

FABIANA DA SILVA VIEIRA MATRANGOLO

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEÍNA SECRETÓRIA DE
SOJA E DE SUA INTERAÇÃO COM BiP**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte
das exigências do Curso de
Agroquímica, para obtenção do
título de “*Magister Scientiae*”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
JULHO-1998

A Deus;
Aos meus pais;
Aos meus irmãos;
Em especial, ao meu marido.

AGRADECIMENTO

À Prof^ª. Dr^ª. Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela competência, pela dedicação e pelo empenho na orientação, que possibilitaram a execução deste trabalho.

Aos professores conselheiros, Dr. Sérgio Hermínio Brommonschenkel e Dr^ª. Maria Goreti de Almeida Oliveira, pelo apoio e pela disponibilidade.

A todos os professores do curso, pelo apoio, pela dedicação em ensinar e pela ótima convivência.

Ao professor Wagner, pelo auxílio na condução dos experimentos.

Aos meus colegas Priminho, Sônia e Fátima, pelo auxílio direto na execução desse trabalho, pela amizade e pelo companheirismo.

Aos funcionários do Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela colaboração.

Aos meus colegas do curso de Agroquímica, pela amizade e pelos bons e maus momentos compartilhados.

Aos funcionários da Bioquímica Eduardo e Solange, pela atenção, pela amizade e presteza.

Aos meus colegas de laboratório Júlio, Nelson, Rafaelo (Rafex), Juliana, Andréia, Luís, João, Poliane, Reginaldo e Eduardo, pelas boas risadas e pela amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento do projeto.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao seu Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realizar meu treinamento.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

FABIANA DA SILVA VIEIRA MATRANGOLO, filha de Adair Vieira e Ana da Silva Vieira, nasceu em Montes Claros, Estado de Minas Gerais.

Em 1995, bacharelou-se e licenciou-se em Química pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

No segundo semestre de 1995, nesta mesma Universidade, ingressou no curso de mestrado em Agroquímica, defendendo a tese em 6 de março de 1998.

CONTEÚDO

EXTRATO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Sistema de transporte intracelular de proteínas	4
2.2. Proteína BiP (“Binding Protein”)	8
2.3. Associação de BiP com proteínas	12
2.4. Uso de suspensões celulares para estudo de expressão gênica	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Isolamento, caracterização molecular e seqüenciamento do clone pUFVS64	20
3.2. Clonagem molecular	21
3.3. Isolamento de DNA plasmidial	23
3.4. Cultura de células embriogênicas de soja em suspensão	25
3.5. Eletroporação de células de soja em suspensão	26
3.6. Ensaio de biobalística	27
3.7. Extração e quantificação de proteínas	27

3.8.	Gel de eletroforese SDS-PAGE e “immunoblotting”	28
3.9.	Ensaio de co-sedimentação	29
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1.	Isolamento de cDNAs que codificam proteínas secretórias de soja	30
4.2.	Caracterização estrutural da proteína S-64	32
4.3.	Expressão de S-64 e BiP em células de soja em suspensão	37
4.4.	Expressão transiente de S-64 em células intactas eletroporadas	38
4.5.	Avaliação da expressão transiente de S-64 em células intactas bombardeadas e mantidas na presença de diferentes fontes de carboidratos	44
4.6.	Associação transiente entre as proteínas BiP e S-64	46
5.	RESUMO E CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

EXTRATO

MATRANGOLO, Fabiana da S. Vieira, M. S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 1998. **Caracterização de uma proteína secretória de soja e de sua interação com BiP**. Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Conselheiros: Sérgio Hermínio Brommonschenkel e Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Proteínas solúveis e de membrana da rota secretora são inicialmente endereçadas ao retículo endoplasmático (RE) e translocadas através da membrana deste. Em seguida, elas transitam através do Golgi para alcançar os compartimentos subcelulares e o meio extracelular. O RE mantém uma eficiente maquinaria de translocação, dobramento, associação, montagem de oligômeros e controle de qualidade de proteínas secretórias. A proteína BiP ("Binding Protein"), residente no RE, exibe atividade de chaperone molecular e participa ativamente neste processo por meio de interações proteína:proteína. Com o objetivo de identificar substratos potenciais de BiP, anticorpos contra frações microsomais isoladas da semente de soja foram usados para o escrutínio de uma biblioteca de expressão. Um clone de cDNA, denominado pUFVS64, que codifica uma proteína secretória, foi isolado e caracterizado. A proteína, codificada por

pUFVS64 e denominada S-64, é sintetizada na semente de soja, em baixos níveis, e possui uma identidade de seqüência de 85% com uma proteína de membrana que se liga à sacarose, denominada SBP ("Sucrose Binding Protein"). Células intactas foram utilizadas para introdução de genes via eletroporação, ou biobalística, com o objetivo de aumentar a síntese da proteína S-64 em suspensões celulares de soja, de forma a aumentar a sensibilidade dos ensaios para determinação de associações entre as proteínas BiP e S-64. A associação entre BiP e S-64 foi avaliada, levando-se em consideração características bioquímicas diferenciadas, associadas com as referidas proteínas. Ensaios de sedimentação por afinidade, com o uso das resinas de ATP-agarose, GTP-agarose e ConA-sepharose, foram conduzidos, utilizando-se extratos de proteína total, de suspensões celulares de soja. Tanto S-64 quanto BiP são co-precipitadas por GTP-agarose, embora BiP não se associe com este nucleotídeo. A capacidade da resina GTP-agarose em sedimentar BiP reflete associação prévia entre BiP e uma proteína que liga GTP. Similarmente, ATP-agarose foi eficiente em co-sedimentar ambas as proteínas, embora apenas BiP se ligue diretamente à ATP. A sedimentação indireta de S-64 pela resina ATP-agarose demonstrou que S-64 estava a uma proteína que liga a ATP. A proteína S-64 é glicosilada e se liga diretamente a ConA-sepharose, enquanto BiP não se associa diretamente com concanavalina-A. Mesmo assim, BiP foi co-sedimentada indiretamente por ConA-sepharose. Coletivamente, estes resultados sugerem que S-64 interage com BiP, constituindo um substrato em potencial para caracterização de associações mediadas pela proteína BiP de plantas.

ABSTRACT

MATRANGOLO, Fabiana da S. Vieira, M. S., Universidade Federal de Viçosa, July of 1998. **Characterization of a soybean secretory protein and its interaction with BiP**. Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Committee members: Sérgio Hermínio Brommonschenkel and Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Newly synthesized secretory and membrane proteins are synthesized on membrane-bound polysomes and co-translationally sequestered in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER). These proteins then move to and through the Golgi complex where they are either secreted or sorted to subcellular compartments. The ER keeps an efficient machinery for translocation, association, assembly of secretory proteins which functions as a quality control system of protein exit from this organelle. The ER-resident protein BiP (Binding Protein) exhibits a molecular chaperone activity and has been described as an important component of the quality control mechanism in the ER which is mediated by protein:protein interaction. In order to identify potential substrates for BiP, antibodies raised against membrane-enriched protein fractions from soybean seeds were used as a probe to screen an expression library. A cDNA

clone, named pUFVS64, that encodes a secretory protein was isolated and characterized. The cDNA-encoded protein, designated S-64, is synthesized at low levels in soybean seeds and shares 85% sequence identity with the sucrose binding protein (SBP) which is a membrane-associated protein. In order to increase the sensitivity in the assays for detection of BiP:S-64 associations, the S-64 cDNA was introduced in soybean cultured cells by electroporation or a biolistic particle delivery system. The S-64:BiP association was evaluated taking advantage of the differential biochemical properties associated with the proteins. Affinity-precipitation assays, using ATP-agarose, GTP-agarose and ConA-sepharose resins, were performed with total protein extracts from soybean cultured cells. Both S-64 and BiP are co-precipitated by GTP-agarose, although BiP does not bind to GTP. The capacity of GTP-agarose to precipitate BiP reflects previous association between BiP and a GTP-binding protein. Likewise, the ATP-agarose resin co-precipitates efficiently both proteins, although just BiP binds ATP. The indirect precipitation of S-64 by ATP-agarose demonstrated that S-64 interacts with an ATP-binding protein. The S-64 protein is glycosylated and binds directly to ConA-sepharose, while BiP does not. However, the efficiency of BiP precipitation by ConA-sepharose was as high as of S-64 precipitation. Taken together, these results suggest that S-64 interacts with BiP and may be a potential substrate for the characterization of protein interactions mediated by plant BiP.

1. INTRODUÇÃO

Proteínas solúveis e de membranas da rota secretora são inicialmente endereçadas ao retículo endoplasmático (RE) e, então, co-traducionalmente translocadas através da membrana deste. Em seguida, elas transitam através do complexo de Golgi para alcançar o vacúolo, a membrana plasmática ou o meio extracelular. O RE mantém uma eficiente maquinaria de translocação, dobramento, associação e montagem de oligômeros e controle de qualidade de proteínas secretórias (GETHING e SAMBROOK, 1992; HELENIUS et al., 1992). Durante ou após o processo de translocação através das membranas do RE, os polipeptídios nascentes adquirem uma conformação competente para translocação, podendo, ainda, ocorrer modificações pós-traducionais como adição de glicose, clivagem por enzimas proteolíticas, além de outros processamentos (HALBAN e IRMINGER, 1994; TATU e HELENIUS, 1997).

As proteínas do RE que atuam no processo de co-tradução de polipeptídios nascentes são chamadas de reticuloplasminas. Entre estas proteínas, estão os chaperones moleculares, as proteínas dissulfeto-isomerase e as proteínas que se ligam a cálcio (PELHAM, 1990). A seleção de proteínas a serem exportadas do RE inclui não somente uma discriminação entre as proteínas

residentes ou não na organela, mas também um assessoramento para aquisição da conformação protéica, mediado por chaperones moleculares. A proteína BiP (“Binding Protein”) é o chaperone molecular mais bem caracterizado do RE.

Atualmente, existem consideráveis evidências de que a proteína BiP realiza um papel relevante na síntese de proteínas secretórias (GETHING e SAMBROOK, 1992; VITALE et al., 1993). Tem sido demonstrado que essa proteína se associa com cadeias polipeptídicas nascentes, com monômeros de proteínas multiméricas, que são transportadas na rota secretora, com proteínas semelhantes a prolaminas, designadas para o acúmulo no RE, e com proteínas defeituosas (VOGEL et al., 1990; LI et al., 1993; VITALE et al., 1995; PUEYO et al., 1995; FONTES et al., 1996). A interação com a proteína BiP é claramente proteína-específica, e, acredita-se, o mecanismo de liberação depende da capacidade do polipeptídeo recém-sintetizado adquirir sua estrutura correta. No entanto, o mecanismo de atuação da proteína BiP e o seu papel *in vivo* não estão totalmente elucidados (PEDRAZZINI e VITALE, 1996).

Recentemente foi demonstrado, por ensaios de co-imunoprecipitação, que a proteína BiP da soja se associa transientemente com as subunidades da proteína de reserva de soja β -conglícinina (FONTES et al., 1996). A associação da proteína BiP com proteínas de reserva é dependente de ATP, uma característica bioquímica de interações mediadas por chaperones moleculares. Estes resultados sugerem que a proteína BiP está envolvida no dobramento, na estabilidade e no transporte de proteínas de reserva para os corpos protéicos em células de plantas.

No entanto, devido à natureza transiente da associação, apenas uma pequena fração de subunidades de β -conglícinina pode ser detectada em associação com BiP. Conseqüentemente, a dissociação entre BiP e β -conglícinina e a subsequente oligomerização da proteína de reserva devem ocorrer com alta eficiência. Em feijão (*Phaseolus vulgaris*) tem sido demonstrado que a associação da proteína BiP com a forma monomérica de faseolina, proteína de reserva predominante, precede a oligomerização desta proteína, e BiP

definitivamente não se associa com a forma trimérica da faseolina (PUEYO et al., 1995). Estas observações, aliadas à grande concentração dos oligômeros de proteínas de reserva em extratos de sementes de soja, impedem o uso de proteínas de reserva como substratos para o entendimento do mecanismo de interação entre a proteína BiP e os polipeptídios em plantas. Assim, os objetivos desta investigação foram (1) isolamento de cDNAs que codificam proteínas secretórias da semente de soja, como potenciais substratos para BiP; e (2) desenvolvimento de um sistema eficiente para expressão transiente, dos cDNAs isolados, em suspensão celular de soja para avaliação da interação da proteína secretória isolada com a proteína BiP.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sistema de transporte intracelular de proteínas

Como toda célula eucariótica, células vegetais apresentam uma compartimentalização funcional, ressaltando-se que cada compartimento ou organela contém enzimas características e outras moléculas especializadas, além de um complexo sistema de distribuição que transporta produtos específicos de um compartimento para o outro. A maquinaria secretora da célula é composta de um complexo sistema de endomembranas, cuja ultra-estrutura tem sido extensivamente estudada (GOMORD e FAYE, 1996; SATIAT-JEUNEMAITRE et al., 1996).

Proteínas solúveis e de membranas da rota secretora são inicialmente endereçadas ao retículo endoplasmático (RE) e, então, co-traducionalmente translocadas através da membrana deste. Em seguida, elas transitam através do complexo de Golgi para alcançar o vacúolo, a membrana plasmática ou o meio extracelular. Muitos pesquisadores têm buscado a identificação de vários sinais de retenção e endereçamento envolvidos nesse processo (GOMORD e FAYE, 1996; NEUHAUS, 1996; PARIS e ROGERS, 1996; BRODSKY, 1996).

O movimento de proteínas através da membrana ou para ela é um processo intrinsecamente complexo (JOHNSON, 1997). Na translocação pós-traducional, um polipeptídeo nascente atravessa a membrana somente após ter sido liberado do ribossomo. Durante a translocação co-traducional, o ribossomo permanece associado ao polipeptídeo nascente que atravessa a membrana (BRODSKY, 1996). A exata translocação de uma proteína para o RE requer um peptídeo sinal localizado na extremidade N-terminal da proteína nascente. No caso de proteínas solúveis, o peptídeo sinal é geralmente uma seqüência compreendendo de 20 a 50 resíduos de aminoácidos (VON HEIJNE, 1988), caracterizada pela presença de um trecho interno contendo, pelo menos, seis resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, precedidos de uma pequena seqüência de resíduos de aminoácidos contendo cargas positivas (GOMORD e FAYE, 1996).

A pré-proteína, exatamente após a síntese dos seus primeiros 60 a 70 aminoácidos, associa-se com um complexo, denominado NAC (“nascent polypeptide-associated complex”) (WIEDMAN et al., 1994). A presença de um peptídeo sinal pode promover a dissociação da pré-proteína do NAC. Dessa forma, o peptídeo sinal interage com um fator citossólico, a partícula reconhecedora de sinal (SRP) (WOLIN, 1994). SRP é composta de 7L sRNA e seis subunidades polipeptídicas diferentes, incluindo uma proteína de massa molecular 54 kDa que se liga ao peptídeo sinal. Tem sido demonstrado que a ligação de SRP é dependente de GTP e interrompe a tradução (HIGH e DOBBERSTEIN, 1991). O complexo SRP-pré-proteína é reconhecido por um receptor de membrana (SR), denominado “docking protein” (DP). Um equilíbrio GTP-GDP rompe a interação SRP-DP, permitindo que a tradução da pré-proteína continue e ocorra uma translocação simultânea do polipeptídeo para dentro do RE. O translocon co-traducional de mamíferos contém as proteínas Sec 61 α , Sec 61 β , Sec 61 γ e TRAM (“Translocating Chain Associated Membrane Protein”), além de outras proteínas de membrana, envolvidas no processo de translocação dependente de canal (GÖRLICH e RAPOPORT, 1993; JOHNSON, 1997). SRP e SR não estão envolvidas na translocação pós-traducional, mas outros fatores

asseguram que as proteínas secretórias permaneçam competentes para translocação, impedindo o dobramento prematuro (BRODSKY, 1996). Imediatamente após a pré-proteína ser introduzida no RE, o peptídeo sinal é clivado pelo complexo peptidase sinal da membrana em um sítio específico. A remoção do peptídeo sinal é necessária para promover o dobramento do novo peptídeo (HELENIUS et al., 1992). Isto é ilustrado pela α -amilase de arroz sintetizada *in vitro*, que apresenta atividade enzimática apenas quando o peptídeo sinal é removido (MIYATA e AKAZAWA, 1982). Muitos dados sugerem que o sistema de translocação, que tem sido descrito para mamíferos, é similar em plantas, como mostrado pela homologia de genes (GOMORD e FAYE, 1996).

O RE mantém uma eficiente maquinaria de translocação, dobramento, associação ou montagem de oligômeros e controle de qualidade de proteínas secretórias (GETHING e SAMBROOK, 1992; HELENIUS et al., 1992). O lúmen do RE é provido de um meio exclusivo e altamente especializado para controle do dobramento e maturação de proteínas de membrana e proteínas solúveis destinadas a serem exportadas para outras organelas ou secreção (TATU e HELENIUS, 1997). Durante ou após o processo de translocação através das membranas do RE, os polipeptídios nascentes adquirem uma conformação competente para translocação, podendo ainda ocorrer modificações pós-traducionais como adição de glicose e clivagem por enzimas proteolíticas, além de outros processamentos (HALBAN e IRMINGER, 1994; TATU e HELENIUS, 1997).

Uma proteína secretória recém-sintetizada deve adquirir uma conformação correta, constituindo um pré-requisito para seu transporte subsequente no sistema secretor. Polipeptídios com propriedades físico-químicas ou estruturais incorretas são retidos dentro do RE. Dessa forma, a célula exerce um controle de qualidade dos peptídios recém-sintetizados, eliminando proteínas não funcionais (VITALE et al., 1993; PEDRAZZINI e VITALE, 1996). Porém, o transporte e a localização final dependem de informações adicionais de endereçamento contidas no próprio polipeptídeo (CHRISPEELS, 1991). O

endereço de proteínas solúveis para vacúolos requer pelo menos um sinal adicional diferente para o caso de leveduras e plantas (WELTERS, 1996); por exemplo, sinais de endereço vacuolar C-terminal de plantas não são suficientes para o transporte ao vacúolo de leveduras (GAL e RAIKHEL, 1994).

