

**Importância da região amino-terminal da proteína  
RoIA de *Agrobacterium rhizogenes* em sua  
atividade biológica**

**The importance of the amino-terminal region of  
*Agrobacterium rhizogenes* RoIA protein in its  
biological activity**

**Leila M.G. Barros**

**Roberto T. Arrial**

**Tiê Acauã**

**Juliana D. Almeida**

**Mauro Carneiro**

### **Resumo:**

A proteína RoIA é originária de *Agrobacterium rhizogenes*, uma bactéria fitopatogênica que provoca a doença conhecida como raiz em cabeleira (“hairy root”). RoIA atua no processo de infecção, sendo codificada no T-DNA do plasmídeo Ri da agrobactéria. Embora a expressão de RoIA em plantas implique em severas alterações morfológicas e fisiológicas, seu mecanismo de ação é desconhecido. A identificação da região de RoIA responsável pela sua função e sua localização subcelular são dados importantes na elucidação de seu papel biológico. Com o objetivo de abordar esta questão, foram feitas fusões tradicionais da região codificadora de RoIA completa e truncada com a região codificadora da enzima  $\beta$ -glucuronidase, sob regulação do promotor CaMV35S. Plantas de fumo transformadas com essas fusões tradicionais revelam que a proteína quimérica contendo a RoIA completa (RoIA<sub>(100)</sub>::Gus) é capaz de induzir o fenótipo roIA característico. As plantas expressando a fusão protéica onde

apenas os 60 primeiros resíduos de aminoácidos de RolA estão presentes (RolA<sub>(N-60)</sub>::Gus) apresentam o fenótipo rolA atenuado em relação à proteína completa. O menor segmento de RolA capaz de induzir alguma alteração morfológica é aquele que apresenta os 37 primeiros resíduos de aminoácidos (RolA<sub>(N-37)</sub>::Gus) que, em algumas plantas de fumo, induz a um discreto enrugamento foliar. Quando apenas os 63 resíduos de aminoácidos da região C-terminal de RolA estão presentes (RolA<sub>(C-63)</sub>::Gus), as plantas transgênicas não apresentam qualquer alteração morfológica. O fato da proteína RolA<sub>(N-60)</sub>::Gus induzir fenótipo rolA atenuado, poderia ser explicado pela ausência dos 40 resíduos de aminoácidos da região C-terminal, ou pelo menor acúmulo da proteína em relação a RolA<sub>(100)</sub>::Gus, ou ambos os fatos. A região N-terminal de RolA é extremamente conservada quando comparada a três outras proteínas RolA provenientes de cepas diferentes de *A. rhizogenes*, apresentando estrutura secundária em conformação  $\alpha$ -hélice, compatível com motivos transmembrânicos. Todas as

proteínas quiméricas RolA::Gus apresentam a  $\beta$ -glucuronidase ativa, o que torna viáveis os ensaios citoquímicos visando sua localização subcelular. Estes resultados sugerem que a porção N-terminal de RolA tem importante papel em sua função biológica.

### **Abstract:**

RolA is a protein found in *Agrobacterium rhizogenes*, a plant pathogen that triggers a disease known as hairy root. RolA is codified by the T-DNA region of *A. rhizogenes* Ri plasmid, and acts in the infection process. Although RolA expression in plants results in severe morphological and physiological alterations, its mechanism of action is still unknown. The identification of the RolA region responsible for its biological activity and subcellular localization are important data in the elucidation of its biological role. In order to study this question, translational fusions were made with the full length *rolA* coding region, as well as with different portions of the protein fused to the  $\beta$ -glucuronidase coding region, under the CaMV35S promoter control. Tobacco plants transformed with those translational

fusions revealed that the chimeric protein containing the full length RolA (RolA<sub>(100)</sub>::Gus) is able to induce the characteristic rolA phenotype. Transgenic plants containing the first 60 RolA amino acid residues only (RolA<sub>(N-60)</sub>::Gus) present the rolA phenotype, although in an attenuated manner when compared to the full length RolA. The smaller RolA portion able to induce morphological alterations corresponds to the first 37 amino acids residues (RolA<sub>(N-37)</sub>::Gus) which induces a discrete wrinkle in leaves of some tobacco plants. When only the 64 amino acid residues of the C-terminal region are present (RolA<sub>(C-64)</sub>::Gus), transformed plants do not show any morphological alteration. The attenuated phenotype observed in the plants expressing the chimeric protein RolA<sub>(N-60)</sub>::Gus could be explained by the lack of the 40 C-terminal amino acids residues, or due less protein accumulated in comparison to the entire RolA (RolA<sub>(100)</sub>::Gus), or both. The RolA N-terminal region is highly conserved when compared to three other RolA proteins from different *A. rhizogenes* strains, showing a secondary

structure in  $\alpha$ -helix conformation, compatible to transmembrane motifs. Since  $\beta$ -glucuronidase enzymatic activity of all chimeric proteins was preserved, citochemistry assays are viable for determination of RolA subcellular localization. These results together suggest that the RolA N-terminal portion have an important role in its biological function.

