

SÔNIA MADALI BOSEJA CAROLINO

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA BiP
DA SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill)

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
AGOSTO -1997

A Deus e
aos meus pais.

AGRADECIMENTO

À Professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela competente orientação e dedicação, imprescindíveis na realização deste trabalho.

Aos meus conselheiros, Professores Maurílio Alves Moreira e Maria Goreti de Almeida Oliveira, pelo apoio e pelos ensinamentos.

A todos os professores do curso, pela amizade e pelo agradável convívio.

Ao Professor Joaquim H. Patarroyo Salcedo, pela cessão do material para a condução do experimento.

Aos meus colegas Patrícia e Márcio, pelo interesse e pela disponibilidade.

Ao Newton e ao Valdecir, pela inegável ajuda na execução dos trabalhos de casa de vegetação.

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

Aos meus colegas do Curso de Agroquímica, pelo convívio.

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

Aos meus colegas de laboratório Priminho, Acássia, Fátima, Nelson, Júlio, Osvaldo, Juliana, Dária, Luíz, João, Reginaldo, Fabiana e José Edson, pelo companheirismo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo, ao Conselho Nacional de Pesquisa (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 contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

SÔNIA MADALI BOSEJA CAROLINO, filha de Noraldino Ramaioli Carolino e Sônia Madalena Boseja Carolino, nasceu em Ponte Nova, Estado de Minas Gerais.

Em 1993, bacharelou-se e licenciou-se em Química pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

No segundo semestre de 1994, nessa mesma Universidade, ingressou no Curso de Mestrado em Agroquímica.

CONTEÚDO

	páginas
EXTRATO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Proteínas de choque térmico, Hsp70 (<i>heat shock proteins</i>)	4
2.2. BiP (<i>Binding Protein</i>)	9
2.2.1. Função biológica	11
2.2.2. Mecanismos de ação	14
2.2.3. Regulação gênica	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Crescimento e armazenamento do material vegetal	18
3.2. Quantificação de proteínas	19
3.3. Purificação da proteína homóloga de BiP da soja	20
3.3.1. Fracionamento por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20
3.3.2. Cromatografia de troca-iônica	20
3.3.3. Cromatografia de afinidade	20
3.4. Produção de anticorpos policlonais contra BiP da soja	21

3.5. Obtenção de anticorpo monoespecífico, selecionado pelo clone cUFVBiP	21
3.6. Síntese do terminal carboxílico de BiP em <i>E. coli</i> e produção de anticorpos	22
3.6.1. Clonagem molecular	22
3.6.2. Síntese da proteína truncada em <i>E. coli</i> e produção de anticorpos	22
3.7. Gel de eletroforese SDS-PAGE e “immunoblotting”	23
3.8. Ensaio de co-imunoprecipitação	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Especificidade do anticorpo selecionado pelo clone cUFVBiP	26
4.2. Regulação temporal da síntese de BiP durante o desenvolvimento da semente	28
4.3. Regulação da síntese de BiP em resposta a diversas condições de estresses fisiológicos	30
4.4. Purificação de BiP de semente de soja	35
4.5. Formação de complexos estáveis entre BiP e proteínas específicas da semente	36
5. RESUMO E CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

EXTRATO

CAROLINO, Sônia Madali Boseja, M. S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 1997. **Caracterização biológica e purificação da proteína BiP da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Professora Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Professores Conselheiros: Maurílio Alves Moreira e Maria Goreti de Almeida Oliveira.

A proteína BiP, residente no lúmen do retículo endoplasmático (RE), tem sido descrita como um componente importante no processo de dobramento e montagem de proteínas secretórias recém-sintetizadas. Com base na localização subcelular, identidade imunológica, massa molecular relativa e síntese constitutiva, foi possível identificar o homólogo de BiP da soja, usando-se anticorpos preparados contra BiP do milho. A análise do padrão de acúmulo da proteína BiP revelou que a sua síntese é coordenada, temporalmente, com a síntese de proteínas de reserva na semente. Além disso, a síntese de BiP é correlacionada com a concentração de proteína total acumulada na semente de diferentes variedades de soja. Esses resultados indicam que a proteína BiP é induzida pelo aumento da atividade secretória do cotilédone, associada à síntese ativa de proteínas de reserva. Consistente com sua função de chaperone molecular, BiP é induzida em resposta a diversos estresses fisiológicos que promovem a proliferação do RE e o acúmulo de proteínas mal dobradas nesta

organela. Infestação por *Tetranychus urticae* e infecção por *Cercospora sojina* Hara induziram a síntese de BiP em níveis comparáveis. Similarmente, sua síntese foi induzida, significativamente, em resposta a estresse nutricional. Ao contrário de BiP de espinafre, BiP de soja é regulada positivamente por estresse hídrico. Esses resultados contraditórios indicam que vias distintas de mecanismos regulatórios controlam a expressão dos genes BiP em plantas. Como membro da família Hsp70, foi demonstrado que a proteína BiP da soja se liga a ATP e associa-se com polipeptídios sintetizados exclusivamente na semente. No entanto, o complexo formado entre BiP e esses polipeptídios é altamente estável e insensível a ATP. A propriedade de BiP de se ligar a ATP foi explorada como meio de purificar essa proteína a partir de extratos protéicos de sementes, usando-se cromatografia de afinidade em resinas de ATP-agarose. Conforme julgado através de géis de acrilamida corados com prata, BiP foi purificada em um nível de homogeneidade em torno de 90%. A identidade da proteína purificada foi confirmada, uma vez que seus anticorpos reconheceram eficientemente a proteína expressa pelo clone cUFVBiP1, que codifica BiP da soja.

ABSTRACT

CAROLINO, Sônia Madali Boseja, M. S., Universidade Federal de Viçosa, July, 1997. **Biological characterization and purification of the protein BiP from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Committee members: Maurílio Alves Moreira and Maria Goreti de Almeida Oliveira.

The protein BiP, reticulum endoplasmic resident molecular chaperone, has been described as an important mediator of folding and assembly of newly-synthesized proteins. Based on the subcellular localization, immunological identity, relative molecular mass and constitutive synthesis, we have identified the BiP homologue from soybean, using a maize BiP antibody. The pattern of BiP accumulation reveals that its synthesis is temporally coordinated with the seed storage protein synthesis. In addition, the BiP synthesis is correlated with the concentration of total protein in seeds of different soybean varieties. These results suggest that BiP is induced in response to the secretory activity of the cotyledon, which is associated with the active synthesis of storage proteins. As a molecular chaperone, we have found that soybean BiP is induced in response to several physiological stresses which promote the proliferation of the ER and an accumulation of unfolded proteins within the lumen of this organelle. *Tetranichus urticae* attack and *Cercospora sojina* infection induced the BiP

synthesis to the same extent. Likewise, its synthesis was induced, considerably, in response to nutritional stress. Unlike spinach BiP, soybean BiP is upregulated by water stress. These controversial results suggest that distinct pathways of regulatory mechanisms control the BiP gene expression in plants. As a member of the Hsp70, we have demonstrated that soybean BiP binds to ATP and associates with seed polypeptides. However, these complexes are highly stable and insensitive to ATP. We have taken advantage of the BiP ATP-binding activity as a mean to purify this protein from whole seed protein extracts through affinity chromatography. As judged by silver-staining electrophoresis acrylamide gels, BiP was purified to 90% homogeneity. The identity of the purified protein was further confirmed, since antibodies prepared against it recognize efficiently a recombinant protein expressed by a soybean cDNA.

1. INTRODUÇÃO

O retículo endoplasmático (RE) é um dos maiores compartimentos da célula eucariótica, consistindo da maioria das membranas intracelulares que exibem atividade alta de síntese de proteínas secretórias, por desempenharem o papel de passagem e distribuição de proteínas para o vacúolo (lisossomo em células animais), membrana plasmática e espaço extracelular. A via de translocação partindo do RE é chamada de via secretora, em que as proteínas migram do RE para seu destino final via complexo de Golgi (PALADE, 1975). Durante ou depois do processo de translocação através das membranas do RE, os polipeptídios nascentes adquirem conformação adequada para translocação, podendo ainda ocorrer modificações pós-traducionais como adição de açúcares e clivagem por enzimas proteolíticas, além de outros processamentos. A maioria desses eventos ocorre ou inicia-se no RE, que conseqüentemente possui grande número de proteínas residentes para realizar tais funções. As proteínas recém-sintetizadas que não adquirirem conformação adequada para translocação serão, na maioria dos casos, retidas nesse compartimento.

As proteínas do RE que funcionam no processo de co-tradução de polipeptídios nascentes são chamadas de reticuloplasminas. Entre estas proteínas estão os chaperones moleculares, proteína dissulfeto-isomerase e proteínas que se

ligam ao cálcio (PELHAM, 1989). Embora as reticuloplasminas não sejam estruturalmente relacionadas, elas possuem em comum uma seqüência carboxi-terminal KDEL/HDEL (DENECKE et al., 1992), que funciona como sinal de retenção geral para proteínas residentes no RE. 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 denominada “Binding Protein” (BiP) é o chaperone molecular mais bem caracterizado do RE.

A proteína BiP pertence a uma grande classe de proteínas induzidas por estresse conhecidas como proteínas de choque térmico (Hsp70), possuindo duas funções relacionadas. Como chaperone molecular, a proteína BiP tem sido descrita como importante mediador de translocação, dobramento, montagem e transporte de proteínas recém-sintetizadas. BiP associa-se com polipeptídios nascentes assim que são translocados para o lúmen do RE, auxiliando o dobramento e a montagem corretos através da formação de complexos intermediários que desfavorecem agregados de proteínas no RE (NGUYEN et al., 1991; SANDERS et al., 1992). BiP exerce também papel fundamental no reconhecimento de proteínas mal dobradas, pois se associa permanentemente a elas, formando complexos estáveis que serão reconhecidos pelo sistema proteolítico da célula. Uma vez que o transporte intracelular de proteínas depende da aquisição de estruturas terciárias e quaternárias corretas, BiP tem sido descrita como importante componente da função constitutiva do RE, exercendo controle de qualidade de saída de proteínas dessa organela (HURTLEY et al., 1989).

Em condições normais de crescimento, 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). Essas condições de estresse têm como denominador comum a promoção do acúmulo de proteínas mal dobradas no RE. A associação de BiP

com proteínas anormais é mais estável, retendo as proteínas não funcionais no RE e impedindo suas agregações (BOLE et al., 1986; HENDERSHOT, 1990).

Recentemente, foi demonstrado, através de ensaios de co-precipitação, que a proteína BiP da soja se associa transitoriamente com as subunidades da proteína de reserva de soja β -conglucina (FONTES et al., 1996). A associação de BiP com proteínas de reserva é dependente de ATP, uma característica bioquímica de interações mediadas por chaperones moleculares. Tais resultados indicam 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. Uma vez que a velocidade de dobramento de proteínas no RE constitui fator limitante no transporte intracelular de proteínas, a identificação e caracterização bioquímica de fatores celulares envolvidos nesses processos constituem uma etapa fundamental para elucidação do mecanismo de biogênese de corpos protéicos. Os objetivos primordiais dessa investigação foram purificar a proteína BiP e caracterizar sua atividade de chaperone molecular em soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Proteínas de choque térmico, Hsp70 (*heat shock proteins*)

Estudos recentes têm descrito uma classe de proteínas que assistem o dobramento e a montagem de proteínas oligoméricas na célula, denominadas chaperones moleculares (ELLIS e VAN DER VIES, 1991). Os chaperones estão diretamente envolvidos no processo vital de biogênese de proteínas. A função proposta dos chaperones moleculares é modular as interações proteína-proteína, impedindo a formação de estruturas incorretas que resultam da exposição temporária de superfícies carregadas ou hidrofóbicas, normalmente envolvidas nas interações inter ou intramoleculares. Os chaperones se ligam a essas superfícies interativas, impedindo associações aberrantes que promovem agregações de intermediários, formados no processo de dobramento de proteínas (ELLIS et al., 1989; GETTING e SAMBROOK, 1992).

A maioria dos chaperones moleculares pertence à classe de proteínas denominadas “heat shock proteins” (Hsp). Em particular, existe uma extensa família, conhecida como “heat shock 70” (Hsp70), cujos membros compartilham uma conservação extraordinária de estrutura primária e exercem uma variedade de funções como chaperones. Proteínas Hsp70 estão envolvidas no dobramento

de proteínas, na montagem e desmontagem de complexos oligoméricos, síntese e degradação de proteínas e translocação de polipeptídeo através de membranas (McKAY et al., 1994).

Membros da família Hsp70 foram inicialmente identificados como proteínas induzidas por choque térmico, com massa molecular de aproximadamente 70.000 Da, e encontradas em diferentes organismos (LINDQUIST e CRAIG, 1988). Homólogos dessas proteínas ocorrem no citossol de procaríoto e eucarioto e no lúmen do mitocôndrio, cloroplasto e retículo endoplasmático. Na maioria dos eucariotos, os genes Hsp70 pertencem a uma família multigênica e podem ser classificados em dois grupos: os genes cognatos (Hsc70), que são expressos em condições normais de crescimento, freqüentemente contêm íntrons e não são fortemente induzidos por calor; e os genes induzidos (Hsp70), que não são expressos em condições normais de crescimento, usualmente não contêm íntrons e são induzidos por choque térmico. Em quase todas as células ocorrem ambas as formas de “heat shock” (LINDQUIST e CRAIG, 1988).

O alto nível de conservação de seqüência da família Hsp70 permite prever um modelo-consenso para a estrutura da proteína, que pode ser dividida em dois domínios: o domínio aminoterminal, altamente conservado, de ligação a ATP; e o domínio carboxiterminal, de ligação ao substrato (MILARSKI e MORIMOTO, 1989). Acredita-se que a região mais variável da proteína, adjacente ao carboxiterminal, está mais diretamente envolvida na especificidade pelo substrato e, ou, pelas interações com específicos co-chaperones (CHEETHAM et al., 1994). Conseqüentemente, não é surpreendente que Hsp70, isolado de diferentes organismos, possua propriedades bioquímicas similares.

Todas as proteínas Hsp70 examinadas ligam-se com alta afinidade a ATP e possuem fraca atividade ATPase, que pode ser estimulada pela ligação de proteínas mal dobradas e peptídios sintéticos (ROTHMAN, 1989). Recentemente, PALLEROS e colaboradores (1993) mostraram que a dissociação do substrato não é dirigida pela hidrólise de ATP, como foi originalmente proposto, mas é

dependente da ligação de Hsp70 a ATP, tendo como requerimento o íon potássio (K^+). Somente a combinação de K^+ e ATP poderá causar a mudança conformacional necessária para a dissociação do substrato. A propriedade universal do Hsp70 de sofrer ciclos de associação e dissociação do polipeptídeo substrato, dependentes de ATP, determina seu papel na grande variedade de funções intracelulares vitais como síntese, dobramento, oligomerização e transporte de proteínas. Deleção do sítio de ligação a ATP da forma Hsp70 citossólica de tomate bloqueia a atividade de ATPase da proteína recombinante e resulta em uma proteína mutante incapaz de funcionar *in vitro* como chaperone molecular (MIERNYK e HAYMAN, in press).