As proteínas residentes do RE que funcionam no processo de co-tradução de polipeptídios nascentes são chamadas de reticuloplasminas. Entre estas proteínas estão os chaperones moleculares, as proteínas dissulfeto-isomerase e as proteínas que se ligam a cálcio (PELHAM, 1990). A seleção de proteínas a serem exportadas do RE inclui não somente uma discriminação entre as proteínas residentes ou não na organela, mas também um assessoramento para aquisição da conformação protéica, mediado por chaperones moleculares.

As reticuloplasminas requerem um sinal de retenção específico. O tetrapeptídeo consenso XDEL tem sido identificado, na extremidade C-terminal de reticuloplasminas, pela comparação de seqüência entre reticuloplasminas solúveis de eucariotos. A seqüência KDEL mostrou-se como um sinal funcional de retenção no RE de células animais. A retenção no RE de leveduras é mediada pela seqüência HDEL (MUNRO e PELHAM, 1987; PELHAM et al., 1988; VITALE et al., 1993). Ambas extensões C-terminais, HDEL e KDEL, têm sido identificadas em seqüências de reticuloplasminas de plantas. Estudos recentes demonstraram que a especificidade do sistema de retenção no RE, por KDEL *versus* HDEL, não é tão alta quanto se acreditava inicialmente (NAPIER et al., 1992; SHORROSH et al., 1993; VITALE et al., 1993; HAUGEJORDEN et al., 1991; PIDOUX e ARMSTRONG, 1992; DENECKE et al., 1992), embora seqüências adjacentes ao tetrapeptídeo carboxiterminal parece também influenciarem na eficiência de retenção (JONES e HERMAN, 1993). Estudos genéticos com leveduras têm identificado o produto do gene Erd2p (ERD2), como receptor para o sinal de retenção de proteínas residentes no RE (BARPELED et al., 1995).

Originalmente, identificadas como proteínas especiais envolvidas na proteção contra estresse térmico ou na replicação do fago λ , chaperones

moleculares revelaram-se um grupo de proteínas muito abundantes que, sob condições normais de crescimento, realizam várias funções em processos celulares básicos. A função mais proeminente de um chaperone é seu papel como mediador de reações de dobramento de proteínas. Entretanto, eles também estão envolvidos em vários outros sistemas (ELLIS et al., 1989).

Embora tenham sido propostos vários papéis para chaperones moleculares em células, sua característica comum é a formação de complexos com intermediários de dobramento ou de montagem de proteínas. Vários estudos realizados *in vitro* têm mostrado que a formação destes complexos favorecem uma conformação estrutural correta porque inibem, por competição, reações incorretas na via de dobramento de polipeptídios (PEDRAZZINI e VITALE, 1996).

Importantes avanços têm sido alcançados no estudo da estrutura das proteínas chaperones, e, recentemente, as estruturas cristalinas de GroES e do domínio de ligação ao peptídeo de uma proteína Hsp70 têm sido determinadas (ZHU et al., 1996; MANDE et al., 1996). A resolução dessas estruturas é um avanço significativo no esforço para elucidar o mecanismo de reações mediadas por chaperones moleculares (RASSOW et al., 1997).

Um dos residentes do RE, mais bem caracterizado e denominado BiP (“Binding Protein”), é um membro da família de proteínas Hsp70 de chaperones moleculares, o qual exerce um papel fundamental durante o dobramento e montagem de proteínas secretórias nascentes (GETHING e SAMBROOK, 1992; VITALE et al., 1993; HAAS, 1994).

2.2. Proteína BiP (“Binding Protein”)

A proteína BiP foi identificada em culturas de fibroblastos, crescidas em ausência de glicose, que supersintetizam duas proteínas de massas moleculares 78 e 94 kDa, referidas como proteínas reguladas por glicose, GRP78 e GRP94

(SHIU et al., 1977). A indução da síntese de proteínas GRP também tem sido observada sob tratamento com tunicamicina, que inibe a N-glicosilação de proteínas secretoras nascentes e diminui o metabolismo de glicose (OLDEN et al., 1979). Independentemente, foi observado que uma proteína de massa molecular 78 kDa liga-se de maneira não covalente à cadeia pesada livre de imunoglobulina, sendo denominada “Binding Protein” (BiP) (HAAS e WABL, 1983). A associação BiP:IgG é rompida pela adição de cadeias leves de imunoglobulinas e, subsequentemente, montagem da proteína heterooligomérica. Uma proteína residente do sistema de endomembranas de plantas com massa molecular de 70 kDa foi detectada por GALANTE et al. (1983), devido ao alto nível de acúmulo de proteínas anormais no endosperma de um mutante de milho (*Zea mays*), sendo mais tarde identificada como BiP (FONTES et al., 1991).

O isolamento de cDNAs correspondentes a GRP78 e BiP e posterior caracterização molecular demonstraram que BiP e GRP78 correspondem à mesma proteína, relacionada estruturalmente com Hsp70 (MUNRO e PELHAM, 1986). Estudos subsequentes em células de mieloma de rato identificaram a presença de BiP no interior da cisterna do RE e no envelope nuclear, mas não nas cisternas de Golgi (BOLE et al., 1989). A retenção seletiva de BiP no RE se deve à seqüência consenso KDEL/HDEL localizada no C-terminal da proteína (MUNRO e PELHAM, 1986). Em células de mamíferos, a remoção da seqüência consenso da proteína BiP causou secreção da proteína truncada, enquanto a fusão da seqüência KDEL com proteínas repórteres resultou na retenção no RE dessas proteínas recombinantes (PELHAM, 1990).

A proteína BiP pertence à família de proteínas induzidas por estresse, conhecidas como proteínas de choque térmico de 70 kDa (Hsp70, “heat shock proteins”), e possui um sítio de ligação a ATP altamente conservado, atividade de ATPase e um domínio C-terminal de ligação ao peptídeo (HAAS, 1994). Está estrutural e funcionalmente associada ao Hsp70 citossólico (DENECKE, 1996), possuindo duas funções relacionadas. Como chaperone molecular, a proteína BiP tem sido descrita como um importante mediador de translocação, dobramento,

montagem e transporte de proteínas recém-sintetizadas (VITALE et al., 1993). A proteína BiP associa-se com polipeptídios nascentes assim que são translocados para o lúmen do RE, auxiliando o dobramento e a montagem corretas dessas proteínas, por meio da formação de complexos intermediários, que desfavorecem agregados protéicos no RE (NGUYEN et al., 1991; SANDERS et al., 1992). Essa proteína exerce também um papel fundamental no reconhecimento de proteínas mal dobradas, pois associa-se permanentemente a elas, formando complexos estáveis que serão reconhecidos pelo sistema proteolítico da célula (GETHING e SAMBROOK, 1992). Uma vez que o transporte intracelular de proteínas depende da aquisição de estruturas terciárias e quaternárias corretas, BiP tem sido descrito como um importante componente da função constitutiva do RE, exercendo um controle de qualidade de saída de proteínas dessa organela (HURTLEY et al., 1989).

A associação entre a proteína BiP e os polipeptídios mal dobrados é mais estável graças à exposição permanente de seqüências hidrofóbicas no esqueleto da proteína (GETHING et al., 1986). Conseqüentemente, uma função adicional de BiP é prevenir a saída de proteínas anormais do RE (HAMMOND e HELENIUS, 1994). Enquanto estes sinais não são acessíveis a BiP na conformação nativa da proteína, essas seqüências de aminoácidos hidrofóbicos são expostas nos intermediários normais de montagem. Usando um sistema de células de ovário de hamster, o qual discrimina entre intermediários da montagem de proinsulina normal e proinsulina mal dobrada, mostrou-se que, *in vitro*, os intermediários de montagem de proinsulina normal foram protegidos por BiP contra degradação. Resultados obtidos com mutantes de proinsulina confirmam a hipótese de que domínios internos representam um sinal para a degradação, sendo mascarados por BiP durante o processo de montagem. O fato de que BiP protege os domínios internos dos intermediários de montagem sugere que esta proteína pode funcionar de maneira análoga à estrutura toróide do chaperone Hsp60, embora não haja similaridade estrutural entre os dois chaperones (SCHMITZ et al., 1995).

A função de chaperone, associada a BiP de planta, tem sido examinada principalmente por meio de associações com proteínas de reserva de semente. BiP interage com uma forma defeituosa da proteína de reserva do feijão, faseolina, deletada de 59 aminoácidos no carboxiterminal (PEDRAZZINI et al., 1994). Quando transientemente expressada em protoplastos de folha de tabaco, BiP liga-se ao mutante, enquanto, nas mesmas condições de experimento, a associação entre BiP e faseolina normal não é detectável. A proteína BiP ligada ao mutante pode ser liberada pela adição de ATP. Também em mutantes do endosperma de milho *flowry 2*, BiP associa-se com proteínas anormais acumuladas no RE (FONTES et al., 1991). Estes resultados indicam que BiP exerce função análoga em plantas e animais durante a síntese protéica.

O controle de qualidade de processamento de proteínas realizado pela célula ocorre principalmente no RE, e BiP exerce um papel fundamental neste sentido. SIMONS et al. (1995) demonstraram que estirpes de leveduras, expressando uma mutação restritiva no domínio ATPase de BiP, promovem agregação da proteína vacuolar endógena, carboxipeptidase Y (CPY), impedindo sua saída do RE. Em células normais, a proteína BiP associa-se transientemente com cerca de 10-15% das CPYs marcadas, e, em estirpes mutantes, 30-100% das CPYs marcadas permanecem associadas a BiP. Experimentos de imunoprecipitação, usando proteína G do vírus estomatite vesicular, demonstraram que BiP liga-se de forma transitória com intermediários de montagem da proteína G normais e associa-se, de forma estável, apenas com mutantes da proteína G que não formam pontes dissulfeto corretas (MACHAMER et al., 1990).

Em condições normais de crescimento, a proteína BiP é expressa constitutivamente em baixos níveis. No entanto, uma série de estresses fisiológicos, como deficiência de glicose, inibidores de glicosilação, tratamento com 2-mercaptoetanol, aminoácidos análogos e cálcio ionóforo, induz a síntese de BiP (LEE, 1987; VITALE et al., 1993). Estas condições de estresses têm como denominador comum a promoção do acúmulo de proteínas mal dobradas no RE

(ELLIS e VAN DER VIES, 1991). A associação de BiP com proteínas anormais é mais estável, prevenindo a saída de proteínas não funcionais do RE e impedindo suas agregações (BOLE et al., 1989; GETHING et al., 1986; HENDERSHOT, 1990).

2.3. Associação de BiP com proteínas

O RE contém um grande número de proteínas envolvidas no processamento de polipeptídios secretórios, incluindo BiP que é um membro da família Hsp70, de chaperones moleculares, altamente conservada (CRAVEN et al., 1997). Proteínas dessa família ou classe têm sido encontradas em quase todo organismo e organela. *Escherichia coli* possui ao menos duas Hsp70 diferentes, DnaK e Hsc66 (LELIVELT e KAWULA, 1995), e 14 genes diferentes que codificam Hsp70's têm sido encontrados no genoma de *Saccharomyces cerevisiae* (LEE-YOON et al., 1995; RASSOW et al., 1997).

Hsp70s são proteínas de aproximadamente 70 kDa, que têm como característica um domínio N-terminal de ligação a ATP, com estrutura altamente conservada, de aproximadamente 44 kDa, e um domínio C-terminal, com estrutura mais divergente, responsável pela ligação ao substrato e pela interação com co-chaperones, como DnaJ, de aproximadamente 27 kDa (CHAPPELL et al., 1987; FLAHERTY et al., 1990; GETHING e SAMBROOK, 1992; WANG et al., 1993; RASSOW et al., 1997; CRAVEN et al., 1997).

A estrutura cristalina do domínio N-terminal (domínio de ATPase) de uma Hsp70 bovina revelou similaridades com a estrutura terciária de núcleos de ligação a nucleotídeos de hexocinase e actina (GETHING e SAMBROOK, 1992). Recentemente, ZHU et al. (1996) mostraram a estrutura cristalina do domínio C-terminal do DnaK de *E. coli* (Hsp70 de bactérias) complexado com um peptídeo substrato. A estrutura compreende três subdomínios distintos, os quais são descritos como um β -sanduíche, mais compacto, seguido por uma

região ligante mais flexível, além, de um “cap” em α -hélice. O subdomínio β -sanduíche forma uma fenda na qual a ligação com o peptídeo parece ser estabilizada pela justaposição do “cap”. Esta região “cap” na extremidade C-terminal do DnaK media interações com DnaJ. ZHU et al. (1996) propuseram um modelo no qual DnaJ induz uma mudança conformacional em DnaK durante o ciclo de ligação e liberação do peptídeo. Neste modelo, a forma do DnaK ligada a ATP tem sua fenda de ligação do peptídeo exposta e disponível para interações com os polipeptídios substratos (forma aberta, ligada a ATP). Com o substrato ligado frouxamente, a hidrólise de ATP, estimulada pelo DnaJ, provoca uma mudança conformacional, na qual o subdomínio “cap” fecha a fenda de ligação do peptídeo, estabilizando o complexo substrato-DnaK (forma fechada, ligada a ADP). A permuta de nucleotídeo, de ADT para ATP, é facilitada pela ligação da proteína regulatória GrpE, ao domínio de ATPase (LIBEREK et al., 1991; ZHU et al., 1996), que promove a conversão do DnaK para a forma ligada a ATP (forma aberta), resultando no deslocamento do “cap” e facilitando a liberação do substrato (FLYNN et al., 1989; McKAY, 1993; ZHU et al., 1996; CRAVEN et al., 1997; RASSOW et al., 1997). Este modelo produz a expansão molecular requerida para a mudança conformacional, observada em BiP de hamster, durante este ciclo de reações (WEI et al., 1995).

A importância do subdomínio β -sanduíche na ligação do substrato é sustentada pela observação de que mutações pontuais nessa região reduzem significativamente a afinidade de ligação ao peptídeo (BURKHOLDER et al., 1996). Além disso, comparações de seqüência revelam que a região do subdomínio β -sanduíche é altamente conservada no domínio de ligação ao substrato, com mais de 60% de identidade de seqüência entre DnaK, Hsc70 e BiP. Apesar deste nível de identidade, estas três Hsp70s têm especificidades distintas de ligação ao peptídeo (GRAGEROV e GOTTESMAN, 1994; FOURIE et al., 1994). Como esta diferença de especificidade pode estar relacionada com a função dessas três proteínas ainda não está esclarecido.

Seqüências polipeptídicas com, pelo menos, sete resíduos de aminoácidos hidrofóbicos têm-se mostrado ótimos ligantes para Hsp70 pela estrutura cristalina do domínio de ligação ao peptídio do DnaK (ZHU et al., 1996). O resíduo central do heptâmero é importante para aumentar a afinidade de ligação. Ele se projeta para o fundo de uma larga bolsa, relativamente hidrofóbica, da fenda de ligação. Aminoácidos largamente hidrofóbicos, especialmente leucina, são preferidos (ZHU et al., 1996). Estudos anteriores mostraram que para ligação com alta afinidade, um peptídio ligante não pode conter resíduos de aminoácidos com carga negativa, e que, resíduos contendo carga positiva podem estar presentes junto às extremidades do heptâmero (HARTL, 1996). Embora diferentes Hsp70's compartilhem a preferência por resíduos largamente hidrofóbicos na posição central do heptâmero, elas diferem no requerimento nas posições distais, levando a diferenças notáveis de afinidade para o mesmo polipeptídio (FOURIE et al., 1994). A especificidade de ligação entre a proteína BiP e peptídios sintéticos foi examinada, usando-se uma biblioteca de bacteriófago λ contendo seqüências ao acaso de octapeptídios e dodecapeptídios na região amino-terminal da proteína de adsorção pIII (BLOND-ELGUINDI et al., 1993a). A proteína BiP liga-se preferencialmente a peptídios que contêm resíduos hidrofóbicos e aromáticos em posições alternadas, em uma conformação estendida (BLOND-ELGUINDI et al., 1993a), que apontem para a fenda de ligação da molécula dessa proteína. Peptídios que ligam a DnaK mostram um padrão diferente, constituído de uma seqüência contínua, de quatro ou cinco resíduos hidrofóbicos, que é necessária para uma ligação de alta afinidade (RASSOW et al., 1997).

Estudos *in vitro* demonstraram que a atividade de ATPase da proteína BiP é estimulada pela adição de peptídios que tenham habilidade de se ligar à BiP e substratos que imitem uma proteína normal (FLYNN et al., 1989). Proteínas associadas com BiP *in vivo* podem ser liberadas *in vitro* pela adição de ATP ao complexo proteína-BiP (MUNRO e PELHAM, 1986; VITALE et al., 1995). ADP, análogos não hidrolizáveis de ATP ou outros nucleotídeos trifosfato não

podem substituir o ATP nessas reações (MUNRO e PELHAM, 1986; HURTLEY et al., 1989; D'AMICO et al., 1992; LI et al., 1993).

A substância P (SP), um peptídeo-modelo de ligação estável à proteína BiP, estimula a atividade de ATPase e forma um complexo ternário SP-BiP-ATP, que sofre hidrólise sem liberar o substrato, passando à forma SP-BiP-ADP. Apenas em presença de um alto nível de ATP, superior a 50 μ molar, o substrato se dissocia (BROT et al., 1994). Tem sido proposto que a proteína BiP reage diferentemente com proteínas normais e anormais e que ambos os substratos se ligam à forma monomérica de BiP ligada a ATP. No entanto, enquanto a hidrólise de ATP promove a liberação de um substrato normal, as proteínas anormais permanecem associadas a BiP (BROT et al., 1994). Assim que o substrato é liberado, o ADP ligado à proteína BiP é substituído por ATP, iniciando um novo ciclo de ligação. Este mecanismo é similar ao proposto para proteínas que ligam a GTP, em que a proteína G-GDP é convertida na proteína G-GTP por uma reação de troca, sugerindo que fatores que catalisam uma reação de conversão similar estejam presentes no RE (BROT et al., 1994).