### **Introdução:**

A proteína RolA é originalmente codificada pela *Agrobacterium rhizogenes*, uma bactéria que habita os solos, baciliforme, Gram-negativa, patógeno natural de uma grande variedade de plantas dicotiledôneas. Quando infectada por *A. rhizogenes* a planta desenvolve raízes no sítio de infecção, doença conhecida como raiz em cabeleira ("hairy root"). Essas raízes podem ser cultivadas *in vitro* na ausência de reguladores de crescimento e regenerar plantas, cuja morfologia é alterada (TEPFER, 1984). Quatro dos genes responsáveis pela indução das raízes e alteração morfológica nas plantas foram denominados de *rolA*, *rolB*, *rolC* e *rolD*, estando localizados

no plasmídeo agrobacteriano Ri (root inducing) na região conhecida como T-DNA (transfer DNA) no *locus rol* (root iocus) (WHITE et al., 1985; revisão BARROS et al., 2004).

O gene *rolA* quando isolado e expresso em plantas provoca alterações tais como: nanismo, enrugamento foliar, atraso no florescimento e na senescência e redução do conteúdo de giberelina e poliaminas (DEHIO et al., 1993; BEN-HAYYIM et al., 1996). A proteína RolA, deduzida a partir da seqüência codificadora do seu gene, possui 100 resíduos de aminoácidos com massa molecular estimada em torno de 11,4 kDa e pI 11,2 (LEVESQUE et al., 1988). Embora a proteína RolA provoque profunda modificação no programa de desenvolvimento das plantas, sua função biológica é desconhecida, ainda não foi possível sua identificação em tecidos vegetais e não apresenta similaridade com nenhuma proteína conhecida (RIGDEN e CARNEIRO, 1999). No entanto, encontra-se na literatura duas hipóteses para explicar a função de RolA. A primeira propõe que RolA teria função de regulador gênico (LEVESQUE et al., 1988;

RIGDEN e CARNEIRO, 1999) e a segunda que estaria associada a membrana plasmática (VANSUYT et al., 1992; VILAINE et al., 1998).

O objetivo do presente trabalho é identificar a região da proteína RolA determinante de sua função biológica. Inicialmente, foram feitas análises *in silico* do padrão de hidrofobicidade para definir as regiões de RolA que seriam investigadas (BARROS, 2003). A proteína RolA completa e várias versões truncadas foram fusionadas à região codificadora da proteína repórter  $\beta$ -glucuronidase (Gus), gerando seis distintas proteínas de fusão RolA::Gus. Essas construções foram expressas em plantas de fumo e analisadas quanto à expressão dos genes quiméricos e sua interferência no fenótipo da planta.

Experimentos de Northern blot mostram que os mRNAs das fusões tradicionais são expressos corretamente nas plantas transgênicas. Ensaio histoquímico revelam que Gus é ativa em todas as fusões. A fusão com a proteína RolA intacta induz o fenótipo rolA típico evidenciando a bi-funcionalidade da proteína quimérica. Foi observado que os 60

primeiros aminoácidos da proteína RolA induz alterações morfológicas típicas do gene *rolA* mas em menor intensidade quando comparados com a proteína RolA completa. A menor porção de RolA capaz de induzir alguma alteração morfológica é aquele que apresenta os 37 primeiros resíduos de aminoácidos (RolA<sub>(N-37)::Gus</sub>) que, em algumas plantas de fumo, induz a um discreto enrugamento foliar. Em contraste, os 63 resíduos de aminoácidos do C-terminal não induzem qualquer alteração fenotípica. Ensaio *in silico* mostram que o N-terminal é extremamente conservado quando comparado com outras RolA provenientes de cepas diferentes de *A. rhizogenes*, apresentando estrutura secundária helicoidal compatível com motivos transmembrânicos. Estes resultados sugerem que a porção N-terminal de RolA tem importante papel em sua função biológica.

## Material e Métodos

### *Construção das Fusões*

#### *Traducionais*

A região codificadora completa do gene *rolA* e seus

segmentos foram obtidos por PCR, tendo como molde o gene *rolA* de *A. rhizogenes* linhagem A4, clonado no cosmídeo pLJ.1 (JOUANIN, 1984). Os iniciadores utilizados nas reações contêm um sítio de restrição da enzima *Bam*HI em uma das extremidades, para facilitar a clonagem do fragmento amplificado no vetor pBI221, gerando as fusões tradicionais com a região codificadora do gene *uidA* (*gus*) (JEFFERSON et al., 1987). Os vetores obtidos, denominados de pBIS, foram seqüenciados para confirmação do inserto. Os fragmentos correspondentes à fusão da região codificadora de *rolA* completa ou deletada com a região codificadora do gene *gus* (*rolA::gus*) foram então retirados dos vetores pBIS através da digestão com as enzimas *Xba* I e *Eco*RI e introduzidos no vetor binário pBI121 (JEFFERSON et al., 1987) à jusante do promotor CaMV35S (ODELL et al., 1985), substituindo a região codificadora *gus* original. O pBI121 confere às células eucarióticas, resistência a canamicina. A troca do fragmento *gus* pelos fragmentos contendo as fusões *rolA::gus* resultou nos plasmídeos

