvido em um possível mecanismo de conversão monômero-dímero *in vitro* e *in vivo*.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

7.1. A Hsp90 é uma proteína regulatória

Os resultados deste estudo sugerem que a chaperona Hsp90 tem papel na regulação da germinação e desenvolvimento das raízes, e que os níveis desta chaperona são importantes para a resposta a estresses e termotolerância, fatores verificados através de transgenia em *A. thaliana*. Tais transgênicos apresentaram níveis reduzidos de Hsp90 e Hsp70, e a perturbação na expressão destas chaperonas causou impacto na expressão de outras proteínas, como por exemplo, proteínas relacionadas à sinalização da resposta imune e fotossíntese. Mais estudos são necessários para esclarecer a relação da Hsp90 e com as proteínas diferencialmente expressas levantadas neste trabalho, e seu papel na regulação da expressão das mesmas.

7.2. A co-chaperona Hop pode ser regulada entre os estados monomérico e dimérico

O trabalho mostrou que a proteína Hop D456G, uma substituição no domínio TPR2B, é uma mistura de monômero, dímero e oligômeros maiores. Embora não exista estrutura da Hop inteira, trabalhos prévios de caracterização da proteína por meio de ferramentas de biofísica estabeleceram o papel do domínio TPRA na dimerização e abriram a possibilidade de atuação do domínio TPR2B. Uma possibilidade é que a Hop seja regulada entre estados diméricos e monoméricos para facilitar sua atividade adaptadora.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

- ALBERTS, D., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. Garland Publishing, Inc., New York.
- BECHTOLD, N., ELLIS, J., PELLETIER, G. (1993) In plant *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci.* 316:1194-1199.
- BENFEY, P.N. & CHUA, N.H. (1990) The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: Combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* 250: 959-966.
- BLATCH, G L, & LÄSSLE, M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 21: 932-939.
- BLATCH, G L, LÄSSLE, M., ZETTER, B. R., KUNDRA, V. (1997). Isolation of a mouse cDNA encoding mST11, a stress-inducible protein containing the TPR motif. *Gene* 194: 277-282.
- BOLLAG, D. M., ROZYCHI, M. D., EDELSTEIN, S. J. (1996) Gel filtration chromatography. *In Protein Methods*. 2ª edição. Wiley-Liss. pp 271-275.
- BORGES, J. C., PEROTO, M. C., RAMOS, C. H. I. (2001) Molecular chaperone genes in the sugarcane expressed sequence database (SUCEST). *Genetics and Molecular Biology* 24: 85-92.
- BORGES, J.C. & RAMOS, C.H.I. (2005) Protein folding assisted by chaperones. *Protein Pept. Lett.* 12:257-261.
- BORGES, J.C. & RAMOS, C.H.I. (2011) Analysis of molecular targets of *Mycobacterium tuberculosis* by analytical ultracentrifugation. *Curr Med Chem.* 18:1276-85.
- BORGES, J.C., CAGLIARI, T.C., RAMOS C.H.I. (2007) Expression and variability of molecular chaperones in the sugarcane expressome. *Journal of Plant Physiology* 164: 505-513.
- BORGES, J.C., PEROTO, M.C., RAMOS C.H.I. (2001) Molecular chaperone genes in the sugarcane expressed sequence database (SUCEST). *Genetics and Molecular Biology* 24: 85-92.
- BRINKER, A., SCHEUFLER, C., VON DER MULBE, F., FLECKENSTEIN, B., HERRMANN, C., JUNG, G., MOAREFI, I., HARTL, F.U. (2002). Ligand discrimination by TPR domains. Relevance and selectivity of EEVD-recognition in Hsp70 x Hop x Hsp90 complexes. *J. Biol. Chem.* 277: 19265-19275.
- BURGA, A., CASANUEVA, M.O., LEHNER, B. (2011) Predicting mutation outcome from early stochastic variation in genetic interaction partners. *Nature* 480: 250-253.
- CAGLIARI, T.C. (2009) Análise da expressão de chaperonas moleculares em plantas e clonagem, purificação e caracterização inicial das proteínas Hsp100 e Hsp90 de cana-de-açúcar. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular). Universidade Estadual de Campinas.
- CAGLIARI, T.C. TIROLI, A.O., BORGES, J.C., RAMOS, C.H.I. (2005) Identification and *in silico* expression pattern analysis of *Eucalyptus* expressed sequencing tags (ESTs) encoding molecular chaperones. *Genetics and Molecular Biology* 28: 520-528.
- CANTOR, C.R. & SCHIMMEL, P.R. (1980) Size and shape of macromolecules. *Biophysical Chemistry; Part II: Techniques for the study of biological structure and function*, W H. Freeman and company: New York.
- CARRIGAN, P. E., NELSON, G. M., ROBERTS, P. J., STOFFER, J., RIGGS, D. L., SMITH, D. F. (2004). Multiple domains of the co-chaperone Hop are important for Hsp70 binding. *J. Biol. Chem.* 279: 16185–16193.
- CARRIGAN, P. E., RIGGS, D. L., CHINKERS, M., SMITH, D. F. (2005). Functional comparison of human and *Drosophila* Hop reveals novel role in steroid receptor maturation. *J. Biol. Chem.* 280: 8906-8911.

- CARRIGAN, P. E., SIKKINK, L. A., SMITH, D. F., RAMIREZ-ALVARADO, M. (2006) Domain: domain interactions within Hop, the Hsp70/Hsp90 organizing protein, are required for protein stability and structure. *Protein Science* 15: 522–532.
- CHEN, B., PIEL, W. H., GUI, L., BRUFORD, E., MONTEIRO, A. (2005). The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics* 86: 627-637.
- CHEN, B., ZHONG, D., MONTEIRO, A. (2006). Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genomics*, 7: 156.
- CHEN, S. & SMITH, D. F. (1998) Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and Hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* 52: 35194-35200.
- CLOUGH, S.J. & BENT, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16:735-43.
- CONESA, A., GOTZ, S., GARCÍA-GÓMEZ, J.M., TEROL, J., TALÓN, M., ROBLES, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21: 3674-3676.
- CORREA, D.C. & RAMOS, C.H.I. (2009) The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African Journal of Biochemistry Research* 3: 164-173.
- DA SILVA, V.C.H. & RAMOS, C.H.I. (2012) The network interaction of the human cytosolic 90kDa heat shock protein Hsp90: A target for cancer therapeutics. *J Proteomics* e-pub.
- DAS, A. K., COHEN, P. T. W., BARFORD, D. (1998) The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein–protein interactions. *The EMBO Journal* 17: 1192–1199.
- DE LAS RIVAS, J., BARBER, J. (2004). Analysis of the structure of the PsbO protein and its implications. *Photosynthesis Research* 81: 329–343.
- DEMAND, J., LÜDERS, J., HÖHFELD, J. (1998). The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. *Molecular and Cellular Biology* 18: 2023-2028.
- DHAUBHADEL, S., CHAUDHARY, S., DOBINSON, K. F., KRISHNA, P. (1999). Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. *Plant Molecular Biology* 40: 333-342.
- DIVI, U.K., RAHMAN, T., KRISHNA, P. (2010) Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC Plant Biol.* 19:10:151.
- DONNELLY, A. & BLAGG, B.S. (2008) Novobiocin and additional inhibitors of the Hsp90 C-terminal nucleotide-binding pocket. *Curr Med Chem.*15: 2702-17.
- ECHEVERRÍA, P.C., BERNTHALER, A., DUPUIS, P., MAYER, B., PICARD, D. (2011) An Interaction Network Predicted from Public Data as a Discovery Tool: Application to the Hsp90 molecular chaperone machine. *PLoS ONE* 6: e26044.
- EDELHOCH, H., (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6:1948-1954.
- EL-SAMAD, H. & WEISSMAN, J.S. (2011) Genetics: Noise rules. *Nature* 480:188-189.
- FELLERER, C., SCHWEIGER, R., Schöngruber, K., Soll, J., Schwenkert, S. (2011) Cytosolic HSP90 Cochaperones HOP and FKBP Interact with Freshly Synthesized Chloroplast Preproteins of *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 4: 1133-1145.
- FLOM, G., BEHAL, R. H., ROSEN, L., COLE, D. G., JOHNSON, J. L. (2007) Definition of the minimal fragments of Sti1 required for dimerization, interaction with Hsp70 and Hsp90 an in vivo functions. *Biochem. J.* 404:159-167.
- FRYDMAN, J. (2001) Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 603–647.

- GAESTEL, M. (2006) Molecular chaperones in signal transduction. *In* Molecular chaperones in health and disease. *Handbook of Experimental Pharmacology* 172: 93-109.
- GARCIA-CARDENA G., FAN R., SHAH V., SORRENTINO R., CIRINO G., PAPAPETROPOULOS, A., SESSA, W.C. (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392: 821–24.
- GARNIER, C., LAFITTE, D., TSVETKOV, P.O., BARBIER, P., LECLERC-DEVIN, J., MILLOT, J.M., BRIAND, C., MAKAROV, A.A., CATELLI, M.G., PEYROT, V. (2002). Binding of ATP to Heat Shock Protein 90 - evidence for an ATP-binding site in the C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 277: 12208-12214.
- GAVA, L. M., GONÇALVES, D. C., BORGES, J. C., RAMOS, C. H. I. (2011) Stoichiometry and thermodynamics of the interaction between the C-terminus of human 90 kDa heat shock protein Hsp90 and the mitochondrial translocase of outer membrane Tom70. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 513: 119–125.
- GLOVER, J.R. & LINDQUIST, S. (1998) Hsp104, Hsp70 and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 94: 73–82.
- GONÇALVES, D., LEPIKSON-NETO, J., SALAZAR, M., NASCIMENTO, L., CAMARGO, E., MARQUES, W., PEREIRA, G., RAMOS, C. (2011) *Eucalyptus* transcriptome analysis revealed molecular chaperones highly expressed in xylem. *BMC Proceedings* 2011, 5: P109.
- HARTL, F.U. & HAYER-HARTL, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852-1858.
- HARTL, F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571–580.
- HARTL, F.U., BRACHER, A., HAYER-HARTL, M. (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475: 324-32.
- HERNÁNDEZ, M. P., SULLIVAN, W. P., & TOFT, D. O. (2002). The assembly and intermolecular properties of the hsp70-Hop-hsp90 molecular chaperone complex. *J. Biol. Chem.* 277: 38294-38304.
- HOEKEMA, A., HIRSCH, P.R., HOOYKAAS, P.J.J., SCHILPEROORT, R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303: 179-180.
- HOLT S.E., AISNER D.L., BAUR J., TESMER V.M., DY M., OUELLETTE, M., TRAGER, J.B., MORIN, G.B., TOFT, D.O., SHAY, J.W., WRIGHT. W.E, WHITE, M.A. (1999). Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev.* 13: 817-26.
- HONORÉ, B., LEFFERS, H., MADSEN, P., RASMUSSEN, H. H., VANDEKERCKHOVE, J., CELIS, J. E. (1992). Molecular cloning and expression of a transformation-sensitive human protein containing the TPR motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein ST11. *J. Biol. Chem.* 267: 8485-8491.
- HORWICH, A. L. & FENTON, W. A. (2009) Chaperonin-mediated protein folding: using a central cavity to kinetically assist polypeptide chain folding. *Q. Rev. Biophys.* 42: 83-116.
- HUBERT, D. A., TORNERO, P., BELKHADIR, Y., KRISHNA, P., TAKAHASHI, A., SHIRASU, K., DANGL, J. L. (2003) Cytosolic HSP90 associates with and modulates the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein. *The EMBO Journal* 22: 5679-5689.
- IMAI, J. & YAHARA, I. (2000) Role of HSP90 in salt stress tolerance via stabilization and regulation of calcineurin. *Mol Cell Biol.* 20:9262-70.
- JIANG, C., XU, J., ZHANG, H., ZHANG, X., SHI, J., LI, M., MING, F. (2009) A cytosolic class I small heat shock protein, RchSP17.8, of *Rosa chinensis* confers resistance to a variety of stresses to *Escherichia coli*, yeast and *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment.* 32: 1046-1059.
- JOHNSON, B. D., SCHUMACHER, R. J., ROSS, E. D., TOFT, D. O. (1998). Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. *J. Biol. Chem.* 273: 3679-3686.