A conservação evolucionária de BiP tem sido examinada em vários sistemas eucariotos. Análises de comparação de seqüências de clones de cDNAs isolados de mamíferos mostraram um alto grau de conservação em nível de seqüência primária (CHANG et al., 1987; HAAS e MEO, 1988; TING e LEE, 1988), que se estende para leveduras e plantas (NORMINGTON et al., 1989; ROSE et al., 1989; DENECKE et al., 1991; FONTES et al., 1991; ANDERSON et al., 1994b, FIGUEIREDO et al., 1997). Uma série de estudos funcionais com proteínas homólogas a BiP em plantas demonstrou que esta proteína tem conservação funcional em células eucarióticas. Evidências genéticas para a conservação funcional têm sido obtidas por meio de experimentos de complementação em leveduras mutantes com um gene *bip* de tabaco (DENECKE et al., 1991). BiP de tabaco foi capaz de substituir o produto do gene *kar 2* mutado, que codifica um mutante sensível à temperatura.

A proteína BiP existe na célula em formas monoméricas e oligoméricas (principalmente dímeros) interconversíveis. A proteína BiP oligomérica é modificada por fosforilação e ADP-ribosilação e representa um “pool” de estocagem do chaperone. Em condições que resultem num aumento da concentração de proteínas mal dobradas, tanto as espécies oligoméricas quanto as monoméricas são capazes de se ligarem a peptídios, porém, com a indução da atividade de ATPase pelo peptídio, BiP pode ser rapidamente convertida para um monômero ativo, pela dissociação dos oligômeros e sua defosforilação e deADP-ribosilação (FREIDEN et al., 1992). Com a diminuição da concentração de polipeptídios maldobrados no RE, as espécies monoméricas de BiP tornam-se modificadas, sendo a oligomerização favorecida (BLOND-ELGUINDI et al., 1993b). Em condições de estresses, discrepâncias entre os níveis de mRNA e proteína têm sido observadas (DENECKE et al., 1991; FONTES et al., 1991; DENECKE et al., 1995; ANDERSON et al., 1994b; KALINSKI et al., 1995), sugerindo que mecanismos pós-transcricionais realizem um papel significativo na regulação dos níveis da proteína BiP.

A proteína BiP é necessária para a translocação co-traducional de proteínas recém-sintetizadas para o lúmen do RE, provavelmente para impedir a agregação da cadeia nascente (VOGEL et al., 1990; NGUYEN et al., 1991; SIMONS et al., 1995). BiP de leveduras associa-se de forma estável com Sec63p, uma proteína integral de membrana (FELDHEIM et al., 1992), constituinte do complexo translocon de leveduras, que possui um domínio luminal homólogo ao DnaJ (SADLER et al., 1989; FELDHEIM et al., 1992), que media a interação, regulada por ATP, entre BiP e Sec63p (BRODSKY e SCHEKMAN, 1993; CORSI e SCHEKMAN, 1997). SANDERS e colaboradores (1992) propuseram um modelo que descreve a ação seqüencial de vários fatores de translocação, ressaltando que BiP age associada ao requerimento de ATP nos estágios iniciais da translocação.

Durante a síntese de imunoglobulina, a proteína BiP interage inicialmente com as cadeias leves e dissocia-se tão logo o chaperone GRP94 se

associe com as formas oxidadas (MELNICK et al., 1994). Com o retardamento do processo de dobramento da tiroglobulina no RE por meio de tratamento com ditioneitol (DTT), pode-se observar que calnexina interage com a referida proteina, ap6s sua intera63o com BiP (KIM e ARVAN, 1995). Pequenas quantidades de BiP s3o encontradas em complexos calnexina-hemaglutinina, imunoprecipitados com anti-HA (HURTLEY et al., 1989; TATU e HELENIUS, 1997). Coletivamente, estes resultados indicam que, al6m de a proteina BiP estar envolvida nos est3gios iniciais da s3ntese proteica, os chaperones do RE agem seqüencialmente durante a via de montagem.

Em plantas, a atividade de chaperone molecular da proteina BiP tem sido avaliada inicialmente pela detec63o de associa63es com proteinas de reserva de sementes. Ensaio de co-precipita63o foram conduzidos para detectar associa63o da proteina BiP com subunidades da proteina de reserva β -conglucina da soja (FONTES et al., 1996). Tanto o anticorpo contra BiP quanto o anticorpo contra β -conglucina co-imunoprecipitaram a proteina rec3proca na aus6ncia de ATP. Experimentos de marca63o de proteinas, seguidos por ensaios de co-imunoprecipita63o de extratos do cotil6done de feij3o, t6m sido realizados para examinar a fun63o de BiP no dobramento e na montagem de proteinas de reserva (PUEYO et al., 1995). A proteina BiP associa-se com mon6meros de faseolina antes da oligomeriza63o desta proteina, sendo detectada em associa63o com os polipept3dios monom3ricos, mas n3o com a forma trim3rica. LI et al. (1993) observaram a associa63o entre a proteina BiP e prolaminas do arroz rec6m-sintetizadas.

2.4. Uso de suspens6es celulares para estudo de express3o g6nica

Suspens6es celulares representam um sistema muito 3til quando se faz necess3rio um sistema homog6neo e que esteja sob condi63es controladas, para estudar v3rios tipos de respostas e mecanismos adaptativos de um conjunto

relativamente uniforme de células submetidas a vários estresses. Estes estresses podem ser bióticos ou abióticos. Dentre os estresses bióticos, podem ser citados aqueles relacionados à interação planta—patógeno. A vantagem de se utilizarem células em suspensão nesse caso, além de condição controlada, é poder usar elicitores para desencadear uma resposta. Elicitores são macromoléculas presentes nos patógenos (enzimas, compostos de paredes celulares, dentre outros). A exposição de células vegetais a essas macromoléculas elicitoras resulta em uma massiva mudança no metabolismo, levando ao acúmulo de compostos e proteínas que são descritas como participantes do processo de resposta da planta ao ataque de patógenos (BRADY e FRY, 1997; CHANDRA et al., 1996; NI et al., 1996; ZOOK et al., 1996).

Além disso, células em suspensão têm sido utilizadas para se estudar o metabolismo vegetal sobre diversos aspectos: metabolismo enzimático (KUSKE et al., 1996; ZANSK et al., 1996; ZHANG e KLESSIG, 1997); metabolismo mineral (THEODOROU e PLAXTON, 1996); metabolismo de aminoácidos (PADGETT e LEONARD, 1996); metabolismo de hormônios (ABRAMS et al., 1997), variação somática (OZEKI et al., 1997); e ciclo celular (CALLARD et al., 1996; FUERST et al., 1996; REICHHELD et al., 1996).

Células em suspensão também são uma excelente ferramenta para estudos de expressão transiente de genes introduzidos (via eletroporação ou biobalística). LI e GALLAGHER (1997), bombardeando células de *Kosteletzkya virginica*, estudaram a expressão do gene GUS (β -glucuronidase) via ensaios histoquímicos e RT-PCR. Esse sistema também pode ser utilizado para ensaios de regiões promotoras fundidas ao gene repórter GUS. Usando o método de biobalística, células de milho em suspensão foram transformadas, tendo sido observada alta frequência de co-transformação (SPENCER et al., 1990; GORDON-KAMM et al., 1990). A transferência de genes pela eletroporação tem sido aplicada, visando tanto à transformação transiente quanto à estável. LINDSEY e JONES (1987) analisaram a transferência de DNA mediada por eletroporação, por meio de ensaios de expressão transiente em células de beterraba, o que também tem sido

descrito para bases foliares de arroz, cevada, milho e trigo (DEKEYSER et al., 1990) e em suspensões de células de arroz (CHAUDHURY et al., 1994). A transformação estável pela eletroporação foi descrita para cultura de células em suspensão de milho (LAURSEN et al., 1994; SABRI et al., 1996) e para suspensões embriogênicas de cana-de-açúcar (ARENCIBIA et al., 1995).

Células em suspensão também têm sido frequentemente usadas para o estudo da expressão de genes, desencadeada em função de determinado estímulo. Por exemplo, a proteína BiP (chaperone molecular residente no RE) responde a uma gama de estímulos. A indução do acúmulo da proteína BiP de soja em resposta a vários estímulos (estresses hídrico e térmico, ácido salicílico (AS) e tunicamicina) tem sido observada em células de soja em suspensão (FIGUEIREDO et al., 1997). Similarmente, BiP de milho foi induzida por tunicamicina em suspensões celulares de endosperma de milho (FONTES et al., 1991). Em células de batata em suspensão, submetidas a estresse hídrico com PEG-8000, foi detectado um aumento na expressão de determinadas proteínas que responderam ao estresse (GRILLO et al., 1994). Estudos semelhantes relacionados ao estresse osmótico foram executados por LÖW e RAUSCH (1996). Estes autores utilizaram células de cenoura expostas a altas concentrações de NaCl e observaram modificações bioquímicas associadas ao ajustamento osmótico.

Particularmente relevante para os objetivos da presente pesquisa seria o uso de suspensões celulares para avaliar o acúmulo de BiP em resposta à expressão de proteínas secretórias mutantes, incapazes de adquirirem a conformação nativa. Neste caso, a associação tem caráter mais estável, aumentando a sensibilidade das técnicas-padrão de determinação de complexos proteína:proteína.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolamento, caracterização molecular e seqüenciamento do clone pUFVS64

Anticorpos gerados contra uma fração protéica, enriquecida para proteínas do sistema de endomembranas da semente da soja, foram utilizados para o escrutínio de uma biblioteca de expressão propagada em λ gt11. O RNA mensageiro, usado como substrato para a transcriptase reversa, foi purificado por cromatografia de afinidade, a partir de RNA total extraído de sementes de soja, colhidas 55 dias após o florescimento (FIGUEREDO et al., 1997). A expressão das seqüências clonadas foi induzida, após a formação de placas de lise, por meio de membrana de nitrocelulose embebida com isopropil-tiogalactosídeo. Réplicas das placas de lise, imobilizadas em membranas de nitrocelulose, foram bloqueadas com TBS-T [Tris-HCl 0,01 mol/L, pH 7,6, NaCl 1,5 mmol/L, Tween-20 0,1% (v/v)], contendo albumina de soro bovino (BSA) 1%, e incubadas com o anticorpo supracitado. Anticorpos contra IgG de coelho conjugados com a fosfatase alcalina foram empregados como segundo anticorpo. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada, usando-se os substratos NBT (azul-nitro-

tetrazólio, GIBCO/BRL) e BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, GIBCO/BRL). Após o escrutínio de 5×10^6 pfu (unidades formadoras de placas), diversos fagos recombinantes, que mostraram sinais positivos com os anticorpos usados, foram transferidos para 1 mL do tampão TGM (Tris-HCl 10 mmol/L, pH 7,4, MgSO₄ 10 mmol/L, gelatina 0,01%) (SAMBROOK et al.,1989). A fim de assegurar que cada inóculo fosse homogêneo com relação ao fago recombinante, o escrutínio foi repetido quatro vezes. Entre diversos clones positivos, o clone 10 foi escolhido para caracterização molecular e seqüenciamento, com base no seu padrão de expressão gênica específico para semente (resultados não mostrados).

O inserto, de aproximadamente 1.800 pb, do clone 10 foi liberado do fago utilizando-se a enzima de restrição *EcoRI*, e transferido para pUC119, o que resultou no clone pUFVS64. Após a caracterização molecular do clone pUFVS64 pelo uso de enzimas de restrição, diversos subfragmentos de DNA foram subclonados nos fagos M13mp18 e M13mp19. As seqüências de nucleotídeos desses subclones foram determinadas pela técnica de terminação de cadeia por ddNTPs, usando fitas simples de M13mp18 e M13mp19 (VIEIRA e MESSING, 1982) e um “kit” de sequenase. A fim de reduzir possível compressão de Gs e artefatos do gel, em algumas reações, dGTP foi substituído por dITP. Quando julgado necessário estender o seqüenciamento, além de 400 pb do primer, dNTPs e dATP radioativos foram usados em concentrações 5 x e 2 x, respectivamente, e as reações de extensão procederam por 10 minutos. Todos os subclones foram seqüenciados em ambas direções.

3.2. Clonagem molecular

O clone pUFV 32 (a ser descrito posteriormente) — contendo um fragmento amplificado com nucleotídeos iniciadores que criam sítios para as enzimas de restrição *NdeI*, na extremidade 5', e *EcoRI*, na extremidade 3', no gene S64, no sítio *SmaI* de pUC 118 na orientação anti-senso — foi submetido à

digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* por duas horas a 37 °C. O fragmento liberado, de aproximadamente 1,6 kb, que corresponde à região codificadora do gene *s64*, foi isolado e purificado do gel de agarose, utilizando-se o “Kit Prep-A-Gene” (BIORAD), conforme recomendações do fabricante. Após separação eletroforética, a região do gel de agarose que continha o fragmento de interesse foi cortada e dissolvida em perclorato de sódio 4,5 mol/L, a 55 °C. A “matrix Prep-A-Gene” foi adicionada na relação de 5 µL de matriz para cada µg de DNA e a suspensão, incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a adsorção do DNA à sílica, a amostra foi lavada três vezes com o tampão de lavagem (BIORAD), contendo etanol 70%. O DNA foi eluído em água a 50 °C por 10 minutos.

O vetor de expressão em plantas pMON 921 (HANLEY-BOWDOIN et al., 1990) foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* e defosforilado. As reações de defosforilação foram conduzidas com a enzima fosfatase alcalina, em presença de Tris-HCl 50 mmol/L, pH 9,0, MgCl₂ 1 mmol/L e ZnCl₂ 0,1 mmol/L, e incubadas a 37 °C, por uma hora.

As reações de ligação dos fragmentos de DNA aos vetores foram conduzidas de acordo com técnicas-padrão de clonagem molecular em plasmídios (SAMBROOK et al., 1989). O fragmento de DNA a ser clonado e o vetor foram utilizados na razão molar 3:1, em um volume final de 15 µl, em presença da enzima T4 DNA Ligase (GIBCO/BRL), em Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,5, MgCl₂ 7 mmol/L, DTT (ditiotreitól) 1 mmol/L. As reações foram incubadas a 14 °C por 12 horas.

As células competentes foram preparadas de acordo com SAMBROOK et al. (1989). Células de *E. coli* JM109 foram crescidas em meio LB até atingir uma A_{600nm} de 0,5, incubadas a 0 °C por 10 minutos e concentradas duas vezes por centrifugação a 5.000 x g a 4 °C por 10 minutos, em CaCl₂ 100 mmol/L. Após incubação a 0 °C por 10 minutos, essas células foram coletadas no sobrenadante após centrifugação a 5.000 x g a 4 °C por cinco minutos, concentradas 10 vezes

pela ressuspensão em CaCl_2 100 mmol/L e glicerol 15%, aliquotadas e armazenadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$, até o uso.

Para transformação, foram adicionados 7 μL da reação de ligação a 200 μL de células competentes JM109, e a suspensão foi mantida a $0\text{ }^\circ\text{C}$ por 30 minutos. Após um choque térmico de dois minutos a $42\text{ }^\circ\text{C}$, foi adicionado 1 mL de meio LB, seguido por incubação a $37\text{ }^\circ\text{C}$, por uma hora. As células foram concentradas por centrifugação, ressuspensas em 100 μL de meio LB e espalhadas em placas contendo meio LB (sólido) e ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para seleção das colônias transformantes. O DNA plasmidial, isolado de bactérias transformadas, foi digerido com as enzimas de restrição apropriadas e separado por eletroforese em gel de agarose 1% para identificação dos clones. As colônias recombinantes foram armazenadas em glicerol 40% a $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

O fragmento *EcoRI/BamHI* de 1,6 kb, isolado do clone pUFV32, foi ligado ao vetor pMON921 (HANLEY-BOWDOIN et al., 1990), previamente digerido com as mesmas enzimas, resultando na obtenção do clone pUFV 51, contendo o gene S-64 na orientação anti-senso sob o controle do promotor 35S e a extremidade 3' do gene *srub*. A inserção do mesmo fragmento no vetor pMON921, previamente digerido com as enzimas *EcoRI/BglIII*, resultou na obtenção do clone pUFV 52, contendo o gene S64 na orientação senso, sob o controle do promotor 35S e a extremidade 3' do gene *srub*.

3.3. Isolamento de DNA plasmidial

O isolamento do DNA plasmidial foi conduzido, em pequena e média escala, pelo método da lise alcalina e adsorção de DNA em partículas de vidro e, ou, sílica, usando-se o "FlexiPrep Kit" (Pharmacia Biotech), e, em grande escala, por meio de gradiente de cloreto de céσιο (SAMBROOK et al., 1989). Em todos os métodos, inicialmente, as células foram rompidas pela lise alcalina, sendo o volume das soluções utilizadas ajustado de acordo com o volume inicial da

cultura. A bactéria transformada foi crescida em meio LB, contendo 100 µg/mL de ampicilina, por 12 a 16 horas. Após centrifugação, 5.000 x g por dois minutos a 4 °C, as células foram ressuspensas na solução I (glicose 50 mmol/L, Tris-HCl 25 mmol/L, pH 8,0, EDTA 20 mmol/L). Em seguida, foram adicionadas, consecutivamente, a solução II (NaOH 0,2 mol/L e SDS 1%) e a solução III (CH₃COOK 1mol/L). O resíduo insolúvel foi descartado por centrifugação a 11.000 x g por 10 minutos.

Para os métodos de isolamento em pequena e média escala, após a lise alcalina, o DNA plasmidial foi precipitado do sobrenadante pela adição de isopropanol, na concentração final de 42%, incubado por 10 minutos, à temperatura ambiente, e coletado por centrifugação a 11.000 x g, por 10 minutos. A suspensão "SephaglasTMFP" (Pharmacia Biotech) foi adicionada ao DNA plasmidial, seguida por lavagem com o tampão de lavagem e com etanol 70%. O DNA foi eluído em água por cinco minutos, à temperatura ambiente.