denominados de pBRAG<sub>(100)</sub>, pBRAG<sub>(N-60)</sub>, pBRAG<sub>(N-37)</sub>, pBRAG<sub>(N-34)</sub>, pBRAG<sub>(N-31)</sub>, e pBRAG<sub>(C-63)</sub>. Entre parênteses as letras N e C representam as regiões amino e o carboxi terminais de RolA respectivamente e os números os resíduos de aminácidos de RolA. Finalmente os plasmídeos pBRAG foram introduzidos em células de *A. tumefaciens* linhagem GV3101 (C58pMP90) (KONCZ e SCHELL, 1986) por eletroporação. A presença de cada plasmídeo pBRAG nas agrobactérias foi diagnosticada por meio da técnica de hibridização de colônias, onde a região codificadora de *rolA* marcada com  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP foi utilizada como sonda segundo técnicas descritas por Sambrook e et al. (1989).

#### *Transformação genética de plantas de fumo via A. tumefaciens*

Segmentos foliares de plantas de fumo, *Nicotiana tabacum* cv Xanthi, linhagem XHFD8 (GRANDBASTIEN, 1983) foram co-cultivados com *A. tumefaciens* contendo os plasmídeos pBRAG. As plantas transgênicas regeneradas, resistentes a canamicina foram denominadas TRAG(100), TRAG(N-

60), TRAG(N-37), TRAG(N-34), TRAG(N-31) e TRAG(C-64) de acordo com a nomenclatura dos plasmídeos. Plantas regeneradas não transformadas foram denominadas TCON. Todas as plantas obtidas foram transferidas para casa de vegetação e cultivadas visando a obtenção de sementes (T1).

#### *Análises Fenotípicas*

Sementes de seis transformantes independentes de cada construção (TRAG) e de planta selvagem (TCON) da geração T1 foram desinfetadas em etanol 50% durante 5 minutos, seguido de hipoclorito de sódio 1% por 40 minutos e finalmente lavadas 3 vezes em água estéril. As sementes foram inoculadas em placas de Petri contendo meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescido de sacarose 3%, agar 0,6% e canamicina 100 mg/L. As placas foram colocadas em sala de cultura a  $26^{\circ}\text{C} \pm 2$  e 16 horas de luz. Após seis semanas as plantas foram transferidas para solo e cultivadas em casa de vegetação onde foram realizadas as análises fenotípicas. Dessas plantas foi coletado material

para os ensaios de Northern blot e para os ensaios histoquímicos.

### *Ensaio in silico*

A seqüência de aminoácidos da proteína RolA utilizada neste trabalho, a qual é codificada pelo plasmídeo RiA4 (NCBI GI: 38984) (SINKAR et al, 1988) foi submetida a nove programas *online* de predição de estrutura secundária: GOR IV (GARNIER et al., 1996), HNN (GUERMEUR, 1997), JPRED (CUFF et al., 1998), NNPRELECT (KNELLER, 1990), PROF (OUALI e KING, 2000), PSIPRED (BRYSON et al., 2005), SOPMA (GEOURJON e DELEAGE 1995), SSSPRO4.0 (CHENG et al., 2005) e DPM (DELEAGE e ROUX, 1987). Em seguida foi realizado um consenso manual da estrutura secundária, por concordância da maioria dos programas e sentido biológico, segundo Baxevanis e Ouellette (2001). As proteínas RolA de diferentes cepas de *A. rhizogenes* ou seja, pRi1724 (NCBI GI: 75491534) (TANAKA et al., 1994), pRi8196 (NCBI GI: 142246) (HANSEN et al., 1991), e pRi2659 (NCBI GI:75346265) (SERINO et al, 1994) foram alinhadas com a RolA desse

trabalho, utilizando-se o programa *online* ClustalW (HIGGINS et al., 1994), e previsto suas estruturas secundárias com o programa *online* PSIPRED (BRYSON et al., 2005).

### **Resultados e Discussão:**

#### *As fusões traducionais rolA::gus*

Estudos *in silico* do perfil de hidrofobicidade da proteína RolA revelaram que seu N-terminal apresenta uma região hidrofóbica composta de 26 resíduos de aminoácidos, seguida de uma região básica composta de 11 resíduos de aminoácidos (figura 1). O restante da proteína não apresentou nenhuma peculiaridade (BARROS et al., 2004). Com base nesses resultados foram definidas as regiões de RolA que seriam estudadas. A figura 1 esquematiza os vetores gerados para expressar em planta as proteínas quiméricas onde a RolA completa ou truncada está fusionada a enzima Gus. A proteína de fusão RolA<sub>(100)</sub>::Gus [vetor pBRAG(100)] é composta pela proteína RolA completa fusionada à enzima Gus; a proteína RolA<sub>(N-60)</sub>::Gus [vetor pBRAG(N-60)] apresenta os 60 primeiros aminoácidos da proteína RolA, que corresponde a região