- KADER, J. (1996) Lipid-Transfer Proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 47: 627–654.
- KANEHISA, M. & GOTO, S. (2000) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucl. Acids Res.* 28: 27-30.
- KANZAKI, H., SAITOH, H., ITO, A., FUJISAWA, S., KAMOUN, S., KATOU, S., YOSHIOKA, H., TERAUCHI, R. (2003). Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Pathology* 4: 383-391.
- KEPLER, B.R., GRADY, A.T., JARSTFER, M.B. (2006) The biochemical role of the Heat Shock Protein 90 chaperone complex in establishing human Telomerase activity. *J. Biol. Chem.* 281: 19840-19848.
- KINDGREN, P., NORÉN, L., BARAJAS LÓPEZ, J. DE D., SHAIKHALI, J., STRAND, A. (2011). Interplay between HEAT SHOCK PROTEIN 90 and HY5 Controls PhANG expression in response to the GUN5 plastid signal. *Molecular Plant* epub.
- KOSKI, L.B., GRAY, L.W., LANG, B.F., BURGER, G. (2005). AutoFACT: An Automatic Functional Annotation and Classification Tool. *BMC Bioinformatics*, 6:151.
- KRISHNA, P & GLOOR, G. (2001) The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones* 6: 238-246.
- LAKOWICZ, J. R. (1983) Principles of Fluorescence spectroscopy. Plenum Press, New York, pp 341-379.
- LEBOWITZ, J., LEWIS, M. S., SCHUCK, P. (2002) Modern analytical centrifugation in protein science: a tutorial review. *Prot. Sci.* 11: 2067-2079.
- LI, Y., WEISS, W.F. IV, ROBERTS, C.J. (2009) Characterization of high-molecular-weight nonnative aggregates and aggregation kinetics by size exclusion chromatography with inline multi-angle laser light scattering. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98: 3997-4016.
- LINDQUIST, S. & CRAIG, E.A. (1988) The Heat-Shock Proteins. *A. Rev. of Genet.* 22:631-677.
- LU, R., MALCUIT, I., MOFFETT, P., RUIZ, M. T., PEART, J., WU, A.J., RATHJEN, J. P., BENDAHMANE, A. DAY, L., BAULCOMBE, D. (2003). High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *The EMBO Journal*, 22: 5690-5699.
- MARCU, M.G., CHADLI, A., BOUHOUCHE, I., CATELLI, M., NECKERS, L.M. (2000) The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxy terminus of the chaperone. *J. Biol. Chem.*, 275: 37181-37186.
- MAROZKINA, N. V., YEMEN, S., BOROWITZ, M., LIU, L., PLAPP, M., SUN, F., ISLAM, R., ERDMANN-GILMORE, P., TOWNSEND, R. R., LICHTI, C. F., MANTRI, S., CLAPP, P. W., RANDELL, S. H., GASTON, B. ZAMAN, K. (2010) Hsp 70/Hsp 90 organizing protein as a nitrosylation target in cystic fibrosis therapy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 107: 11393–11398.
- MEIRI, D., & BREIMAN, A. (2009). ARABIDOPSIS ROF1 (FKBP62) Modulates thermotolerance by interacting with Hsp90.1 and affecting the accumulation of HsfA2-regulated sHsps. *The Plant Journal* 59: 387-399.
- MENDONÇA, Y.A. & RAMOS, C.H. (2012) Cloning, purification and characterization of a 90kDa heat shock protein from *Citrus sinensis* (sweet orange). *Plant Physiol Biochem.* 50: 87-94.
- MINAMI, Y., KIMURA, Y., KAWASAKI, H., SUZUKI, K., YAHARA, I. (1994). The carboxy-terminal region of mammalian hsp90 is required for its dimerization and function in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 14: 1459-1464.
- MISHIBA, K., YAMASAKI, S., NAKATSUKA, T., ABE, Y., DAIMON, H., ODA, M., NISHIHARA, M. (2010). Strict de novo methylation of the 35S enhancer sequence in gentian. *PLoS One* 5: e9670.
- MORTAZAVI, A., WILLIAMS, B.A., MCCUE, K., SCHAEFFER, L., WOLD, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods* 5: 621-628.

- MURPHY, P.J., KANELAKIS, K.C., GALIGNIANA, M.D., MORISHIMA, Y., PRATT, W.B. (2001). Stoichiometry, abundance, and functional significance of the hsp90/hsp70-based multiprotein chaperone machinery in reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* 276: 30092-30098.
- MÜSSIG, C., SHIN, G.H., ALTMANN, T. (2003). Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133: 1261-1271.
- NELSON, D.L & COX, M.M. (2008) Lehninger Principles of Biochemistry. 5ª edição, W.H. Freeman and Company, New York, pp 86, 173-174, 592-593.
- NELSON, G.M., HUFFMAN, H., SMITH, D.F. (2003) Comparison of the carboxy-terminal DP-repeat region in the co-chaperones Hop and Hip. *Cell Stress Chaperones* 8: 125-133.
- NEUMANN, D., NOVER, L., SCHARF, K.D. (1989a) Heat shock and other stress response systems of plants (Berlin: Springer) *Results Probl Cell Differ.* 16:1-155.
- NICOLET, C.M., & CRAIG, E.A. (1989). Isolation and characterization of ST11, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 9: 3638-3646.
- NIMCHUK, Z., EULGEM, T., HOLT, B., F., 3RD, DANGL, J. L. (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics* 37: 579-609.
- NOËL, L.D., CAGNA, G., STUTTMANN, J., WIRTHMÜLLER, L., BETSUYAKU, S., WITTE, C., BHAT, R., POCHON, N., COLBY, T., PARKER J. E. (2007) Interaction between SGT1 and cytosolic/nuclear Hsc70 chaperones regulates *Arabidopsis* immune responses. *The Plant Cell* 19: 4061–4076.
- ODUNUGA, O.O., HORNBY, J.A., BIES, C., ZIMMERMANN, R., PUGH, D.J., BLATCH, G.L. (2003). Tetratricopeptide repeat motif-mediated Hsc70-mSTI1 interaction. Molecular characterization of the critical contacts for successful binding and specificity. *J. Biol. Chem.* 278: 6896-6904.
- ODUNUGA, O.O., LONGSHAW, V.M., BLATCH, G.L. (2004). Hop: more than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein. *Bioessays* 26:1058-1068.
- ONUOHA, S.C., COULSTOCK, E.T., GROSSMANN, J.G., JACKSON, S.E. (2008) Structural studies on the co-chaperone Hop and its complexes with Hsp90. *J. Mol. Biol.* 379: 732-44.
- PACE, C.N., VAJDOS, F., FEE, L., GRIMSLEY, G., GRAY, T. (1997). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4: 2411-2423.
- PANARETOU, B., SILIGARDI, G., MEYER, P., MALONEY, A., SULLIVAN, J.K., SINGH, S., MILLSON, S.H., CLARKE, P.A., NAABY-HANSEN, S., STEIN, R., CRAMER, R., MOLLAPOUR, M., WORKMAN, P., PIPER, P.W., PEARL, L.H., PRODRUMOU, C. (2002). Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated co-chaperone Aha1. *Molecular Cell* 10: 1307-1318.
- PAPINI-TERZI, F.S., ROCHA, F.R., VÊNCIO, R.Z.N., FELIX, J.M., BRANCO, D.S., WACLAWOVSKY, A.J., DEL BEM, L.E.V., LEMBKE, C.G., COSTA, M.D.L., NISHIYAMA Jr, M.Y., VICENTINI, R., VINCENTZ, M.G.A., ULIAN, E.C., MENOSSI, M., SOUZA, G.M. (2009) Sugarcane genes associated with sucrose content. *BMC Genomics* 10:120.
- PARK S.J., SUETSUGU S., TAKENAWA T. (2005) Interaction of HSP90 to N-WASP leads to activation and protection from proteasome-dependent degradation. *The EMBO Journal.* 24: 1557–70.
- PEARL, L. H. (2005). Hsp90 and Cdc37 - a chaperone cancer conspiracy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15: 55-61.
- PEARL, LH & PRODRUMOU, C. (2006). Structure and mechanism of the hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 271-294.
- PHILLIPS, T. (2008) Regulation of transcription and gene expression in eukaryotes. *Nature Education* 1(1).
- PORATH, J., CARLSSON, J., OLSSON, I., BELFRAGE, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258: 598-599.