Tanto a forma monomérica de Hsp70 quanto dímeros e oligômeros de elevada massa molecular foram identificados em frações protéicas que contêm Hsp70 citoplasmático e Hsp70 do RE. A identidade química do complexo oligomérico ainda não foi determinada, de forma que não se sabe se este complexo contém Hsp70 livre ou Hsp70 associado com co-chaperones ou com proteínas substrato. Contudo, a adição de ATP aos oligômeros, assim como interação com polipeptídios, induz aumento na concentração de monômeros e de dímeros (ANDERSON et al., 1994a; FONTES et al., 1996; BENAROUDJ et al., 1996).

Em *E.coli*, a proteína Hsp70, DnaK, forma um complexo com outras duas proteínas, DnaJ e GrpE. DnaJ e GrpE agem juntas, estimulando a atividade de ATPase de DnaK. DnaJ interage com DnaK para acelerar a taxa de hidrólise de ATP ligado (LIBEREK et al., 1991a) e parece ser capaz de mudar a especificidade do substrato por DnaK (LANGER et al., 1992; LIBEREK e GEORGOPOULOS, 1993; WICKNER et al., 1991a), enquanto GrpE aumenta a taxa de dissociação do nucleotídeo ligado por DnaK (LIBEREK et al., 1991a). Embora nenhuma proteína similar à GrpE tenha sido identificada em células eucarióticas, cinco DnaJ's foram identificadas em levedura (ATENCIO e YAFFE, 1992; LUKE et al., 1991; BLUMBERG e SILVER, 1991; SADLER et al., 1989; ZHANG e BOSTON, 1992) e dois homólogos *dnaj* foram clonados em

células humanas (CHETHAM et al., 1992). A natureza da interação Hsp70/DnaJ não está elucidada, sendo questionado se a ação primária do DnaJ é direta, aumentando a hidrólise de ATP associado a Hsp70, ou indireta, mediando a mudança conformacional que permite o aumento da hidrólise de ATP. Apesar da alta conservação da estrutura primária entre os membros da família de proteínas Hsp70, proteínas Hsp70 específicas mostraram compartimentalização e funções especializadas. Os DnaJ's de eucarioto, ao contrário dos Hsp70, têm baixa similaridade, o que indica diversificação da função através da evolução. Isso leva a uma possível hipótese de que as proteínas tipo DnaJ direcionam a especificidade da proteína Hsp70 (CHETHAM et al., 1994).

O citossol é o compartimento celular, onde a atividade de síntese de proteínas é máxima. Não obstante, existem várias evidências que demonstram que os Hsp70 citossólicos estão fortemente associados com síntese, dobramento e secreção de proteínas. Células de mamíferos possuem formas constitutivas, denominadas Hsp73, e formas induzidas, Hsp72, que apresentam identidade de seqüências maior que 90% e funções idênticas. No entanto, as duas classes de Hsp70 citossólicas de levedura, Ssaps e Ssbps, têm cerca de 65% de identidade e não são capazes de se substituírem funcionalmente (CRAIG e JACOBSEN, 1984 e 1985). Em plantas, as proteínas Hsp70 citossólicas participam no processo de dobramento de polipeptídios recém-sintetizados, facilitam o transporte da proteína para o interior das organelas e exercem diversas funções comuns às Hsp70 descritas em outros organismos (HENDRICK e HARTL, 1993). Hsp70 de ervilha é capaz de descobrir vesículas cobertas de clatrina, como tem sido demonstrado para Hsp 70 de mamíferos (KIRSCH e BEEVERS, 1993). MIERNYK e colaboradores (1992) mostraram que Hsp70, presente em extrato de tradução de germe de trigo livre de células, associa-se com proteínas recém-sintetizadas de maneira dependente de ATP. Hsp70 citossólico também está envolvido na translocação de proteínas através da membrana.

A proteína Hsp70 mitocondrial (mt-Hsp70) exerce função essencial no dobramento e na montagem de proteínas na matriz mitocondrial, assim como

facilita a translocação de proteínas para o interior da organela. A proteína mt-Hsp70 é codificada pelo gene *Ssc1* em *S. cerevisiae*, e deleções neste gene são letais para a célula de levedura (CRAIG et al., 1989). A mt-Hsp70 exerce função vital, facilitando o transporte de pré-proteínas através do sistema de membranas para a matriz mitocondrial. Essa função parece estar fortemente acoplada à maquinaria de importação localizada na membrana do mitocôndrio. Além disso, a proteína mt-Hsp70 está envolvida no dobramento e redobramento de algumas pré-proteínas após a translocação pela membrana, processo que requer um homólogo de DnaJ, como Mdj1p (ROWLEY et al., 1994). MOONEY e HARMEY (1996) identificaram uma nova Hsp70 de mitocôndria localizada na membrana mitocondrial de feijão e couve-flor. Essa nova proteína é distinta da forma mt-Hsp70 da matriz mitocondrial, mas é similar à sua forma citossólica. Estudos utilizando protease K para determinar a localização da proteína na membrana indicaram que Hsp70 da membrana deve manter a pré-proteína em conformação adequada para translocação.

Em mamíferos, a superexpressão dos genes “heat shock” confere resistência a uma série de drogas anticâncer (KARLSEDER et al., 1996). Em células transfectantes estáveis, a alta expressão dos genes Hsp70 é suficiente para proteger as células do efeito citotóxico da droga doxorrubicina. A superexpressão do Hsp70 aumenta muito a capacidade de reinício de proliferação depois do tratamento com a droga, indicando o envolvimento do Hsp70 na duração da fase G2 e, conseqüentemente, na regulação do ciclo celular. De maneira similar, em micrósporo de *Brassica napus* foi demonstrada, por meio de experimentos de imunocitoquímica, forte correlação entre a fase S do ciclo celular e o envolvimento de Hsp70. Indução da embriogênese foi acompanhada de intensa síntese de Hsp70 no nucleoplasma durante a elongação da fase S, indicando que Hsp70 está diretamente envolvido no processo de divisão celular (CORDEWENER et al., 1995).

Diversas proteínas são sintetizadas como precursores no citossol e, subseqüentemente, translocadas através da membrana para organelas específicas.

A translocação ocorre através de canais, que são constituídos de proteínas transmembranas. Algumas proteínas precursoras permanecem associadas ao Hsp70 citossólico antes de engajar na maquinaria de translocação. Em adição, a importação de proteínas para o mitocôndrio ou RE depende do Hsp70 dessas organelas, sendo ambos os Hsp70 componentes essenciais no sistema de translocação nas respectivas organelas (BRODSKY e SCHEKMAN, 1993; KANG et al., 1990; GOMORD e FAYE, 1996). A interação entre uma proteína Hsp70 organelar e um elemento da maquinaria de translocação tem sido descrita no RE de leveduras Sec63p (BRODSKY e SCHEKMAN, 1993). A proteína Hsp70 do RE, Kar-2, foi detectada associada com uma proteína transmembrana. Dados genéticos e bioquímicos indicam que a interação específica de Kar-2 e Sec63p é crítica para a translocação.

Proteção da célula contra as mudanças causadas por vários estresses é outra atribuição das proteínas Hsp70, assim como para as outras Hsp. A maioria das condições de estresses compromete a integridade estrutural das proteínas, expondo domínios de interação internalizados e não acessíveis na forma nativa. A ligação das proteínas Hsp70 aos domínios de interação nessas proteínas anormais impede a agregação, dando oportunidade para a proteína dobrar-se novamente ou promover sua degradação (SCHMITZ et al., 1995). A interação entre um membro da família Hsp70 e proteínas mal dobradas foi, inicialmente, descrita para a proteína Hsp70 do RE, denominada BiP, em plantas e mamíferos, e Kar-2, em leveduras. HAAS e WABL (1983) demonstraram que BiP se liga não covalentemente às cadeias pesadas de imunoglobulinas que não foram completamente oligomerizadas com as cadeias leves. A proteína BiP tem sido caracterizada em leveduras, mamíferos e plantas.

2.2. BiP (*Binding Protein*)

A proteína BiP foi identificada independentemente em células de mamíferos, pela sua associação com as cadeias pesadas de imunoglobulinas

“Binding Protein” e pela sua indução por escassez de glicose, GRP78 (“Glucose Regulated Protein”). SHIU et al. (1977) observaram que culturas de fibroblastos crescidas na ausência de glicose supersintetizam as proteínas GRP78 e GRP94, de massas moleculares 78.000 Da e 94.000 Da, respectivamente, referidas como proteínas reguladas por glicose. Indução da síntese de GRP também tem sido observado sob tratamento com tunicamicina, que inibi a N-glicosilação de proteínas secretoras nascentes e diminui o metabolismo da glicose (OLDEN et al., 1979). Independentemente, foi observado que uma proteína de 78.000 Da liga-se não co-valentemente a cadeias pesadas livres de imunoglobulinas, sendo denominada “Binding Protein” (HAAS e WABL, 1983). A associação BiP:IgG é rompida pela adição de cadeias leves de imunoglobulinas e, subseqüentemente, montagem da proteína heteroligomérica.

Por meio do isolamento dos cDNA correspondentes a GRP78 e BiP e posterior caracterização molecular, foi demonstrado que BiP e GRP78 correspondem à mesma proteína, relacionada estruturalmente com Hsp70 (MUNRO e PELHAM, 1986). Estudos subseqüentes em células de mieloma de rato identificaram presença de BiP no interior da cisterna do RE e envelope nuclear, mas não nas cisternas do 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 com proteínas repórteres resultou na retenção destas proteínas no RE (PELHAM, 1989). Do mesmo modo, em plantas, essa seqüência-consenso é altamente específica da maquinaria de retenção de reticuloplasminas, embora seqüências adjacentes ao tetrapeptídio carboxi-terminal pareçam também influenciar na eficiência de retenção (JONES et al., 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 (BAR-PELED et al., 1995).

2.2.1. Função biológica

A proteína BiP é um dos mais abundantes e mais bem caracterizados chaperones do retículo endoplasmático. Como membro da família Hsp70, a proteína BiP é estrutural e funcionalmente relacionada com Hsp 70 citossólico, exceto pela presença do peptídeo-sinal e da seqüência de retenção no RE presente no carboxiterminal. BiP participa do processo de dobramento e montagem de proteínas secretórias (VITALE et al., 1993; HAAS, 1994), interage transitoriamente com polipeptídios durante estádios iniciais de dobramento e liga-se mais firmemente a proteínas mal dobradas e oligômeros montados incorretamente (GETHING e SAMBROOK, 1992).

A associação entre BiP e polipeptídios mal dobrados é mais estável devido à exposição permanente de seqüências hidrofóbicas na estrutura primária da proteína (GETHING et al., 1986). Conseqüentemente, uma função adicional de BiP é impedir a saída de proteínas anormais do RE (HAMMOND e HELENIUS, 1994). Enquanto esses sinais não são acessíveis à 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 de montagem de proinsulina normal e proinsulina mal dobrada, mostrou-se que *in vitro* os intermediários de montagem de proinsulina normal foram protegidos contra degradação por BiP. 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 indica que essa proteína pode funcionar de maneira análoga à da estrutura toróide do chaperone Hsp60, embora não haja similaridade estrutural entre os dois chaperones (SCHMITZ et al., 1995).

O controle de qualidade no processamento de proteínas, realizado pela célula, ocorre principalmente no RE, onde BiP exerce papel fundamental.

SIMONS e colaboradores (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, BiP associa-se transitoriamente com cerca de 10-15% das CPYs marcadas, enquanto em estirpes mutantes 30-100% permanecem associadas à BiP. Do mesmo modo, experimentos de imunoprecipitação, usando proteína G do vírus estomatite vesicular, demonstraram que BiP se liga transitoriamente com intermediários de montagem da proteína G normais e se associa, de forma estável, apenas a mutantes da proteína G que não formam pontes corretas de dissulfeto intracelularmente (MACHAMER et al., 1990).

A função de chaperone, associada à BiP de planta, tem sido examinada principalmente por meio de associações com proteínas de reserva de semente. BiP interage com uma forma mutante da proteína de reserva do feijão, faseolina, deletada de 59 aminoácidos no carboxiterminal (PEDRAZZINI et al., 1994). Quando transitoriamente expressa 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. BiP ligada ao mutante pode ser liberada pela adição de ATP. Também, em mutantes do endosperma de milho chamado de *floury 2*, BiP associa-se com proteínas anormais acumuladas no RE (FONTES et al., 1991). Esses resultados indicam que BiP exerce função análoga em plantas e animais durante a síntese protéica. Evidências genéticas para conservação funcional têm sido obtidas por meio de experimentos de complementação em leveduras mutantes com um homólogo de tabaco (DENECKE et al., 1991). BiP de tabaco foi capaz de substituir o produto do gene *kar 2* mutado, que codifica um mutante de BiP sensível a variações de temperatura.

Além da associação de BiP com proteínas de reserva anormais, tem sido demonstrado que BiP associa-se com subunidades de proteínas de reserva, competentes para aquisição da conformação nativa. Ensaio de co-imunoprecipitação foram conduzidos para detectar associação de BiP com

subunidades da proteína de reserva β -conglucina de soja (FONTES et al., 1996). Tanto o anticorpo contra BiP quanto o contra β -conglucina co-imunoprecipitaram a proteína recíproca na ausência de ATP. A função de BiP no dobramento e na montagem de proteínas de reserva tem sido examinada em experimentos de marcação de proteínas seguidos por ensaios de co-imunoprecipitação de extratos do cotilédono de feijão (PUEYO et al., 1995). Associação de BiP com faseolinas monoméricas precede a oligomerização da proteína, porque BiP foi detectada em associação com os polipeptídios monoméricos, mas não com a forma trimérica. Associação entre BiP e prolaminas do arroz recém-sintetizadas também tem sido observado *in vitro* (LI et al., 1993).

BiP também está envolvida na via de translocação de peptídios recém-sintetizados para o lúmen do RE, possivelmente impedindo a agregação da cadeia nascente, o que impossibilitaria a translocação da cadeia polipeptídica nascente através das membranas (VOGEL et al., 1990; NGUYEN et al., 1991). O modelo proposto por SANDERS e colaboradores (1992) descreve a ação seqüencial de vários fatores de translocação, ressaltando-se que BiP age nos estádios iniciais associados ao requerimento de ATP.