hidrofóbica e região básica mais 23 resíduos de aminoácidos, fusionada a Gus; a proteína RolA<sub>(N-37)::Gus</sub> [vetor pBRAG(N-37)] apresenta os primeiros 37 resíduos de aminoácidos da proteína RolA, que corresponde a região hidrofóbica e região básica; As fusões RolA<sub>(N-34)::Gus</sub> e RolA<sub>(N-31)::Gus</sub> [vetores pBRAG(N-34) e pBRAG(N-31)] contêm, respectivamente, os primeiros 34 e 31 resíduos de aminoácidos da proteína RolA fusionados a proteína Gus, correspondendo a região hidrofóbica completa e a região básica com menos 3 e menos 6 resíduos de aminoácidos respectivamente. E finalmente, a fusão RolA<sub>(C-63)::Gus</sub> [vetor pBRAG(C-63)] contém os últimos 63 resíduos de aminoácidos da proteína RolA adicionado do aminoácido metionina na posição +1 fusionados a enzima Gus (Figura 1).

#### *Fenótipo das plantas transgênicas*

Plantas de fumo transformadas com os vetores pBRAG e TGUS estão apresentadas na Figura 2. Seis plantas transformadas de cada construção, da geração T1, foram cultivadas em casa de vegetação para análises

fenotípicas. Plantas de fumo expressando a proteína de fusão RolA<sub>(100)::Gus</sub> [TRAG(100)] apresentam fenótipo característico de plantas rolA: baixo porte, enrugamento foliar, atraso na floração e na senescência, sendo que a intensidade desses sintomas variam muito de planta para planta. Observa-se que os sintomas são correlacionados, isto é, quanto mais enrugadas as folhas, menor é o tamanho e maior é o atraso no florescimento e na senescência. Plantas expressando a proteína RolA<sub>(N-60)::Gus</sub> [TRAG(N-60)] apresentam fenótipo rolA atenuado em relação às plantas TRAG(100). Das seis plantas expressando a proteína RolA<sub>(N-37)::Gus</sub> [TRAG(N-37)] duas delas apresentam apenas um discreto enrugamento foliar, enquanto as outras quatro não apresentam qualquer sintoma. As outras plantas expressando as fusões RolA<sub>(N-34)::Gus</sub> [TRAG(N-34)], RolA<sub>(N-31)::Gus</sub> [TRAG(N-31)], RolA<sub>(C-63)::Gus</sub> [TRAG(C-63)] e o vetor pBI121 (TGUS) não apresentam alteração morfológica, o fenótipo é idêntico ao das plantas não transformadas (TCON) (Figura 2). Deste modo evidencia-se a



importância do N-terminal de RolA na indução das alterações fenotípicas.

#### *Análise da expressão das fusões traducionais*

O Northern blot (dados não apresentados) revela que os genes exógenos foram transcritos de maneira correta, tendo o mRNA da fusão RolA<sub>(100)</sub>::Gus (planta TRAG(100)) aproximadamente 2,6 Kb e o mRNA de Gus nativa (planta TGUS) aproximadamente 2,3 Kb coincidindo com o tamanho previamente publicado (BARROS et al., 2003). Todos os outros mRNAs possuem entre 2,6 e 2,3 Kb, comportando-se de acordo com o esperado.

Os ensaios histoquímicos para detecção da enzima Gus realizados em três plantas (TRAG) de cada construção, mostram que todas as fusões protéicas RolA::Gus geradas apresentam atividade Gus, demonstrando que a fusão de Gus com a RolA não comprometeu a atividade de Gus (Figura 3). Ensaios enzimáticos fluorimétricos quantitativos anteriores revelaram que a atividade específica de Gus é até cinquenta vezes maior na fusão

RolA<sub>(100)</sub>::Gus quando comparado com a atividade específica de Gus nativa e que as fusões RolA<sub>(N-37)</sub>::Gus e RolA<sub>(C-63)</sub>::Gus apresentam uma atividade específica aumentada em torno de 10 vezes maior que a de Gus nativa (BARROS et al., 2003). No mesmo trabalho mostramos que o incremento da atividade específica de Gus na fusão RolA<sub>(100)</sub>::Gus é devido a um acúmulo da proteína em torno de 36 vezes maior que Gus nativa. Novos ensaios fluorimétricos deverão ser executados incluindo a fusão RolA<sub>(N-60)</sub>::Gus para que possamos definir se o fenótipo rolA atenuado observado nas plantas é decorrência da quantidade menor de proteína, ou da ausência dos 40 aminoácidos do C-terminal, ou se ambos os fatos estão correlacionados.

#### *Ensaios in silico*

O alinhamento da proteína RolA em estudo com outras três provenientes de cepas distintas de *A. rhizogenes* revelou uma alta similaridade na região N-terminal e grande variabilidade no C-terminal (Figura 4). Embora a RolA proveniente do plasmídeo pRi8196 possua um segmento adicional em

seu N-terminal, que não encontra equivalência com as outras três seqüências, a identidade no N-terminal após esta região é alta em relação a todas as outras RolA. Nove programas de previsão de estrutura secundária disponíveis na Internet foram consensuais ao previrem uma estrutura  $\alpha$ -hélice no N-terminal de RolA (Figura 5), enquanto que os programas TMHMM (KROGH et al., 2001), TMPRED (HOFMANN e STOFFEL, 1993) PHOBIUS (KÄLL et al., 2004) e CONPRED II (ARAI et al., 2004) previram nesta mesma região um motivo transmembrânico (dado não apresentado).