- PRATT, WB & TOFT, DO. (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp. Biol. Med.* 228: 111-133.
- PRODROMOU, C., ROE, S.M., O'BRIEN, R., LADBURY, J.E., PIPER, P.W., PEARL, L.H. (1997a). Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* 90: 65-75.
- PRODROMOU, C., SILIGARDI, G., O'BRIEN, R., WOOLFSON, D.N., REGAN, L., PANARETOU, B., LADBURY, J.E., PIPER, P.W., PEARL, L.H. (1999) Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *The EMBO Journal* 18: 754-762.
- QUEITSCH, C., HONG, S.W., VIERLING, E., LINDQUIST, S. (2000) Heat stress protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 479-492.
- QUEITSCH, C., SANGSTER, T.A., LINDQUIST, S. (2002) Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature* 417: 618-624.
- RAMOS, C.H.I. & FERREIRA, S.T. (2005) Protein folding, misfolding and aggregation: involving concepts and conformational diseases. *Protein Pept. Lett.* 12:213-22.
- RASER, J.M. & O'SHEA, E.K. (2005) Noise in gene expression: origins, consequences, and control. *Science* 309:2010-2013.
- RUSHTON, P.J., SOMSSICH, I.E., RINGLER, P., SHEN, Q.J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* 15: 247-258.
- SAMALI, A., CAI, J., ZHIVOTOVSKY, B., JONES, D. P., ORRENIUS, S. (1999). Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *The EMBO Journal* 18: 2040-2048.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Segunda Edição. Cold spring Harbor Laboratory – New York.
- SANCHEZ, Y. & LINDQUIST, S.L. (2000). HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* 248: 1112-1115.
- SANGSTER, T.A. & QUEITSCH, C. (2005). The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 86-92.
- SANGSTER, T.A., SALATHIA, N., UNDURRAGA, S., MILO, R., SCHELLENBERG, K., LINDQUIST, S., QUEITSCH, C. (2008). HSP90 affects the expression of genetic variation and developmental stability in quantitative traits. *Proc. Nat. Ac. Sci. USA* 105: 2963-2968.
- SANTOS, N.C. & CASTANHO, M.A.R.B. (1996). Teaching Light Scattering Spectroscopy: The Dimension and Shape of Tobacco Mosaic Virus. *Biophysical Journal* 71: 1641-1646.
- SCHÄGGER, H. & VON JAGOW, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-79.
- SCHÄGGER, H., CRAMER, W. A., VON JAGOW, G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 217: 220-230.
- SCHEUFLER, C, BRINKER, A., BOURENKOV, G., PEGORARO, S., MORODER, L., BARTUNIK, H., HARTL, F. U., MORAEFI, I. (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 101: 199-210.
- SCHULTE, T.W., AKINAGA, S., MURAKATA, T., AGTSUMA, T., SUGIMOTO, S., NAKANO, H., LEE, Y.S., SIME, B.B., ARGON, Y., FELTS, S., TOFT, D.O., NECKERS, L.M., SHARMA, S.V. (1999) Interaction of radicicol with members of the heat shock protein 90 family of molecular chaperones. *Mol. Endocrinol.*, 13: 1435-1448.
- SEO, Y., LEE, S., SONG, M., SUH, J., HAHN, T., RONALD, P., JEON, J. (2008) The HSP90-SGT1-RAR1 Molecular Chaperone Complex: a Core Modulator in Plant Immunity. *Journal of Plant Biology* 51: 1 -10.

- SHIRASU, K. (2009). The HSP90-SGT1 chaperone complex for NLR immune sensors. *Annual Review of Plant Biology* 60: 139-164.
- SLATER, G.S.C. & BIRNEY, E. (2005). Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *BMC Bioinformatics* 6:31.
- SMITH, D. F. (2004). Tetratricopeptide repeat cochaperones in steroid receptor complexes. *Cell Stress Chaperones* 9: 109-121.
- SOGA, S., KOZAWA, T., NARUMI, H., AKINAGA, S., IRIE, K., MATSUMOTO, K., SHARMA, S.V., NAKANO, H., MIZUKAMI, T., HARA, M. (1998) Radicol leads to selective depletion of Raf kinase and disrupts K-Ras-activated aberrant signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 273: 822-828.
- SONG, H., ZHAO, R., FAN, P., WANG, X., CHEN, X., LI, Y. (2009) Overexpression of AtHsp90.2, AtHsp90.5 and AtHsp90.7 in *Arabidopsis thaliana* enhances plant sensitivity to salt and drought stresses. *Planta*. 229:955-64.
- SONG, Y., & MASISON, D.C. (2005). Independent Regulation of Hsp70 and Hsp90 Chaperones by Hsp70/Hsp90-organizing Protein Sti1 (Hop1). *J. Biol. Chem.* 280: 34178-34185.
- SOTI, C.S., RÁCZ, A., CSERMELY, P. (2002) A nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of Hsp90: N-terminal nucleotide binding unmask a C-terminal binding pocket. *J. Biol. Chem.* 277: 7066-7075.
- SREEDHAR, A. S., KALMÁR, E., CSERMELY, P., SHEN, Y.F. (2004). Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Letters* 562: 11-15.
- STEBBINS, C.E., RUSSO, A.A., SCHNEIDER, C., ROSEN, N., HARTL, F.U., PAVLETICH, N.P. (1997) Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumour agent. *Cell* 89: 239-250.
- STUDIER, F.W., ROSENBERG, A.H., DUNN, J.J., DUBENDORFF, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, 185: 60-89.
- TAIPALE, M., JAROSZ, D.F., LINDQUIST, S. (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 11: 515-528.
- TELLES, G.P., BRAGA, M. D. V., DIAS, Z., LIN, T., QUITZAU, J. A. A., SILVA, F. R., MEIDANIS, J. (2001) Bioinformatics of the sugarcane EST Project. *Genetics and Molecular Biology* 24: 9-15.
- TIROLI, A.O. & RAMOS, C.H.I. (2007) Biochemical and biophysical characterization of small heat shock proteins from sugarcane Involvement of a specific region located at the N-terminus with substrate specificity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 818–831.
- TIROLI-CEPEDA, A.O. & RAMOS, C.H. (2011) An Overview of the Role of Molecular Chaperones in Protein Homeostasis. *Protein Pept. Lett.* 18:101-109.
- TÖPFER, R., MATZEIT, V., GRONENBORN, B., SCHELL, J., STEINBISS, H.H. (1987) A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res* 15:5890.
- TREPEL, J., MOLLAPOUR, M., GIACCONE, G., NECKERS, L. (2010). Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nature Reviews Cancer* 10: 537-549.
- UVERSKY, V. N. (1993) Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule. *Biochemistry* 32:13288-13298.
- VAN DER SPUIJ, J., KANA, B. D., DIRR, H. W., BLATCH, G. L. (2000). Heat shock cognate protein 70 chaperone-binding site in the co-chaperone murine stress-inducible protein 1 maps to within three consecutive tetratricopeptide repeat motifs. *Biochemical Journal* 345: 645-651.

- VARET, A., HAUSE, B., HAUSE, G., SCHEEL, D., LEE, J. (2003). The *Arabidopsis* NHL3 gene encodes a plasma membrane protein and its overexpression correlates with increased resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Plant Physiology* 132: 2023-2033.
- VIERLING, E. (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 579–620.
- VOET, D., VOET, J. G., PRATT, C. W. (2000) Purificação de Proteínas in Fundamentos de Bioquímica. Artmed, pp.99-105.
- WANG, M., QI, X., ZHAO, S., ZHANG, S., LU, M. (2009) Dynamic changes in transcripts during regeneration of the secondary vascular system in *Populus tomentosa* Carr. revealed by cDNA microarrays. *BMC Genomics* 10:215.
- WANG, W., VINOCCUR, B., SHOSEYOV, O., ALTMAN, A. (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9: 244-252.
- WANG, Z., GERSTEIN, M., SNYDER, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 10: 57-63.
- WATERS, E.R., LEE G.J., VIERLING, E. (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.* 47: 325–338.
- WEBB, J. R., CAMPOS-NETO, A., SKEIKY, Y. A., REED, S. G. (1997). Molecular characterization of the heat-inducible LmST11 protein of *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 89: 179-193.
- WEGELE, H., MÜLLER, L., BUCHNER, J. (2004). Hsp70 and Hsp90 - a relay team for protein folding. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 151: 1-44.
- WELCH, W.J. & BROWN, C.R. (1996) Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chaperones.* 1:109-115.
- WELCH, W.J. & FERAMISCO, J.R. (1982) Purification of the major mammalian heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 267: 14949-14959.
- XU, Z.S., CHEN, M., LI, L.C., MA, Y.Z. (2011). Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement. *Journal of Integrative Plant Biology* 53: 570-585.
- YAMADA, K. & NISHIMURA M. (2008) Cytosolic heat shock protein 90 regulates heat shock transcription factor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav.* 3: 660–662.
- YAMADA, K., FUKAO, Y., HAYASHI, M., FUKAZAWA, M., SUZUKI, I., NISHIMURA, M. (2007) Cytosolic Hsp90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* 282: 37794-37804.
- YANG, X.X., MAURER, K.C., MOLANUS, M., MAGER, W.H., SIDERIUS, M., VAN DER VIES, S.M. (2006) The molecular chaperone Hsp90 is required for high osmotic stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 6:195-204.
- YI, F., DOUDEVSKI, I., REGAN, L. (2010) HOP is a monomer: investigation of the oligomeric state of the co-chaperone HOP. *Protein Science* 19:19-25.
- ZANATA, S. M., LOPES, M. H., MERCADANTE, A. F., HAJJ, G. N. M., CHIARINI, L. B., NOMIZO, R., FREITAS, A. R. O., CABRAL, A.L., LEE, K.S., JULIANO, M.A., DE OLIVEIRA, E., JACHIERI, S.G., BURLINGAME, A., HUANG, L., LINDEN, R., BRENTANI, R.R., MARTINS, V.R. (2002). Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *The EMBO Journal*, 21: 3307-3316.
- ZHANG, T., LI, Y., YU, Y., ZOU, P., JIANG, Y., SUN, D. (2009) Characterization of celastrol to inhibit hsp90 and cdc37 interaction. *J Biol Chem.* 284:35381-35389.
- ZHANG, Z., QUICK, M. K., KANELAKIS, K. C., GIJZEN, M., KRISHNA, P. (2003). Characterization of a plant homolog of hop, a cochaperone of hsp90. *Plant Physiology*, 131: 525-535.

- ZHAO, R. & HOURY, W.A. (2005). Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation. *Biochem. Cell Biol.* 83: 703-710.
- ZHAO, Y.J., SULKOWSKI, E., PORATH, J. (1991) Surface topography of histidine residues in lysozymes. *Eur J Biochem.* 202: 1115-1119.
- ZOU, J., GUO, Y., GUETTOUCHE, T., SMITH, D.F., VOELLMY, R. (2009) Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 94: 471–480.

ANEXOS

9. ANEXOS

Anexo 1

Artigo publicado

Human Hsp70/Hsp90 organizing protein (Hop) D456G is a mixture of monomeric and dimeric species. (2010) Gonçalves, DC, Gava, LM & Ramos, CHI. Protein and Peptide Letters, (17) 492-498.

Copyright Bentham Science Publishers Ltd.

Human Hsp70/Hsp90 Organizing Protein (Hop) D456G Is a Mixture of Monomeric and Dimeric Species

Danieli C. Gonçalves^{1,2,#}, Lisandra M. Gava^{1,2,#} and Carlos H.I. Ramos^{1,3,*}

¹Institute of Chemistry and ²Institute of Biology, University of Campinas-UNICAMP. P.O. Box 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brazil. ³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagem, Brazil

Abstract: Hop is a tetratricopeptide repeat domain (TPR)-containing co-chaperone that is able to directly associate with both Hsp70 and Hsp90. Previous data showed that the TPR2A-domain is the primary site for dimerization and that the TPR2B-domain may also play a role in dimerization. We present Hop-D456G, a mutant within the TPR2B-domain, that is a mixture of monomeric and dimeric species.

Keywords: Heat shock protein, Hop, TPR domain, Protein folding, protein-protein interaction, Hsp90.

1. INTRODUCTION

Hsp90 is a molecular chaperone that is responsible for maintaining the folding, stability and function of many proteins involved with signal-transduction pathways, cell-cycle regulation and apoptosis [1,2]. Hsp90 collaborates with Hsp70 to form a multifunctional multicomponent chaperone machine that plays a pivotal role in protecting the cell from environmental and genetic stresses [1]. Hop (Hsp70/Hsp90 Organizing Protein) was first identified in yeast as STI1 (for stress-inducible protein 1 [3]), and it is able to directly associate with both Hsp70 and Hsp90 [4,5]. In fact, Hop appears to be involved in several important processes, including recruitment of Hsp90 to preexisting steroid receptor-Hsp70 complexes, thus promoting the assembly and functional maturation of the receptor [4-6], and acting as a receptor for prion proteins [7].