Dos chaperones residentes no RE, BiP está mais freqüentemente envolvida nos estádios iniciais no processo de dobramento de polipeptídios. Em leveduras expressando mutação no gene Kar-2 (BiP), experimentos de ligação cruzada demonstraram que BiP associa-se com polipeptídios nascentes (SANDERS et al., 1992; SIMONS et al., 1995; VOGEL et al., 1990). Durante a síntese de imunoglobulinas, BiP interage inicialmente com as cadeias leves e dissocia-se tão logo GRP94 associa-se 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 proteína depois de BiP (KIM e ARVAN, 1995). Esses dados em conjunto indicam que, além de BiP estar normalmente envolvida nos estádios iniciais da síntese protéica, os chaperones do RE devem agir seqüencialmente durante a via de montagem.

2.2.2. Mecanismos de ação

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 alto grau de conservação no 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., no prelo).

Como outros membros da família Hsp70, BiP possui domínio aminoterminal de aproximadamente 44.000 Da, altamente conservado, que contém um sítio de ligação e hidrólise de ATP, além de um domínio carboxiterminal de aproximadamente 30.000 Da, que contém o sítio de ligação do substrato (KASSENBRÖCK e KELLY, 1989; CHAPPELL et al., 1987; FLAHERTY et al., 1991). Acredita-se que haja significativa interação entre esses dois domínios, porque a hidrólise de ATP, catalisada pelo domínio aminoterminal, resulta na dissociação do peptídio do domínio carboxiterminal (MUNRO e PELHAM, 1986). Certos peptídios ligam-se à BiP, estimulando sua atividade de ATPase (BLOND-ELGUINDI et al., 1993b; FLYNN et al., 1989 e 1991). Tais peptídios ligam-se de maneira dependente de ATP e são liberados quando este é adicionado (FLYNN et al., 1989 e 1991; MCKAY, 1993). Substância P, um peptídio-modelo para estudar a interação de BiP com proteína substrato, estimula a atividade de ATPase e forma complexo estável com BiP, sendo dissociado na presença de ATP em níveis superiores a 50 μ molares (BROT et al., 1994). Similarmente, a atividade de ATPase de BiP do milho pode ser estimulada por co-chaperones DNAJ e GrpE de levedura (ZHOU e MIERNYK, in press). A especificidade de ligação entre BiP e peptídios sintéticos foi examinada, usando-se uma biblioteca de bacteriófago λ contendo seqüências ao acaso de octapeptídios e dodecapeptídios na região aminoterminal da proteína de adsorção pIII. Esses estudos demonstraram que BiP se liga, preferencialmente, a

peptídios contendo subgrupos de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos em posições alternadas e em conformação estendida (BLOND-ELGUINDI et al., 1993a).

Em células de mamíferos, BiP é pós-traducionalmente modificada por fosforilação e ADP-ribosilação, existindo um “pool” de formas oligoméricas e monoméricas interconversíveis. Condições que resultam no aumento da concentração de proteínas mal dobradas no RE promovem a dissociação dos oligômeros e a sua desfosforilação e de ADP-ribosilação (FREIDEN et al., 1992). Tanto as espécies oligoméricas quanto as monoméricas são capazes de se ligarem a peptídios. No entanto, a indução da atividade de ATPase de BiP pelo peptídio resulta na conversão dos oligômeros inativos e, ou, espécies modificadas em monômeros ativos. Com a diminuição da concentração de polipeptídios mal dobrados no RE, as espécies monoméricas de BiP tornam-se modificadas, sendo a oligomerização favorecida (BLOND-ELGUINDI et al., 1993b). Também, em espinafre, foram identificadas três formas de BiP: um monômero de 85.000 Da, um multímero de 280.000 Da e um grande oligômero de massa molecular superior a 650.000 Da (ANDERSON et al., 1994a). Somente a forma oligomérica de massa molecular superior a 650.000 Da é fosforilada *in vitro*, ressaltando-se que dímeros e monômeros se ligam a ATP e sofrem mudança conformacional na presença de Mg-ATP. Com base nesses trabalhos, ANDERSON e colaboradores (1994a) propuseram que em plantas, assim como em mamíferos, o nível de BiP funcional na célula seja regulado pelos níveis de ATP.

2.2.3. Regulação gênica

BiP é constitutivamente sintetizada em baixos níveis, mas é induzida por condições de estresses fisiológicos que promovem aumento na atividade secretora da célula ou acúmulo de proteínas mal dobradas no RE (ELLIS e VAN DER VIES, 1991). Uma série de reagentes, como inibidores de glicosilação, cálcio ionóforo ou qualquer outra condição de estresse que leve à desnaturação e à

agregação da proteína, é capaz de induzir a síntese de BiP (VITALE et al., 1993). A indução da expressão dos genes BiP, em resposta à presença de proteínas mal dobradas no RE, ocorre no nível de transcrição. Uma seqüência de 22 pb, ligada ao promotor dos genes BiP e denominada UPRE (“unfolded protein response element”), tem sido caracterizada em leveduras e mamíferos, como necessária e suficiente para ativar transcrição de promotores pelo acúmulo de proteínas mal dobradas no RE (MORI et al., 1992). Um segundo elemento na via de resposta a proteínas mal dobradas tem sido caracterizado em leveduras - trata-se de uma proteína cinase transmembrana, denominada Ire1p (SHAMU e WALTER, 1996). A proteína Ire1p contém um peptídio-sinal no terminal amino, um único domínio transmembrana localizado na parte central da proteína e um domínio cinase no terminal carboxílico. O domínio C-terminal citossólico exhibe similaridade de seqüências aos domínios catalíticos de proteínas cinases serina-treonina. Evidências indicam que o acúmulo de proteínas mal dobradas no RE leva à ativação do domínio citossólico cinase de Ire1p. O sinal é então conduzido diretamente, ou através de outras proteínas na via de transdução de sinal, para o núcleo, onde a transcrição dos genes contendo o cis-elemento UPRE é ativada.

Em plantas, a expressão de BiP exhibe especificidade de órgão e tecido. Nos mutantes naturais de BiP de milho, *floury 2* (*fl₂*), *mucronate* (*Mc*) e *defective endosperma* (*De-B30*), ocorre o acúmulo da proteína BiP em níveis elevados durante a maturação da semente, sendo específico do endosperma (GALANTE et al., 1983; BOSTON et al., 1991). Em *floury 2*, o acúmulo de zeínas, proteína de reserva majoritária do milho, é reduzido e os corpos protéicos apresentam forma irregular e com arranjo das proteínas de reservas alterado (ZHANG e BOSTON, 1992). A indução da síntese de BiP nesse mutante é regulada no nível de mRNA (FONTES et al., 1991). A expressão de BiP em diferentes órgãos de tabaco está correlacionada positivamente com altas taxas de divisão celular, atividade secretora e proliferação do sistema de endomembranas da célula (DENECKE et al., 1991). Em soja, os níveis de mRNA de BiP oscilam, dependendo do tecido e do estágio de desenvolvimento, não refletindo o acúmulo

proporcional da proteína (KALINSKI et al., 1995; FONTES et al., 1996). Em espinafre, aclimação por frio resulta em aumento do acúmulo do mRNA de BiP, enquanto estresse hídrico e choque térmico causam desaparecimento de transcritos de BiP. No entanto, o nível basal da proteína BiP permanece constante sob todas as condições de estresse (ANDERSON et al., 1994b).

A organização dos genes BiP como família multigênica parece ser uma situação única na planta. BiP é codificada por diversos genes em tabaco (DENECKE et al., 1991) e em soja (KALINSKI et al., 1995; FIGUEIREDO et al., no prelo); em milho, duas isoformas de BiP foram identificadas por eletroforese bidimensional (FONTES et al., 1991). A presença de múltiplas cópias de BiP não parece ser característica comum a todas as plantas superiores, porque BiP de espinafre é codificada por um único gene (ANDERSON et al., 1994b). O significado biológico para a diferença em número de cópias dos genes BiP em plantas ainda não foi elucidado, embora a presença de uma família multigênica possa ser uma das possíveis explicações para a discrepância entre o nível de mRNA e a proteína em condições de estresse.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Crescimento e armazenamento do material vegetal

Plantas de soja das variedades Bienville, Doko, IAC-8, IAC-12 e Cooker foram cultivadas em casa de vegetação sob condições naturais de luz, umidade relativa e temperatura controlada entre 16 e 32° C. As sementes foram colhidas nos estádios de desenvolvimento indicados nas figuras, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a – 80° C.

A indução dos estresses deu-se da seguinte maneira:

Estresse por fungo - A obtenção do inóculo foi realizada através do crescimento de culturas monospóricas de *Cercóspora sojina* Hara em placas de Petri contendo como meio de cultura suco de tomate sem tempero, preparado semelhantemente ao V - 8 ágar, como descrito por VEIGA (1973), substituindo-se apenas o V - 8 pelo suco de tomate. Em cada placa de Petri contendo a colônia de *C. Sojina* Hara foram adicionados, aproximadamente, 3 mL da solução do espalhante adesivo "Tween" 80, a 0,05%. Para facilitar o desprendimento dos conídios do patógeno, foi passado um pincel diversas vezes sobre as colônias. Obtida a suspensão, esta foi agitada e filtrada em uma camada dupla de gaze. A calibração foi feita por meio de um hemacitômetro para concentração de 40.000 conídios por mililitro,

conforme proposto por CASELA et al. (1979) e CASELA e BRANDÃO (1981). A inoculação do patógeno foi feita quando as plântulas apresentaram a primeira folha trifoliolada completamente desenvolvida (cerca de 20 dias após a emergência), pulverizando-se cerca de 10 mL da suspensão de conídios por planta, nas faces superior e inferior das folhas, por meio de um pulverizador manual. Imediatamente após a inoculação, os vasos foram transferidos para uma câmara de inoculação e, após três dias, transferidos para as bancadas da casa de vegetação, onde permaneceram até a avaliação. As folhas foram colhidas, baseando-se sempre no folíolo mais infectado da planta, cerca de 20 dias após a inoculação.

Estresse por inseto - Após a terceira semana do plantio, colocaram-se plantas não tratadas com inseticidas ao lado de plantas infestadas por ácaro, *Tetranychus urticae*, dentro de uma câmara cercada com tela. Sendo as condições da casa de vegetação propícias para o contágio, houve a manifestação dos sintomas aproximadamente 20 dias após o contágio. Coletaram-se as folhas que apresentaram sinais de maior infestação.

Estresse nutricional - As plantas submetidas ao estresse nutricional foram transferidas para areia na segunda semana após o plantio e colhidas quando apresentavam os sintomas (amarelecimento foliar).

Estresse hídrico - Para indução do estresse hídrico, interrompeu-se a adição de água quatro semanas após o plantio e colheram-se as folhas quando estas apresentavam sinais evidentes de murcha.

Plantas-controle - Coletaram-se folhas de plantas normais, que foram tratadas com inseticidas e não submetidas a nenhum estresse, a partir da quarta semana após o plantio.

3.2. Quantificação de proteínas

Extratos de proteínas totais de diferentes órgãos de soja foram quantificados de acordo com o método de BRADFORD (1976).

3.3. Purificação da proteína homóloga de BiP da soja

3.3.1. Fracionamento por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Todas as etapas de purificação foram realizadas a 4° C e as sementes de soja, colhidas 35 dias após o florescimento (DAF). A proteína BiP foi purificada a partir de sementes de soja da variedade Bienville, de acordo com o seguinte protocolo modificado de FONTES et al. (1991): aproximadamente 100 g de semente de soja da variedade Bienville foram triturados e homogeneizados em 350 mL de tampão A (Tris-HCL 50 mmol/L, pH 6,8, e PMSF 1 mmol/L), e o resíduo insolúvel foi removido por centrifugação a 16.000 \times g por 20 minutos. As proteínas foram fracionadas por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no intervalo de 40 a 90% de saturação. O precipitado foi ressuspenso em um volume mínimo de tampão B (tampão A + NaCl 50 mmol/L) e dialisado nesse mesmo tampão.

3.3.2. Cromatografia de troca-iônica

Após 12 horas de diálise contra tampão B, o extrato foi fracionado em coluna de DEAE-sepharose CL-CB (20 x 1,5 cm, PHARMACIA) equilibrada em tampão B e desenvolvida com 300 mL de gradiente linear de 0,05 a 0,3 mmol/L de NaCl em tampão A. O fracionamento foi acompanhado por SDS-PAGE e “immunoblotting”, usando-se anticorpos contra BiP de milho como sonda.

3.3.3. Cromatografia de afinidade

As frações contendo BiP foram reunidas e dialisadas contra tampão C (Tris-acetato 20 mmol/L, pH 7,5, NaCl 20 mmol/L, MgCl_2 3 mmol/L, EDTA 0,1 mmol/L e 2-mercaptoetanol 15 mmol/L). O dialisado foi aplicado na coluna ATP-agarose (5 x 1 cm, SIGMA), previamente equilibrada com o mesmo tampão. Após passagem de 30 mL do tampão C contendo NaCl 0,5 mmol/L, seguida por

30 mL do tampão C, as proteínas foram eluídas com tampão C contendo ATP 3 mmol/L. Frações contendo BiP foram analisadas por SDS-PAGE e “immunoblotting”.

3.4. Produção de anticorpos policlonais contra BiP de soja

Frações eluídas da coluna de ATP-agarose contendo BiP foram reunidas, misturadas com adjuvante completo de Freund (GIBCO) na proporção 1:1 e injetadas subcutaneamente em coelho. As aplicações subseqüentes foram preparadas, misturando-se adjuvante incompleto de Freund e a fração da proteína na proporção 1:1. Depois do término das aplicações, totalizando-se cinco aplicações num intervalo regular de sete dias, as amostras do sangue do coelho imunizado foram centrifugadas a 2.800 rpm e o soro foi estocado a -20° C.

3.5. Obtenção de anticorpo monoespecífico, selecionado pelo clone cUFVBiP

Anticorpos monoespecíficos contra BiP da soja foram preparados por imunoafinidade, usando-se o clone cUFVBiP, que contém o cDNA da proteína BiP de soja inserido no vetor de expressão λ gt11 (FIGUEIREDO et al., no prelo). Após a infecção de *E.coli*, estirpe LE 392, a expressão da proteína recombinante foi induzida com solução de IPTG 10 mmol/L e imobilizada em membranas de nitrocelulose. As membranas foram, subseqüentemente, incubadas com soro policlonal de BiP de milho para selecionar anticorpos específicos contra β -galactosidase fundida à proteína BiP de soja. Os anticorpos monoespecíficos foram eluídos com glicina 0,1 mol/L, pH 2,9, e imediatamente neutralizados com solução de NaOH. O anticorpo eluído foi estocado a 4° C em Tris-HCl 10 mmol/L, pH 7,4 e NaN_3 0,2% (p/v) a 4° C. Os anticorpos selecionados pelo clone são referidos como anticorpos monoespecíficos.