### Conclusões

As fusões traducionais (RolA::Gus) geradas neste trabalho possibilitam concluir que o N-terminal de RolA é importante para sua atividade biológica. Foi visto que embora a proteína RolA possua 100 resíduos de aminoácidos uma RolA truncada contendo apenas os primeiros 60 resíduos é capaz de induzir, em plantas de fumo, o fenótipo rolA de modo atenuado, quando comparado a RolA completa. Mesmo a fusão RolA<sub>(N-37)</sub>::Gus onde

a proteína RolA possui apenas os 37 primeiros resíduos de aminoácidos foi observado em duas plantas do total de seis um leve enrugamento nas folhas sem apresentar os outros sintomas. Em contraste, os 63 resíduos de aminoácidos do C-terminal na proteína RolA<sub>(C-63)</sub>::Gus, não são capazes de induzir qualquer alteração morfológica. Ensaio *in silico* mostram que o N-terminal de quatro proteínas RolA possuem grande identidade enquanto que no C-terminal a similaridade é reduzida. Também *in silico* foi prevista uma estrutura secundária do N-terminal do tipo  $\alpha$ -hélice compatível com motivos transmembrânicos. Portanto, os resultados sugerem que o N-terminal de RolA tem importante papel na sua atividade. O fato de Gus estar ativa em todas as proteínas quiméricas (RolA::Gus) possibilita a realização de ensaios citoquímicos e imunocitoquímicos de localização subcelular, resultados estes que possibilitarão dar um grande passo rumo ao entendimento do papel de RolA tanto na indução das alterações morfológicas em plantas transgênicas, quanto no seu papel na interação planta-patógeno.

## Referências Bibliográficas

ARAI, M.; MITSUKE, H.; IKEDA, M.; XIA, J. X.; KIKUCHI, T.; SATAKE, M.; SHIMIZU, T. ConPred II: a consensus prediction method for obtaining transmembrane topology models with high reliability. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, p. 390-393, 2004.

BARROS, L. M. G. **Estudos moleculares da proteína RolA de *Agrobacterium rhizogenes* em plantas de *Nicotiana tabacum***. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular. Brasília, 2003.

BARROS, L. M. G.; CURTIS, R. H.; VIANA, A. A. B.; CAMPOS, L.; CARNEIRO, M. Fused RolA protein enhances  $\beta$ -glucuronidase activity 50-fold: implication for RolA mechanism of action. **Protein and Peptide Letters**, v. 10, n. 3, p. 303-311, 2003.

BARROS, L. M. G.; VIANA, A. A. B.; CARNEIRO, M. Aprendendo com as Agrobactérias: das plantas transgênicas aos mecanismos de crescimento e desenvolvimento vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 32, p. 15-27, 2004.

BAXEVANIS, A. D.; OUELLETTE, B. F. F. **Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins**. New York: John Wiley and Sons, 2001.

BEN-HAYYIM, G.; MARTIN-TANGUY, J.; TEPFER, D. Changing

root and shoot architecture with the *rolA* gene from *Agrobacterium rhizogenes*: Interactions with gibberellic acid and polyamine metabolism. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, Denmark, v. 96, p. 237-243, 1996.

BRYSON, K.; MCGUFFIN, L. J.; MARSDEN, R. L.; WARD, J. J.; SODHI, J. S.; JONES, D. T. Protein structure prediction servers at University College London. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, Web Server issue, p.W36-38, 2005.

CHENG, J.; RANDALL, A.; SWEREDOSKI, M.; BALDI, P. SCRATCH: a Protein Structure and Structural Feature Prediction Server. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, Web Server Issue, p. 72-76, 2005.

CUFF, J. A.; CLAMP, M. E.; SIDDIQUI, A. S.; FINLAY, M.; BARTON, G. J. Jpred: A Consensus Secondary Structure Prediction Server. **Bioinformatics**, Oxford, v. 14, p. 892-893, 1998.

DEHIO, C.; GROSSMANN, K.; SCHELL, J.; SCHMÜLLING, T. Phenotype and hormonal status of transgenic tobacco plants overexpressing the *rolA* gene of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, Netherlands, v. 23, p. 1199-1210, 1993.

DELEAGE, G.; ROUX, B. An algorithm for protein secondary structure prediction based on class

prediction. **Protein Engineering**, Oxford, v. 1, n. 4, p. 289-294, 1987.

GARNIER, J.; GIBRAT, J. F.; ROBSON, B. GOR secondary structure prediction method version IV. **Methods in Enzymology**, San Diego, USA, v. 266, p.540-553, 1996.

GEOURJON, C.; DELEAGE, G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. **Computer Applications in the Biosciences**, v. 11, n. 6, p. 681-684, 1995.