Para o método de isolamento em grande escala, a lise alcalina foi conduzida conforme descrito anteriormente, à exceção de que após a adição da solução II a mistura foi incubada a 0 °C por 10 minutos e, após a adição da solução III, incubada a 0 °C por mais 15 minutos. Após a lise alcalina, os ácidos nucléicos foram precipitados do sobrenadante pela adição de isopropanol, na concentração final de 42%, coletados por centrifugação a 11.000 x g por 15 minutos a 4 °C e ressuspensos em TE contendo 0,86 g/mL de brometo de etídio e cloreto de cézio (d = 1,55 g/mL). O gradiente de densidade de CsCl foi formado por centrifugação a 55.000 x g por 24 horas. O DNA plasmidial foi visualizado por meio de luz ultravioleta, isolado do gradiente, precipitado com etanol 70% e ressuspensado em água.

3.4. Cultura de células embriogênicas de soja em suspensão

A suspensão de células embriogênicas de soja foi obtida de acordo com a metodologia descrita por FINER e NAGASAWA (1988). Resumidamente, plantas de soja (*Glycine max* L. Merrill. cv. Cristalina) foram crescidas em casa de vegetação e 7 a 14 dias após o florescimento, suas vagens foram removidas e as sementes imaturas excisadas.

As vagens foram desinfestadas por imersão em álcool etílico 70% (v/v) por 20 a 30 segundos e pela imersão em solução de hipoclorito de sódio 20% (v/v) e Tween-20 0,05% (v/v), por 20 minutos. Em seguida, foram lavadas três vezes com água destilada e autoclavada. Os cotilédones foram removidos da semente para a cultura como descrito por LAZZERI et al. (1985).

Tecidos embriogênicos proliferantes de soja foram obtidos de acordo com FINER e NAGASAWA (1988). Os cotilédones foram divididos ao meio e transferidos para um meio de cultura composto dos sais básicos de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e suplementado com o complexo vitamínico do meio B5 (GAMBORG et al., 1968), mio-inositol 100 mg/L, sacarose 6% (p/v), 2,4-D (ácido 2-4-diclorofenoxiacético) 40 mg/L e ágar (Sigma Chemical Company, USA) 0,8% (p/v), sendo o pH ajustado em $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem. Utilizando-se tubos de ensaio (25 x 150 mm de diâmetro) com tampas de polipropileno, foram vertidos em cada um aproximadamente 10 mL de meio. Após o processo de autoclavagem e solidificação, o meio foi inoculado com metade de um cotilédone por tubo. As culturas foram transferidas para sala de crescimento e mantidas no escuro por uma semana. Após este período, as culturas foram transferidas a 28 °C com um fotoperíodo de 16 horas, com uma irradiância em torno de $20 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Embriões e tecidos embriogênicos foram subcultivados, a cada quatro a seis semanas, nesse meio. Em seguida, 20 a 50 mg de calos embriogênicos foram transferidos para frascos de 125 mL contendo 35 mL de meio de cultura líquido. Os frascos foram vedados e mantidos em agitador orbital, a 100 rpm. O meio de cultura em suspensão (meio 10A40N)

consiste em modificações dos sais básicos de MS, suplementado com o complexo vitamínico B5, sacarose 6%, 2,4-D 5 mg/L e glutamina 15 mmol/L (pH 5,7). A fonte de nitrogênio dos sais básicos de MS foi substituída por NH_4NO_3 10 mmol/L e KNO_3 30 mmol/L. O meio foi esterilizado em autoclave. As culturas em suspensão foram mantidas nas mesmas condições de temperatura e irradiância, com subcultivos semanais. Para subcultivo, 20 a 50 mg de tecido embriogênico foram transferidos para 50 mL de meio 10A40N fresco.

3.5. Eletroporação de células de soja em suspensão

Os experimentos de eletroporação foram conduzidos de acordo com as metodologias descritas por LUONG et al. (1995), em eletroporador "Gene Pulser II" com unidade "Capacitance Extender II" (BIORAD). Células após quatro dias de subcultivo foram sedimentadas por centrifugação a 200 x g, lavadas três vezes com tampão de eletroporação [KCl 80 mmol/L, CaCl_2 5 mmol/L, MES (ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico) 10 mmol/L, pH 6,7, manitol 0,425 mol/L] e concentradas duas vezes por ressuspensão em tampão de eletroporação. Em cubetas para eletroporação de 4 mm (BIORAD), foram adicionados 800 μL da suspensão celular, 10 μg de DNA plasmidial e 40 μg de ssDNA carreador. As amostras foram incubadas a 37 °C por uma hora e, em seguida, no gelo por 10 minutos. Foram aplicados dois pulsos de 380 V, 975 μF , com tempo médio de 30 ms. Após o pulso elétrico, as cubetas foram incubadas no gelo por 15 minutos e, em seguida, as suspensões celulares foram transferidas para erlenmeyers de 125 mL, contendo 10 mL do meio 10A40N. A cultura em suspensão foi mantida a 28 °C com um fotoperíodo de 16 horas, irradiância em torno de 20 $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sob agitação orbital de 100 rpm. As células foram eletroporadas na ausência de DNA e, ou, com vetor de expressão (pMON 921), como controle, e com as construções senso (pUFV52) e anti-senso (pUFV51) de

S-64, em três repetições. A extração de proteínas foi feita 24, 48 e 72 horas após a eletroporação.

3.6. Ensaio de biobalística

As células de soja foram bombardeadas com micropartículas de tungstênio M10 revestidas com DNA plasmidial do vetor pUC118 e dos clones pUFV51 e pUFV52, como descrito por RECH et al. (1996). O DNA plasmidial foi precipitado sobre as micropartículas e aliqotado na região central das membranas carreadoras, previamente posicionadas no suporte destas. Os discos, contendo as micropartículas cobertas com DNA, foram armazenados em dessecador. As células de soja foram filtradas, em peneira de 60 mesh (Sigma), e espalhadas homogeneamente sobre placas de Petri contendo 30 mL de meio 10A40N, acrescido de 0,8% de ágar e coberto por papel-filtro estéril. Em seguida, as células foram bombardeadas com as micropartículas, como descrito por RECH et al. (1996). Alternativamente, a fonte de açúcar do meio 10A40N foi substituída por 6% (p/v) de glicose ou de manitol. As placas foram transferidas para a sala de crescimento e mantidas sob irradiância em torno de $36 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, à temperatura de 28 °C e em fotoperíodo de 16 horas. O material foi coletado 48 horas após o bombardeamento. As proteínas totais foram extraídas e analisadas por SDS-PAGE, seguido por “immunoblotting”, como descrito a seguir.

3.7. Extração e quantificação de proteínas

As proteínas totais de células de soja em suspensão foram extraídas com tampão de lise [Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 7,5, KCl 0,05 mol/L, EDTA 1 mmol/L, TritonX-100 1% (v/v), PMSF (fluoreto α -toluenossulfônico) 1 mmol/L, DDT (ditiotretitol) 0,1 mmol/L, MgCl₂ 5 mmol/L]. A suspensão celular foi filtrada a

vácuo, e a massa celular obtida foi congelada em nitrogênio líquido e macerada em almofariz com 2 mL de tampão por grama de células. O resíduo insolúvel foi removido por centrifugação a 13.000 x g, por 10 minutos a 4 °C. Alternativamente, células eletroporadas ou bombardeadas foram homogeneizadas com tampão de lise [Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 7,5, KCl 0,05 mol/L, EDTA 1 mmol/L, TritonX-100 1% (v/v), PMSF 1 mmol/L, DDT 0,1 mmol/L, MgCl₂ 5 mmol/L] na proporção de 1:1 (p/v) e ultra-sonicadas. O material insolúvel foi descartado por centrifugação a 13.000 x g, por 10 minutos a 4 °C.

Extratos de proteínas totais de células de soja em suspensão foram quantificados pelo método "DC Protein Assay" (BIORAD), de acordo com as instruções do fabricante.

3.8. Gel de eletroforese SDS-PAGE e "immunoblotting"

Os extratos de proteína total de células de soja em suspensão foram analisados por SDS-PAGE, seguido por "immunoblotting". Eletroforeses em géis de poliacrilamida contendo SDS foram realizadas como descrito por LAEMMLI (1970), à exceção da concentração do gel de concentração, que foi de 5%. O extrato de proteína foi incubado por três minutos, a 100 °C, em tampão da amostra [glicerol 10% (v/v), SDS 2,3%, azul-de-bromofenol 0,25%, 2-mercaptoetanol 5% (v/v) e Tris-HCl 0,0625 mol/L, pH 6,8] antes de ser aplicado no gel. A eletroforese foi conduzida por 16 horas, aproximadamente, a 30 V no tampão de corrida (Tris-HCl 0,025 mol/L, glicina 0,2 mol/L, EDTA 1 mmol/L e SDS 3,5 mmol/L). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, usando-se o sistema de transferência da BIORAD, de acordo com as instruções do fabricante. Após a transferência (em aproximadamente uma hora, a 700 mA), a membrana de nitrocelulose foi incubada com o reagente de bloqueio "Blotting Grade Blocker, non-fat dry milk" (BIORAD) por uma hora, à temperatura ambiente. A membrana foi lavada com

TBS-T [Tris-HCl 0,01 mol/L, pH 7,6, NaCl 1,5 mmol/L, Tween-20 0,1% (v/v)] três vezes, por 15 minutos cada lavagem, e incubada com o anticorpo contra S64 (PIROVANI e FONTES, 1996) ou contra BiP (FIGUEREDO et al., 1997), numa diluição 1:1000, por quatro horas sob agitação. Em seguida, foram feitas três lavagens de 15 minutos, com TBS-T, e, então, a membrana foi incubada com o anticorpo contra IgG conjugada à fosfatase alcalina (Sigma), numa diluição de 1:5000, por duas horas. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada, usando-se o sistema de detecção NBT/BCIP (GIBCO/BRL).

3.9. Ensaio de co-sedimentação

Proteínas totais de células de soja em suspensão foram extraídas com tampão de lise [Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 7,5, KCl 0,05 mol/L, EDTA 1 mmol/L, TritonX-100 1% (v/v), PMSF 1 mmol/L, DDT 0,1 mmol/L, MgCl₂ 5 mmol/L]. A suspensão celular foi filtrada a vácuo, e a massa celular obtida foi macerada na proporção de 1 g de células por 2 mL de tampão. O resíduo insolúvel foi removido por centrifugação a 13.000 x g, por 10 minutos, a 4 °C. Um mL do sobrenadante foi incubado com 50 µL de suspensão da resina ATP-agarose, por quatro horas, a 4 °C, sob agitação constante. O mesmo procedimento foi feito com a resina GTP-agarose. Os complexos foram sedimentados por centrifugação a 8.000 × g, por dois minutos, a 4 °C. As resinas foram lavadas três vezes com 500 µL de tampão de lise e ressuspensas em 80 µL de tampão da amostra para SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). As proteínas co-sedimentadas foram analisadas por SDS-PAGE, seguido por “immunobloting”, usando-se os soros anti-BiP (FIGUEREDO et al., 1997) ou anti-S64 (PIROVANI e FONTES, 1996), anti-IgG conjugado à fosfatase alcalina como segundo anticorpo e o sistema de detecção NBT/BCIP (GIBCO/BRL).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento de cDNAs que codificam proteínas secretórias de soja

Inicialmente, foi conduzido o escrutínio de uma biblioteca de expressão de soja, usando anticorpos preparados contra frações microssomais da semente, com o objetivo de isolar cDNAs que codificam proteínas secretórias da semente de soja como potenciais substratos para BiP. Após o escrutínio de 5×10^6 placas, diversos clones positivos foram isolados, dos quais o clone 70 foi selecionado para a caracterização molecular, baseado na sua expressão semente-específica e na abundância dos transcritos correspondentes na semente (resultados não mostrados). O inserto de 1.8 kb foi liberado de γ gt11 e clonado no sítio *Eco*RI de pUC119, resultando no clone pUFVS64.

O clone pUFVS64 possui uma seqüência aberta de leitura (ORF) com potencial para codificar uma proteína de 496 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 64 kDa (Figura 1). Com base na presença da cauda de poli A, concluiu-se que a extremidade 3' do clone está completa. Na extremidade 5', o primeiro códon para metionina está inserido na seqüência GACCTCACCATGG, que atende às regras de KOZAK (1989) na definição do códon de iniciação para

TCCTCACTGACCTCACCATGGCGACCAGAGCCAAGCTTTCTTTAGCTATCTTCCTTTTCTTTCTTTAGCCT
M A T R A K L S L A I F L F F L L A
TGATTTCAAACCTAGCCTTGGGCAAACCTAAAGAAACCGAGGTCGAAGAAGATCCCGAGCTCGTAACATGCA
L I S N L A L **G** K L K E T E V E E D P E L V T C
AACACCAGTGCCAACAGCAACGGCAATACACTGAGAGTGACAAGCGAACATGCTTGCAACAATGTGACAGTA
K H Q C Q Q Q R Q Y T E S D K R T C L Q Q C D S
TGAAGCAAGAGCGAGAGAAACAAGTCGAAGAGGAAACTCGCGAGAAGGAAGAAGAACATCAAGAGCAGCATG
M K Q E R E K Q V E E E T R E K E E E H Q E Q H
AGGAGGAGCAAGACCAAAATCCCTACGTTTTTGAAGAAGATAAGGATTTTTCGACCAGAGTCGAAACAGAAG
E E E Q D Q N P Y V F E E D K D F S T R V E T E
GTGGCAGCATTCGGGTTCTCAAGAAGTTCAGTGAGAAATCCAAGCTTCTTCAAGGCAATGAGAATTTCCGTT
G G S I R V L K K F T E K S K L L Q G N E N F R
TGGCCATCTTAGAAGCTAGAGCACACACGTTTCGTGTCCCCACGCCACTTTGATTCGAGGTTGTCTTGTTCAL
L A I L E A R A H T F V S P R H F D S E V V L F
ACATTAAGGGGAGAGCCGTACTTGGGTTGGTGAGGGAAAGTGAACAGAAAAAATCACCCCTAGAACCTGGAG
N I K G R A V L G L V R E S E T E K I T L E P G
ACATGATACATACCAGCAGGCACACCACTGTACATCGTTAACAGAGATGAGAATGAGAAGCTCCTCCTTG
D M I H I P A G T P L Y I V N R D E N E K L L L
CCATGCTCCATATACCTGTCTCTACTCCTGGAAAATTTGAGGAATTTTTCGGGCCCTGGAGGACGAGACCCAG
A M L H I P V S T P G K F E E F F G P G G R D P
AATCGGTCCTCTCAGCATTGAGCTGGAATGTGCTGCAAGCTGCGCTCCAAACCCCAAGGAAAGTTAGAAA
E S V L S A F S W N V L Q A A L Q T P K G K L E
GGCTTTTTAATCAACAGAACGAGGAAGTATTTTCAAATAAGCAGAGAACGGGTGCGTGCCTTGGCCCCA
R L F N Q N E G S I F K I S R E R V R A L A P
CCAAGAAAAGCTCTTGGTGGCCATTTCGGCGGCAATCCAAGGCTCAATTCAATATTTTCAGCAAGCGTCCCA
T K K S S W W P F G G E S K A Q F N I F S K R P
CTTTCTCCAACGGATATGGCCGTTTAACTGAAGTTGGTCCTGATGATGAAAAGAGTTGGCTTCAAAGACTCA
T F S N G Y G R L T E V G P D D E K S W L Q R L
ACCTCATGCTTACCTTTACCAACATCACCCAGAGATCTATGAGTACTATTCACTACAACCTCACATGCAACGA
N L M L T F T **N I T** Q R S M S T I H Y N S H A T
AGATAGCACTGGTGATGGATGGTAGAGGGCATCTTCAAATATCATGTCCACACATGTCATCAAGGTCAGACT
K I A L V M D G R G H L Q I S C P H M S S R S D
CAAAGCATGATAAGAGTAGCCCCATACCATAGAATCAGTGGGACTTGAAGCCTGGAATGGTGTGTTGTTG
S K H D K S S P S Y H R I S A D L K P G M V F V
TCCCTCTGGTCATCCCTTCGTCACTATAGCTTCAAATAAGAGAATCTCCTCATAATTTGCTTCGAGGTTA
V P P G H P F V T I A S N K E N L L I I C F E V
ACGTTGAGACAACAAGAAGTTTACGTTTGCAGGGAAGGACAACATTGTGAGCTCTTGGACCAACGTCAGTA
N V R D N K K F T F A G K D N I V S S L D N V A
AGGAGCTGGCCTTAACTATCCTTCTGAGATGGTGAACGGAGTCTTCGAAAGAAAGGAGAGTCTCTTTTCC
K E L A F N Y P S E M V N G V F E R K E S L F F
CCTTCGAGTTGCCGAGCGAGGAGCGTGGTCGTGCGCTGTTGCGTGAGAAGCAGTGTGGAGGTGGCTGATAA
P F E L P S E E R G R R A V A *
CGGGGAATGATTTAGCTTTGAGAGTCTTTAAATTTTCTGTATTTGTTGTAATGTTAGTAGTTCCTTAAATT

GGCCAGATGGAGTTTATGTGTTTGTAATGCAGGGATGCTAACCGAATAAAATGGCCACTTGATTTGCTAAA

AAAAAAAAAAAA

Figura 1- Sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos de pUFVS64 (a sequência de aminoácidos deduzida é indicada pelo código de uma letra, abaixo da sequência de nucleotídeos; o primeiro códon para metionina é indicado por uma barra, e o códon terminador indicado por asterisco; a sequência consenso correspondente ao sítio de ligação de GTP está sublinhada; a sequência correspondente ao sítio de glicosilação está hachurada).

genes de células eucarióticas. A seqüência consenso GCCGCCCCAUGG, definida por Kozak, influencia na seleção do códon de iniciação durante o mecanismo de síntese de proteínas. Os nucleotídeos do consenso não exercem influências equivalentes, e a presença de uma purina na posição -3 e um G na posição +4 (sublinhados) parece ser particularmente importante. Estrategicamente, ambas as posições no clone pUFVS64 atendem perfeitamente a esse requisito.