Alternativamente, as membranas imobilizadas com a proteína recombinante foram incubadas com anticorpo contra BiP de milho ou com

anticorpos preparados contra BiP purificada da soja por uma hora, sob agitação, à temperatura ambiente. Após a incubação, seguiu-se o procedimento normal para “western”, conforme descrito no subitem 3.7.

3.6. Síntese do terminal carboxílico de BiP em *E.coli* e produção de anticorpos

3.6.1 . Clonagem molecular

O clone pUFV41, contendo a região codificadora de BiP e um sítio BamHI, criado imediatamente adjacente ao códon de terminação, já foi descrito anteriormente (MARTINS, 1996). O fragmento de DNA que codifica o terminal carboxílico de BiP (326 resíduos de aminoácidos) foi liberado com as enzimas de restrição NcoI e BamHI, purificado com géis de agarose e inserido no vetor de expressão pET16b, previamente digerido com as mesmas enzimas e desfosforilado. As purificações de DNA plasmidial, a reação de ligase e a desfosforilação de vetores foram conduzidas de acordo com técnicas-padrão de clonagem molecular em plasmídios (SAMBROOK et al., 1989).

3.6.2. Síntese da proteína truncada em *E.coli* e produção de anticorpos

O terminal carboxílico de BiP foi sintetizado sob o controle do promotor da T7 RNA polimerase em uma estirpe de *E.coli*, BL21 (DE 3), que contém um gene para T7 RNA polimerase, regulado pelo promotor lacUV5 (Novagene). A bactéria transformada foi crescida em LB broth 2% até atingir a densidade ótica a 600 nm de 0,6. A expressão da proteína truncada foi induzida após duas horas de incubação com IPTG 2 mmol/L. As bactérias foram sedimentadas por centrifugação e ressuspendidas em Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8,0, e EDTA 2 mmol/L. Após a ultra-sonicação, o resíduo insolúvel foi sedimentado por centrifugação a 12.000 \times g, por 30 minutos, a 4° C. As proteínas foram separadas

por SDS-PAGE e visualizadas por ““coomassie brilliant blue”” R-250. A banda correspondente à proteína induzida foi cortada do gel, liofilizada, triturada em almofariz de porcelana e ressuspenida em TBS (Tris-HCl 10 mmol/L, pH 7,6, e NaCl 140 mmol/L). A suspensão obtida foi homogeneizada com igual volume de adjuvante de Freund completo para a primeira imunização do coelho e de adjuvante incompleto para as imunizações posteriores. Os coelhos foram imunizados subcutaneamente, em intervalos de uma semana. O soro foi obtido por sangria seis dias após a terceira imunização e estocado a -20° C.

3.7 . Gel de eletroforese SDS-PAGE e “immunoblotting”

Os extratos de proteína total foram preparados a partir de sementes de soja colhidas nos estádios de desenvolvimento indicados nas Figuras. As sementes, congeladas em nitrogênio líquido, foram trituradas em almofariz com Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,5, e PMSF 1 mmol/L (SIGMA). O material insolúvel foi descartado por centrifugação a 16.000 \times g por 15 minutos. No caso de plântulas e folhas, o tampão de extração usado foi NaCl 50 mmol/L, MgCl₂ 5 mmol/L, Tris-HCl 100 mmol/L, pH 7,5, Triton X-100 1% (v/v) e PMSF 1 mmol/L.

Eletroforese em géis de poliacrilamida contendo SDS foi realizada essencialmente como descrito por LAEMMLI (1970), exceto a concentração do gel empilhador, 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 aproximadamente 16 horas, 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). O gel foi corado com solução corante (metanol 40% (v/v), CH₃COOH 7,5% (v/v) e “coomassie brilliant blue” R-250 0,01%), por aproximadamente 12 horas, e descorado em solução de metanol 10% (v/v) e ácido acético 7,5% (v/v). Para coloração com

prata, seguiu-se o protocolo do kit de “silver staining” (PHARMACIA), conforme recomendações do fabricante.

Alternativamente, 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 24 horas a 200 mA), a membrana de nitrocelulose foi bloqueada com TBS-T [Tris-HCl 0,01 mol/L, pH 7,6, NaCl 1,5 mmol/L, Tween-20 0,1% (v/v)] por uma hora, à temperatura ambiente, e incubada com o anticorpo contra BiP, anticarboxi ou anti-soja, numa diluição 1:1000 por duas a quatro horas sob agitação. Após o período de incubação, a membrana foi lavada com TBS-T três vezes, por 15 minutos cada, e em seguida incubada com o anticorpo contra IgG conjugada à fosfatase alcalina (SIGMA), numa diluição de 1:5000, por aproximadamente duas horas. A membrana foi lavada extensivamente com TBS-T e, subseqüentemente, incubada com tampão da enzima (Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 9,8, NaCl 0,1 mol/L, MgCl₂ 0,5 mol/L) por cinco minutos. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada, usando-se os substratos NBT (azul-nitro-tetrazolium, GIBCO/BRL) e BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, GIBCO/BRL).

3.8. Ensaios de co-imunoprecipitação

Proteínas totais de sementes e folhas de soja foram extraídas com tampão de lise [Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 7,5, KCl 0,05 mol/L, EDTA 0,1 mmol/L, Triton X-100 1 % (v/v), PMSF 1 mmol/L, DDT 0,1 mmol/L e MgCl₂ 5 mmol/L]. As imunoprecipitações, utilizando-se os anticorpos monoespecífico, anticarboxi ou anti-soja, foram conduzidas na ausência de ATP, enzimaticamente removido pela adição de solução contendo a enzima apirase, ou na presença de ATP 2 mmol/L. As etapas de imunoprecipitação foram conduzidas a 4° C. Extratos de proteínas totais foram preparados pela homogeneização de sementes, colhidas em 35 DAF, ou folhas completamente expandidas com o tampão de lise na proporção de 1 g

de sementes por 5 mL de tampão ou 1 g de folhas por 2 mL de tampão. Após a incubação do extrato protéico por 10 minutos, o material insolúvel foi removido por centrifugação a $13.000 \times g$, por 15 minutos. O sobrenadante foi incubado por duas horas com o anticorpo policlonal apropriado, seguido por incubação com 25 μ l de suspensão da proteína A-sepharose 50% (v/v) em TBS. Os imunocomplexos foram sedimentados por centrifugação a $8.000 \times g$ por dois a três minutos. A resina de sepharose foi extensivamente lavada com 500 μ l de tampão de lise e ressuspensa em 100 μ l de tampão da amostra para SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). As proteínas imunoprecipitadas foram analisadas por SDS-PAGE, seguido por “immunoblotting”, usando-se o soro anti-soja, o anti-IgG conjugado com a fosfatase alcalina como segundo anticorpo e o sistema de detecção NBT/BCIP (GIBCO/BRL).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 . Especificidade do anticorpo selecionado pelo clone cUFVBiP1

A proteína BiP é membro da família de proteínas de choque térmico (Hsp70) e tem sido descrita como componente importante do processo de dobramento e montagem de proteínas recém-sintetizadas no retículo endoplasmático (RE). Com a finalidade de identificar o homólogo de BiP de soja, foram usados anticorpos policlonais gerados contra a proteína purificada de BiP de milho (FONTES et al., 1991). Uma proteína de massa molecular em torno de 75.000 Da e imunologicamente relacionada com a proteína BiP de milho foi detectada em frações do RE de sementes de soja (Figura 1, coluna RE). Com base na localização subcelular do polipeptídeo que reagiu com anti-BiP de milho e sua mobilidade eletroforética, pode-se inferir que o anticorpo de milho reconhece a proteína homóloga de BiP da soja.

Consistente com o padrão de expressão de genes de BiP, descritos em outros organismos, a proteína BiP de soja foi detectada em extratos protéicos de folhas, sementes e plântulas (Figura 1, colunas F, S e P). No entanto, o anticorpo contra BiP de milho apresentou uma série de reações cruzadas com outros polipeptídios presentes em extratos de proteínas totais, sendo somente

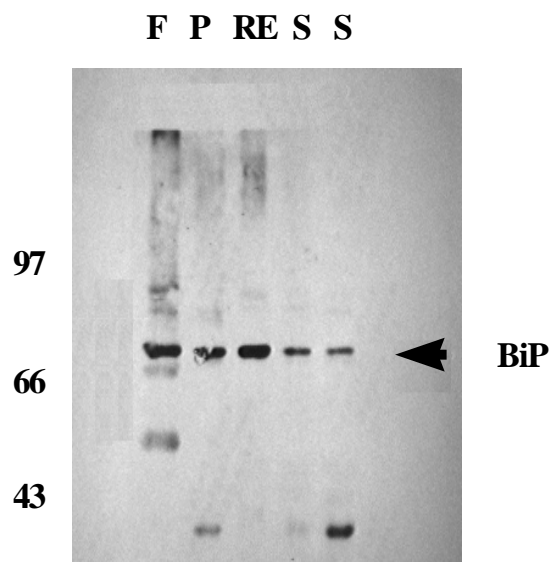


Figura 1- “Imunoblotting” do homólogo de BiP de soja. Proteínas totais de extratos de folhas (F), plântulas (P) e sementes (S) da variedade Bienville foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas, usando-se anticorpo contra BiP de milho. A coluna RE corresponde à fração do RE isolada de sementes. A proteína BiP está indicada à direita. A migração eletroforética de padrões de massa molecular relativa está indicada à esquerda, em frações de 1.000.

eliminados na fração RE. Em virtude dessa interação inespecífica do anti-BiP de milho com outras proteínas, o anticorpo policlonal foi purificado, usando-se a proteína quimérica expressa a partir do clone cUFVBiP1 (FIGUEIREDO et al., no prelo). Essa proteína recombinante consiste de β -galactosidase fundida ao N-terminal de BiP de soja. O fracionamento do anticorpo de BiP de milho por imunoafinidade foi eficiente em selecionar epitopos para a proteína BiP da soja. Tais anticorpos, selecionados pelo clone e denominados monoespecíficos, reconhecem somente a proteína BiP em extratos de proteína total preparados a partir de sementes (Figura 2), folhas e plântulas (Figuras 7 e 9).

4.2. Regulação temporal da síntese de BiP durante o desenvolvimento da semente

Durante o processo de diferenciação da semente, que se inicia com o período de armazenamento, ocorre proliferação do RE acompanhada pela síntese ativa de proteínas de reserva. Com a finalidade de correlacionar a atividade secretória do cotilédone com a síntese de BiP, foram conduzidos “immunoblottings” de extratos de proteínas totais preparados em diferentes estádios de desenvolvimento da semente (Figura 2). A proteína BiP foi detectada a partir de 25 dias após o florescimento (DAF) e persistiu até a maturação da semente, mas acumula predominantemente nos estádios intermediários de desenvolvimento do cotilédone. A taxa de síntese de BiP parece ser coordenada com a síntese ativa de proteínas de reserva. Nos estádios correspondentes a 25 e 35 DAF, a transcrição dos genes de proteína de reserva é máxima e, presumivelmente, também o é a translocação dessas proteínas para o RE (WALLING et al., 1986). A regulação temporal do acúmulo de BiP indica que o estímulo para a síntese de BiP em sementes de soja é resultado do aumento da atividade secretória associada ao aumento da síntese de proteínas de reserva no cotilédone. Em células de mamíferos, o acúmulo de proteínas secretórias no lúmen do RE causa aumento na taxa de síntese de BiP

55 45 35 25

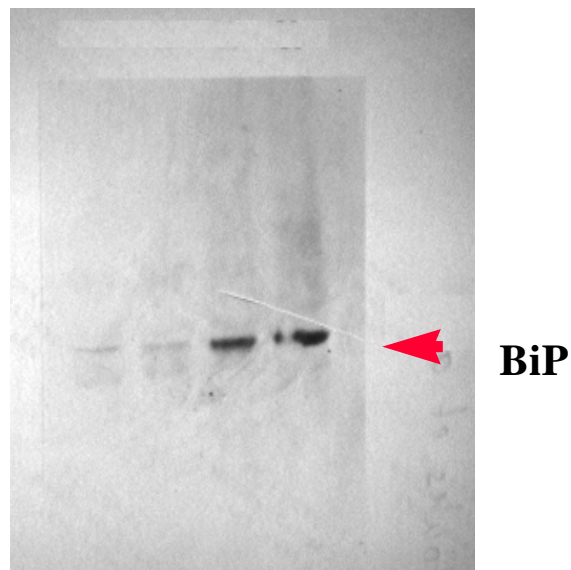


Figura 2- Acúmulo de BiP durante o desenvolvimento da semente. Extratos de proteínas solúveis preparados de diferentes estádios de desenvolvimento da semente foram fracionados por eletroforese (SDS-PAGE), e a proteína BiP foi identificada por “imunoblotting”, usando-se anticorpo monoespecífico de BiP. Alíquotas idênticas dos extratos foram aplicadas em cada coluna. Os estádios de desenvolvimento são indicados acima da figura em dias após o florescimento (DAF). A posição de BiP está mostrada à direita.

(NORMINGTON et al., 1989). Transcritos de BiP em tabaco também acumulam predominantemente em tecidos secretórios com alta divisão celular (DENECKE et al., 1991). Coletivamente, esses resultados indicam que a síntese de BiP em células não estressadas é regulada positivamente pela atividade secretória da célula. Uma evidência adicional para essa hipótese é que a síntese de BiP é superior em variedades de soja que acumulam concentração elevada de proteína total, conforme demonstrado na Figura 3. “Immunoblots” de proteínas totais extraídas de sementes das variedades Bienville (coluna B) e Cooker (coluna C) demonstraram que a concentração de BiP é superior em sementes de Bienville. A variedade Bienville acumula na semente teor de proteína correspondente a, aproximadamente, 45% da matéria seca, enquanto em semente de Cooker a concentração de proteína total é em torno de 35% da matéria seca.

Recentemente, foi demonstrado que BiP associa-se transitoriamente com as subunidades α e α' da proteína de reserva de soja β -conglucina (FONTES et al., 1996). A associação entre BiP e β -conglucina é completamente revertida pela adição de ATP, uma propriedade bioquímica de associações mediadas por chaperones moleculares. Na presente investigação, foi demonstrado que a regulação temporal da síntese de BiP na semente é coordenada com a síntese ativa de proteínas de reserva. Esses resultados são consistentes com o envolvimento de BiP na via de transporte biossintético de proteínas de reserva para os corpos protéicos, provavelmente assistindo o dobramento e a montagem das proteínas de reserva no RE.