GRANDBASTIEN, M. A. **Etude d'un marqueur de génétique cellulaire, la résistance à la valine: optimisation dès conditions de mutagenèse et de selection à partir de protoplasts de mésophylle de tabac (Nicotiana tabacum cv Xanthi)**. 1983. Thèse (Docteur) – Ingénieur en Sciences Agronomiques. Laboratoire de Biologie Cellulaire – CNRA. Versailles, France.

GUERMEUR, Y. **Combinaison de classifieurs statistiques, Application a la prediction de structure secondaire des proteines**. 1997. Tese (PhD) – University of Paris 6, Paris, France.

HANSEN, G.; LARRIBE, M.; VAUBERT, D.; TEMPE, J.; BIERMANN, B. J.; MONTROYA, A. L.; CHILTON, M. D.; BREVET, J. *Agrobacterium rhizogenes* pRi8196 T-DNA: mapping and DNA sequence of functions involved in mannopine

synthesis and hairy root differentiation. **PNAS USA**, v. 88, n. 17, p. 7763-7767, 1991.

HIGGINS, D.; THOMPSON, J.; GIBSON, T.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

HOFMANN, K.; STOFFEL, W. TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 374, p. 166, 1993.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusion:  $\beta$ -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, Basingstoke, UK., v. 6, p. 3901-3907, 1987b.

JOUANIN, L. Restriction map of an agropine-type Ri plasmid and its homologies with Ti plasmids. **Plasmid**, New York, v. 12:91-102. (1984).

KÄLL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E. L. L. A. Combined Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Method. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, Netherlands, v. 338, n. 5, p. 1027-1036, 2004.

KNELLER, D. G.; COHEN, F. E.; LANGRIDGE, R. Improvements in Protein Secondary Structure Prediction by an Enhanced Neural Network. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, Netherlands, v. 214, p. 171-182, 1990.

KONCZ, C.; SCHELL, J. The promoter of TL-DNA *gene5* controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. **Molecular Genetics and Genomics**, Heidelberg, Germany, v. 204, p. 383-396, 1986.

KROGH, A.; LARSSON, B.; HEIJNE, G. von; SONNHAMMER, E. L. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, Netherlands, v. 305, n. 3, p. 567-580, 2001.

LEVESQUE, H.; DELEPELAIRE, P.; ROUZE, P.; SLIGHTOM, J.; TEPFER, D. Common evolutionary origin of the central portions of the Ri TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* and the Ti T-DNAs of *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, Netherlands, v. 11, p. 731-744, 1988.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, Denmark, v. 15, p. 473-497, 1962.

ODELL, J. T.; NAGY, F.; CHUA, N. H. Identification of DNA sequences

required for the activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. **Nature**, London, n. 313, p. 810-812, 1985.

OUALI, M.; KING, R. D. Cascaded multiple classifiers for secondary structure prediction. **Prot., Sci**, v. 9, p. 1162-1176, 2000.

RIGDEN, D. J.; CARNEIRO, M. A structural model for the RolA protein and its interaction with DNA. **Proteins: Structure, Functions, and Genetics**, v. 37, p. 697-708, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SERINO, G.; CLEROT, D.; BREVET, J.; COSTANTINO, P.; CARDARELLI, M. *rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes* cucumopine strain: sequence, effects and pattern of expression. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, Netherlands, v. 26, n. 1, p. 415-422, 1994.

SINKAR, V. P.; PYTHOUD, F.; WHITE, F. F.; NESTER, E. W.; GORDON, M. P. *rolA* locus of the Ri plasmid directs developmental abnormalities in transgenic tobacco plants. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor, USA, v. 2, n. 6, p. 688-697, 1988.

TANAKA, N.; IKEDA, T.; OKA, A. Nucleotide sequence of the *rol* region of the mikimopine-type root-inducing plasmid pRi1724. **Bioscience, Biotechnology and**