4.2. Caracterização estrutural da proteína S-64

A partir da seqüência de nucleotídeos do clone pUFVS64, pode-se deduzir a estrutura primária da proteína S64, utilizando o programa de análise de seqüências FASTA do grupo de genética da Universidade de Wisconsin (Figura 1). A estrutura primária de S-64 apresenta características estruturais bioquimicamente relevantes. A seqüência de aminoácidos N-I-T (posições 338-341), localizada no terminal carboxílico dessa proteína, representa a seqüência consenso (N-X-T/S) para glicosilação de proteínas, cujo mecanismo se inicia no retículo endoplasmático pela ligação covalente do oligossacarídeo-núcleo. De maneira geral, a glicosilação contribui para a estabilidade de glicoproteínas e, indiretamente, acelera o dobramento correto da proteína na aquisição de sua conformação nativa funcional.

A proteína S-64 possui também a seqüência de aminoácidos ALAPTKKS (posições 279-287) que difere da seqüência consenso (A,G)X(4N)GK(S,T) por apenas um aminoácido. Esta seqüência consenso é comumente denominada de seqüência consenso A (WALKER et al., 1982) ou “P-loop” (SARASTE et al., 1990) e foi derivada de análises de comparações de seqüências e estudos cristalográficos de diversas proteínas que ligam ATP ou GTP. A estrutura secundária foi deduzida para a proteína S-64, aplicando-se as regras CHOU e FASMAN (1978), e o método GOR (GARNIER et al., 1996) (dado não

mostrado) reforça a hipótese de que S-64 possui um sítio funcional de associação com nucleotídeos. A sequência ALAPTKKS encontra-se no mesmo contexto de estrutura secundária do "motif A" ou "P-loop", formando uma alça flexível entre regiões intramoleculares de α -hélice e β -conformação que, provavelmente, liga a um dos grupamentos fosfato do nucleotídeo.

A análise de hidrofobicidade da proteína deduzida revelou que a proteína S-64 é, predominantemente, hidrofílica, embora apresente algumas regiões hidrofóbicas (Figura 2). Dentre elas, a mais acentuada corresponde ao terminal amino da proteína, cuja hidrofobicidade é característica de um peptídeo sinal que direciona a síntese da proteína para o lúmen do retículo endoplasmático. De fato, pelo método de VON HEIJNE (1988), esta sequência possui características de peptídeo sinal, com o sítio de clivagem deduzido no aminoácido 26. Contudo, o peptídeo compreendido entre o aminoácido 7 e o 27 possui características de hélices transmembranas, identificada pelo método SOSUI (MITAKU e HIROKAWA, 1997). Em células eucarióticas, frequentemente as proteínas que são transportadas no sistema de endomembranas possuem um peptídeo sinal no terminal amino, que é clivado após translocação para o retículo endoplasmático (RE). Recentemente, tem sido demonstrado que, em algumas proteínas de membranas, o peptídeo sinal não é clivado e permanece como um segmento transmembrana funcional. Ensaio de fracionamento subcelular têm demonstrado que a proteína S-64 associa-se à membrana plasmática (PIROVANI et al., 1997).

A análise comparativa de estrutura primária de proteínas revelou algumas regiões de conservação moderada entre a proteína S-64 e diversas proteínas de reserva de leguminosas e globulinas de cereais (Figura 3). Porém, a maior identidade de sequência observada (85%) foi com uma proteína de membrana que se liga à sacarose denominada SBP ("Sucrose Binding Protein"), previamente identificada em sementes de soja (GRIMES et al., 1992) (Figura 4). A proteína SBP foi originalmente identificada por meio de marcação de membranas do cotilédone da soja por fotoafinidade, usando HABS radioativo, um análogo de sacarose que inibe seu transporte (RIPP et al., 1988). Tem sido demonstrado que

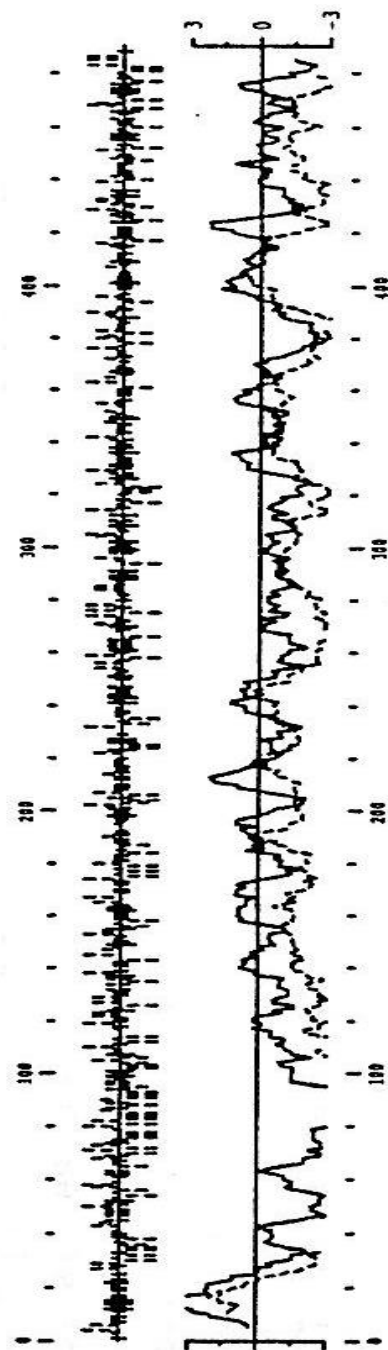


Figura 2- Análise de hidrofobicidade da proteína S-64 (a curva de hidrofobicidade, calculada usando uma janela de sete aminoácidos pelo método de Goldman, está indicada em linhas cheias e, pelo método de Kyte-Doolittle (1982), em linhas pontilhadas; à direita dos eixos verticais estão os aminoácidos hidrofílicos e os ácidos e, à esquerda, os hidrofóbicos e os básicos).


```

S-64  MATRAKLSLAIFLFFLLALISNLALGKLETEVEE.DPELVTCCKHQCQQQRQYTESDKRT
SBP   -GM-T-----F-----F----F--C-----E-----Q-----G---V

S-64  CLQQCD...SMKQEREKQVEEETREK.....EEHQEQHEEEQDQNPYVFEEKDFS
SBP   ---S--RYHR-----IQ-----KEEESRER---Q-----.-E--I-----E

S-64  TRVETEGGSIRVLKKFTEKSKLLQGNENFRLAILEARAHTFVSPRHFDSEVVLFNIGRA
SBP   -----R-----I-----F-----

S-64  VLGLVRESETEKITLEPGDMIHIPAGTPLYIVNRDENEKLLMLHIP..VSTPGKFEEF
SBP   ----SE-----D--F-----VS-----

S-64  FGPGGRDPESVLSAFSWNVLQAALQTPKGKLERLFNQNEGSIFKISRERVRALAPTGKS
SBP   -A-----NV-D-----R----QV-----K--

S-64  SWWPFGGESKAQFNIFSKRPTFSNGYGRLETVGPDD.EKSWLQRLNLMLTFTNITQRSNS
SBP   -----P-----I-----D-----

S-64  TIHYNHATKIALVMDGRGHLQISCPHMSSRS.DSKHDKSSPSYHRISADLKPGMVFPVP
SBP   -----I-----SH-----S-----

S-64  PGHPFVTIASNKENLLIICFEVMVRDNKKFTFAGKDNIVSSLDNVAKELAFNYPSEMVNG
SBP   -----M-----NA-----

S-64  VFE-----RKESLFFPFELPSEERGRAVA
SBP   --LLQRFLERKLIGRLYHLPHKD----F-----R-----

```

Figura 4- Análise de comparação de seqüência primária entre as proteínas S-64 e SBP (“Sucrose Binding Protein”) (os pontos representam “gaps” que foram introduzidos para permitir melhor alinhamento das seqüências; os traços indicam os aminoácidos idênticos; o alinhamento das seqüências primárias foi feito, utilizando-se o programa “Swiss Protein”).

a proteína SBP está associada com a membrana plasmática de células de planta ativamente engajadas no transporte de sacarose (GRIMES et al., 1992). No cotilédone, a síntese de SBP está sujeita a uma regulação temporal, coordenada com a taxa de transporte de sacarose para a semente. Evidências mais diretas do envolvimento da proteína SBP no transporte de sacarose para o interior da célula foram obtidas em leveduras mutantes no gene da invertase, que definitivamente não crescem em meios nos quais a sacarose é a única fonte de carboidrato (RIESMEIER et al., 1992). A expressão do cDNA que codifica SBP em leveduras mutantes é suficiente para reverter o fenótipo desses mutantes. A alta identidade de seqüências entre SBP e S-64 constitui forte indicativo de que a proteína S-64 é funcionalmente análoga e, provavelmente, está envolvida no transporte de sacarose em células de plantas. Contudo, a identificação de um peptídeo sinal em potencial na estrutura primária da proteína S-64 e sua localização subcelular indicam que, de fato, o clone pUFVS64 codifica uma proteína secretória. Sendo assim, a via de biossíntese da proteína S-64 a torna um substrato em potencial para estudo de interações com BiP de soja.

4.3. Expressão de S-64 e BiP em células de soja em suspensão

A proteína S-64 é sintetizada na semente de soja, em baixos níveis, e possui uma homologia moderada de seqüência com as proteínas de reserva (Figura 3). Estas características representam uma dificuldade na detecção de S-64 em extratos de proteína total de sementes, uma vez que anticorpos contra S-64 reconhecem epitopos comuns a proteínas de reserva da soja (PIROVANI e FONTES, 1996). Diante dessa dificuldade, suspensão de células embriogênicas de soja foi usada como um sistema-modelo para o estudo da expressão de S-64 e sua interação com BiP, pela facilidade de se introduzirem genes (via eletroporação ou biobalística) e por representar um sistema homogêneo, que permite um maior controle das condições experimentais.

Para verificar a expressão da proteína BiP e da proteína S-64 endógenas em suspensão celular de soja, o extrato de proteínas totais foi fracionado por SDS-PAGE, transferido para uma membrana de nitrocelulose e sondado com anticorpos preparados contra S-64 (Figura 5, anti-S64) e contra a proteína BiP da soja (Figura 5, anti-BiP). A expressão de BiP em suspensão celular foi facilmente detectada (Figura 5A), enquanto a expressão de S-64 apresenta algumas dificuldades de detecção, sendo necessário maior tempo de contato com o sistema de revelação (NBT/BCIP), o que resultou no aparecimento de reações cruzadas (Figura 5B). Assim sendo, os experimentos subseqüentes foram conduzidos com o objetivo de aumentar a síntese da proteína S-64 em suspensões celulares, de forma a aumentar a sensibilidade dos ensaios para determinação de associação entre BiP e S-64.

4.4. Expressão transiente de S-64 em células intactas eletroporadas

O uso de células intactas na introdução de genes via eletroporação apresenta vantagens em relação a protoplastos quando o objetivo é o estudo da expressão gênica transiente, já que as células não passam pelo processo de remoção, mesmo que parcial, da parede celular. Com o objetivo de superexpressar ou suprimir S-64 em células de soja em suspensão, a seqüência codificadora desta proteína foi clonada em pMON 921, na orientação anti-senso, pUFV 51, e na orientação senso, pUFV 52 (Figura 6).

Num experimento preliminar, as células de soja em suspensão foram inicialmente eletroporadas com o clone pUFV52, a fim de se avaliar a expressão do gene exógeno e fixar um período de tempo mínimo para esta. Cultura de células em suspensão (quatro dias após o subcultivo) foram eletroporadas com um pulso de 380 V, 975 μ F, com tempo médio de 30 ms. A síntese da proteína S-64 foi avaliada por meio de "immublottings" de proteínas totais, extraídas 24, 48 e 72 horas após a eletroporação (Figura 7). Um segundo parâmetro considerado foi

(A)

ANTI-BiP

1 2 3



(B)

ANTI-S64

1 2 3

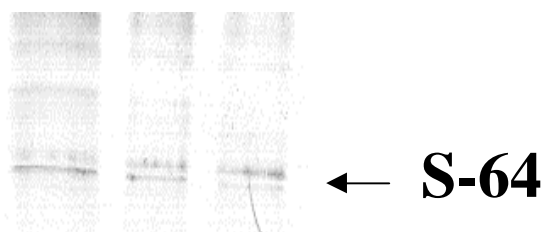


Figura 5- Expressão de S-64 e BiP em células de soja em suspensão (o extrato protéico, total de células de soja em suspensão saturadas, foi separado por SDS-PAGE, transferido para membrana de nitrocelulose e sondado com anti-S64 (B) e anti-BiP (A); foram aplicados 20 μ L (linha 1), 10 μ L (linha 2) e 5 μ L (linha 3) de extrato de proteínas totais de células de soja saturadas, para ambos anticorpos; a detecção foi feita, usando-se anti-IgG conjugado à fosfatase alcalina e os substratos NBT/BCIP).

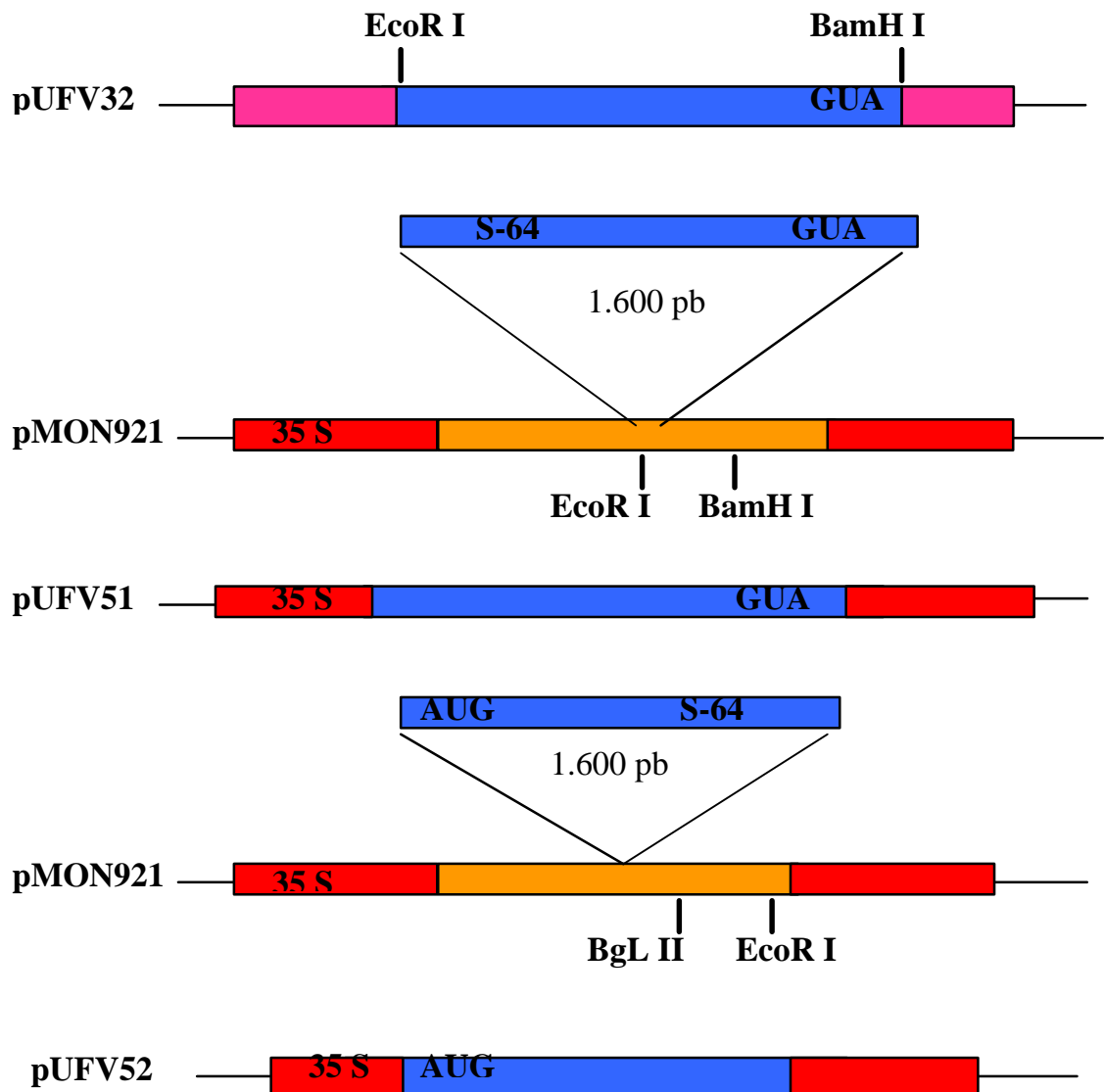


Figura 6- Etapas da clonagem do gene S-64 em pMON 921, vetor para expressão de genes em plantas (o clone pUFV 32, que contém o fragmento amplificado de S-64 no sítio de *SmaI* em pUC118 com orientação anti-senso, foi digerido com *EcoRI* e *BamHI*; o inserto liberado foi clonado em pMON 921, nos sítios de *EcoRI* e *BamHI*, para a orientação anti-senso, e, nos sítios de *BglII* e *EcoRI*, para a orientação senso).