4.3. Regulação da síntese de BiP em resposta a diversas condições de estresses fisiológicos

Como um membro da família Hsp70, a síntese de BiP é regulada por condições de estresses fisiológicos que promovem aumento na atividade secretória da célula ou do acúmulo de proteínas mal dobradas no retículo

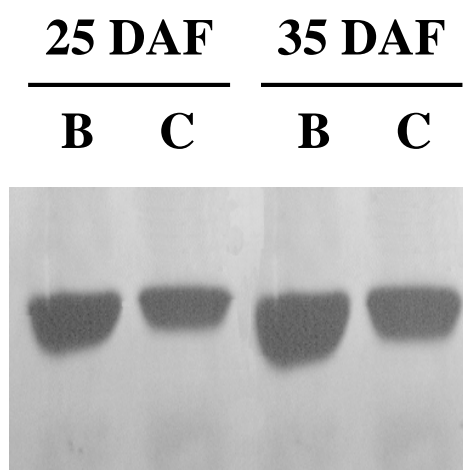


Figura 3- Correlação da síntese de BiP com a concentração de proteína total da semente. Proteínas totais isoladas de sementes das variedades Bienville (B) e Cooker (C) foram processadas conforme descrito na Figura 2. Estádios de desenvolvimento da semente são indicados acima da figura, em dias após o florescimento (DAF). Aliquotas idênticas dos extratos foram aplicadas em cada coluna.

endoplasmático. A presença de proteínas no RE que não são capazes de dobrar-se corretamente ativa a transcrição dos genes BiP, bem como de outras reticuloplasminas que exibem atividade de chaperone molecular (KOZUTSUMI et al., 1988). Acredita-se que o aumento na atividade de associação de BiP com agregados de proteínas mal dobradas resulte na redução da concentração de BiP livre no lúmen, a qual é monitorada por um receptor transmembrana cinase (SHAMU e WALTER, 1996). A via da resposta a proteínas mal dobradas tem sido extensivamente analisada em leveduras, plantas e mamíferos, usando-se células tratadas com tunicamicina. Tunicamicina inibe glicosilação de proteínas, o que resulta na incapacidade de uma série de glicoproteínas dobrar-se corretamente.

Recentemente, foi demonstrado que a síntese da proteína BiP de soja é induzida por tunicamicina em células de soja em suspensão (FIGUEIREDO et al., no prelo). Tem sido proposto que a indução de BiP de plantas, mediada por tunicamicina, é o resultado da via de resposta a proteínas mal dobradas, conservadas em células eucarióticas. Em leveduras e mamíferos, uma seqüência de 22 pares de base, denominada UPRE nos genes BiP, é necessária e suficiente para ativar transcrição desses genes em resposta ao acúmulo de proteínas mal dobradas no RE (MORI et al., 1992). Além do cis-elemento UPRE, o promotor do gene Kar-2 (BiP de leveduras) contém cis-elementos funcionais responsáveis pela sua indução direta em resposta a choque térmico (MORI et al., 1992). Conseqüentemente, mecanismos regulatórios adicionais, nunca observados em plantas e mamíferos, têm sido descritos para o gene BiP de leveduras. Além disso, ao contrário de leveduras e mamíferos, a proteína BiP de soja é codificada por uma família multigênica (KALINSKI e al., 1995). Essas observações conduziram às especulações de que os genes BiP de soja pudessem conter outros elementos de respostas a diferentes condições de estresses, responsáveis por sua indução em uma via de transdução de sinal, diferente da via de resposta a proteínas mal dobradas. Assim, plantas de soja foram submetidas a diversas

condições de estresses fisiológicos e a indução de BiP foi analisada por “immunoblottings” (Figura 4).

Folhas de plantas de soja inoculadas por *Cercospora sojina* Hara (coluna FU) e submetidas ao ataque por *Tetranichus urticae* (coluna IN) acumulam uma quantidade de BiP duas a três vezes superior àquela acumulada em folhas não estressadas (coluna C). O aumento da síntese de BiP em resposta a patógenos deve estar relacionado com o aumento e, ou, a degradação de proteínas que ocorre como mecanismo de defesa da planta para compensar as injúrias. Nessas condições de estresse, uma série de proteínas relacionadas com a patogênese é ativamente sintetizada pelo sistema de endomembranas da planta, resultando na proliferação do RE e no conseqüente aumento da atividade secretória da célula. Provavelmente, o estímulo para o aumento da taxa de síntese de BiP em plantas infectadas por patógenos é o resultado do aumento da atividade secretória das células em função da ativação da síntese de proteínas secretórias de defesa.

A indução de BiP da soja também foi avaliada em plantas submetidas a estresses nutricional e hídrico. Pode-se especular que estresse nutricional promove decréscimo na concentração de ATP no lúmen do RE. Uma vez que ligantes anormais requerem altos níveis de ATP para se dissociarem de BiP, estresse nutricional promoveria estabilização de complexos formados entre BiP e proteínas mal dobradas, reduzindo o nível de BiP livre, o que, provavelmente, ativaria a via de resposta a proteínas mal dobradas. Além disso, o estado metabólico da célula, em condições de estresse nutricional, compromete a eficiência de processamento de proteínas, o que pode acarretar acúmulo de proteínas mal dobradas no RE. De fato, a síntese de BiP foi significativamente induzida em resposta a estresse nutricional (compare coluna NU e coluna C).

Similarmente, estresse hídrico teve efeito dramático na indução da síntese de BiP em soja (coluna HI), enquanto em espinafre tem sido demonstrado que a expressão de BiP não é induzida pelas mesmas condições (ANDERSON et al., 1994b). Ao contrário, em espinafre, estresse hídrico causa desaparecimento

HI FU IN NU C

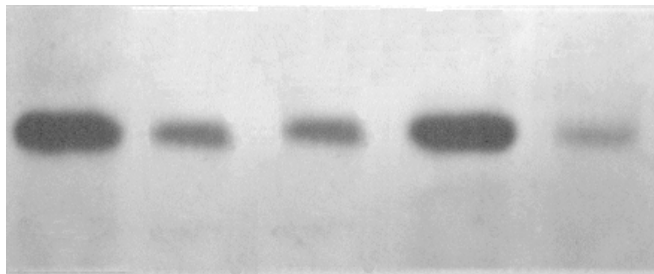


Figura 4 - Indução da síntese de BiP em plantas de soja sob condições de estresses fisiológicos. Plantas de soja da variedade IAC - 8 foram submetidas a diversas condições de estresses, como indicado na figura: estresse hídrico (HI), estresse nutricional (NU), infestação por ácaro (IN) e infecção por fungo (FU). Proteínas solúveis de folhas foram fracionadas em SDS-PAGE, e a proteína BiP foi identificada por “imunoblotting”, usando-se anticorpos monoespecíficos de BiP. Aproximadamente, 100 µg de proteína total foram aplicados em cada coluna. A coluna (C) corresponde a plantas-controle.

dos transcritos de BiP, enquanto permanecem inalterados os níveis de proteína. Esses resultados contraditórios indicam que BiP de soja e de espinafre respondem diferentemente a condições de estresse hídrico. Alternativamente, considerando que a razão entre BiP livre e BiP associada controla sua síntese, pode-se argumentar que não se detectou indução de BiP em espinafre por estresse hídrico em função da alta concentração de BiP basal nas condições do experimento. No entanto, algumas observações desfavorecem essa hipótese. BiP de espinafre foi induzida por tunicamicina nas mesmas condições do experimento, e estresse hídrico causou regulação negativa no acúmulo de transcritos de BiP. Além disso, para o caso específico da soja, estresse hídrico foi tão efetivo quanto estresse nutricional para indução da síntese de BiP. Uma explicação alternativa para a aparente contradição de resultados entre espinafre e soja seria que uma via de transdução de sinal adicional deve ser responsável pela indução de genes BiP de soja, sob específicas condições de estresse. Uma observação favorável a essa hipótese é que BiP de espinafre é codificada por um único gene, enquanto BiP de soja é o produto da expressão de uma família multigênica (ANDERSON et al., 1994b, FIGUEIREDO et al., no prelo). Dessa forma, acredita-se que pelo menos um membro da família dos genes BiP da soja teria evoluído mecanismos alternativos e, ou, adicionais de controle da expressão gênica.

4.4. Purificação de BiP de semente de soja

A habilidade dos membros da família Hsp70 de se ligarem a ATP tem sido explorada como meio eficiente de purificação das referidas proteínas (KASSENBRÖCK e KELLY, 1989). Assim, a purificação de BiP foi conduzida basicamente em três etapas, consistindo de um fracionamento inicial com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em de extratos de proteínas totais preparados a partir de sementes de soja, seguido por cromatografias de troca-iônica e de afinidade. Após a cromatografia de troca-iônica, as frações eluídas em um gradiente de NaCl (150 a 300 mmol/L) (Figura 5-A) foram sondadas com o anticorpo monoespecífico

contra BiP (Figura 5-B). As frações contendo maior concentração de BiP (28 a 38) foram reunidas e submetidas à cromatografia de afinidade, utilizando-se uma resina de ATP-agarose. Duas proteínas de 85 a 90.000 Da e abrangendo aproximadamente 50% do total de proteína presente na fração eluída foram co-purificadas com BiP (dado não mostrado). Com a finalidade de identificar as proteínas contaminantes, a fração obtida pela cromatografia de afinidade foi usada como imunógeno para preparar anticorpos, denominados anti-soja. As frações eluídas pela cromatografia de troca-iônica (Figura 5-A) foram ressonadas com o soro anti-soja, as quais se mostraram eficientes em detectar as proteínas contaminantes (Figura 5-C). Essa estratégia permitiu identificar e eliminar as frações enriquecidas para as proteínas contaminantes, não identificadas pela “immunoblots”, usando-se o anticorpo monoespecífico (compare as Figuras 5-B e 5-C). Em seguida, as frações de número 22 a 30, praticamente isentas das proteínas contaminantes, foram reunidas e submetidas à cromatografia em resinas de ATP-agarose, resultando na purificação da proteína BiP em um nível de homogeneidade em torno de 90%, conforme julgado por géis de acrilamida corados por prata (Figura 6, coluna ATP-agarose).

A identidade da proteína purificada foi também confirmada pela capacidade de seus anticorpos em reconhecer a proteína recombinante expressa pelo clone cUFVBiP1 (dados não mostrados). O clone cUFVBiP1 contém um cDNA que codifica BiP da soja, inserido no sítio de λ gt11, sob controle do promotor lacZ, induzido por IPTG (FIGUEIREDO et al., no prelo).

4.5. Formação de complexos estáveis entre BiP e proteínas específicas da semente

A ineficiência da resina de ATP-agarose em eliminar polipeptídios contaminantes na purificação de BiP pode ser devida à propriedade intrínseca dos polipeptídios em interagir com ATP. Alternativamente, uma vez que BiP exibe atividade de chaperone molecular, a co-purificação de BiP e proteínas

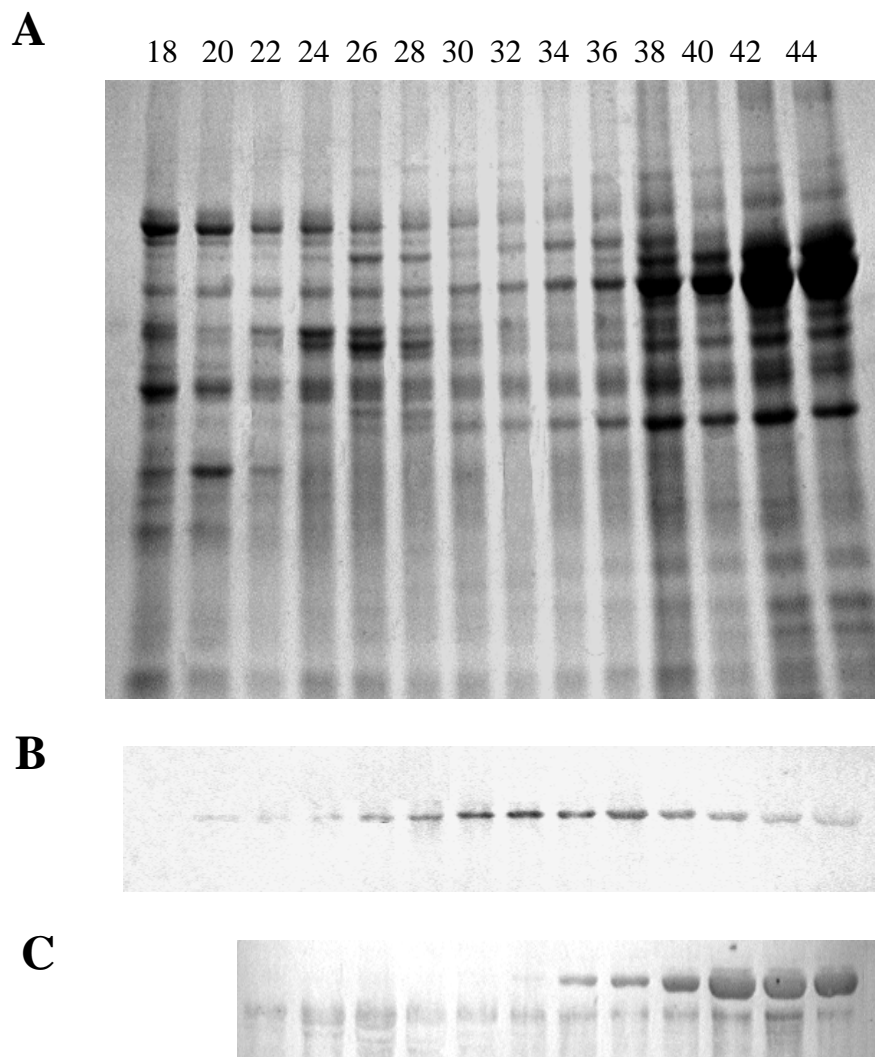


Figura 5 -Fracionamento de BiP de soja por cromatografia de troca-iônica. Extratos de proteínas solúveis de sementes de soja foram previamente fracionados com sulfato de amônia (40 a 90%) e aplicados na coluna DEAE-sepharose. As frações eluídas da coluna foram fracionadas por SDS-PAGE (A), transferidas para membrana nitrocelulose e sondadas com anticorpo monoespecífico de BiP (B) e soro anti-soja (C).