The binding of Hop to Hsps is mediated by multiple tetratricopeptide repeat (TPR) domains, each formed by three TPR motifs, which are antiparallel α -helical hairpins (helix-turn-helix) that are 34 amino acids in length [6,8,9]. The Hop TPR1 and TPR2A domains, which have known crystallographic structures, consist of an antiparallel α -helical stack that forms a large groove along one surface of the domain [10-14]. The TPR domain has side chains projecting into the groove solvent space that can readily specify interactions with side chains from a bound polypeptide and thus facilitate specific protein-protein interactions. Two other domains containing aspartic acid-proline (DP) repeats complete the domain structure of Hop, which has the following arrangement: TPR1-DP1-TPR2A-TPR2B-DP2 (Fig. 1). TPR domains link chaperones and other protein systems into cooperative networks and participate in the action of Hsp90 as a stabilizer of the cancer phenotype thus TPR-Hsp90 com-

plexes are potential drug targets. Additionally, the presence of multiple domains gives Hop the ability to simultaneously bind the EEVD sites of both Hsp70 and Hsp90.

Although a structure for full-length Hop does not exist, it has been shown that the protein is dimeric in solution and binds as a dimer to Hsp90 [10]. Many lines of evidence show that the TPR2A-domain, which contains the Hsp90-binding site, is the primary site for dimerization [13,15]. Proteins deleted for the TPR2A-domain are monomers, but deletion of the TPR2B-domain, whose structure is unknown, causes a mixture of monomeric and dimeric species, suggesting the existence of residues within TPR2B that may also play a role in dimerization [15]. Also, there is evidence that the isolated TPR2B-domain is a dimer [16]. We report here on human Hop-D456G, which has a single mutation within the TPR2B-domain, that is a mixture of monomeric and dimeric species.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Protein Preparation and Characterization

The molecular biology assays of *Homo sapiens* Hop cDNA (NCBI - BC002987), including cloning and site-directed mutagenesis, and protein production using the pET system (pET28a) were performed by standard methods [17,18]. A three-step chromatography procedure was used to purify Hop-D456G, which had a 6xHis-tag to facilitate purification, from the soluble fraction of *E. coli* lysate. The first step was affinity chromatography using a HiTrap Chelating 5 ml column (GE) on an ÄKTA FPLC instrument (GE) equilibrated in 20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 500 mM NaCl and 20 mM imidazole, in which the protein was eluted by a 20-500 mM linear gradient of imidazole. The second step was ion exchange chromatography carried out in a DEAE 26/20 45 mL column (GE) previously equilibrated with 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM NaCl and 2 mM EDTA, in which the protein was eluted by a 10-1000 mM linear gradient of NaCl. The third step was a HiLoad Superdex 200 pg 26/60 size exclusion column (GE) previously equilibrated in 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl and 2 mM EDTA.

*Address correspondence to this author at the Institute of Chemistry, University of Campinas-UNICAMP. P.O. Box 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brazil and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagem, Brazil; Tel: 55-19-3521-3144; Fax: 55-19-3521-3023; E-mail: cramos@iqm.unicamp.br

[#]These two authors contributed equally to this work.

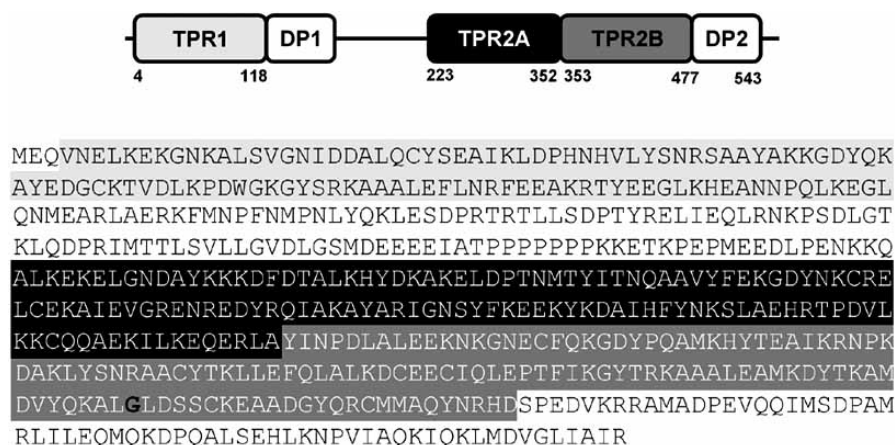


Figure 1. Hop-D456G structural arrangement. Top: Hop-D456G is composed of three tetratricopeptide repeat (TPR) domains and two other domains containing aspartic acid-proline (DP) repeats and has the following arrangement: TPR1-DP1-TPR2A-TPR2B-DP2. Bottom: The amino acid sequence is shown and TPR domains are labeled as in the top. Residue G456 is labeled in bold.

Protein purification was analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

2.2. Spectroscopic Experiments

Protein concentration was 2.5 $\mu\text{g/ml}$ for circular dichroism (CD) and 3 $\mu\text{g/ml}$ for emission fluorescence experiments, in buffer 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl and 2 mM EDTA. A JASCO model J-810 CD spectropolarimeter (Jasco, Japan) equipped with a thermoelectric sample temperature controller (Peltier system) was used to record CD spectra as previously described [19]. Measurements were taken from 260 to 200 nm, unfolding was monitored at 222 nm, and the average of at least three independent experiments is reported. Measurements were performed at a temperature rate of 1°C/min using a 1 mm pathlength cell. The prediction of secondary structure content was performed as previously described [19]. Emission fluorescence was measured using a Multifrequency Cross-Correlation and Modulation Fluorometer K2™ - ISS (ISS, Champaign, IL, USA) using quartz cuvettes of 1 cm x 1 cm optical pathlength with excitation at 295 nm and emission was from 300 to 450 nm. Fluorescence data were analyzed by their maximum wavelength (λ_{max}) and center of spectral mass ($\langle\lambda\rangle$), as described by the equation:

$$\langle\lambda\rangle = \frac{\sum \lambda_i F_i}{\sum F_i} \quad 1$$

where λ_i is each wavelength and F_i is the fluorescence intensity at λ_i [19].

2.3. Hydrodynamic Experiments

Analytical ultracentrifugation (AUC) sedimentation equilibrium (SE) experiments were performed using a Beckman Optima XL-A analytical ultracentrifuge and analyzed as previously described [20,21]. Briefly, experiments were conducted from 4,000 to 10,000 rpm at 20°C with scan data acquisition at 279 nm and protein concentration of 800-1,200 $\mu\text{g/mL}$ in 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl and 2

mM EDTA. SE analyses involved fitting a model of absorbance versus cell radius data using nonlinear regression. The Self-Association method was used to analyze the experiments using several models of association for Hop-D456G. Distribution of the protein along the cell was fitted with the following equation [21]:

$$C = C_0 e^{\left[\frac{M(1 - \bar{v}\rho)\omega^2(r^2 - r_0^2)}{2RT} \right]} \quad 2$$

Dynamic light scattering (DLS) experiments were performed on a DynaPro-MS800 instrument (Protein Solutions Inc.) that monitors the scattered light at 90°, equipped with a temperature controlled microsampler and used to obtain the diffusion coefficient parameter, D , at 20°C. Hop-D456G concentration was 0.5-1.6 $\mu\text{g/ml}$ in 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl and 2 mM EDTA. The software Sednterp (www.jphilo.mailway.com/download.htm) was used to estimate protein partial specific volume at 20°C (\bar{v}), buffer density (ρ) and buffer viscosity (η), and D_{sphere} for a globular protein of 66.4 kDa.

2.4. Blue-Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE)

BN-PAGE is a “charge shift” method for assessing the oligomeric form, molecular mass and homogeneity of native proteins in which the electrophoretic mobility of the proteins is mainly determined by the negative charges of the bound Coomassie dye. The molecular sieving effect of the acrylamide gradient gel is the separation principle because the migration ceases when areas of appropriate pore size are reached [22]. BN-PAGE was performed as previously described [22-24]. Briefly, 5 to 16% linear gradient gels were poured into a protean II minigel system (Bio-Rad) and 5 μg of Hop-D456G (monomer 66.4 kDa; pI 6.9), Bovine Serum Albumin (BSA, 66 and 132 kDa, monomer and dimer respectively; pI 4.9), Conalbumin (Co, 78 kDa; pI 5.9), and unfolded Hop-D456G (4 M urea, 90 °C, 15 min) were loaded as monomer standards. Runs started with anode buffer (50 mM Bis-Tris, pH 7.0) and blue cathode buffer (15 mM Bis-Tris (pH 7.0), 50 mM tricine, 0.02% Coomassie-Blue G250) at 4°C and 80 V until the separating gel was reached, and

then conditions were switched to 200 V and colorless cathode buffer (15 mM Bis-Tris, pH 7.0, 50 mM tricine).

2.5. Gel Filtration Chromatography

Gel filtration chromatography was used to estimate the hydrodynamic or Stokes radius (R_s) at different temperatures. Gel filtration chromatography was performed on a Superdex™ 200 10/300 molecular exclusion (GE) pre-equilibrated with 25 mM Tris-HCl (pH8.0), 2mM EDTA, and 150 mM NaCl. Experiments were performed at a flow rate of 0.5 ml.min⁻¹, at room temperature. Hop-D456G (30 μM) and a mixture of proteins with known Stokes radii (standard: Ribonuclease A (16.4 Å, 3.0 mg/mL), ovalbumin (30.5 Å, 3.5 mg/mL), aldolase (48.1 Å, 3.5 mg/mL) and apoferritin (61.0 Å, 0.4 mg/mL) (Sigma)) were centrifuged at 12,000 g for 10 min and then loaded onto the column. Elution profiles were monitored by measuring absorbance at 280 nm. Hop-D456G Stokes radius was estimated by a linear fit of the Stokes radii of the standard proteins versus the partition coefficient K_{av} as described by the following equation:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad 3$$

where V_e is the elution volume of the protein, V_0 is the void volume and V_t is the total volume of the column. All data were analyzed with Origin software (Microcal).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Hop-D456G: Purification and Initial Characterization

Longshaw *et al.* [16] showed that two regions disrupted the alignment of TPR1, TPR2A and TPR2B domains (Fig. 1A in their paper). These regions correspond to the first 3 residues of helix 3A and residue 12 of helix 3B. To answer whether specific residues where involved in the role of TPR2B in dimerization we studied Hop-D456G. Residue D456 (residue 12 in helix 3B of TPR2B) mutated to Glycine may disrupt any possible interaction in that particular position (Fig. 1). Human Hop-D456G was produced pure (Fig. 2) and analyzed in solution. Circular dichroism spectroscopy showed that Hop-D456G was natively folded and predominantly α -helical (Fig. 3A), with an estimated α -helical content of $64 \pm 4\%$ (Table 1). The CD spectrum had minima at 210 nm, with a signal of about $-24,800 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$, and at 221 nm, with a signal of about $-28,100 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ (Table 1). These values were within the margin of error of those reported for the wild-type (WT) protein [25]. Hop-D456G has one tryptophan residue located in the TPR1 domain, and its emission fluorescence spectrum had a maximum intensity at $339 \pm 1 \text{ nm}$ and a spectral center of mass at $345 \pm 1 \text{ nm}$ (Fig. 3B). These results suggested that the single tryptophan residue was well-buried into the protein structure. Thermal-induced unfolding measurements showed that Hop-D456G unfolded reversibly through a sigmoidal transition curve with a T_m of $53 \pm 1^\circ\text{C}$ (Table 1). This value was within the margin of error reported for the WT protein [25]. Altogether, these results indicated that Hop-D456G had secondary structure and thermal stability similar to that of WT.