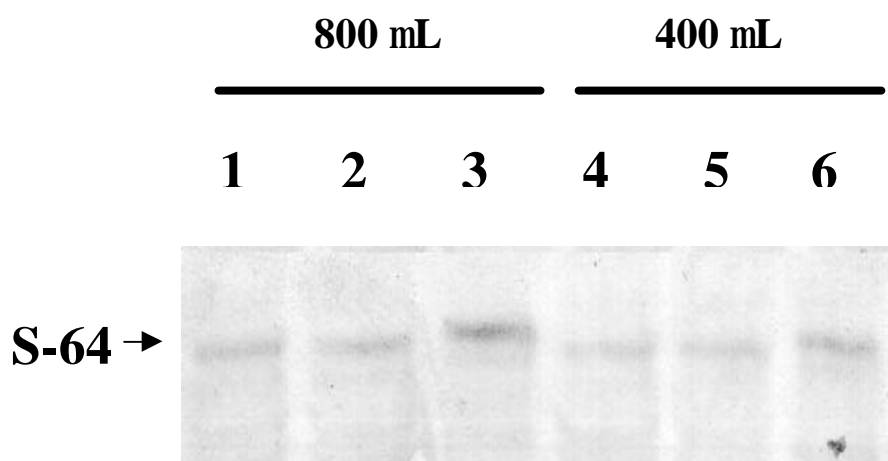


Figura 7- Expressão transitória de S-64 em células de soja em suspensão eletroporadas (as células foram eletroporadas em três repetições; o material foi coletado 24 (linhas 3 e 6), 48 (linhas 2 e 5) e 72 horas (linhas 1 e 4) após a eletroporação; as proteínas totais foram extraídas, por ultra-sonicação, fracionadas em SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas com anticorpo contra S64; nas linhas 4, 5 e 6 foram utilizados 800 μ L da suspensão celular e 10 μ g de DNA plasmidial, pUFV52, para eletroporação; nas linhas 1, 2 e 3 foi utilizada uma diluição 1:1 (v/v) da suspensão celular em tampão de eletroporação, num volume final de 800 μ L e 10 μ g de DNA plasmidial, pUFV52).

a quantidade de células eletroporadas, sendo utilizados 400 μ L (linhas 1, 2 e 3) e 800 μ L (linhas 4, 5 e 6) de células. A expressão transiente do gene S-64 foi detectada a partir de 24 horas (linhas 3 e 6), e o acúmulo da proteína persistiu por 48 horas (linhas 2 e 5) e 72 horas (linhas 1 e 4), após a eletroporação, não havendo diferença marcante na eficiência da expressão transiente da proteína recombinante com relação ao tempo de incubação e a quantidade de células eletroporadas.

Os anticorpos preparados contra uma versão truncada da proteína S-64, produzida em bactéria, revelaram a presença de dois polipeptídios imunologicamente conservados em frações de membranas da semente (PIROVANI e FONTES, 1996). Com a finalidade de identificar se estes polipeptídios são produtos de diferentes genes ou diferentes formas pós-traducionalmente modificadas da mesma proteína, o clone pUFV52 foi eletroporado em suspensões celulares e sua expressão transiente, avaliada por "immunoblottings" de proteína total, extraída 48 horas após eletroporação. Para aumentar a eficiência de transferência do gene quimérico, DNA de esperma de salmão (40 μ g) foi incluído nos ensaios de eletroporação como carreador. A eficiência de expressão transiente do gene quimérico S-64 foi confirmada pelo aumento significativo do acúmulo da proteína S-64 em células eletroporadas (Figura 8, linha Ce), quando comparado com o acúmulo dessa proteína em células não-eletroporadas (Figura 8, linha Cn). A proteína codificada pelo cDNA isolado, pUFVS-64, e sintetizada em suspensões celulares possui uma migração eletroforética correspondente àquela do polipeptídio da semente de soja de menor massa molecular (compare linhas Ce e Me). Uma vez que suspensões celulares mantêm, eficientemente, a maquinaria funcional de biossíntese e processamento de proteínas, o acúmulo de apenas uma forma da proteína como produto da expressão transiente do gene quimérico S-64 constitui forte indicativo de que os dois polipeptídios, imunologicamente conservados, da semente de soja são produtos de diferentes genes. Coerente com estes resultados, a análise de "Southern blot" genômico de reconstituição do número de cópias tem revelado

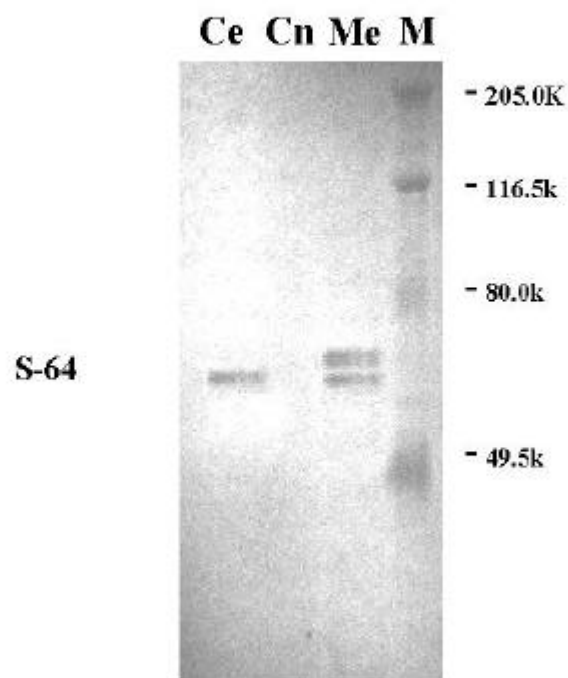


Figura 8- Comparação entre a expressão de S-64 endógena em fração microsomal e a expressão transitente em células eletroporadas (extrato de proteínas totais de células de soja eletroporadas com o clone pUFV52 (Ce), fração microsomal de sementes colhidas 20 DAF (ME) e extrato de proteínas totais de sementes colhidas 20 DAF (Cn) foram fracionados em SDS-PAGE e submetidos a "immunobloting"; (M) corresponde ao marcador de peso molecular; foram utilizadas quantidades equivalentes de proteínas).

que existem, pelo menos, duas cópias homólogas ao gene S-64 no genoma da soja (Fontes, E. P. B., resultados não publicados). Além disso, esses resultados demonstraram a obtenção de um sistema eficiente de expressão transiente de genes por meio de eletroporação de células intactas de cotilédones de soja em suspensão.

4.5. Avaliação da expressão transiente de S-64 em células intactas bombardeadas e mantidas na presença de diferentes fontes de carboidratos

A proteína S-64 exibe conservação de seqüência com a proteína SBP (Figura 4), previamente purificada de extratos de sementes de soja por cromatografia de afinidade, baseando-se na sua capacidade de se ligar à sacarose (RIPP et al., 1988). A proteína SBP tem sido detectada associada à membrana plasmática de células ativamente comprometidas com o transporte de sacarose, incluindo células do mesofilo de folhas jovens, células companheiras do floema e células de cotilédones em desenvolvimento (GRIMES et al., 1992). No cotilédone, a expressão do gene *sbp* é detectada a partir de 10 dias após o florescimento (DAF). Entre 18-20 DAF ocorre um aumento acentuado nos níveis dos transcritos correspondentes e que persiste durante os estádios intermediários de desenvolvimento, com subsequente declínio com a maturação da semente (GRIMES et al., 1992). Este padrão de expressão temporal está coordenado com a taxa de transporte de sacarose para o cotilédone e sugere uma regulação positiva em resposta à sacarose.

Com a finalidade de avaliar se a expressão do gene S-64 é sensível à sacarose, células de soja em suspensão foram crescidas na presença de diferentes fontes de carboidratos, por 48 horas, sendo o acúmulo da proteína S-64 avaliado por meio de "immunoblottings" (Figura 9, controle). Um aumento significativo no acúmulo da proteína S-64 foi observado em células crescidas na presença de

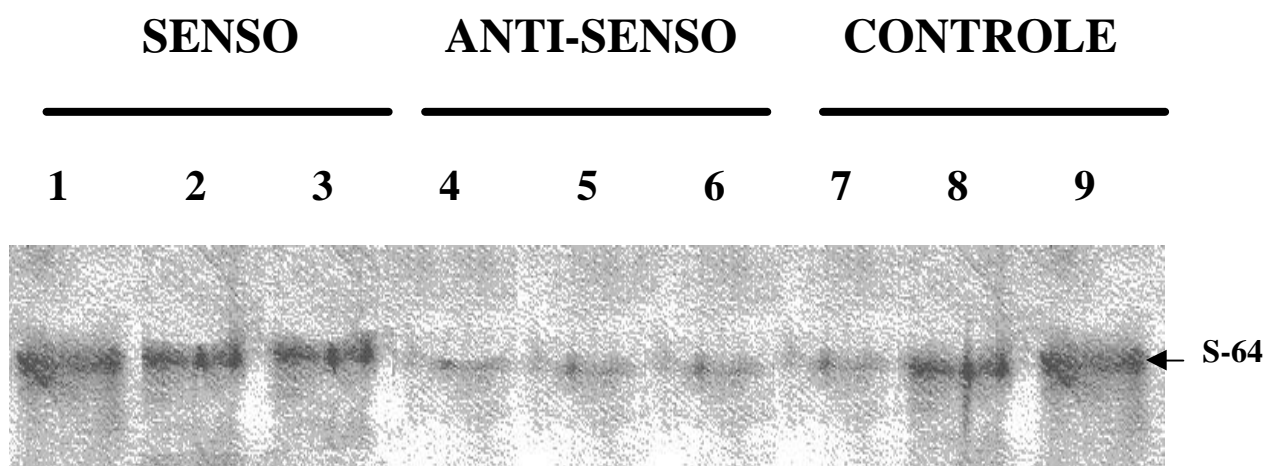


Figura 9- Expressão transiente de S-64 em células de soja transformadas por meio de bombardeamento (células de soja foram bombardeadas com micropartículas de tungstênio revestidas com DNA plasmidial dos clones pUFV51 (anti-senso) e pUFV52 (senso), sendo o controle o DNA plasmidial de pMON921; a fonte de açúcar, sacarose (linhas 3, 6 e 9), do meio 10A40N, foi substituída por glicose (linhas 2, 5 e 8) e por manitol (linhas 1, 4 e 7) na concentração de 6% (p/v); as placas foram mantidas em sala de crescimento, sob irradiância em torno $36 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, à temperatura de 28°C e em fotoperíodo de 16 horas; o material foi coletado 48 horas após o bombardeamento; as proteínas totais foram extraídas e analisadas por SDS-PAGE, seguido por "immunoblotting").

sacarose (linha 9) e glicose (linha 8), mas não na presença de manitol (linha 7). A indução da síntese de S-64 em resposta a altas concentrações de sacarose sugere que a proteína S-64 é funcionalmente análoga à proteína SBP e, provavelmente, está envolvida no transporte de sacarose em células vegetais.

A expressão transiente do gene S-64 também foi avaliada em suspensões celulares de soja bombardeadas com genes quiméricos, na orientação senso e anti-senso. A expressão do gene anti-senso (Figura 9, anti-senso) em células bombardeadas não resultou no silenciamento completo do gene endógeno (compare linhas 4 e linha 7), mantendo-se num nível basal de expressão. No entanto, a eficiência da expressão do gene antisenso pode ser avaliada pela perda da regulação positiva em presença de glicose (compare linhas 5 e 8) e sacarose (compare linhas 6 e 9) nas células bombardeadas.

A eficiência da expressão transiente do gene quimérico senso pelo método biobalístico também foi avaliada (Figura 9, senso). Células bombardeadas com a construção senso acumularam níveis muito superiores da proteína S-64 (linha 1) quando comparados com aqueles observados em células não transformadas (linha 7). Além disso, a expressão do gene endógeno em células superexpressando o gene S-64 senso não é sensível à presença de sacarose (compare linhas 2 e 8) e glicose (compare linhas 3 e 9). Esses resultados sugerem que a concentração de S-64 regula sua expressão gênica e que, provavelmente, essa proteína está envolvida em um eficiente mecanismo de transporte de sacarose.

4.6. Associação transiente entre as proteínas BiP e S-64

A associação entre as proteínas BiP e S-64 foi avaliada, levando-se em consideração atividades bioquímicas diferenciadas, associadas com as referidas proteínas. A proteína BiP, como membro da família de proteínas de choque térmico Hsp70, tem um domínio de ligação a ATP e possui atividade de ATPase

(HAAS,1994). Análises bioquímicas têm mostrado que BiP de plantas se liga a ATP *in vitro* com alta afinidade e não se liga a GTP (ANDERSON et al., 1994a; FONTES et al., 1991).

Uma característica bioquimicamente relevante na estrutura primária da proteína S-64 é a presença da seqüência de aminoácidos ALAPTKKS, que difere da seqüência consenso (A,G)X(4N)GK(S,T), comum a proteínas que ligam ATP ou GTP, por apenas um aminoácido. Esta seqüência consenso é considerada a seqüência mais bem conservada para sítios de ligação de GTP ou ATP. De fato, ensaios usando [α -³²P]-GTP têm demonstrado que a proteína S-64 associa estavelmente com este nucleotídeo (Pirovani et al., resultados não publicados). Além disso, a proteína S-64 possui a seqüência NIT, localizada em seu terminal carboxílico, que corresponde a um sítio de glicosilação de proteínas.

Ensaio de sedimentação de proteínas por afinidade, usando-se resinas de ATP-agarose, GTP-agarose e ConA-sepharose, foram conduzidos com extratos de proteína total preparados a partir de suspensões celulares. A capacidade das proteínas BiP e S-64 de se ligarem a estas resinas foi avaliada por "immunoblottings" das proteínas sedimentadas, usando os anticorpos anti-BiP e anti-S64 (Figura 10). Coerente com sua atividade de ligação a GTP, a proteína S-64 foi sedimentada por afinidade pela resina GTP-agarose (Figura 10A, linha 2). No entanto, apesar de BiP não interagir com GTP, a resina GTP-agarose foi efetiva em precipitar a proteína BiP (Figura 10B, linha 2). Provavelmente, a co-sedimentação de BiP com GTP-agarose reflete uma associação prévia entre BiP e proteínas que se ligam a GTP.

Uma vez que BiP exibe a atividade de ligação a ATP, a proteína BiP da soja associa-se diretamente à resina ATP-agarose (Figura 10B, linha 1). Similarmente, a proteína S-64 foi precipitada por ATP-agarose (Figura 10A, linha 1), embora não se associe diretamente a este nucleotídeo. A co-sedimentação de S-64 com ATP-agarose sugere a existência de associações prévias entre S-64 e proteínas que ligam a ATP, provavelmente BiP.

Interessantemente, os dois polipeptídios imunologicamente relacionados foram co-sedimentados por ATP-

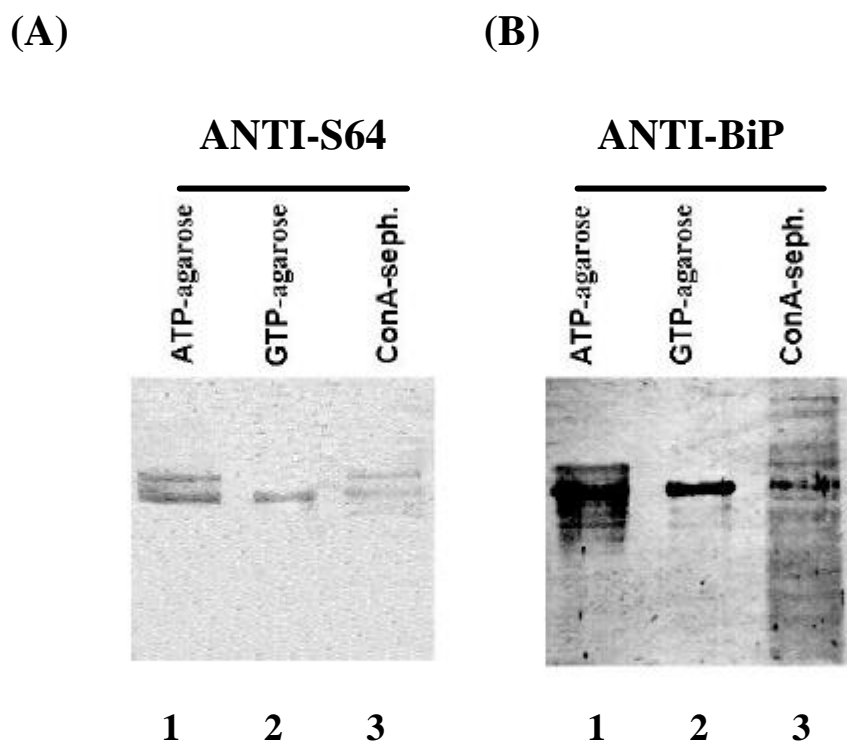


Figura 10- Associação transitória entre as proteínas BiP e S-64 (a proteína total extraída de células de soja em suspensão foi incubada, por quatro horas, a 4°C, sob agitação constante, com as resinas conjugadas de ATP-agarose, GTP-agarose e ConcanavalinaA-sepharose (ConA-seph); as frações sedimentadas por centrifugação foram fracionadas em SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas com anti- S64 (A) e anti-BiP (B)).

agarose (Figura 10A, linha 1), enquanto apenas S-64 se liga diretamente a GTP (linha 2). Assim, também, ambos os polipeptídios reconhecidos por anti-S64 são glicosilados, conforme julgado pela capacidade de se ligarem à concanavalina A-sepharose (Figura 10A, linha 3). No entanto, apesar de BiP não ser glicoproteína, a proteína BiP da soja foi co-sedimentada por ConA-sepharose (Figura 10B, linha 3). Coletivamente, estes resultados sugerem que a proteína BiP interage com S-64. Evidências mais diretas foram fornecidas por meio de ensaios de co-imunoprecipitação, usando anticorpos contra BiP e contra S-64 (dados não mostrados).