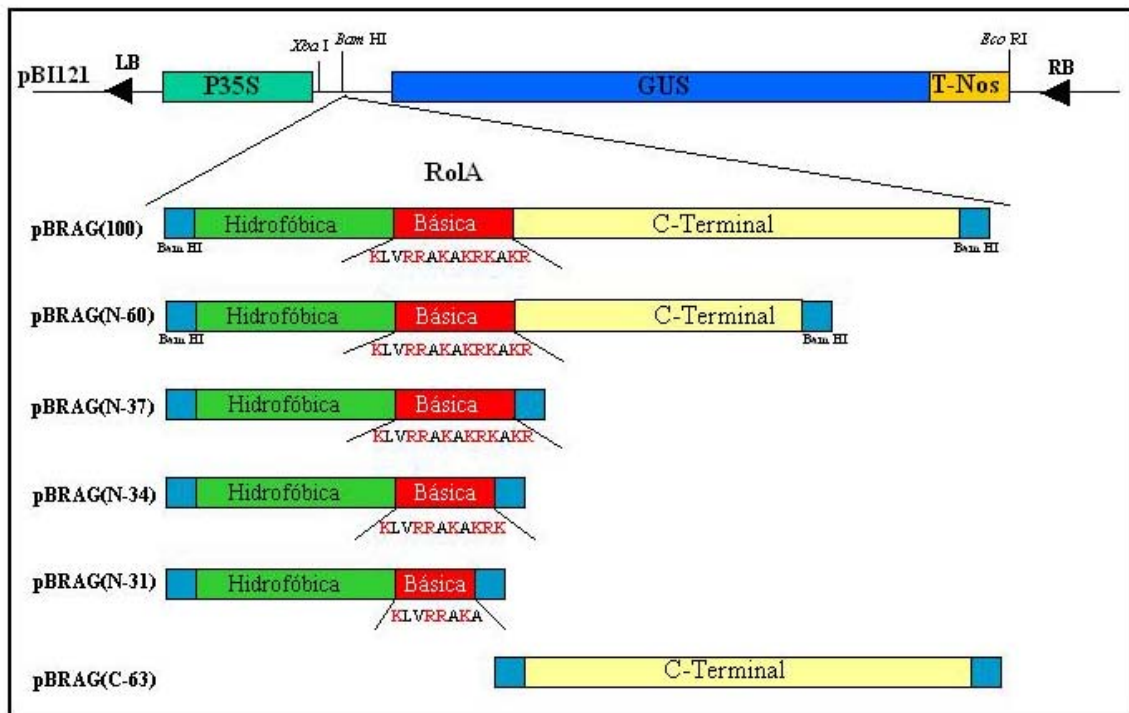
**Biochemistry**, v. 58, n. 3, p. 548-551, 1994.

TEPFER, D. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. **Cell**, v. 37, p. 959-967, 1984.

VANSUYT, G.; VILAINE, F.; TEPFER, M.; ROSSIGNOL, M. *rolA* modulates the sensitivity to auxin of the proton translocation catalyzed by the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in transformed tobacco. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 298, p. 89-92, 1992.

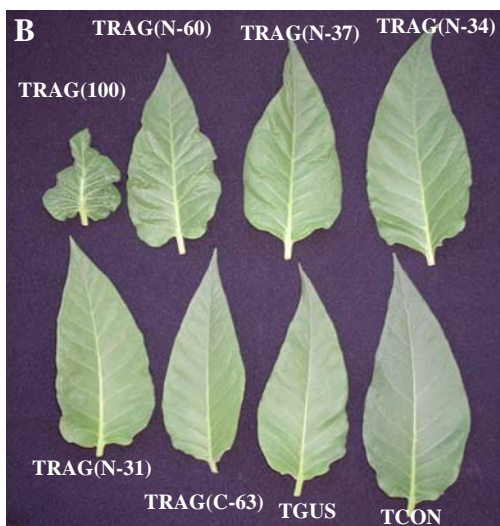
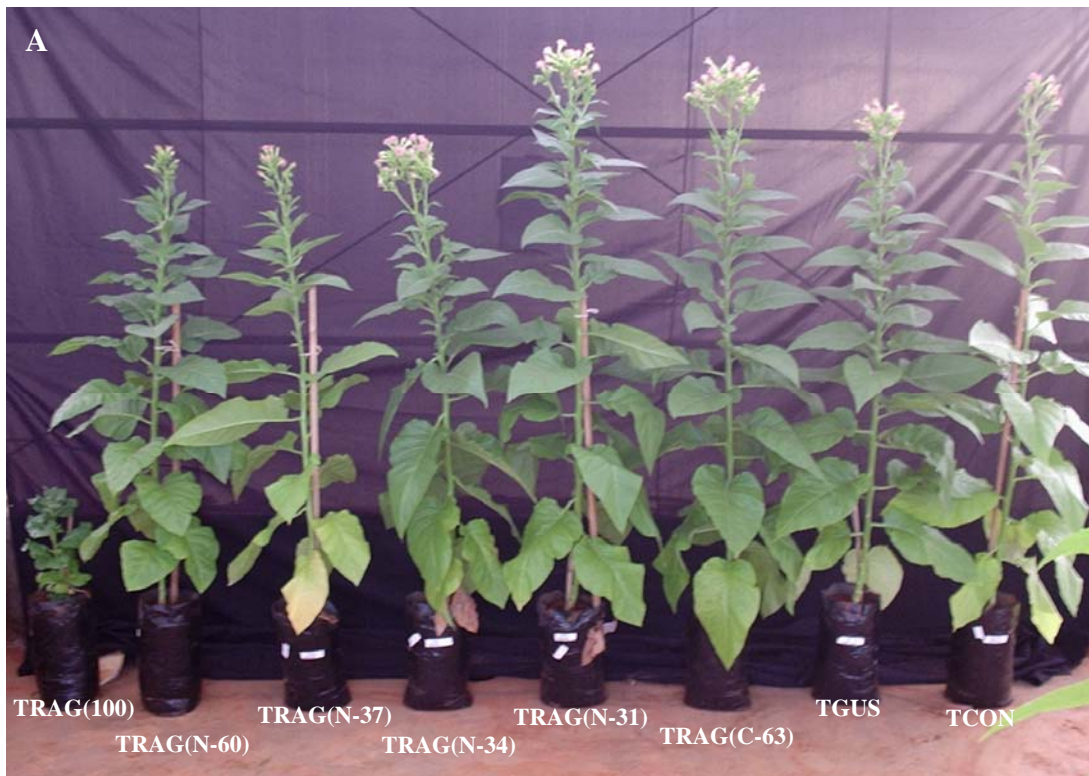
VILAINE, F.; REMBUR, J.; CHRQUI, D.; TEPFER, M. Modified Development in transgenic tobacco plants expressing a *rolA::GUS* translational fusion and subcellular localization of the fusion protein. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 11, n. 9, p. 855-859, 1998.