3.2. Hop-D456G is a Mixture of Monomeric and Dimeric Species

Upon sedimentation equilibrium (SE) analytical ultracentrifugation (AUC), Hop-D456G was mainly a single species with a molecular mass of $66 \pm 2 \text{ kDa}$ (Fig. 4 and Table 2), similar to that of 66.4 kDa predicted for a monomer from the amino acid sequence. The random distribution of the residuals (top panel in Fig. 4) indicated that the fit had very good quality and was in good agreement with a single species.

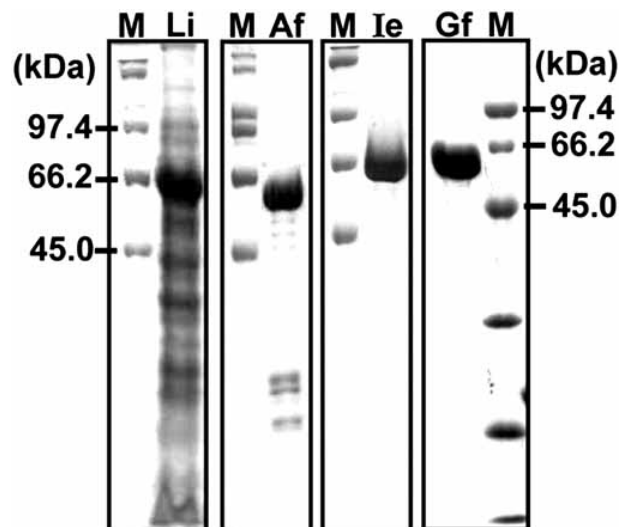


Figure 2. Protein purification. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was used to monitor protein purification. Hop-D456G (main band in Li, Af, Ie and Gf) was produced pure. M, molecular standards (mass in kDa are shown); Li, soluble fraction after bacterial lyses; Af, after Affinity chromatography; Ie, after Ion-exchange chromatography; Gf, after Gel filtration chromatography.

Blue-native polyacrylamide gels electrophoresis (BN-PAGE) is a “charge shift” method for assessing the oligomeric form, molecular mass and homogeneity of native proteins [22]. In this experiment, folded Hop-D456G migrated mainly as a monomer as compared to the standards: the unfolded Hop-D456G (by high urea concentration and heat), a standard for monomer migration, BSA a monomer-dimer protein with 66 and 132 kDa respectively, and Conalbumin with 78 kDa (Fig. 5). The folded Hop-D456G also had some oligomeric species, probably dimer and higher species. The participation of the TPR2B-domain in dimerization has been suggested before. Onuhua *et al.* [15] showed that Hop lacking the DP2 domain (1-477) is a dimer, Hop lacking the TPR2B domain (1-352) is converted into a monomer-dimer and additional deletion of the TPR2A-domain (1-211) converts the protein into a monomer. In their work [15] Hop lacking the TPR2B domain was a monomer at 5 μM, a concentration similar to that used in our AUC experiments, and a dimer at 50 μM, a concentration similar to that used in our BN-PAGE experiments. Therefore, our results indicate that Hop-D456G was converted into a monomer-dimer, a result also verified with mutants deleted for the TPR2B-domain [14]. Previous mutations within the TPR2B-domain of full-length Hop (K429E, K429A, R433E, R433A [10], K364A-N368A and K429A-R433A [16]) have not showed any effect on dimerization.

Table 1. Spectroscopy and Stability Parameters

	Circular Dichroism at 210 nm (deg.cm ² .dmol ⁻¹)	Circular Dichroism at 221 nm (deg.cm ² .dmol ⁻¹)	Estimated α -Helical Content	T _m of Unfolding (°C)
Hop	-25,000 ± 600 ^a	-29,000 ± 600 ^a	65 ± 6%	54 ± 2 ^a
Hop-D456G	-24,800 ± 400	-28,100 ± 300	64 ± 4%	53 ± 1

^a from reference [27];

3.3. Hydrodynamic Properties of the Monomer

We investigated the hydrodynamic characteristics of Hop-D456G to gain insight about its overall shape. Analytical gel filtration chromatography experiments were used to calculate the Stokes radius (R_S), also known as the hydrodynamic radius (R_h). The results showed that Hop-D456G eluted as a homogeneous species (Fig. 6, inset) with an R_S of 44 ± 2 Å (Fig. 6 and Table 2). It is important to mention that these results are not caused by Hop-D456G being misfolded, as this hypothesis is ruled out by CD (Fig. 3A), tryptophan emitted fluorescence (Fig. 3B) and thermal-induced unfolding experiments (Table 1).

The value of R_S was used to calculate the so-called Perrin or shape factor F [26], which is informative of the shape of the molecule. The Perrin factor is a ratio of the measured frictional coefficient f to the frictional coefficient f_0 of a hypothetical sphere for which a hypothetical radius is calculated using its molecular mass. For the theoretical calculations, the subunits were treated as globular proteins (both equatorial, a , and polar, b , radii are equal). In this way, the Perrin factor (f/f_0 ratio) provides information about the shape of the particle because the closer it is to 1, the more spherical (globular) the shape is. Mutant Hop was an asymmetric protein with an f/f_0 ratio (Perrin factor) of about 1.6.

In addition, dynamic light scattering experiments were used to measure the diffusion coefficient D of Hop-D456G at several protein concentrations (Fig. 7). Then, the standard diffusion coefficient ($D_{20,w}$) at each protein concentration was calculated and plotted in order to estimate the $D_{20,w}$ at a 0 mg/mL protein concentration ($D_{20,w}^0$) by extrapolation (Fig. 7). The measurements revealed that $D_{20,w}^0 = 6.2 \times 10^{-7} \pm 0.2$ cm²/s (Fig. 7 and Table 2). Otherwise, the Perrin factor can be estimated by $D_{sphere}/D_{20,w}^0$. A hard sphere with the mass of a monomeric Hop-D456G will have a theoretical R_S of 27 Å, a theoretical $D_{20,w}^0$ of 8.0×10^{-7} cm²/s and thus a Perrin factor of about 1.3. The disagreement of Perrin factor values estimated from the two independent experiments may be explained by the effect of hydration, which can increase the effective volume of the proteins and thus increase the R_S and affect the results. In any case, our results indicate that Hop-D456G is a monomeric protein that appears to be elongated and hydrated. An elongated monomer is in good agreement with the estimated conformation of Hop from the SAXS experiments [15].

3.4. Is Hop an Adaptor Capable of Switching from Monomer to Dimer?

Hop is a versatile protein that is capable of binding to Hsp70 and Hsp90 but also to other chaperones. Hop is in-

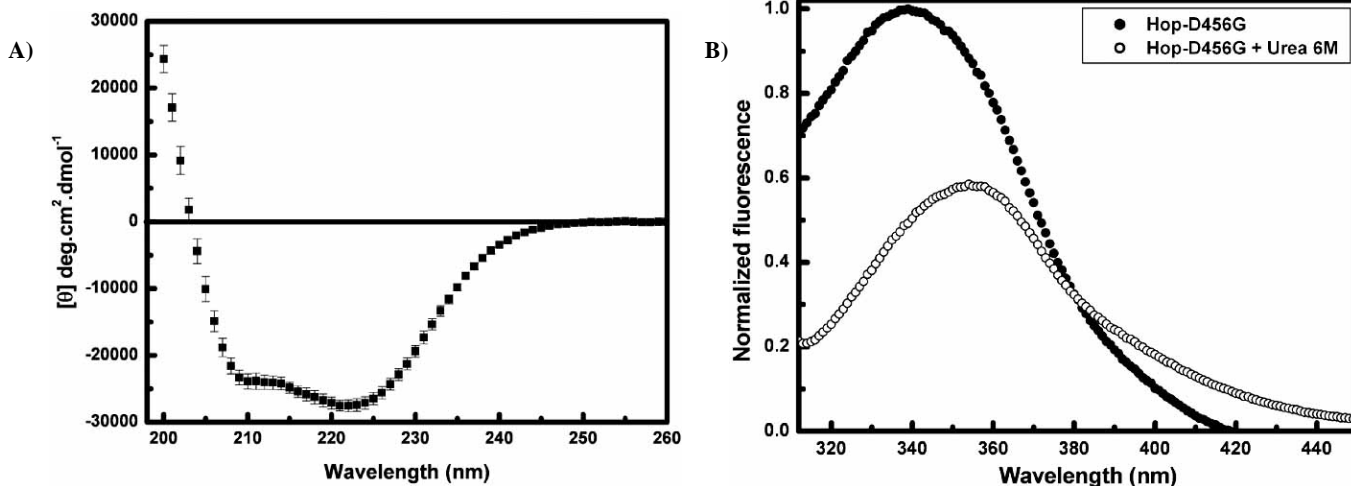


Figure 3. Hop-D456G is folded. A) *Circular dichroism spectrum.* Residual molar ellipticity $[\theta]$ was measured from 200 to 260 nm with protein in a solution of 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl and 2 mM EDTA. The spectrum profile is characteristic of α -helical protein. B) *Emission fluorescence spectrum.* Excitation was at 295 nm and emission was from 300 to 450 nm in 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl and 2 mM EDTA, in the absence or in the presence of 6M urea. Fluorescence spectra revealed that the tryptophan is well-buried in the protein structure. λ_{max} was 339 ± 1 and spectral center of mass was 345 ± 1 nm. In the presence of 6 M urea, λ_{max} was 354 ± 1 and spectral center of mass was 361 ± 1 .

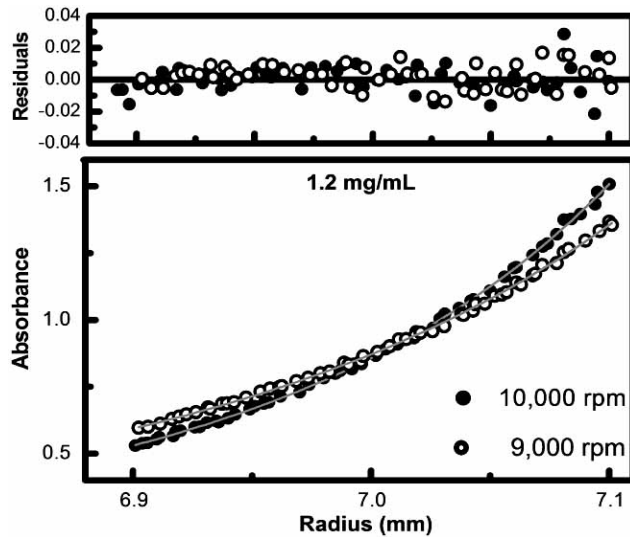


Figure 4. Sedimentation equilibrium experiments. The data analysis involved fitting a model of absorbance versus cell radius data using nonlinear regression using the Origin software package (Microcal). The best fit was determined by the randomness of the residuals and by minimization of variance (5×10^{-5}), and the random distribution of the residuals (top panel) indicated a good quality fit in good agreement with a single species with molecular mass of 66 ± 2 kDa. Experiments were conducted from 4,000 to 10,000 rpm at 20°C with scan data acquisition at 279 nm. The best fits of the experimental data for 1200 $\mu\text{g/mL}$ at 9,000 and 10,000 rpm are shown.