Tem sido demonstrado que interações mediadas por chaperones moleculares são mais estáveis com proteínas anormais, incapazes de se dobrarem corretamente (GETHING et al., 1986). Associações entre a proteína BiP e proteínas recém-sintetizadas são transientes, porque BiP se dissocia tão logo a proteína adquire sua conformação funcional. Associações "permanentes" entre BiP e proteínas secretórias refletem a falha desses polipeptídios de se dobrarem corretamente, sendo retidas no RE (BOLE et al., 1989; GETHING et al., 1986). Assim sendo, uma maneira de aumentar a estabilidade do complexo BiP:S-64 seria promover, intencionalmente, mutações na proteína S-64 que impossibilitassem o seu dobramento correto. Tem sido demonstrado que agentes químicos que impedem a glicosilação de proteínas no RE promovem um acúmulo de BiP e previnem o dobramento correto de proteínas anormais. Conseqüentemente, mutações no sítio de glicosilação de S-64 seriam tão efetivas, com vantagens de direcionar interações específicas mais estáveis entre as proteínas BiP e S-64. Dessa forma, o sítio de glicosilação de S-64 foi mutado pela conversão dos aminoácidos NIT para GII. A obtenção de S-64 mutante e um sistema eficiente de expressão transiente de genes exógenos em suspensões celulares de soja fornecem um meio eficiente para detecção de associações mais estáveis entre S-64 e BiP, o que possibilitará a caracterização bioquímica dessas interações.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O clone pUFVS64 foi, inicialmente, isolado de uma biblioteca de expressão de soja, usando anticorpos contra frações microssomais da semente, e selecionado para caracterização molecular, com base na sua expressão semente-específica e na abundância dos transcritos correspondentes. O clone codifica para uma proteína de 496 aminoácidos e massa molecular de 64 kDa. A estrutura primária deduzida para a proteína S-64 apresenta uma seqüência consenso para glicosilação, localizada no terminal carboxílico, e um sítio de associação com nucleotídeos, ATP ou GTP. A análise de hidrofobicidade da proteína deduzida revelou a presença de uma seqüência altamente hidrofóbica no terminal amino, que constitui um peptídeo sinal em potencial. A análise comparativa de estrutura primária revelou algumas regiões de conservação moderada entre S-64 e diversas proteínas de reserva de leguminosas e globulinas de cereais. No entanto, a proteína S-64 exibe conservação de seqüência de 85% com SBP, uma proteína de membrana que se liga à sacarose em plantas. Com essas características, S-64 se mostrou um substrato em potencial para estudos de interações entre a proteína BiP e as proteínas secretórias da soja.

Uma vez que suspensões celulares mantêm, eficientemente, a maquinaria funcional de biossíntese e processamento de proteínas, suspensões embriogênicas de soja foram utilizadas como um sistema eficiente de expressão transiente de genes por meio de eletroporação e bombardeamento. Com o objetivo de superexpressar ou suprimir a proteína S-64 em suspensão celular de soja, a seqüência codificadora de S-64 foi clonada em pMON921, na orientação anti-senso (pUFV51) e na orientação senso (pUFV52). A expressão transiente do gene quimérico S-64 introduzido por eletroporação foi detectada a partir de 24 horas, e o acúmulo da proteína persistiu por 48 e 72 horas após a eletroporação. A eficiência de expressão transiente do gene quimérico S-64 foi confirmada pelo aumento significativo do acúmulo de S-64 em células eletroporadas, quando comparado com o acúmulo dessa proteína em células não-eletroporadas.

Ensaio em suspensões celulares, na presença de diferentes fontes de carboidratos, demonstraram que o gene S-64 é induzido ou reprimido em resposta a sacarose. Esse padrão de expressão gênica é consistente com o envolvimento de S-64 no transporte de sacarose. A eficiência da expressão transiente do gene S-64 também foi avaliada em suspensões celulares de soja bombardeadas com genes quiméricos, nas orientações senso e anti-senso. A expressão do gene anti-senso em células bombardeadas não resultou no silenciamento completo do gene endógeno, mantendo-se um nível basal de expressão. A eficiência da expressão do gene anti-senso pode ser avaliada pela perda da regulação positiva em presença de glicose e sacarose. A eficiência da expressão transiente do gene quimérico senso pelo método biobalístico mostra um acúmulo em níveis muito superiores da proteína S-64 quando comparados com aqueles observados em células não transformadas. Além disso, a expressão do gene endógeno em células superexpressando o gene S-64 senso não é sensível à presença de sacarose e glicose. Estes resultados sugerem que a concentração de S-64 regula sua expressão gênica e que, provavelmente, esta proteína está envolvida em um eficiente mecanismo de transporte de sacarose.

A interação entre as proteínas BiP e S-64 foi avaliada por meio de ensaios de sedimentação por afinidade, usando-se resinas de ATP-agarose, GTP-agarose e ConA-sepharose e extratos de proteína total de suspensões celulares. Coerente com sua atividade de ligação a ATP, a proteína BiP foi precipitada pela resina ATP-agarose. No entanto, embora BiP não se associe diretamente com GTP e concanavalina A, as resinas de GTP-agarose e ConA-sepharose foram eficientes em co-sedimentar a proteína BiP. Por ser uma glicoproteína que se liga a GTP, foi demonstrado que a proteína S-64 se associa diretamente a GTP-agarose e ConA-sepharose. Porém, apesar de não exibir atividade de ligação a ATP, a resina ATP-agarose foi eficiente em co-sedimentar S-64. Coletivamente, esses resultados de co-sedimentação indireta de BiP e S-64 sugerem que a proteína S-64 forma um complexo com a proteína BiP, provavelmente durante o processo de dobramento no RE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, S. R., ROSE, P. A., CUTLER, A. J., BALSEVICH, J. J., LEI, B., WALKER-SIMMONS, M. K. 8'-methylene abscisic acid: An effective and persistent analog of abscisic acid. **Plant Physiology**, v.114, n.1, p. 89-97, 1997.
- ANDERSON, J. V., HASKELL, D. W., GUY, C. L. Differential influence of ATP on native spinach 70-kilodalton heat-shock cognates. **Plant Physiology**, v.104, n.4, p. 1371-1380, 1994a.
- ANDERSON, J. V., LI, Q.-B., HASKELL, D. W., GUY, C. L. Structural organization of the spinach endoplasmic reticulum-luminal 70-kilodalton heat-shock cognate gene and expression of 70-kilodalton heat-shock genes during cold acclimation. **Plant Physiology**, v.104, n.4, p. 1359-1370, 1994b.
- ARENCIBIA, A., MOLINA, P. R., de la RIVA, G., SELMAN-HOUSEIN, G. Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by intact cell electroporation. **Plant Cell Reports**, v.14, p. 305-309, 1995.
- BAR-PELED, M., CONCEIÇÃO, A. S., FRIGERIO, L., RAIKHEL, N. V. Expression and regulation of aERD2, a gene encoding the KDEL receptor homolog in plants, and other genes encoding proteins involved on ER-Golgi vesicular trafficking. **The Plant Cell**, v.7, n.6, p. 667-676, 1995.

- BLOND-ELGUINDI, S., CWIRIA, S. E., DOWER, W. J., LIPSHULTZ, R. J., SPRANG, S. R., SAMBROOK, J. F., GETHING, M. H. Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. **Cell**, v.75, n.4, p. 717-728, 1993a.
- BLOND-ELGUINDI, S., FOURIE, A. M., SAMBROOK, J. F., GETHING, M. H. Peptide-dependent stimulation of the ATPase activity of the molecular chaperone BiP is the result of conversion of oligomers to active monomers. **The Journal of Biological Chemistry**, v.268, n.17, p. 12730-12735, 1993b.
- BOLE, D. G., DOWIN, R., DORIAUX, M., JAMIESON, J. D. Immunocytochemical localization of BiP to the rough endoplasmic reticulum: evidence for protein sorting by selective retention. **The Journal Histochemistry and Cytochemistry**, v.37, n.12, p. 1817-1823, 1989.
- BRADY, J. D., FRY, S. C. Formations of di-isodityrosine and loss of isodityrosine in the cell walls of tomato cell-suspension cultures treated with fungal elicitors or H₂O₂. **Plant Physiology**, v.115, p. 87-82, 1997.
- BRODSKY, J. L. Post-translational protein translocation: not all hsc70s are created equal. **Trends Biochemistry Science**, v.21, n.4, p. 122-126, 1996.
- BRODSKY, J. L., SCHEKMAN, R. A Sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. **The Journal of Cell Biology**, v.123, p. 1355-1363, 1993.
- BROT, N., REDFIELD, B., QIU, N.-H., CHEN, G.-J., VIDAL, V., CARLINO, A., WEISSBACH, H. Similarity of nucleotide interactions of BiP and GTP-binding proteins. **Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America**, v.91, n.25, p. 12120-12124, 1994.
- BURKHOLDER, W. F., ZHAO, X., ZHU, X., HENDRICKSON, W. A., GRAGEROV, A., GOTTESMAN, M. E. Mutations in the C-terminal fragment of DNaK affecting peptide binding. **Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America**, v. 93, n.20, p. 10632-10637, 1996.

- CALLARD, D.; ALEXOS, M., MAZZOLINI, L. Novel molecular markers for late phases of the growth cycle of *Arabidopsis thaliana* cell-suspension cultures are expressed during organ senescence. **Plant Physiology**, v.112, p. 705-715, 1996.
- CHANDRA, S., MARTIN, G.B., LOW, P. S. The Pto kinase mediates a signaling pathway leading to the oxidative burst in tomato. **Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America**, v.93, p. 13393-13397, 1996.
- CHANG, S. C., WOODEN, S. K., NAKAKI, T., KIM, Y. K., LIN, A. Y., KUNG, L., ATTENELLO, J. W., LEE, A. S. Rat gene encoding the 78-kDa glucose-regulated protein GRP78: its regulatory sequences and the effect of protein glycosylation on its expression. **Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America**, v.84, p. 680-684, 1987.
- CHAPPELL, T. G., KONFORTI, B. B., SCHIMID, S. L., ROTHMAM, J. E. The ATPase core of a clathrin uncoating protein. **Journal Biological Chemistry**, v.262, p. 746-751, 1987.
- CHAUDHURY, A., CHOWDHURY, C. N., MAHESHWARI, N., MAHESHWARI, S. C. Growth behaviour of suspension cultures of rice and transient expression of electroporated gene in intact cells. **Journal Plant Biochemistry Biotechnology**, v.3, p. 9-13, 1994.
- CHOU, P. Y., FASMAN, G. D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. **Adv. Enzymol Relat Areas Molecular Biology**, v.47, p. 45-148, 1978.
- CHRISPEELS, M. J. Sorting of proteins in the secretory system. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 21-53, 1991.
- CORSI, A. K., SCHEKMAN, R. The luminal domain of Sec63p stimulates the ATPase activity of BiP and mediates BiP recruitment to the translocon in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Cell Biology**, v.137, n.7, p. 1483-1493, 1997.

- CRAVEN, R. A., TYSON, J. R., STIRLING, C. J. A novel subfamily of Hsp70s in the endoplasmic reticulum. **Trends in Cell Biology**, v.7, p. 277-282, 1997.
- D'AMICO, L., VALSASINA, B., DAMINATI, M. G., FABRINI, M. S., NITTI, G., BOLLINI, R., CERIOTTI, A., VITALE, A. Bean homologues of the mammalian glucose regulated proteins: induction by tunicamycin and interaction with newly synthesized storage proteins in the endoplasmic reticulum. **The Plant Journal**, v.2, p. 443-445, 1992.
- DEKEYSER, R. A., CLAES, B., De RYCKE, R. M. U., HABETS, M. E., Van MONTAGÜ, M. C., CAPLAN, A. B. Transient gene expression in intact and organized rice tissues. **The Plant Cell**, v.2, n.7, p. 591-602, 1990.
- DENECKE, J. Soluble endoplasmic reticulum resident proteins and their function in protein synthesis and transport. **Plant Physiology Biochemistry**, v.34, n.2, p.197-205, 1996.
- DENECKE, J., CARLSSON, L. E., VIDAL, S., EK, B., HÖGLUND, A. S., Van ZEIJ, M., SINJORGO, K. M. C., PALVA, E. T. The tobacco homolog of mammalian calreticulin is present in protein complexes *in vivo*. **The Plant Cell**, v.7, n.4, p. 391-406, 1995.
- DENECKE, J., GOLDMAN, M. H. S., DEMOLDER, J., SEURINCK, J., BOTTERMAN, J. The tobacco luminal binding protein is encoded by a multigene family. **The Plant Cell**, v.3, n.6, p. 1025-1035, 1991.
- DENECKE, J., RYCKE, R., BOTTERMAN, J. Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. **EMBO Journal**, v.11, n.6, p. 2345-2355, 1992.
- ELLIS, R. J., VAN DER VIES, S. M. Molecular chaperones. **Annual Review Biochemistry**, v.60, p. 321-347, 1991.
- ELLIS, R. J., VAN DER VIES, S. M., HEMMINGSEN, S. M. The molecular chaperone concept. **Biochemistry Society Symposium**, v.55, p.145-153, 1989.

- FELDHEIM, D., ROTHBLATT, J., SCHEKMAN, R. Topology and functional domains of Sec63p, an ER membrane protein required for secretory protein translocation. **Molecular Cell Biology**, v.12, n.7, p. 3288-3296, 1992.
- FIGUEIREDO, J. E. F., CASCARDO, J. C. M., CAROLINO, S. M. B., da ROCHA, W. D., BATISTA, D. P. O., FONTES, E. P. B. Water-stress regulation and molecular analysis of the soybean BiP gene family. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.9, n.2, p. 103-110, 1997.
- FINER, J. J., NAGASAWA, A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.15, p. 125-136, 1988.
- FLAHERTY, K. M., DELUCA-FALHERTY, C., McKAY, D. B. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. **Nature**, v.346, p.623-628, 1990.
- FLYNN, G. C., CHAPPELL, T. G., ROTHMAN, J. E. Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. **Science**, v.245, n.4916, p.385-390, 1989.
- FONTES, E. P. B., SHANK, B. B., WROBEL, R. L., MOOSE, S. P., OBRIAN, G. R., WURTZEL, E. T., BOSTON, R. S. Characterization of an immunoglobulin binding protein homolog in the maize *floury-2* endosperm mutant. **The Plant Cell**, v.3, n.5, p. 483-496, 1991.
- FONTES, E. P. B., SILVA, C. J., CAROLINO, S. M. B., FIGUEIREDO, J. E. F., BATISTA, D. P. O. A soybean binding protein (BiP) homolog is temporally regulated in soybean and associates detectably with normal storage proteins *in vitro*. **Brazilian Journal of Genetics**, v.19, n.2, p. 305-312, 1996.
- FOURIE, A. M., SAMBROOK, J. F., GETHING, M. J. H. Common and divergent peptide binding specificities of hsp70 molecular chaperones. **Journal Biology Chemistry**, v.269, n.48, p. 30470-30478, 1994.
- FREIDEN, P. J., GAUT, J. R., HENDERSHOT, L. M. Interconversion of three differential modified and assembled forms of BiP. **EMBO Journal**, v.11, n.1, p. 63-70, 1992.

- FUERST, R. A. U. A.; SONI, R.; MURRAY, J. A. H., LINDSEY, K. Modulation of cyclin transcript levels in cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v.112, p. 1023-1033, 1996.
- GAL, S., RAIKHEL, N. V. A carboxy-terminal plant vacuolar targeting signal is not recognized by yeast. **Plant Journal**, v.6, p. 235-240, 1994.
- GALANTE, E., VITALE, A., MANZOCCHI, L., SOAVE, C., SALAMINI, F. Genetic control of a membrane component and zein deposition in maize endosperm. **Molecular & General Genetics: MGG**, v.192, p. 316-321, 1983.
- GAMBORG, O. L., MILLER, R. A., OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exp Cell Res**, v.50, n.1, p. 151-158, 1968.
- GARNIER, J., GIBRAT, J. F., ROBSON, B. GOR method for prediction protein secondary structure from amino acid sequence. **Methods Enzymology**, v.266, p. 540-553, 1996.
- GETHING, M.-J., McCAMMON, K., SAMBROOK, J. Expression of wild-type and mutant forms of influenza hemagglutinin: the role of folding in intracellular transport. **Cell**, v.46, n.5, p. 939-950, 1986.
- GETHING, M.-J., SAMBROOK, J. Protein folding in the cell. **Nature**, v.355, p. 33-45, 1992.
- GOMORD, V., FAYE, L. Signals and mechanisms involved in intracellular transport of secreted proteins in plants. **Plant Physiology Biochemistry**, v.34, n.2, p. 165-181, 1996.
- GORDON-KAMM, W. J., SPENCER, T. M., MANGANO, M. L., ADAMS, T.R., DAINES, R. J., START, W. G., O'BRIEN, J. V., CHAMBERS, S. A., ADAMS, W. R., Jr., WILLETTS, N. G., RICE, T. B., MACKEY, C. J., KRUEGER, R. W., KAUSCH, A. P., LEMAUX, P. G. Transformation of

- maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. **The Plant Cell**, v.2, n.6, p. 603-618, 1990.
- GÖRLICH, D., RAPOPORT, T. A. Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. **Cell**, v.75, n.4, p. 615-630, 1993.
- GRAGEROV, A., GOTTESMAN, M. E. Different peptide binding specificities of hsp70 family members. **Journal Molecular Biology**, v.241, n.2, p. 133-135, 1994.
- GRILLO, S., COSTA, A., TUCCI, M., LEONE, A. Regulation of gene expression in response to drought and osmotic stress. **Biochemical and Cellular Mechanisms of Stress Tolerance in Plants**. In: Cherry, J. H. (ed.) Springer-Verlag, Berlin, 604p. 1994.
- GRIMES, H. D., OVERVOORDE, P. J. RIPP, K., FRANCESCHI, V. R., HITZ, W. D. A 62-kD sucrose binding protein is expressed and localized in tissues actively engaged in sucrose transport. **The Plant Cell**, v.4, n.9, p.1561-1574, 1992.
- HAAS, I. G. BiP (GRP78), an essential hsp70 resident of the endoplasmic reticulum. **Experientia**, v.50, n.11-12, p.1012-1020, 1994.
- HAAS, I. G., MEO, T. cDNA cloning of the immunoglobulin heavy chain binding protein. **Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America**, v.85, n.7, p. 2250-2254, 1988.
- HAAS, I. G., WABL, M. Immunoglobulin heavy chain binding protein. **Nature**, v.306, p. 387-389, 1983.
- HALBAN, P. A., IRMINGER, J.-C. Sorting and processing of secretory proteins. **Biochemistry Journal**, v.299, n.1, p. 1-18, 1994.
- HAMMOND, C., HELENIUS, A. Folding of VSV G protein: sequential interaction with BiP and calnexin. **Science**, v.266, n.5184, p.456-458, 1994.