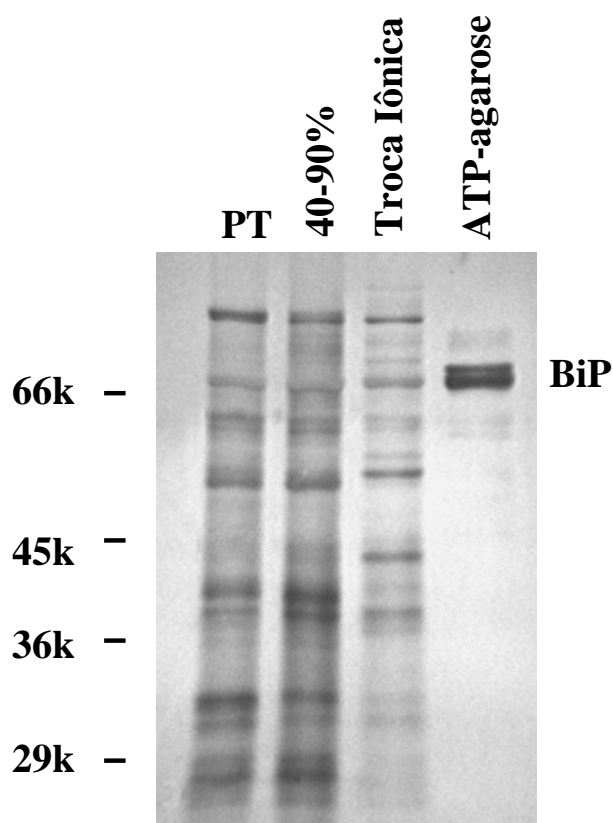


Figura 6- Purificação de BiP a partir de extratos de sementes da variedade Bienville. A composição de polipeptídios das frações obtidas pelas etapas sequenciais de purificação foi monitorada por meio de gel de acrilamida corado com prata, como se segue: coluna PT, proteína total da semente 35 DAF; coluna 40-90%, proteínas recuperadas da precipitação com sulfato de amônio entre 40-90 % de saturação; coluna troca-iônica, frações eluídas da resina DEAE-sepharose enriquecidas para BiP; e coluna ATP-agarose, “pool” das frações eluídas da resina ATP-agarose.

contaminantes pode ser o resultado de uma associação estável entre os polipeptídios e BiP. As associações proteína:proteína têm sido extensivamente analisadas por meio de imunoprecipitações indiretas de proteínas. Essa técnica é baseada na co-imunoprecipitação do antígeno associado a qualquer polipeptídio. A detecção da interação requer a formação de um complexo proteína:proteína relativamente estável, disponibilidade estérica de epitopos no complexo de proteínas associadas e absolutamente nenhuma reação cruzada entre o anticorpo e as proteínas associadas. Com a finalidade de analisar a possível associação entre BiP e as proteínas co-purificadas, para os ensaios de co-imunoprecipitação foram preparados anticorpos contra o terminal carboxílico de BiP, que corresponde à região menos conservada entre BiP e outros membros da família Hsp70. Esses anticorpos foram denominados anti-carboxi.

A especificidade dos anticorpos foi analisada por meio de “immunoblottings” de extratos protéicos, preparados a partir de diferentes órgãos da planta (Figura 7). Enquanto o soro anti-soja reconhece eficientemente as proteínas contaminantes e BiP a partir de extratos de semente (Figura 7: anti-soja, coluna S), os anticorpos monoespecíficos (monoespecífico, coluna S) e anti-carboxi (anti-carboxi, coluna S) são mais específicos e não reconhecem as proteínas co-purificadas. Interessantemente, a síntese dos polipeptídios contaminantes é restrita à semente, não sendo detectados no caule (C), na vagem (V) e nas folhas (F) (Figura 7, anti-soja). O soro anti-carboxi mostrou-se tão eficiente quanto ao anticorpo monoespecífico para detectar BiP em extratos protéicos de todos os órgãos analisados, apresentando reações cruzadas com os polipeptídios co-purificados (Figura 7, comparar anti-carboxi e monoespecífico).

A especificidade dos anticorpos monoespecíficos e anti-carboxi possibilitou analisar a associação entre BiP e as proteínas contaminantes por meio de ensaios de co-imunoprecipitação (Figura 8). Consistente com o padrão de expressão das proteínas contaminantes e com a especificidade do soro anti-soja, o anticorpo anti-soja foi eficiente em imunoprecipitar polipeptídios contaminantes a partir de extratos de semente (coluna 10), mas não de extratos

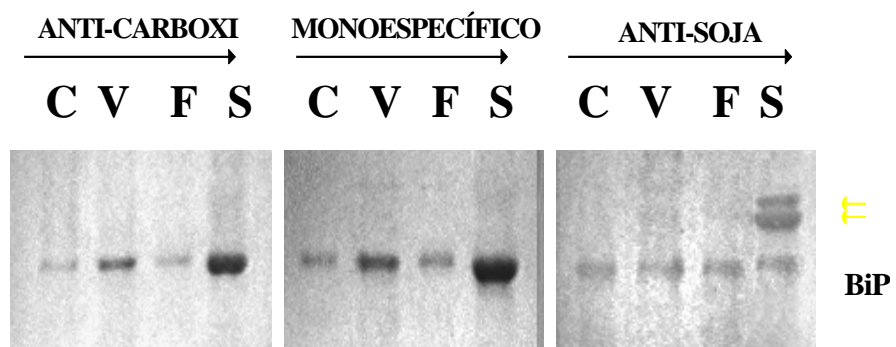


Figura 7- “Imunoblotting” de diferentes órgãos de soja, usando-se anticorpos contra BiP. Proteínas solúveis isoladas de vagem (V), folha (F) e semente (S) foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas, usando-se os anticorpos anti-carboxi, monoespecífico e anti-soja, conforme indicado acima da figura. A proteína BiP está indicada à direita da figura, e as setas indicam as proteínas co-purifadas.

de folhas (coluna 7), enquanto a proteína BiP foi imunoprecipitada pelo anti-soja a partir de extratos tanto de sementes (coluna 1) quanto de folha (coluna 7). Assim, também, a incubação de extratos de sementes com suspensão de ATP-agarose, na ausência de apirase, sedimenta BiP e as proteínas contaminantes (coluna 4), enquanto ATP-agarose precipita apenas BiP em extratos protéicos de folhas (coluna 10).

Apesar de os anticorpos monoespecíficos e anti-carboxi não reagirem com as proteínas contaminantes (Figura 7), ambos são capazes de imunoprecipitar os referidos polipeptídios a partir de extratos de sementes em que o ATP foi enzimaticamente removido (Figura 8, colunas 2 e 5). No entanto, adição prévia de ATP aos extratos não desestabiliza o complexo formado, conforme esperado para associação proteína:proteína mediada por chaperones moleculares (colunas 3 e 6). Em contraste, β -conglucina associa-se com BiP da soja, formando complexos sensíveis a ATP, de natureza transiente (FONTES et al., 1996). A presença de múltiplas cópias de BiP no genoma da soja, associado com sua capacidade de formar complexos com polipeptídios sensíveis e insensíveis a ATP, indica que as diferentes isoformas de BiP possuem funções e, ou, especificidades distintas. Alternativamente, a associação estável entre BiP e os polipeptídios contaminantes reflete a incapacidade desses polipeptídios de dobrar-se corretamente. PEDRAZZINI et al. (1994) demonstraram que BiP de feijão forma complexos estáveis com mutantes de faseolinas, requerendo altos níveis de ATP para dissociação. Uma vez que os polipeptídios contaminantes foram co-purificados a partir de extratos protéicos de sementes da variedade Bienville, a presença desses polipeptídios foi também analisada em outras variedades de soja, geneticamente distantes (Figura 9). Em extratos de proteínas totais de sementes das variedades IAC-8 e IAC-12, o soro anti-soja reconhece dois polipeptídios de massas moleculares relativas idênticas às massas dos identificados na variedade Bienville. Embora esses resultados não eliminem a possibilidade de que os polipeptídios co-purificados, identificados na variedade Bienville, sejam formas mutantes de similar mobilidade eletroforética à dos

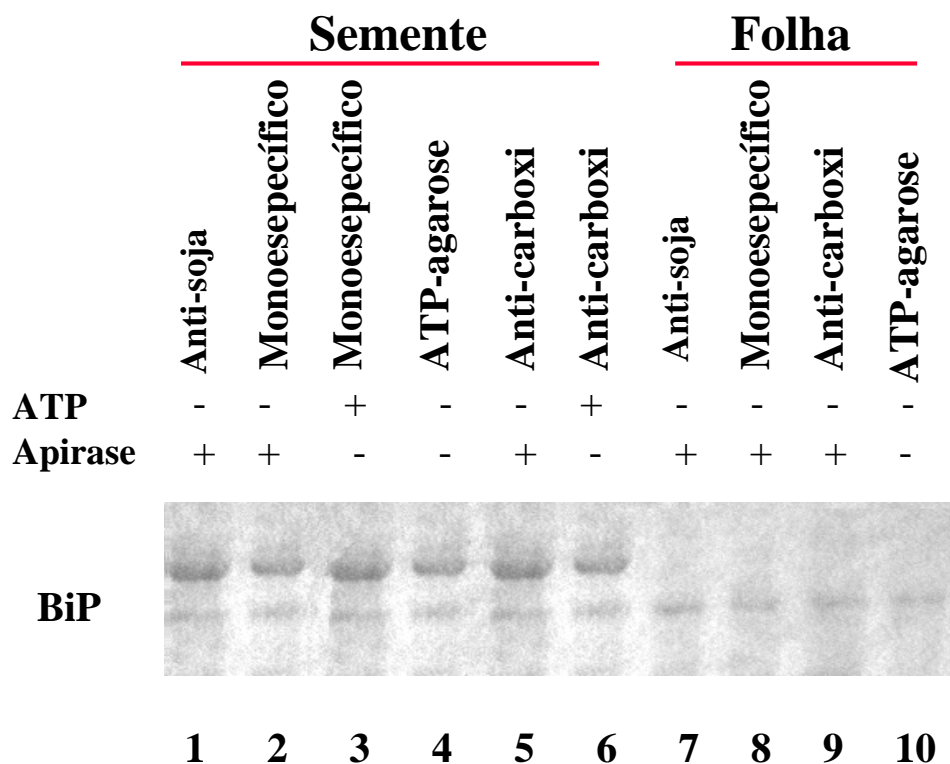


Figura 8- Imunoprecipitação de BiP e polipeptídios específicos da semente de soja. As reações de imunoprecipitação foram conduzidas, usando-se os anticorpos anti-soja, mono-específico e anti-carboxi, seguidas por incubação com proteína-A sepharose. A proteína BiP e os polipeptídios específicos da semente foram imunoprecipitados a partir de 1 mL de extrato de proteína total da semente colhida a 35 DAF e também de folhas da variedade Bienville, conforme indicado acima da figura. Os produtos imunoprecipitados foram separados por SDS-PAGE, transferidos para nitrocelulose e sondados com soro anti-soja. Imunoprecipitações foram conduzidas com o soro anti-soja (colunas 1 e 7), anticorpo mono-específico menos ATP (colunas 2 e 8), anticorpo mono-específico mais ATP (coluna 3), anti-carboxi menos ATP (colunas 5 e 9) e anti-carboxi mais ATP (coluna 6). As colunas 4 e 10 correspondem à sedimentação das proteínas com ATP-agarose. A posição de BiP é indicada à esquerda da figura.

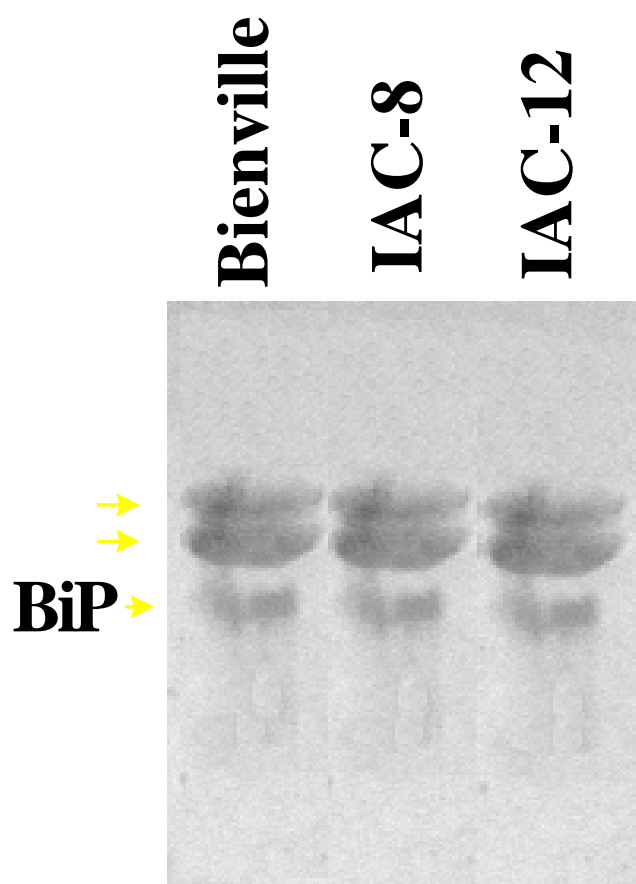


Figura 9- “Imunoblotting” de diferentes variedades de soja, usando-se o anticorpo anti-soja. Proteínas solúveis de sementes de soja das variedades Bienville, IAC-8 e IAC-12 foram fracionadas por SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas, usando-se o soro anti-soja. Acima da figura, estão indicadas as variedades utilizadas, e à direita encontra-se a posição das proteínas copurificadas e BiP.

polipeptídios normais, pelo menos eles indicam que mutações aberrantes que possam impedir modificações pós-traducionais nos referidos polipeptídios não tenham ocorrido na variedade Bienville.

Em arroz, têm sido detectadas associações *in vitro* entre BiP e prolaminas nascentes ainda associadas aos polirribossomos e, também, entre BiP e prolaminas já processadas nos corpos protéicos (LI et al., 1993). Tratamento dos complexos com ATP (5 mmol/L) causa dissociação de BiP dos corpos protéicos, mas não dissocia o complexo BiP:prolamina nascente. Provavelmente, essa associação estável entre BiP e prolaminas nascentes acarreta uma cinética de retenção das prolaminas no RE, favorável à obtenção de concentração crítica dessas proteínas, necessária para engatilhar o processo de deposição ordenada das proteínas no lúmen, dando origem a corpos protéicos no endosperma da semente de arroz derivados do RE.