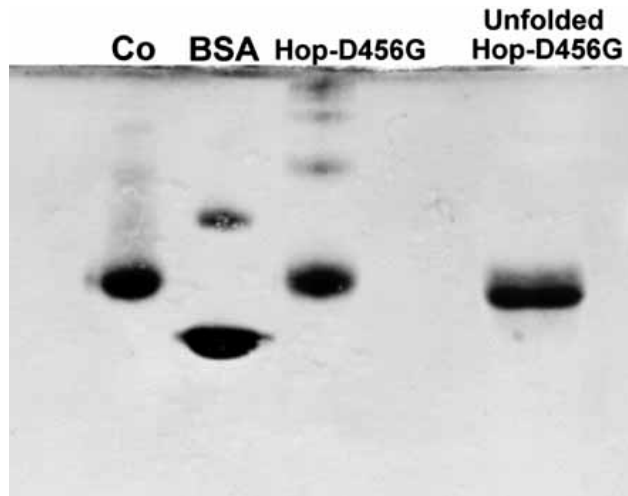


Figure 5. Blue native electrophoresis. BN-PAGE is a “charge shift” method for assessing oligomeric form, molecular mass and homogeneity of native proteins, and the electrophoretic mobility of the proteins is mainly determined by the negative charge of the bound coomassie dye. Hop-D456G (monomer 66.4 kDa; pI 6.9), Bovine Serum Albumin (BSA, 66 and 132 kDa, monomer and dimer respectively; pI 4.9), Conalbumin (Co, 78 kDa; pI 5.9), and unfolded Hop-D456G (as the standard for monomer migration; urea 4 M, 90 °C, 15 min).

involved in many cellular processes, acts in many cellular compartments and may have other partners. To accomplish all these functions, the protein may have to be promiscuous,

a property facilitated by the large amount of TPR domains. However, Hop's promiscuity may also be facilitated by an ability to switch from monomer to dimer depending on the partner or some other factor. In fact, it has been proposed that full-length Hop associates with Hsp70 in a monomer-monomer interaction [27,28]. Our results indicated that the switch from monomer to dimer could be mediated by an intervention in the TPR2B domain. However more experiments will be necessary to show whether this residue is really involved in a possible dimer to monomer mechanism.

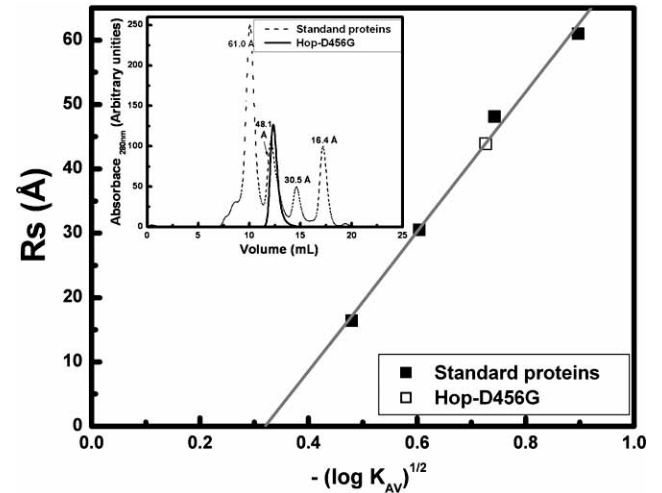


Figure 6. Analytical gel filtration. Analytical gel filtration chromatography experiments were used to calculate the Stokes radius (R_s), also known as the hydrodynamic radius (R_h). Standard proteins with known R_s were loaded onto a gel filtration column (Inset; dashed line) and their elution volume ($-\sqrt{\log K_{av}}$) was calculated to create a plot of elution volume versus R_s . The Hop-D456G elution volume (inset; solid line) was inserted into the plot (white square) and corresponded to a Stokes radius of $44 \pm 2 \text{ \AA}$.

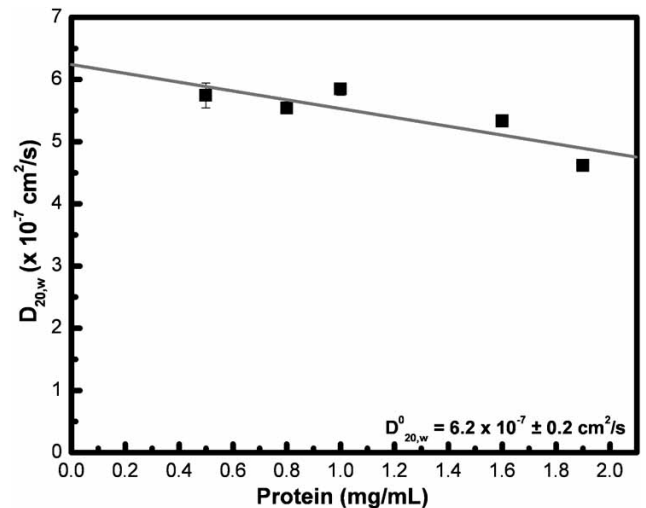


Figure 7. Plot of $D_{20,w}$ versus protein concentration. The diffusion coefficient $D_{20,w}$, calculated by dynamic light scattering versus protein concentration, was fit with linear regression to calculate $D_{20,w}^0$. Hop-D456G had a $D_{20,w}^0 = 6.2 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Table 2. Hydrodynamic Parameters of Hop-D456G

Molecular mass by analytical ultracentrifugation (kDa)	Stokes radius by gel filtration chromatography (Å)	Diffusion coefficient ($D_{20,w}^0$) by dynamic light scattering (cm^2/s)
66±2	44 ± 2 ^a	6.2x10 ⁻⁷ ±0.2 ^b

a, Perrin factor=1.3; b, Perrin factor=1.6;

In conclusion, we have shown for the first time that Hop-D456G, a mutation within the TPR2B-domain, is a mixture of monomer and higher species. Although no structure for full-length Hop exists previous works have characterized the wild-type protein using biophysical tools, established the role of the TPR2A-domain in dimerization and opened up the possibility that the TPR2B-domain might also be involved in dimerization. It may be possible that Hop is regulated between monomeric and dimeric states to facilitate its adaptor functions.

Additional indication that Hop-D456G is primarily monomeric at low concentrations is shown on Fig. S1 (Supplementary data) using SEC-MALS (size exclusion chromatography- multi-angle light scattering).

ACKNOWLEDGEMENTS

Research in the laboratory of CHIR is supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), and NIH-R03TW007437 funded by the Fogarty International Center. DCG and LMG thank CNPq and FAPESP for fellowships. We thank J.C. Borges and T.C. Cagliari for helpful discussion.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is available on the publishers Web site along with the published article.

ABBREVIATIONS

Hsp	=	Heat shock protein
Hop	=	Hsp70-Hsp90 organizing protein
AUC	=	Analytical ultracentrifugation
CD	=	Circular Dichroism
DLS	=	Dynamic Light Scattering
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
BN-PAGE	=	Blue native polyacrylamide gel electrophoresis
Rs	=	Stokes radius
TPR	=	Tetratricopeptide repeat
WT	=	Wild-type

REFERENCES

- [1] Wegele, H.; Müller, L.; Buchner, J. Hsp70 and Hsp90 - a relay team for protein folding. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **2004**, *151*, 1-44.

- [2] Gava, L.M.; Ramos, C.H.I. Human 90 kDa Heat Shock Protein Hsp90 as a Target for Cancer Therapeutics. *Curr. Chem. Biol.*, **2009**, *3*(1), 10-21.
- [3] Nicoletti, C.M.; Craig, E.A. Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **1989**, *9*, 3638-3646.
- [4] Chen, S.; Smith, D.F. Hop as an Adaptor in the Heat Shock Protein 70 (Hsp70) and Hsp90 Chaperone Machinery. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 35194-35200.
- [5] Johnson, D.B.; Schumacher, R.J.; Ross, E.D.; Toft, D.O. Hop Modulates hsp70/hsp90 Interactions in Protein Folding. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 3679-3686.
- [6] Smith, S.F. Tetratricopeptide repeat cochaperones in steroid receptor complexes. *Cell Stress Chaperones*, **2004**, *9*(2), 109-121.
- [7] Zanata, S.M.; Lopes, M.H.; Mercadante, A.F.; Hajj, G.N.; Chiarini, L.B.; Nomizo, R.; Freitas, A.R.; Cabral, A.L.; Lee, K.S.; Juliano, M.A.; de Oliveira, E.; Jachieri, S.G.; Burlingame, A.; Huang, L.; Linden, R.; Brentani, R.R.; Martins, V.R. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J.*, **2002**, *21*(13), 3307-3316.
- [8] Das, A.K.; Cohen, P.W.; Barford, D. The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J.*, **1998**, *17*(5), 1192-1199.
- [9] Blatch, G.L.; Lässle, M. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays*, **1999**, *21*(11), 932-939.
- [10] Carrigan, P.E.; Nelson, G.M.; Roberts, P.J.; Stoffer, J.; Riggs, D.L.; Smith, D.F. Multiple domains of the co-chaperone Hop are important for Hsp70 binding. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 16185-16193.
- [11] Odunuga, O.O.; Longshaw, V.M.; Blatch, G.L. Hop: more than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein. *Bioessays*, **2004**, *26*(10), 1058-1068.
- [12] Song, Y.; Marison, D.C. Independent regularization of Hsp70 and Hsp90 chaperones by Hsp70/Hsp90-organizing protein Sti1 (Hop1). *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 34178-34185.
- [13] Flom, G.; Behal, R.H.; Rosen, L.; Cole, D.G.; Johnson, J.L. Definition of the minimal fragments of Sti1 required for dimerization, interaction with Hsp70 and Hsp90 and *in vivo* functions. *Biochem. J.*, **2007**, *404*, 159-167.
- [14] Scheufler, C.; Brinker, A.; Bourenkov, S.; Pegoraro, L.; Moroder, L.; Bartunik, H.; Hartl, F.; Moarefi, I. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell*, **2000**, *101*(2), 199-210.
- [15] Onuoha, S.C.; Coulstock, E.T.; Grossman, J.G.; Jackson, S.E. Structural studies on the co-chaperone Hop and its complexes with Hsp90. *J. Mol. Biol.*, **2008**, *379*(4), 732-744.
- [16] Longshaw, V.M.; Stephens, L.L.; Daniel, S.; Blatch, G.L. The TPR2B domain of the Hsp70/Hsp90 organizing protein (Hop) may contribute towards its dimerization. *Prot. Pep. Lett.*, **2009**, *16*, 402-407.
- [17] Sambrook, J.; Russel, D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, **2001**.
- [18] Borges, J.C.; Fischer, H.; Craievich, A.F.; Hansen, L.D.; Ramos, C.H.I. Free human mitochondrial GrpE is a symmetric dimer in solution. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 35337-35344.
- [19] Corrêa, D.H.A.; Ramos, C.H.I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *Afr. J. Biochem.*, **2009**, *3*(5), 164-173.
- [20] Tiroli, A.O.; Ramos, C.H.I. Biochemical and biophysical characterization of small heat shock proteins from sugarcane. Involvement of a specific region located at the N-terminus with substrate specificity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2007**, *39*, 818-831.