- HANLEY-BOWDOIN, L., ELMER, J. S., ROGERS, S. G. Expression of functional replication protein from tomato golden mosaic virus in transgenic tobacco plants. **Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America**, v.87, p. 1446-1450, 1990.
- HARTL, F.-U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, v.381, p. 571-580, 1996.
- HAUGEJORDEN, S. M., SRINIVASAN, M., GREEN, M. Analysis of the retention signals of two resident luminal endoplasmic reticulum proteins by *in vitro* mutagenesis. **Journal Biology Chemistry**, v.266, p. 6015-6018, 1991.
- HELENIUS, A., MARQUARDT, T., BRAAKMAN, L. The endoplasmic reticulum as a protein folding compartment. **Trends Cell Biology**, v.2, p. 227-231, 1992.
- HENDERSHOT, L. M. Immunoglobulin heavy chain and binding protein complexes are dissociated *in vivo* by light chain addition. **The Journal of Cell Biology**, v.111, n.3, p.829-837, 1990.
- HIGH, S., DOBBERSTEIN, B. The signal sequence interacts with the methionine-rich domain of the 54 kDa protein of signal recognition particle. **The Journal of Cell Biology**, v.113, p. 229- 233, 1991.
- HURTLEY, S. M., BOLE, D. G., HOOVER-LITTY, H., HELENIUS, A., COPELAND, C. S. Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP). **The Journal of Cell Biology**, v.108, n.6, p. 2117-2126, 1989.
- JOHNSON, A. E. Protein translocation at the ER membrane: a complex process become more so. **Cell Biology**, v.7, p. 90-95, 1997.

- JONES, A. M., HERMAN, E. M. A KDEL-containing auxin-binding protein is secreted to the plasma membrane and cell wall. **Plant Physiology**, v.101, p. 595-606, 1993.
- KALINSKI, A., ROWLEY, D. L., LOER, D. S., FOLEY, C., BUTA, G., HERMAN, E. M. Binding-protein expression is subject to temporal, developmental and stress-induced regulation in terminally differentiated soybean organs. **Planta**, v.195, p.611-621, 1995.
- KIM, P. S., ARVAN, P. Calnexin and BiP act as sequential molecular chaperones during thyroglobulin folding in the endoplasmic reticulum. **The Journal of Cell Biology**, v.128, p.29-38, 1995.
- KOZAK, M. The scanning model for translation: an update. **The Journal of Cell Biology**, v.108, p. 229-238, 1989.
- KUSKE, C. R., HILL, K. K., GUZMAN, E., JACKSON, P. J. Subcellular location of O-acetylserine sulfhydrylase isoenzymes in cell cultures and plant tissues of *Datura innoxia* Mill. **Plant Physiology**, v.112, p. 659-667, 1996.
- KYTE, J., DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. **The Journal of Cell Biology**, v.157, p. 105-132, 1982.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-695, 1970.
- LAURSEN, C. M., KRYZEK, R. A., FLICK, C. E., ANDERSON, P. C., SPENCER, T. M. Production of fertile transgenic maize by electroporation of suspension culture cells. **Plant Molecular Biology**, v. 24, p. 51-61, 1994.
- LAZZERI, P. A., HILDEBRAND, D. F., COLLINS, G. B. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. **Plant Molecular Biology**, v. 3, p. 160-167, 1985.

- LEE, A. S. Coordinated regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells. **Trends Biochemistry Science**, v.12, p. 20-23, 1987.
- LEE-YOON, D., EASTON, D., MURAWSKI, M., BURD, R., SUBJECK, J. R. Identification of a major subfamily of large hsp70-like proteins through the cloning of the mammalian 110-kDa heat shock protein. **Journal Biology Chemistry**, v.270, n.26, p. 15725-15733, 1995.
- LELIVELT, M. J., KAWULA, T. H. Hsc66, an Hsp70 homolog in *Escherichia coli*, is induced by cold shock but not by heat shock. **Journal Bacteriol**, v.177, n.17, p. 4900-4907, 1995.
- LI, X., GALLAGHER, J. L. Expression of foreign genes, GUS and hygromycin resistance, in the halophyte *Kosteletzkya virginica* in response to bombardment with the Particle Inflow Gun. **Journal of Experimental Botany**, v.47, n.302, p. 1437-1447, 1997.
- LI, X., WU, Y., ZHANG, D.-Z., GILLIKIN, J. W., BOSTON, R., FRANCESCHI, V. R., OKITA, T. W. Rice prolamine protein body biogenesis: a BiP-mediated process. **Science**, v.262, n.5136, p. 1054-1056, 1993.
- LIBEREK, K., MARSZALEK, J., ANG, D., GEORGOPOULOS, C., ZYLICZ, M. *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of dnaK. **Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America**, v.88, p. 2874-2878, 1991.
- LINDSEY, K., JONES, M. G. K. Transient gene expression in electroporated protoplasts and intact cells of sugar beet. **Plant Molecular Biology**, v.10, p. 43-52, 1987.
- LÖW, R., RAUSCH, T. In suspension-cultured *Daucus carota* cells salt stress stimulates H⁺- transport but not ATP hydrolysis of the V-ATPase. **Journal of Experimental Botany**, v.47, n.304, p. 1725-1732, 1996.

- LUONG, H. T., SHEWRY, P. R., LAZZERI, P. A. Transient gene expression in cassava somatic embryos by tissue electroporation. **Plant Sciences**, v.107, p. 105-115, 1995.
- MACHAMER, C. E., DOMS, R. W., BOLE, D. G., HELENIUS, A., ROSE, J. K. Heavy chains binding protein recognizes incompletely disulfide-bonded forms of vesicular stomatitis virus G protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v.265, n.12, p. 6879-6883, 1990.
- MANDE, S. C., MEHRA, V., BLOOM, B. R., HOL, W. G. Structure of the heat shock protein chaperonin-10 of *Mycobacterium leprae*. **Science**, v.271, n.5246, p. 203-207, 1996.
- McKAY, D. B. Structure and mechanism of the 70-kDa heat-shock-related proteins. **Advances Protein Chemistry**, v.44, p. 67-98, 1993.
- MELNICK, J., KUL, J. L., ARGON, Y. Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. **Nature**, v.370, n.6488, p. 373-375, 1994.
- MITAKU, S., HIROKAWA, T. Structure prediction of membrane proteins: discrimination of membrane proteins and secondary structure prediction. **Tanpakushitsu Kakusan Koso**, v.42, n.17, p. 3020-3025, 1997.
- MIYATA, S., AKAZAWA, T. α -amylase biosynthesis signal sequence prevents normal conversion of the unprocessed precursor molecule to the biologically active form. **Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America**, v.79, p. 7792-7795, 1982.
- MUNRO, S., PELHAM, H. R. B. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. **Cell**, v.48, n.2, p. 899-907, 1987.
- MUNRO, S., PELHAM, H. R. B. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. **Cell**, v.46, n.2, p. 291-300, 1986.

- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.
- NAPIER, R, M., FOWKE, L. C., HAWES, C., LEWIS, M., PELHAM, H. R. B. Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. **Journal Cell Science**, v.102, p. 261-271, 1992.
- NEUHAUS, J. M. Protein targeting to the plant vacuole. **Plant Physiology Biochemistry**, v.34, n.2, p. 217-221, 1996.
- NGUYEN, T. H., LAW, D. T. S., WILLIAMS, D. B. Binding protein BiP is required for translocation of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America**, v.88, n.4, p.1565-1569, 1991.
- NI, W., SEWALT, V. J. H., KORTH, K. L., BLOUNT, J. W., BALLANCE, G. M., DIXON, R. A. Stress response in alfalfa XXI. Activation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeyol coenzyme A 3-O-methyltransferase genes does not contribute to changes in metabolite accumulation in elicitor-treated cell-suspension cultures. **Plant Physiology**, v.112, p. 717-726, 1996.
- NORMINGTON, K., KOHNO, K., KOZUTSUMI, Y., GETHING, M. J., SAMBROOK, J. *Saccharomyces cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. **Cell**, v.57, n.7, p. 1223-1236, 1989.
- OLDEN, K., PRATT, R. M., JAWORSKI, C., YAMADA, K. M. Evidence for role of glycoprotein carbohydrates in membrane transport: specific inhibition by tunicamycin. **Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America**, v.76, p. 791-795, 1979.

- OZEKI, Y., DAVIES, E., TAKEDA, J. Somatic variation during long term subculturing of plant cells caused insertion of a transposable element in a phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene. **Molecular & General Genetics: MGG**, v.254, p. 407-416, 1997.
- PADGETT, P.E., LEONARD, R. T. Free amino acid levels and the regulation of nitrate uptake in maize cell suspension cultures. **Journal of Experimental Botany**, v.47, n.300, p. 871-883, 1996.
- PARIS, N., ROGERS, J. C. The role of receptors in targeting soluble proteins from the secretory pathway to the vacuole. **Plant Physiology Biochemistry**, v.34, n.2. p. 223-227, 1996.
- PEDRAZZINI, E., GIOVINAZZO, G., BOLLINI, R., CERIOTTI, A., VITALE, A. Binding of BiP to an assembly-defective protein in plant cells. **Plant Journal**, v.5, n.1, p. 103-110, 1994.
- PEDRAZZINI, E., VITALE, A. The binding protein (BiP) and the synthesis of secretory proteins. **Plant Physiology Biochemistry**, v.34, n.2, p. 207-216, 1996.
- PELHAM, H. R. B., HARDWICK, K. G., LEWIS, M. J. Sorting of soluble ER protein in yeast. **EMBO Journal**, v.7, n.7, p. 1757-1762, 1988.
- PELHAM, H. R. P. The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. **Trends Biochemistry Science**, v.15, n.12, p. 483-486, 1990.
- PIDOUX, A. L., ARMSTRONG, J. Analysis of the BiP gene and identification of an ER retention signal in *Schizosaccharomyces pombe*. **EMBO Journal**, v.11, n.4, p. 1583-1591, 1992.
- PIROVANI, C. P., CONTIN, L. A. S., VIEIRA, F. S. Análise de expressão e caracterização bioquímica de uma “GTP- BINDING PROTEIN” específica da membrana plasmática de semente de soja. **VI Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal**, p.187, 1997.

- PIROVANI, C. P., FONTES, E. P. B. Produção da proteína S-64 da soja em bactéria e análise da expressão do gene correspondente. **VI Simpósio de Iniciação Científica, UFV**, p. 72, 1996.
- PUEYO, J. J., CHRISPEELS, M. J., HERMAN, E. M. Degradation of transport-competent destabilized phaseolin with a signal for retention in the endoplasmic reticulum occurs in the vacuole. **Planta**, v.196, p. 586-596, 1995.
- RASSOW, J., VON AHSEN, O., BÖMER, U., PFANNER, N. Molecular chaperones: towards a characterization of the heat-shock protein 70 family. **Trends in Cell Biology**, v.7, p. 129-133, 1997.
- RECH, E. L., DE-BEM, A. R., ARAGÃO, F. J. L. Biolistic-mediated gene expression in guinea pigs and cattle tissue in vivo. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29, n.10, p. 1265- 1267, 1996.
- REICHHELD, J., CHAUBET, N., SHEN, W. H., RENAUDIN, J., GIGOT, C. Multiple A-type cyclins express sequentially during the cell cycle in *Nicotiana tabacum* BY2 cells. **Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America**, v.93, p. 13819-13824, 1996.
- RIESMEIER, J. W., WILLMITZER, L., FROMMER, W. B. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. **EMBO Journal**, v.11, n.13, p. 4705-4713, 1992.
- RIPP, K. G., VIITANEN, P. V., HITZ, W. D., FRANCESCHI, V. R. Identification of a membrane protein associated with sucrose transport into cells of developing soybean cotyledons. **Plant Physiology**, v. 88, p. 1435-1445, 1988.
- ROSE, M. D., MISRA, L. M., VOGEL, J. P. KAR-2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. **Cell**, v.57, n.7, p. 1211-1221, 1989.

- SABRI, N., PELISSIER, B., TEISSIE, J. Transient and stable electrotransformations of intact black mexican maize cells are obtained after preplasmolysis. **Plant Cell Reports**, v.15, p. 924-928, 1996.
- SADLER, I., CHIANG, A., KURIHARA, T., ROTHBLATT, J., WAY, J., SILVER, P. A yeast gene important for protein assembly into the endoplasmic reticulum and the nucleus has homology to DnaJ, an Escherichia coli heat shock protein. **The Journal of Cell Biology**, v.109, (6 PT 1), p. 2665-2675, 1989.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular cloning - a laboratory manual**. 2^a ed., New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- SANDERS, S. L., WHITFIELD, K. M., VOGEL, J. P., ROSE, M. D., SCHEKMAN, R. W. Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. **Cell**, v.69, n.2, p. 353-365, 1992.
- SARASTE, M., SIBBALD, P. R., WITTINGHOFER, A. The P-loop-a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. **Trends Biochemistry Science**, v.15, n.11, p. 430-434, 1990.
- SATIAT-JEUNEMAITRE, B., STEELE, C., HAWES, C. Maintenance of the exocytotic and endocytic apparatus involved in protein targeting in plant cells. **Plant Physiology Biochemistry**, v.34, n.2, p. 183-195, 1996.
- SCHMITZ, A., MAINTZ, M., KEHLE, T., HERZOG, V. *In vivo* iodination of a misfolded proinsulin reveals co-localized signals for BiP binding and for degradation in the ER. **EMBO Journal**, v.14, n.6, p. 1091-1098, 1995.
- SHIU, R. P. C., POUYSSEGUR, J., PASTAN, I. Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America**, v.74, p. 3840-3844, 1977.

- SHORROSH, B. S., SUBRAMANIAM, J., SCHUBERT, K. R., DIXON, R. A. Expression and localization of plant protein disulfide isomerase. **Plant Physiology**, v.103, p. 719-726, 1993.
- SIMONS, J. F., FERRO-NOVICK, S., ROSE, M. D., HELENIUS, A. BiP/Kar-2p serves as a molecular chaperone during carboxypeptidase Y folding in yeast. **The Journal of Cell Biology**, v.130, n.1, p. 41-49, 1995.
- SPENCER, T. M., GORDON-KAMM, W. J., DAINES, R. J., START, W. G., LEMAUX, P. G. Bialaphos selection of stable transformants from maize cell culture. **Theoretical Applied Genetics**, v.79, p. 625-631, 1990.
- TATU, U., HELENIUS, A. Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. **The Journal of Cell Biology**, v.136, n.3, p. 555-565, 1997.
- THEODOROU, M. E., PLAXTON, W.C. Purification and characterization of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from phosphate-starved *Brassica nigra* suspension cells. **Plant Physiology**, v.112, p. 343-351, 1996.
- TING, J., LEE, A. S. Human gene encoding the 78,000-dalton glucose-regulated protein and its pseudogene: structure, conservation and regulation. **DNA**, v.7, p. 275-286, 1988.
- VIEIRA, J., MESSING, J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. **Gene**, v.19, n.3, p. 259-268, 1982.
- VITALE, A., BIELLI, A., CERIOTTI, A. The binding protein associates with monomeric phaseolin. **Plant Physiology**, v.107, p. 1411-1418, 1995.
- VITALE, A., CERIOTTI, A., DENECKE, J. The role of the endoplasmic reticulum in protein synthesis, modification and intracellular transport. **Journal of Experimental Botany**, v.44, n.266, p. 1417-1444, 1993.

- VITALE, A., CHRISPEELS, M. J. Sorting of proteins to the vacuoles of plant cells. **BioEssays**, v.14, n.3, p. 151-160, 1992.
- VOGEL, J. P., MISRA, L. M., ROSE, M. D. Loss of BiP/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast. **The Journal of Cell Biology**, v.110, n.6, p. 1885-1895, 1990.
- VON HEIJNE, G. Transcending the impenetrable: how proteins come to terms with membranes. **Biochemistry Biophysics Acta.**, v.947, p. 307-333, 1988.
- WALKER, J. E., SARASTE, M., RUNSWICK, M. J., GAY, N. J. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. **EMBO Journal**, v.1, n. 8, p. 945-951, 1982.
- WANG, T.-F., CHANG, J.-H., WANG, C. Identification of the peptide binding domain of Hsc70. **Journal Biology Chemistry**, v.268, n.35, p. 26049-26051, 1993.
- WEI, J., GAUT, J. R., HENDERSHOT, L. M. Characterization of the nucleotide binding properties and ATPase activity of recombinant hamster BiP purified from bacteria. **Journal Biology Chemistry**, v.270, n.44, p. 26670-26676, 1995.
- WELTERS, P. Vacuolar targeting: proteins of the transport machinery. **Plant Physiology Biochemistry**, v.34, n.2, p. 229-235, 1996.
- WIEDMAN, B., SAKAI, H., DAVIS, T. A., WIEDMAN, M. A protein complex required for signal-sequence specific sorting and translocation. **Nature**, v.370, p. 434-440, 1994.
- WOLIN, S. L. From the elephant to *E. coli*: SRP dependent protein targeting. **Cell**, v.77, n.3, p. 787-790, 1994.

- ZANSK, E., YAMAMOTO, Y. T., WILLIANSO, J. D., CONKLING, M. A., PHARR, D. M. Immunolocalization of mannitol dehydrogenase in celery plants and cells. **Plant Physiology**, v.112, p. 931-938, 1996.
- ZHANG, S., KLESSIG, D. F. Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. **The Plant Cell**, v.9, n.5, p. 809-824, 1997.
- ZHU, X., ZHAO, X., BURKHOLDER, W. F., GRAGEROV, A., OGATA, C. M., GOTTESMAN, M. E., HENDRICKSON, W. A. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. **Science**, v.272, n.5268, p. 1606-1614, 1996.
- ZOOK, M., HOHN, T., BONNEN, A., TSUJI, J., HAMMERSCHMIDT, R. Characterization of novel sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco expressing a fungal sesquiterpene synthase. **Plant Physiology**, v.112, p. 311-318, 1996.