Diferentemente do arroz, em soja a via majoritária de biogênese de corpos protéicos consiste no transporte de proteínas de reserva do RE para os vacúolos, mediado pelo aparelho de Golgi. Consistente com esse mecanismo de formação de corpos protéicos, as subunidades α e α' da proteína de reserva β -conglícinina formam complexos com BiP, altamente reversíveis pela adição de ATP (FONTES et al., 1996). Além disso, a fração de β -conglícinina associada é extremamente baixa. Isso indica que a dissociação do complexo BiP: β -conglícinina e a subsequente montagem da proteína trimérica ocorrem com alta eficiência no RE. Conseqüentemente, o tempo de retenção dessas proteínas no RE deve ser limitado, não favorecendo a obtenção de uma concentração crítica para formação de corpos protéicos derivados do RE. No entanto, corpos protéicos originados do RE já foram identificados em cotilédones de soja, nos estádios iniciais de desenvolvimento do cotilédone. A detecção de associações estáveis entre BiP e polipeptídios específicos da semente aponta um mecanismo provável para a formação minoritária de corpos protéicos derivados do RE em cotilédones de soja.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Anticorpos preparados contra BiP de milho foram usados para identificar o homólogo de BiP de soja em “immunoblots” de extratos protéicos de folhas, sementes e plântulas. Esses anticorpos foram eficientes em detectar uma proteína de massa molecular de 75.000 Da presente na fração do RE e constitutivamente sintetizada na soja. Os anticorpos de milho foram imunopurificados, utilizando-se a proteína recombinante expressa pelo clone cUFVBiP1, que codifica BiP da soja, e usados em “western blots” para análise do padrão da síntese de BiP. Durante o desenvolvimento do cotilédone, a proteína BiP se acumula predominantemente em estádios de desenvolvimento, em que a eficiência de síntese de proteínas de reserva é máxima. Conseqüentemente, o acúmulo de BiP em sementes é coordenado com a atividade de síntese de proteínas de reserva. A regulação temporal de BiP parece ser resultado de um aumento da atividade secretória associado à síntese de proteínas de reserva. Além disso, a síntese de BiP está correlacionada com a concentração de proteína total acumulada na semente de diferentes variedades de soja. Esses resultados indicam que BiP é induzida pelo aumento da atividade secretória do cotilédone associado à síntese ativa de proteínas de reserva.

Consistente com o padrão de expressão de chaperones moleculares, a síntese de BiP, na soja, foi induzida por diversas condições de estresse. Infecção pelo fungo *Cesccorpora sojina* Hara e infestação pelo inseto *Tetranichus urticae*, assim como estresses nutricional e hídrico, causaram aumento significativo no acúmulo de BiP nas folhas estressadas. Coletivamente, os resultados obtidos evidenciaram o envolvimento de BiP no transporte biossintético de proteína de reserva, além de terem mostrado uma analogia funcional entre BiP de soja e de outros organismos.

A propriedade de BiP de se ligar a ATP foi explorada como meio eficiente de purificação da proteína de extratos protéicos preparados a partir de sementes. A proteína foi eventualmente purificada em nível de homogeneidade em torno de 90%. No entanto, inicialmente dois polipeptídios de 85 a 90.000 Da, sintetizados exclusivamente em sementes, foram co-purificados com BiP. Para investigar a interação entre BiP e os polipeptídios específicos, ensaios de co-precipitação foram realizados. A proteína BiP associa-se com os polipeptídios da semente, formando complexos estáveis, mesmo na presença de K^+ e Mg-ATP. Uma vez que ATP tem sido usado como diagnóstico para interações proteína:proteína, mediadas por chaperones moleculares, causando dissociação dos complexos, os resultados demonstraram que provavelmente a proteína BiP da soja funcione com mecanismos alternativos de ação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, p. 1371-1380, 1994a.
- ANDERSON, J. V., LI, Q.-B., HASDELL, D. W. et al. 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, p.1359-1370, 1994b.
- ANFINSEN, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. **Science**, v.181, p.223-230, 1973.
- ATENCIO, D. P., YAFFE, M. P. MAS5, a yeast homLog of DnaJ involved in mitochondrial protein import. **Molecular Cell Biology**, v.12, p.283-291, 1992.
- BAR-PELED, M., CONCEIÇÃO, A. S., FRIGERIO, L. et al. 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, p.667-676, 1995.

- BECKER, J., CRAIG, E. A. Heat shock proteins as molecular chaperones. **European Journal Biochemistry**, v.219, p.11-23, 1994.
- BECKMANN, R. P., MIZZEN, L. A., WELCH, W. J. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for proteins folding and assembly. **Science**, v. 248, p. 223-230, 1990.
- BENAROUDJ, N., TRINIOLLES, F., LADJIMI, M. M. Effect of nucleotides, peptides, and unfolded proteins on the self-association of the molecular chaperone HSC70. **The Journal Biological Chemistry**, v.271, n.3, p.18471-18473, 1996.
- BLOND-ELGUINDI, S., CWIRIA, S. E., DOWER, W. J. et al. Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. **Cell**, v.75, p. 717-728, 1993a.
- BLOND-ELGUINDI, S., FOURIE, A. M., SAMBROOK, J. F. et al. 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.
- BLUMBERG, H., SILVER, P. SCJ1, a DnaJ homologue that alters protein sorting in yeast. **Nature**, v.349, p.627-630, 1991.
- BOLE, D. G., DOWIN, R., DORIAUX, M. et al. 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.
- BOLE, D. G., HENDERSHOT, L. M., KEARNEY, J. F. Post-translational association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chain and secreting hybridomas. **The Journal of Cell Biology**, v. 102, p. 1558-1566, 1986.

- BOORSTEIN, W. R., ZIEGELHOFFER, T., CRAIG, E. A. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. **Journal Molecular Evolution**, v.38, p.1-17, 1994.
- BOSTON, R. S., FONTES, E. P. B., SHANK, B. B. et al. Increased expression of the maize immunoglobulin binding protein homolog b-70 in three zein regulatory mutants. **Plant Cell**, v.3, p.497-505, 1991.
- BOSTON, R. S., VIITANEN, P. V., VIERLING, E. Molecular chaperones and protein folding in plants. **Plant Molecular Biology** (In press).
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.171, p.248-254, 1976.
- BRODSKY, J. L., HAMAMOTO, S., FELDHEIM, D. et al. Reconstitution of protein translocation from solubilized yeast membranes reveals topologically distinct roles for BiP and cytosolic Hsc70. **Journal Cell Biology**, v.120, p.95-102, 1993.
- BRODSKY, J. L., SCHEKMAN, R. A Sec63-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. **Journal Cell Biology**, v.123, p.1355-1363, 1993.
- BROT, N., REDFIELD, B., QIU, N.-H. et al. 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, p.12120-12124, 1994.
- CASELA, C. R., BRANCÃO, N. Evaluation of resistance in soybean (*Glycine max*) lines to frog-eye leaf spot (*Cercospora sojina*). **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p.475-482, 1981.
- CASELA, C. R., NOGUEZ, M. A., LUZZARDI, C. G. et al. Mancha "olho-de-rã" (*Cercospora sojina* Hara) em soja (*Glycine max* (L.) Merrill). In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 1, 1978, Londrina, **Anais**, Londrina: EMBRAPA ICNPSO, 1979. v.2, p.139-143.

- CERIOTTI, A., PEDRAZZINI, E., FABBRINI, M. S. et al. Expression of wild-type and mutated vacuolar storage protein phaseolin in *Xenopus* oocytes reveals relationships between assembly and intracellular transport. **European Journal Biochemistry**, v.202, p.959-968, 1991.
- CHANG, S. C., ERWIN, A. E., LEE, A. S. Glucose-regulated protein (GRP94 and GRP78) genes share common regulatory domains and are coordinately regulated by common trans-acting factors. **Molecular and Cellular Biology**, v.9, p.2153-2162, 1989.
- CHANG, S. C., WOODEN, S. K., NAKAKI, T. et al. 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. et al. The ATPase core of a clathrin uncoating protein. **Journal Biological Chemistry**, v.262, p.746-751, 1987.
- CHAPPELL, T. G., WELCH, W. J., SCHLOSSMAN, D. M. et al. Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins. **Cell**, v.45, p.3-13, 1986.
- CHEETHAM, M. E., BRION, J. P., ANDERTON, B. H. Human homologues of the bacterial heat-shock protein DnaJ are preferentially expressed in neurons. **Biochemistry**, v.284, p.469-476, 1992.
- CHEETHAM, M. E., JACKSON, A. P., ANDERTON, B. H. Regulation of 70-kDa heat-shock-protein ATPase activity and substrate binding by human DnaJ-like proteins, HSJ1a and HSJ1b. **European Journal Biochemistry**, v.226, p.99-107, 1994.
- CORDEWENER, J. H. G., HAUSE, G., GORGEN, E. et al. Changes in synthesis and localization of members of the 70-kDa class of heat-shock proteins accompany the induction of embryogenesis in *Brassica napus* L. microspores. **Planta**, v.196, p.747-755, 1995.

- CRAIG, E. A. Essential roles of 70 kDa heat inducible proteins. **Bioassays**, v.11, p.48-52, 1993.
- CRAIG, E. A., GAMBILL, B. D., NELSON, R. J. Heat shock proteins: Molecular chaperones of protein biogenesis. **Microbiology Review**, v.57, p.402-414, 1993.
- CRAIG, E. A., JACOBSEN, K. Mutations of the heat-inducible 70 kilodalton genes of yeast confer temperature-sensitive growth. **Cell**, v.38, p.841-849, 1984.
- CRAIG, E. A., JACOBSEN, K. Mutations in cognate gene of *Sacharomyces cerevisiae* HSP70 result in reduced growth rates at low temperatures. **Molecular Cell Biology**, v.5, p.3517-3524, 1985.
- CRAIG, E. A., KRAMER, J., SHILLING, J. et al.. SSC1, and essential member of the *S. cerevisiae* HSP70 multigene family, encodes a mitochondrial protein. **Molecular Cell Biology**, v.268, p.3000-3008, 1989.
- CRAIG, E. A., WEISSMAN, J. S., HORWICH, A. L. Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover on the cell. **Cell**, v.78, p.365-372, 1994.
- CYR, D. M., LANGER, T., DOUGLAS, M. G. DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. **Trends Biochemistry**, v.19, p.176-181, 1994.
- CYR, M. D., STUART, R. A., NEUPERT. W. A matrix ATP requirement for presequence translocation across the inner membrane of mitochondria. **Journal Biological Chemistry**, v.268, p.23751-23754, 1993.
- D'AMICO, L., VALSASINA, B., DAMINATI, M. G. et al. Bean homologues of the mammalian glucose regulated proteins: induction by tunicamycin and interaction with newly-synthesized storage proteins in the endoplasmatic reticulum. **The Plant Journal**, v.2, p.443-445, 1992.

- 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., GOLDMAN, M. H. S., DEMOLDER, J. et al. The tobacco luminal binding protein is encoded by a multigene family. **Plant Cell**, v.3, n.6, p.51-59. 1991.
- DENECKE, J., RYCKE, R., BOTTERMAN, J. Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. **The EMBO Journal**, v.11, 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 Soc. Symp.**, v.55, p.145-153, 1989.
- FIGUEIREDO, J. E. F., CASCARDO, J. C. M., CAROLINO, S. M. B. et al. Isolation and characterization of a novel binding protein (BiP) gene. **Brasilian Journal of Plant Physiology**. (No prelo).
- 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.
- FLAHERTY, K. M., MCKAY, D. B., KABSCH, W. et al. Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. **Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America**, v.88, p.5041-5045, 1991.
- FLYNN, G. C., CHAPPELL, T. G., ROTHMAN, J. E. Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. **Science**, v.245, p.385-390, 1989.
- FLYNN, G. C., POHL, J., FLOCCO, M. T. et al. Peptide- binding specificity of the molecular chaperone BiP. **Nature**, v.353, p.726-730, 1991.

- FONTES, E. B. P., SHANK, B. B., WROBEL, R. L. et al. Characterization of an immunoglobulin binding protein homolog in the maize *floury-2* endosperm mutant. **The Plant Cell**, v.3, p.483-496, 1991.
- FONTES, E. P. B., SILVA, C. J., CAROLINO, S. M. B. et al. 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, p.30470-30478, 1994.
- FREEMAN, B. C., MORIMOTO, R. I. The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. **The EMBO Journal**, v.15, n.12, p.2969-2979, 1996.
- FREIDEN, P. J., GAUT, J. R., HENDERSHOT, L. M. Interconversion of three differential modified and assembled forms of BiP. **The EMBO Journal**, v.11, p.63-70, 1992.
- FRYDMAN, J., NIMMESGERN, E., OHTSUKA, K. et al. Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. **Nature**, v.370, p.111-117, 1994.
- GALANTE, E., VITALE, A., MANZOCCHI, L. et al. Genetic control of a membrane component and zein deposition in maize endosperm. **Molecular & General Genetics: MGG**, v.192, p.316-321, 1983.
- GAMBILL, B. D., VOOS, W., KANG, P. J. et al. A dual role of mitochondrial hsp70 in membrane translocation of preproteins. **Journal of Cell Biology**, v.123, p.109-117, 1993.

- GEORGOPOULOS, C., WELCH, W. J. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. **Annual Review Cell Biology**, v.9, p.601-634, 1993.
- 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, p.939-950, 1986.
- GETHING, M.-J., SAMBROOK, J. Protein folding in the cell. **Nature**, v.355, p.33-45, 1992.
- GIERASCH, L. M. Panning for chaperone-binding peptides. **Current Biology**, v.4, n.2, p.173-174, 1994.
- GILMORE, R. Protein translocation across the endoplasmic reticulum: a tunnel with toll booths at entry and exit. **Cell**, v.75, p.589-592, 1993.
- GLICK, B. S. Can Hsp70 proteins act as force-generating motors? **Cell**, v.80, p.11-14, 1995.
- 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.
- GRAGEROV, A., GOTTESMAN, M. E. Different peptide binding specificities of hsp70 family members. **Journal Molecular Biology**, v.133-135, 1994.
- HAAS, I. G. BiP (GRP78), an essential hsp70 resident of the endoplasmic reticulum. **Experientia**, v.50, 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, p.2250-2254, 1988.
- HAAS, I. G., WABL, M. Immunoglobulin heavy chain binding protein. **Nature**, v.306, p.387-389, 1983.