- [21] Borges, J.C.; Ramos, C.H.I. Characterization of nucleotide-induced changes on the structure of human 70 kDa heat shock protein Hsp70.1 by analytical ultracentrifugation. *BMB Reports.*, **2009**, *42*,166-171.
- [22] Schägger, H.; Cramer, W.A.; von Jagow, G. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **1994**, *217*(2), 220-230.
- [23] Schägger, H.; von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, **1987**, *166*(2), 368-379.
- [24] Schägger, H.; von Jagow, G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.*, **1991**, *199*(2), 223-231.
- [25] Carrigan, P.E.; Sikkink, L.A.; Smith, D.F.; Ramirez-Alvarado, M. Domain:domain interactions within Hop, the Hsp70/Hsp90 organizing protein, are required for protein stability and structure. *Prot. Sc.*, **2006**, *15*, 522-532.
- [26] Cantor, C.R.; Schimmel, P.R. Size and shape of macromolecules. *Biophysical Chemistry; Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function*, W. H. Freeman and Company: New York, **1980**.
- [27] Prodromou, C.; Siligardi, G.; O'Brien, R.; Woolfson, D.N.; Regan, L.; Panaretou, B.; Ladbury, J.E.; Piper, P.W.; Pearl, L.H. Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *EMBO J.*, **1999**, *18*(3), 754-762.
- [28] van der Spuy, J.; Cheetham, M.E.; Dirr, H.W.; Blatch, G.L. The cochaperone murine stress-inducible protein 1: overexpression, purification, and characterization. *Protein Expr. Purif.*, **2001**, *21*(3), 462-469.

Received: October 19, 2009 Revised: November 16, 2009 Accepted: November 07, 2009

Anexo 2

Tabela 8: Categorias de processos biológicos mais recorrentes.

GO: Processo Biológico	Transcritos mais expressos	Transcritos menos expressos
Geração de metabólitos precursores e energia	ATP sintase subunidade epsilon, ATP sintase subunidade beta, PORB, PSAD1, PSAF, LHCB2.3, LHCB4.2, LHC1, LHCA4, LHCB5	
Resposta imune	ERF11, ERF4, WRKY40, NHL3	
Transcrição	ERF11, ERF4, WRKY33, WRKY40, STZ, SZF1, VSP1	LHY, MYB59, RAP2-3, CCA1
Resposta de defesa	ERF11, WRKY33, WRKY40, SZF, SYP122, VSP1, NHL3, CCR2, TGG1	HSP70, RCA
Estímulos endógenos	ERF11, ERF4, WRKY40, STZ, SZF1, PORB, SYP122, VSP1, TGG1	LHY, MYB59, GASA1, CCA1, DIN1, PIP2A
Estímulos químicos	ERF11, ERF4, WRKY40, STZ, SZF, PORB, GDSL esterase/lipase, SYP122, VSP1, CCR2, OPR3, TGG1, SAM2	LEA3, LHY, MYB59, GASA1, HSP70, HSP90, CCA1, PDX1.1, PDX1.3, NIT1, PIP2A
Estímulos bióticos	WRKY59, SYP122, VSP1, NHL3, OPR3,	HSP70, NIT1, RCA
Estímulos abióticos	STZ, GDSL esterase/lipase, VSP1, CCR2, LHCB2.3, LHCB4.2, LHC1, LHCB5, SAM2	LEA3, LHY, HSP70, HSP90, PIP1, PIP2A, PIP1B CCA1, PDX1.1, PDX1.3, RCA
Transporte	UCP5, SYP122, ATP sintase subunidade epsilon, ATP sintase subunidade beta, PUP14, CCR2, SCR2	PIP1, PIP2A, PIP1B
Regulação de processos biológicos	ERF11, ERF4, WRKY40, SYP122, CCR2, TGG1	LHY, MYB59, RCA
Organização de componentes celulares e biogênese	UCP5, SYP122, CCR2, SCR2	GASA1
Metabolismo de macromoléculas	CCR2, SAM2, GDSL, PORB, Subtilase, LHCB2.3, LHC1, LHCA4, TGG1	QQS, Amido sintase, HSP70, HSP90, DIN1, NIT1, Frutose bifosfato aldolase, SAMDC, oxigenase 2-oxoglutarato dependente, PDX1.1, PDX1.3, Pectina acetilesterase, EXGT

Anexo 3

Tabela 9: Descrição das proteínas contidas na Figura 27 (traduzido do banco de dados String 9.0).

HSP81-2	3702.AT5G56030.1-P	HSP81-2 (HEAT SHOCK PROTEIN 81-2); ligação de ATP; membro da família HSP90. Expressa em todos os tecidos e abundante no meristema apical da raiz, pólen e tapetum. Expressão não é induzida pelo calor, mas induzido pelo IAA e NaCl ; Chaperona molecular. Devido à sua associação com determinadas proteínas, tais como receptores hormonais e algumas classes de quinases, está implicada na transdução de sinal e desenvolvimento.
AT5G02490	3702.AT5G02490.1-P	HSP70;HSC70 (HEAT SHOCK COGNATE 70 kDa protein 2); FUNÇÕES: ligação de ATP; ENVOLVIDA: no enovelamento de proteínas, na resposta ao íon cádmio, na resposta ao calor, resposta a bactérias; LOCALIZADA: no citosol, na parede celular, membrana plasmática; EXPRESSA EM: 19 estruturas da planta; expressa durante: 9 fases de crescimento;
PETC	3702.AT4G03280.1-P	PETC (PHOTOSYNTHETIC ELECTRON TRANSFER C); transportador de elétrons, transferência de elétrons do complexo citocromo b6/f do fotossistema II; Codifica o Rieske FeS, centro do complexo citocromo b6f. O gene é expresso no caule, mas não na raiz. O mutante tem reduzido o transporte de elétrons em intensidades saturantes de luz e a atividade cíclica do Q é hipersensível a acidificação do lúmen tilacóides; Proteína essencial para fotoautotropismo. Confere resistência a danos foto-oxidativos, contribuindo para a dissipação térmica de energia luminosa e para a acidificação luminal (aumento de gradiente de pH).
PSAF	3702.AT1G31330.1-P	PSAF (photosystem I subunit F); Codifica a subunidade F do fotossistema I.; Participa na eficiência de transferência de elétrons da plastocianina para P700 (ou citocromo c553 em algas e cianobactérias).
HSP83	3702.AT5G52640.1-P	ATHSP90.1 (HEAT SHOCK PROTEIN 90.1); Ligação de ATP / ligação de proteínas desenoveladas; Codifica uma proteína de choque térmico AtHSP90.1 citosólica. AtHSP90.1 interage com proteínas de resistência a doenças e componentes de sinalização SGT1b RAR1 e é necessária para a resistência mediada por RPS2; Chaperone molecular. Devido à sua associação com determinadas proteínas, tais como receptores hormonais e algumas classes de quinases, está implicada na transdução de sinal e desenvolvimento.
LHCA3	3702.AT1G61520.1-P	LHCA3; clorofila ligação; PSI tipo III; proteína de ligação a clorofila a-b.
AT1G51400	3702.AT1G51400.1-P	Proteína de 5kDa do fotossistema II; FUNÇÕES: desconhecida; ENVOLVIDA EM: resposta à radiação UV-B, resposta à ferimento, resposta ao ozônio; LOCALIZADA: membrana tilacóide do cloroplasto, cloroplasto fotossistema II, cloroplasto lúmen dos tilacóides; expressa: 22 estruturas da planta; expressa durante: 13 estágios de crescimento; Melhor correspondência proteína Arabidopsis thaliana é PSBTN (fotossistema II subunidade T) (TAIR: AT3G21055.1);
PSBB	3702.ATCG00680.1-P	Proteína desconhecida; codifica a subunidade CP47, do centro de reação fotossistema II; um dos componentes do complexo de antena do fotossistema II. Ele se liga a clorofila e ajuda a catalisar processos fotoquímicos do fotossistema II
CAB6	3702.AT3G54890.1-P	LHCA1; ligação de clorofila; Codifica um componente do complexo de de captação de luz associado fotossistema I.
ATJ3	3702.AT3G44110.1-P	ATJ3; ligação de proteínas; homóloga à proteína co-chaperona DNAJ de E coli; têm um papel contínuo no desenvolvimento de plantas, provavelmente na organização estrutural dos compartimentos.
AT1G30070	3702.AT1G30070.1-P	Proteína com domínio SGS; função desconhecida; processo biológico desconhecido; LOCALIZADA EM: membrana plasmática, expressa em: 24 estruturas da planta; expressas durante: 13 estágios de crescimento; Chaperona semelhante a HSP20.
J2	3702.AT5G22060.1-P	ATJ2; ligação às proteínas; semelhante a co-chaperona DnaJ de E. coli; têm um papel contínuo no desenvolvimento das plantas, provavelmente, na organização estrutural dos compartimentos.
AT3G07090	3702.AT3G07090.1-P	Proteína desconhecida; expressa em 24 estruturas e 15 estágios de crescimento.
SGT1A	3702.AT4G23570.3-P	SGT1A; ligação de proteínas; estreitamente relacionada com a SGT1B, pode atuar na degradação proteica mediada por SCF(TIR1). AtSGT1a e AtSGT1b são funcionalmente redundantes na resistência a patógenos. AtSGT1b é mais

