

MARIA ANETE SANTANA VALENTE

CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE BIP E DE PROTEÍNAS  
DE RESERVA EM SEMENTES DE SOJA

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2004

MARIA ANETE SANTANA VALENTE

CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE BIP E DE PROTEÍNAS  
DE RESERVA EM SEMENTES DE SOJA

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

APROVADA: 30 de julho de 2004.

---

Prof. Maurílio Alves Moreira  
(Conselheiro)

---

Dr<sup>a</sup> Sônia Madali Boseja Carolino  
(Conselheira)

---

Prof<sup>a</sup> Maria Cristina Baracat Pereira

---

Prof<sup>a</sup> Marli Lourdes de Oliveira

---

Prof<sup>a</sup> Elizabeth Pacheco Batista Fontes  
(Orientadora)

A Deus  
A meus pais  
A meus irmãos

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela determinação e força.

À professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela orientação, ensinamentos e apoio.

Aos meus conselheiros, professor Maurílio Alves Moreira e Dr<sup>a</sup> Sônia Madali Boseja Carolino, pela colaboração e incentivo.

À professora Marli Lourdes de Oliveira e ao professor Sebastião Tavares de Rezende, pela atenção e apoio.

À professora Maria Cristina Baracat Pereira, pela contribuição e presteza.

A todos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e do Laboratório de Proteômica, pelo agradável convívio e colaboração para a obtenção dos resultados.

Ao Newton e a Inês, pelo apoio e contribuição.

Aos meus pais José Geraldo Lisboa Valente e Lúcia Janote Santana Valente e aos meus irmãos Amélia e Sidney, pelo carinho, compreensão e apoio, incondicionalmente dispensados.

Aos meus amigos, pela contribuição para o êxito deste trabalho.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do Curso.

## **BIOGRAFIA**

MARIA ANETE SANTANA VALENTE, filha de José Geraldo Lisboa Valente e Lúcia Janote Santana Valente, nasceu em Porto Firme, Minas Gerais.

Em outubro de 1998, diplomou-se nutricionista pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG. Exerceu atividades profissionais, na qualidade de nutricionista, de janeiro de 1999 a agosto de 2002.

Em setembro de 2002, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Bioquímica Agrícola, nessa mesma Universidade, submetendo-se à defesa de tese em 30 de julho de 2004.

## CONTEÚDO

	Página
RESUMO .....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. Acúmulo de BiP no desenvolvimento de sementes.....	3
2.2. Proteínas de reserva de sementes .....	6
2.3. Interação entre BiP e proteínas de reserva de sementes.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	11
3.1. Material vegetal .....	11
3.2. Expressão e purificação da proteína BiP recombinante.....	12
3.3. Extração e quantificação de proteínas .....	13
3.4. Eletroforese em gel de acrilamida e <i>immunoblotting</i> .....	14
3.5. Quantificação da proteína BiP em sementes .....	15
3.6. Análise Estatística .....	15
3.7. Clonagem da seqüência que codifica a subunidade de - conglucina em pBSII-KS.....	16
3.8. Clonagem da subunidade de -conglucina em pAD-GAL4 fusionada ao domínio de ativação de GAL-4 .....	16
3.6.4. Clonagem de BiP em pBD-GAL4 .....	17

	Página
3.10. Propagação em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YR2 estirpe YRG-2.....	17
4. RESULTADOS .....	19
4.1. Indução e purificação da proteína BiP .....	19
4.2. Determinação da concentração de proteína nas sementes de soja em diferentes estádios de desenvolvimento .....	21
4.3. Acúmulo temporal de BiP nos diferentes estádios de desenvolvimento de sementes .....	21
4.4. Relação entre as concentrações da proteína BiP e de proteínas de reserva de sementes de soja .....	24
4.5. Interação entre BiP e proteína de reserva .....	25
4.6. Análise da Expressão de BiP em sementes de <i>Nicotiana tabacum</i> transgênicas.....	27
4.7. Determinação do teor protéico das sementes de <i>Nicotiana tabacum</i> transgênicas.....	30
5. DISCUSSÕES E CONCLUSÕES.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36

## RESUMO

VALENTE, Maria Anete Santana, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2004. **Correlação entre as concentrações de BiP e de Proteínas de Reserva em Sementes de Soja.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Conselheiros: Maurílio Alves Moreira e Sônia Madali Boseja Carolino

O dobramento de proteínas secretórias no lúmen do retículo endoplasmático é altamente facilitado por chaperones moleculares. A proteína BiP é um dos chaperones mais bem caracterizados residentes do RE. BiP tem demonstrado ser um modulador multifuncional de vários processos que ocorrem no retículo endoplasmático. Essa proteína auxilia no dobramento e enovelamento das cadeias polipeptídicas nascentes e exerce papel no controle de qualidade do RE, reconhecendo e direcionando proteínas incorretamente dobradas para degradação. Também funciona como um sensor da via de resposta a proteínas incorretamente enovelada (UPR), regulando indiretamente a atividade da cinase eIF-2 e a sua própria expressão. As proteínas de reserva são sintetizadas em ribossomos associados à membrana do retículo endoplasmático, sendo co-traducionalmente translocadas para o lúmen do RE, onde podem permanecer associadas em corpos protéicos ou ser transportadas, via complexo de Golgi, para vacúolos de proteínas de reserva. Evidências na literatura indicam que BiP associa-se com proteínas de reserva