WHITE, F. F.; TAYLOR, B. H.; HUFFMAN, G. A.; GORDON, M. P.; NESTER, E. W. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 164, p. 33-44, 1985.



**Figura 1:** Representação esquemática das proteínas quiméricas RolA::Gus construídas no vetor pBI121.

No nome dos plasmídeos, entre parênteses as letras N e C referem-se ao amino e carboxi terminais respectivamente enquanto os números referem-se à quantidade de resíduos de aminoácidos da proteína RolA presentes na fusão. Estão destacadas as regiões hidrofóbica (verde) e básica (vermelho) e apresentado os resíduos básicos em vermelho.

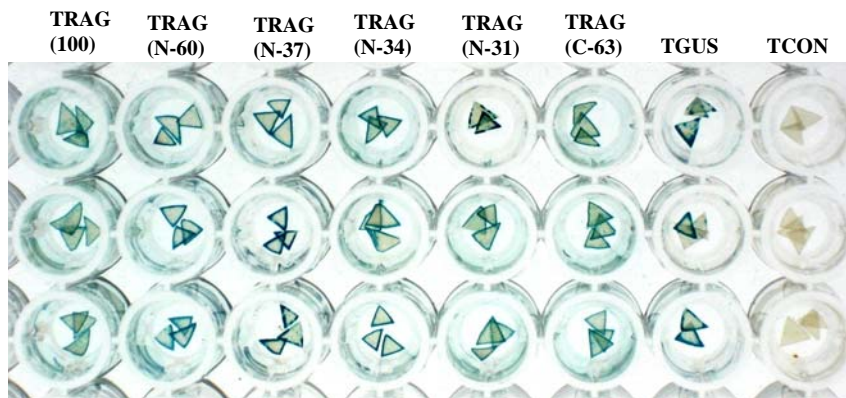


**Figura 2.** Plantas transgênicas de fumo expressando as diversas construções.

A) Plantas em casa de vegetação. B) folhas das respectivas plantas

TRAG: Tobacco RoA::Gus, TGUS: Tobacco transformado com o gene Gus original. Os números e letras entre parênteses representam o número de resíduos de aminoácidos do amino (N) ou Carboxi (C) terminais da proteína RoA que foram fusionados a enzima Gus.





**Figura 3:** Ensaio histoquímico de  $\beta$ -Glucuronidase nas plantas transgênicas. Segmentos foliares de três plantas de cada construção TRAG, TGUS e planta selvagem TCON foram testadas. A nomenclatura é a mesma utilizada na figura 2.





**Figura 5.** Predição da estrutura secundária da proteína RoIA.

Nove programas disponíveis na Internet foram utilizados para prever a estrutura secundária da proteína RoIA. Acima: a seqüência de RoIA, seguida do nome dos programas e respectivas predições. Abaixo: esquema da estrutura obtida consensualmente por concordância dos programas e relevância biológica. Legenda: “h” e cilindros representam regiões de potencial estrutura alfa-hélice, “e” e seta regiões potencialmente de folha  $\beta$ -pregueada e “c” e linhas contínuas, estruturas não-periódicas.

<p>Comunicado Técnico, 142</p> <p>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento</p>	<p>Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Serviço de Atendimento ao Cidadão Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) – Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624 <a href="http://www.cenargen.embrapa.br">http://www.cenargen.embrapa.br</a> e.mail:sac@cenargen.embrapa.br</p> <p>1ª edição 1ª impressão (2005):</p>	<p>Comitê de Publicações</p> <p>Expediente</p>	<p><b>Presidente:</b> <i>Maria Isabel de Oliveira Penteadó</i></p> <p><b>Secretário-Executivo:</b> <i>Maria da Graça Simões Pires Negrão</i></p> <p><b>Membros:</b> Arthur da Silva Mariante          Maria Alice Bianchi          Maria da Graça S. P. Negrão          Maria de Fátima Batista          Maria Isabel de O. Penteadó          Maurício Machain Franco          Regina Maria Dechechi Carneiro          Sueli Correa Marques de Mello          Vera Tavares de Campos Carneiro</p> <p><b>Supervisor editorial:</b> <i>Maria da Graça S. P. Negrão</i></p> <p>Normalização Bibliográfica: <i>Maria Iara Pereira Machado</i></p> <p><b>Edição eletrônica:</b> <i>Maria da Graça Simões Pires Negrão</i></p>
---	---	--	--