		expressa do que AtSGT1. AtSGT1a é induzida após infecção por patógenos e pode na resistência mediada por proteínas R.
TPR2	3702.AT3G16830.1-P	TPR2 (TOPLESS-RELATED 2); envolvida no desenvolvimento do caule, no meristema apical. LOCALIZADO EM: sistema endomembrane; expressa: 24 estruturas da planta; expressa durante: 13 estágios de crescimento;
SGT1B	3702.AT4G11260.1-P	SGT1B; ligação de proteínas; sinalização na resistência a doenças, degradação de proteínas Aux/IAA mediada por SCF (TiR1), e degradação de proteínas de resistência R mediada por HSP90. AtSGT1a e AtSGT1b são funcionalmente redundantes na resistência a patógenos. AtSGT1b é mais expressa que AtSGT1.
AT3G12050	3702.AT3G12050.1-P	Proteína com domínio Aha1; FUNÇÕES: ativadora da atividade ATPase da Hsp90; ENVOLVIDA EM: resposta ao estresse; LOCALIZADA EM: citoplasma; expressa: 24 estruturas da planta; expressas durante: 15 estágios de crescimento;
TPR1	3702.AT1G80490.2-P	TPR1 (TOPLESS-RELATED 1); envolvida no desenvolvimento do caule, pelo meristema apical
HSP81-3	3702.AT5G56010.1-P	HSP81-3; Ligação de ATP / ligação de proteínas desenoveladas, um membro da família HSP90. Expressa em todos os tecidos e abundante no meristema apical da raiz, pólen e tapetum. Expressão não é induzida pelo calor, mas por IAA e NaCl; Chaperona molecular. Devido à sua associação com determinadas proteínas, tais como receptores hormonais e algumas classes de quinases, está implicada na transdução de sinal e desenvolvimento.
PKS5	3702.AT2G30360.1-P	SIP4 (SOS3-INTERACTING PROTEIN 4); proteína quinase; codifica uma proteína quinase SOS2-like que é um membro da família quinase que interage com CBL. Mutantes de perda de função mostram uma diminuição da sensibilidade ao pH elevado. Fosforila AHA2, uma H + ATPase de membrana plasmática. Esta fosforilação parece regular a atividade do transportador de prótons;
CR88	3702.AT2G04030.1-P	CR88; Ligação de ATP; codifica uma Hsp90 de cloroplasto, envolvida na resposta a estilação mediada por luz vermelha. Mutantes resistentes à clorato, têm hipocótilo alongado na luz, e afeta a expressão de NR2, CAB, e RBCS mas não de NR1 e NIR.
ROF1	3702.AT3G25230.2-P	ROF1 (ROTAMASE FKBP 1); ligação de FK506 / ligação de calmodulina / peptidil-prolil cis-trans isomerase; codifica um membro de alta massa molecular da família de proteínas de ligação a FK506 (FKBP). Tem três domínios semelhantes a FKBP12, repetições de tetratricopeptídeos, e um domínio hipotético de ligação a calmodulina; Acelera o enovelamento de proteínas durante a síntese.
HSC70-5	3702.AT5G09590.1-P	MTHSC70-2 (MITOCHONDRIAL HSP70 2); ligação de ATP, chaperona da família Hsp70 mitocondrial.
ROF2	3702.AT5G48570.1-P	peptidil-prolil cis-trans isomerase, hipotética/proteína ligadora de FK506, hipotética/ligação de calmodulina; envolvida no enovelamento de proteínas, localizada no vacúolo, expressa durante 14 estágios de desenvolvimento em 25 estruturas; contém domínios TPR
ATHSFA1D	3702.AT1G32330.1-P	ATHSFA1D; ligação de DNA / fator de transcrição; membro da família de fatores de transcrição responsivos a choque térmico (HSF); regulador de transcrição que se liga especificamente seqüência de DNA 5'-AGAA _n TTCT-3' conhecidos como elementos de choque térmico (HSE).
PSAK	3702.AT1G30380.1-P	PSAK (photosystem I subunit K); subunidade K do centro de reação do fotossistema I.
PSAD1	3702.AT4G02770.1-P	PSAD-1 (photosystem I subunit D-1); centro de reação do fotossistema I, subunidade II; Pode formar complexos com a ferredoxina oxidoredutase no fotossistema I.
OEE2	3702.AT1G06680.1-P	PSBP-1 (PHOTOSYSTEM II SUBUNIT P-1); ligação de poli(U); codifica uma proteína parte do fotossistema II, que participa na regulação do desprendimento de oxigênio.
PSBO	3702.AT5G66570.1-P	PSBO1 (PS II OXYGEN-EVOLVING COMPLEX 1); ligação de poli(U); codifica uma proteína parte do fotossistema II, que possivelmente possui um papel central na estabilização do centro catalítico de manganês.
PSAG	3702.AT1G55670.1-P	PSAG (PHOTOSYSTEM I SUBUNIT G); Codifica a subunidade G do fotossistema I, uma proteína da membrana 11 kDa, que desempenha um papel importante no transporte de elétrons entre plastocianina e PSI e está envolvida na estabilidade do complexo PSI.
PSAL	3702.AT4G12800.1-P	PSAL (photosystem I subunit L); subunidade L do centro de reação do fotossistema I
ATHSFA2	3702.AT2G26150.1-P	ATHSFA2; ligação de DNA / fator de transcrição; membro da família de fatores de transcrição responsivos a choque térmico (HSF). Envolvida na resposta ao acúmulo de proteínas denaturadas no citosol. Ativador de transcrição que se

		liga especificamente seqüência de DNA 5'-AGAA ⁿ TTCT-3' conhecidos como elementos de choque térmico (HSE). Envolvidos na resposta ao estresse de calor. Parece estar envolvido em outras respostas a estresse ambiental. Ativa ascorbato peroxidase 2 (APX2), além de proteínas diversas de choque térmico (HSPs).
AT5G53400	3702.AT5G53400.1-P	Proteína semelhante a Hsp20; expressa em 24 estruturas, durante 15 estágios de desenvolvimento.
HSC70-3	3702.AT3G09440.1-P	HSC70-3; HSP70-3 (Heat shock cognate 70 kDa protein 3); ligação de ATP, enovelamento protéico, resposta ao calor.
PSAE1	3702.AT4G28750.1-P	PSAE-1 (PSA E1 KNOCKOUT); catálise; mutantes tem diminuição do rendimento das reações do fotossistema II.
HSP70	3702.AT3G12580.1-P	HSP70 (heat shock protein 70); ligação de ATP; localizada em: citosol, mitocôndria, parede celular, membrana plasmática.
RPM1	3702.AT3G07040.1-P	RPM1 (RESISTANCE TO P. SYRINGAE PV MACULICOLA 1); ligação de nucleotídeos / ligação de proteínas; confere resistência a <i>Pseudomonas syringae</i> .
HSP91	3702.AT1G79930.1-P	HSP91; ligação de ATP; expressa constitutivamente mas transientemente induzida por choque térmico.
PBS2	3702.AT5G51700.1-P	PBS2 (PPHB SUSCEPTIBLE 2); ligação de proteínas / ligação de íon zinco; codifica uma proteína sinalizadora de resistência com dois domínios de ligação a zinco (CHORD), altamente conservado entre eucariotos.
ART1	3702.AT1G79040.1-P	PSBR (photosystem II subunit R); codifica uma subunidade do fotossistema II. Participa da montagem do fotossistema II, particularmente do complexo de desprendimento de oxigênio.
PSAD2	3702.AT1G03130.1-P	PSAD-2 (photosystem I subunit D-2); centro de reação do fotossistema I.

Anexo 4

Tabela 10: Descrição das proteínas contidas na Figura 28 (traduzido do banco de dados String 9.0).

ERF11	3702.AT1G28370.1-P	ERF11 (ERF DOMAIN PROTEIN 11); ligação de DNA/fator de transcrição/repressão da transcrição; codifica um membro da família ERF (fator de transcrição responsivo a etileno) subfamília B-1. Possui domínio AP2. Envolvida na regulação da expressão gênica por fatores de estresse e vias de transdução de sinal de estresse.
AT5G18470	3702.AT5G18470.1-P	Proteína de ligação a lectina; atua na ligação de açúcares; localizada na parede celular.
SYP122	3702.AT3G52400.1-P	SYP122 (SYNTAXIN OF PLANTS 122); proteína syntaxina, envolvida na regulação negativa de vias de defesa, como morte celular, via do ácido salicílico e ácido jasmônico.
WRKY40	3702.AT1G80840.1-P	WRKY40; fator de transcrição induzido por patógeno. A co-expressão de WRKY18 ou WRKY60 faz com que as plantas fiquem mais suscetíveis a infecção por <i>P. syringae</i> e <i>B. cinerea</i> .
CMPG2	3702.AT5G64660.1-P	Proteína com domínio U-box; proteína ubiquitina, atividade ligase. Possui domínios <i>zinc finger</i> (dedos de zinco) e <i>armadillo-like helical</i> .
GUN5	3702.AT5G13630.1-P	GUN5 (GENOMES UNCOUPLED 5); envolvida na transdução de sinal cloroplasto-núcleo.
ERF2	3702.AT5G47220.1-P	ERF2 (ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 2); ligação de DNA/ativador da transcrição/fator de transcrição. Atua na regulação da expressão gênica por fatores de estresse e componentes de vias de transdução de sinal de estresse. Envolvida em vias de resistência a doenças.
SYR1	3702.AT3G11820.1-P	SYP121 (SYNTAXIN OF PLANTS 121); syntaxina de plantas; codifica uma syntaxina localizada na membrana plasmática. Envolvida na sinalização celular, tráfego de vesicular, crescimento e desenvolvimento.
STZ	3702.AT1G27730.1-P	STZ (salt tolerance zinc finger); ligação de ácidos nucleicos/fator de transcrição/repressor de transcrição/ligação de íon zinco. Localizada no núcleo, age como repressor transcricional e também responde a estresse foto-oxidativo.
DIC2	3702.AT4G24570.1-P	Proteína da família de carreadores de substrates mitocondriais; localizado na membrana interna da mitocôndria.
AT2G22880	3702.AT2G22880.1-P	Proteína com motivo VQ; localizada no cloroplasto.
RHL41	3702.AT5G59820.1-P	RHL41 (RESPONSIVE TO HIGH LIGHT 41); ligação de ácidos nucleicos/fator de transcrição/ligação de íon zinco. Envolvida na aclimação ao frio e luz intensa.
AT3G56880	3702.AT3G56880.1-P	Proteína com motivo VQ; proteína ligadora de calmodulina.
GATL10	3702.AT3G28340.1-P	GATL10 (Galacturonosyltransferase-like 10); proteína semelhante a galacturanosil transferase 10.
WRKY18	3702.AT4G31800.1-P	WRKY18; fator de transcrição induzido por patógeno. A co-expressão de WRKY18 ou WRKY60 faz com que as plantas fiquem mais suscetíveis a infecção por <i>P. syringae</i> e <i>B. cinerea</i> .
AT5G35735	3702.AT5G35735.1-P	Proteína responsiva à auxina; localizada na membrana plasmática.
WRKY60	3702.AT2G25000.1-P	WRKY60; fator de transcrição induzido por patógeno. A co-expressão de WRKY18 ou WRKY60 faz com que as plantas fiquem mais suscetíveis a infecção por <i>P. syringae</i> e <i>B. cinerea</i> .
AT5G22250	3702.AT5G22250.1-P	CCR4-NOT; fator de transcrição/ atividade ribonuclease/ligação de ácido nucleico/modificação de RNA.
SNAP33	3702.AT5G61210.1-P	SNAP33 (SOLUBLE N-ETHYLMALIMIDE-SENSITIVE FACTOR ADAPTOR PROTEIN 33); proteína envolvida na citocinese, tráfego de vesículas e processos de fusão de membrana.
NHL3	3702.AT5G06320.1-P	NHL3; semelhante à proteína HIN1 de tabaco e NDR1 de <i>Arabidopsis</i> . A expressão deste gene é induzida por <i>Pseudomonas syringae</i> e vírus do mosaico da cebola.
WRKY46	3702.AT2G46400.1-P	WRKY46; fator de transcrição.