- HAMMOND, C., HELENIUS, A. Folding of VSV G protein: sequential interaction with BiP and calnexin. **Science**, v.266, p.456-458, 1994.
- 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, p.829-837, 1990.
- HENDERSHOT, L. M., WEI, J.-Y., GAUT, J. R. et al. *In vitro* expression of mammalian BiP ATPase mutants causes disruption of the endoplasmic reticulum. **Molecular Biology Cell**, v.6, p.283-296, 1995.
- HENDERSHOT, L. M., BOLE, D., KOHLER, G. et al. Assembly and secretion of heavy chains that do not associate posttranslationally with immunoglobulin heavy chain-binding protein. **The Journal of Cell Biology**, v.104, p.761-767, 1987.
- HENDRICK, J. P., HARTL, F.-U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. **Annual Review Biochemistry**, v.62, p.349-384, 1993.
- HERRMANN, J. M., STUART, R. A., CRAIG, E. A. et al. Mitochondrial heat shock protein 70, a molecular chaperone for proteins encoded by mitochondrial DNA. **The Journal of Cell Biology**, v.127, n.4, p.893-902, 1994.
- HURTLEY, S. M., BOLE, D. G., HOOVER-LITTY, H. et al. Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein BiP. **The Journal of Cell Biology**, v. 108, p.2127-2136, 1989.
- 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. et al. Binding-protein expression is subject to temporal, developmental and stress-induced regulation in terminally differentiated soybean organs. **Planta**, v.195, p.611-621, 1995.
- KANG, P. J., OSTERMANN, J., SHILING, J. et al. Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. **Nature**, v.348, p.137-143, 1990.
- KARLSEDER, J., WISSING, D., HOLZER, G. et al. HSP70 overexpression mediates the escape of a doxorubicin-induced G2 cell cycle arrest. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.220, n.373, p.153-159, 1996.
- KASSENBRÖCK, C. K., GARCIA, P. D., WALTER, P. et al. Heavy-chain binding protein recognizes aberrant polypeptides translocated in vitro. **Nature**, v.333, p.90-93, 1988.
- KASSENBRÖCK, C. K., KELLY, R. B. Interaction of heavy chain binding protein (BiP/GRP78) with adenine nucleotides. **The EMBO Journal**, v.8, n.5, p.1461-1467, 1989.
- KIM, P. S., ARVAN, P. Calnexin and BiP act as sequential molecular chaperones during thyroglobulin folding in the endoplasmic reticulum. **Journal Cell Biology**, v.128, p.29-38, 1995.
- KIRSCH, T., BEEVERS, L. Uncoating of clathrin-coated vesicles by uncoating ATPase from developing peas. **Plant Physiology**, v.103, p.205-212, 1993.
- KOZUTSUMI, Y., SEGAL, M., NORMINGTON, K. et al. The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. **Nature**, v.332, p.462-464, 1988.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-695, 1970.
- LANDRY, S. J., GIERASCH, L. M. Polypeptide interactions with molecular chaperones and their relationship to in vivo protein folding. **Annual Review Biophysics Biomolecular Structura**, v.23, p.645-669, 1994.

- LANGER, T., LU, C., ECHOLS, H. et al. Successive action of dnaK, dnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. **Nature**, v.356, p. 683-689, 1992.
- 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.
- LENO, G. H., LEDFORD, B. E. ADP-ribosylation of the 78-kDa glucose regulated during nutritional stress. **European Journal Biochemistry**, v.186, p.205-211, 1989.
- LI, X., WU, Y., ZHANG, D. Z. et al. Rice prolamine protein body biogenesis: a BiP-mediated process. **Science**, v.226, p.1054-1056, 1993.
- LIBEREK, K., GEORGOPOULOS, C. Autoregulation of the *Escherichia coli* heat shock response by the DnaK and DnaJ heat shock proteins. **Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America**, v.90, p.11019-11023, 1993.
- LIBEREK, K., MARSZALEK, J., ANG, D. et al. *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, 1991a.
- LIBEREK, K., SKOWYRA, D., ZYLICZ, M. et al. The *Escherichia coli* DnaK chaperone, the 70-kDa heat shock protein eukaryotic equivalent, changes conformation upon ATP hydrolysis, thus triggering its dissociation from bound target protein. **Journal Biological Chemistry**, v.266, p.14491-14496, 1991b.
- LINDQUIST, S., CRAIG, E. A. The heat shock proteins. **Annual Review Genetics**, v.22, p.631-677, 1988.
- LUKE, M. M., SUTTON, A., ARNDT, K. T. Characterization of S1S1, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of bacterial dnaJ proteins. **Journal Cell Biology**, v.114, p.6a23-638, 1991.

- MACHAMER, C. E., DOMS, R. W., BOLE, D. G. et al. Heavy Chains Binding Protein recognizes incompletely disulfide-bonded forms of vesicular stomatitis virus G protein. **The Journal Biological Chemistry**, v.265, n.12, p. 6879-6883, 1990.
- MARTINS, M. F. **Caracterização molecular e análise da expressão do gene BiP da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Viçosa, MG: UFV, 1996. 82p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- McKAY, D. B. Structure and mechanism of the 70-kDa heat-shock-related proteins. **Advances Protein Chemistry**., v.44, p.67-98, 1993.
- McKAY, D. B., WILBANKS, S. M., FLAHERTY, K. M. et al. Stress-70 proteins and their interaction with nucleotides. In: MORIMOTO, R. I., TISSIERES, A., GEORGOPOULOS, C. (Eds.). **The biology of heat shock proteins and molecular chaperones**. 1994, p.417-455.
- 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, p.373-375, 1994.
- MIERNYK, J. A., DUCK, N. B., SHATTERS, R. G. et al. The 70-kilodalton heat shock cognate can act as a molecular chaperone during the membrane translocation of a plant secretory protein precursor. **Plant Cell**, v.4, p.821-829, 1992.
- MIERNYK, J. A., HAYMAN, G. T. ATPase activity and molecular chaperone function of the stress 70 proteins. **Plant Physiology** (In press).
- MILARSKI, K. L., MORIMOTO, R. I. Mutational analysis of the human HAP70 protein: distinct domains for nucleolar localization and adenosine triphosphate binding. **Journal Cell Biology**, v.109, p.1947-1962, 1989.
- MILLERD, A. Biochemistry of legume seed proteins. **Annual Review Plant Physiology**, v.26, p.53-72, 1975.

- MOONEY, B., HARMEY, M. A. The occurrence of hsp70 in the outer membrane of plant mitochondria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.218, n.54, p.309-313, 1996.
- MOREIRA, M. A., HERMODSON, M. A., LARKINS, B. A. et al. Partial characterization of the acidic and basic polypeptides of glycinin. **Journal Biology Chemistry**, v.254, p.9921-9926, 1979.
- MORI, K., SANT, A., KOHNO, K. et al. A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR-2 (BiP) gene by unfolded proteins. **The EMBO Journal**, v.11, n.7, p.2583-2593, 1992.
- MUNRO, S., PELHAM, H. R. B. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. **Cell**, v.48, p.899-907, 1987.
- MUNRO, S., PELHAM, H. R. B. An Hsp70-like protein in the ER: with the 78kDa glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. **Cell**, v.46, p.291-300, 1986.
- NAPIER, R. M., FOWKE, L. C., HAWES, C. et al. 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.
- NELSON, R. J., ZIEGELHOFFER, T., NICOLSON, C. et al. The translation machinery and 70 kDa heat shock protein cooperate in protein synthesis. **Cell**, v.71, p.97-105, 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, p.1565-1569, 1991.

- NICHOLSON, R. C., WILLIAMS, D. B., MORAN, L. S. An essential member of the HSP70 gene family of *Saccharomyces cerevisiae* is homologous to immunoglobulin heavy chain binding protein. **Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America**, v.86, p.1159-1163, 1990.
- NORMINGTON, K., KOHNO, K., KOZUTSUMI, Y. et al. *Saccharomyces cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. **Cell**, v.57, p.1223-1236, 1989.
- OLDEN, K., PRATT, R. M., JAWORSKI, C. et al. 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.
- OSTERMANN, J., VOOS, W., KANG, P.-J. et al. Precursor proteins in transit through mitochondrial contact sites interact with hsp70 in the matrix. **FEBS Letters**, v.277, p.281-284, 1990.
- PALADE, G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. **Science**, v.189, p.347, 1975.
- PALLEROS, D. R., REID, K. L., SHI, L. et al. ATP-induced protein-Hsp70 complex dissociation requires K^+ but not ATP hydrolysis. **Nature**, v.365, p.664-666, 1993.
- PARSELL, D. A., LINDQUIST, S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. **Annual Review Genetics**, v.27, p.437-496, 1993.
- PEDRAZZINI, E., GIOVINAZZO, G., BOLLINI, R. et al. Binding of BiP to an assembly-defective protein in plant cells. **Plant Journal**, v.5, 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. Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. **Annual Review Cell Biology**, v.5, p.1-23, 1989.
- PFEFFER, S. R., ROTHMAN, J. E. Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. **Annual Review Biochemistry**, v.56, p.829-852, 1987.
- 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.
- 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, p. 1211-1221, 1989.
- ROSENBERG, N., SHIMONI, Y., ALTSCHULER, Y. et al. Wheat (*Triticum aestivum* L.) γ -Gliadin accumulates in dense protein bodies within the endoplasmic reticulum of yeast. **Plant Physiology**, v.102, p.61-69, 1993.
- ROTHMAN, J. E. Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells. **Cell**, v.59, p.591-601, 1989.
- ROWLEY, N., PRIP-BUUS, C., WESTERMANN, B. et al. Mdj1, a novel chaperone of the DnaJ family is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding. **Cell**, v.77, p.249-259, 1994.
- ROWLING, P. J. E. Folding, assembly and posttranslational modification of proteins within the lumen of endoplasmic reticulum. **Subcellular Biochemistry**, v.21, p.41-80, 1993.
- SADLER, I., CHIANG, A., KURIHARA, T. et al. A yeast gene important for protein assembly into the endoplasmic reticulum and the nucleus has

- homology to DnaJ, an *E.coli* heat shock protein. **Journal Cell Biology**, v.109, p.2665-2675, 1989.
- SAMBROOK, J. The involvement of calcium in transport of secretory proteins from the endoplasmic reticulum. **Cell**, v.61, p.197-199, 1990.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular cloning - a laboratory manual**. 2^a ed., New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- SANCHEZ, C., PADILLA, R., PACIUCCI, R. et al. Binding of heat-shock protein 70 (hsp70) to tubulin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.310, p.428-432, 1994.
- SANDERS, S. L., WHITFIELD, K. M., VOGEL, J. P. et al. Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. **Cell**, v.69, n.2, p.353-365, 1992.
- 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, p.183-195, 1996.
- SCHLENSTEDT, G., HARRIS, S., RISSE, B. et al. A yeast DnaJ homologue, Scj1p, can function in the endoplasmic reticulum with BiP/Kar-2p via a conserved domain that specifies interactions with Hsp70s. **The Journal of Cell Biology**, v.129, n.4, p. 979-988, 1995.
- SCHMITZ, A., MAINTZ, M., KEHLE, T. et al. *In vivo* iodination of a misfolded proinsulin reveals co-localized signals for BiP binding and for degradation in the ER. **The EMBO Journal**, v.14, n.6, p.1091-1098, 1995.
- SCIDMORE, M. A., OKAMURA, H. H., ROSE, M. D., Genetic interactions between Kar-2 and Sec63, encoding homologues of DnaK and DnaJ, in the endoplasmic reticulum. **Molecular Biology Cell**, v.4, p.1145-1159, 1993.

- SHAMU, C. E., WALTER, P. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p Kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. **The EMBO Journal**, v.15, n.12, p.3028-3039, 1996.
- 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.
- SIMONS, J. F., FERRO-NOVICK, S., ROSE, M. D. et al. BiP/Kar-2p serves as a molecular chaperone during carboxypeptidase Y folding in yeast. **Journal Cell Biology**, v.130, p.41-49, 1995.
- STUART, R. A., CYR, D. M., NEUPERT, W. Mitochondrial molecular chaperones: their role in protein translocation. **Trends Biochemistry of Science**, v.19, p.87-92, 1994b.
- STUART, R. A., GRUHLER, A., VAN DER KLEY, I. J. et al. The requirement of matrix ATP for the import of precursor proteins into the mitochondrial matrix and intermembrane space. **European an Journal of Biochemistry**, v.220, p.9-18, 1994a.
- 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.
- TING, J., WOODEN, S. K., KRIZ, R. et al. The nucleotide sequence encoding the hamster 78-kDa glucose-regulated protein (GRP78) and its consevation between hamster and rat. **Gene**, v.55, p.147-152, 1987.
- UNGERMANN, C., NEUPERT, W., CYR, D. M. The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria. **Science**, v.266, p. 1250-1253.
- VITALE, A., BIELLI, A., CERIOTTI, A. The binding protein associates with monomeric phaseolin. **Plant Physiology**, v.107, p.1411-1418, 1995a.

- 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, p.1417-1444, 1993.
- VEIGA, P. ***Cercospora Sojina* Hara: obtenção de inóculo, inoculação e avaliação da resistência em soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. ESALQ, USP, 1973.32p. Escola Superior de Agricultura Luíz de Queirós, Universidade Estadual de São Paulo, 1973.
- VOGEL, J. P., MISRA, L. M., ROSE, M. D. Loss of BiP/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast. **Journal Cell Biology**, v.110, p.1885-1895, 1990.
- WAGNER, I., ARLT, H., VAN DYCK, L. et al. Molecular chaperones cooperate with P1M1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. **The EMBO Journal**, v.13, n.21, p.5135-5145, 1994.
- WALL, D., ZYLICZ, M., GEORGOPOULOS, C. The conserved G/F motif of the DnaJ chaperones is necessary for the activation of the substrate binding properties of the DnaK chaperone. **The Journal Biological Chemistry**, v.270, n.5, p.2139-2144, 1995.
- WALLING, L., DREW, G. N., GOLDBERG, R. B. Transcriptional and post-transcriptional regulation of soybean seed protein messenger-RNA levels. **Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America**, v.83, p.2123-2127, 1986.
- WICKNER, S. H., HOSKINS, J., MCKENNEY, K. Functions of DnaJ and DnaK as chaperones in origin-specific DNA binding by RepA. **Nature**, v.350, p.165-167, 1991a.
- WICKNER, S. H., HOSKINS, J., MCKENNEY, K. Monomerization of RepA dimers by heat shock proteins activates binding to DNA replication origin. **Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America**, v.88, p.7903-7907, 1991b.

WICKNER, S. H., SKOWYRA, D., HOSKINS, J. et al. KnaJ, DnaK, and GrpE heat shock proteins are required in ori P1 DNA replication solely at the RepA monomerization step. **Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America**, v.89, p.10345-10349, 1992.

ZHANG, F., BOSTON, R. S. Increases in binding protein (BiP) accompany changes in protein body morphology in three high-lysine mutants of maize. **Protoplasma**, v.171, n.33, p.142-152, 1992.

ZHANG, J., WALKER, G. C. Identification of elements of the peptide binding site of DnaK by peptide cross-linking. **The Journal of Biological Chemistry**, V.271, p.19668-19674, 1996.

ZHOU, R., MIERNYK, J. A. ATPase activities of the maize stress 70 molecular chaperone proteins. **Journal Biology Chemistry**. (In press).