*in vitro*, e seu acúmulo nas sementes está coordenado com a síntese de proteínas de reserva. Nesta investigação, foram analisados o nível de BiP nos diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de soja e a correlação entre as concentrações de BiP e de proteínas de reserva de sementes. Para isso, utilizaram-se sementes de soja das variedades CAC-1 e CC3 com diferentes teores de proteína, determinados pelo método Kjeldahl. BiP acumulou-se predominantemente nos estádios iniciais de desenvolvimento das sementes, coincidindo com a síntese ativa de proteínas de reserva. O acúmulo temporal de BiP foi significativamente superior nas sementes CC3 que apresentam maior teor protéico. A capacidade de BiP associar-se a proteínas de reserva foi funcionalmente avaliada por meio do sistema duplo híbrido. Este ensaio demonstrou que BiP interage eficientemente com a subunidade de -conglucina em leveduras. A partir desses resultados, surgiu a hipótese de que um aumento da expressão de BiP poderia resultar em elevação do teor de proteína das sementes. O efeito da superexpressão da proteína BiP no teor de proteína total foi diretamente avaliado em sementes de *Nicotiana tabacum* transgênicas (geração T4) superexpressando o gene BiP da soja. Embora o nível de BiP nas sementes transgênicas, detectado por *immunoblotting* e quantificado por densitometria, tenha sido maior nas linhagens transgênicas senso em relação às controle e anti-senso, a superprodução constitutiva de BiP não foi correlacionada diretamente com o aumento do teor protéico, determinado pelo método Kjeldahl. Esses resultados sugerem que a capacidade de processamento do retículo endoplasmático em tabaco durante o desenvolvimento da semente não constitui o fator limitante do processo de síntese e acúmulo de proteínas de reserva.

## ABSTRACT

VALENTE, Maria Anete Santana, M. S., Universidade Federal de Viçosa, July 2004. **Correlation between BiP and soybean seeds storage proteins accumulation concentration.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Committee members: Maurílio Alves Moreira e Sônia Madali Boseja Carolino

The folding of secretory proteins within the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) is greatly facilitated by molecular chaperones. The binding protein BiP is one of the best characterized ER-resident molecular chaperones. In mammalian cells, BiP has been demonstrated to serve as a multifunctional modulator of various ER-supported processes including regulation of eIF-2 kinase and mRNA translation, regulation of *BiP* expression, and the catalysis of protein folding, as well as, potentially, the targeting of misfolded proteins for degradation. The storage proteins from soybean are synthesized in ER membrane-bound polyribosomes and through a Golgi-mediated translocation are deposited into specialized vacuoles, designated protein bodies. We have previously demonstrated that BiP associated detectably with storage proteins *in vitro* and the efficiency of BiP synthesis correlated with the accumulation of seed storage protein, such that soybean cultivars that exhibited a greater content of storage proteins also accumulated higher levels of BiP. In this investigation, we further analyzed the synthesis of soybean BiP during seed development and the naturally occurring correlation between the content of BiP

and seed storage proteins. *Immunoblottings* of total protein extracts from CAC1 (normal protein content) and CC3 (high protein content) cultivars demonstrated that, during the seed development, BiP accumulates to high levels at developmental stages that coincide with the onset of active storage protein synthesis. We further characterized the association of BiP and  $\beta$ -conglycinin storage proteins through the two-hybrid system. In order to understand whether an increase in BiP levels would promote a concomitant increase in seed storage protein accumulation, we obtained tobacco transgenic seeds-overexpressing a soybean BiP gene. The effect of BiP overexpression on total protein accumulation was directly evaluated in *Nicotiana tabacum* homozygous transgenic seeds (T3 generation). The BiP protein levels detected in the transgenic seeds were significantly higher than those of wild type and antisense BiP-transformed seeds. Nevertheless, total protein from seeds-overexpressing BiP, as determined by Kjeldahl, did not differ significantly from that of wild type and antisense seeds. These results suggest, although do not prove, that the capacity of ER processing during seed development does not constitute a rate limiting process for storage protein synthesis and accumulation.

## 1. INTRODUÇÃO

Avanços recentes no isolamento de genes, na transformação de plantas e na engenharia genética têm sido amplamente empregados, buscando alterar vias metabólicas em plantas por modificações em únicos ou múltiplos genes. Muitas dessas modificações no metabolismo de plantas são direcionadas com o propósito de aumentar o valor nutricional dos alimentos e melhorar os níveis primários de metabólitos essenciais. A expectativa da crescente lista de metabólitos torna-se cada vez maior após novas descobertas na nutrição, medicina e ciências (GALILI et al., 2002). Assim, utilizando-se técnicas disponibilizadas pela biologia molecular é possível obter alimentos com melhor perfil nutricional.

O retículo endoplasmático é uma organela composta por uma membrana contínua, onde ocorrem a síntese, o enovelamento e a maturação de proteínas secretórias, bem como a translocação de proteínas através de sua membrana, a integração de proteínas transmembranas, a síntese de fosfolipídios e esteróis e a estocagem de íons de cálcio (VOELTZ et al., 2002). O retículo endoplasmático também possui um mecanismo de controle de qualidade que discrimina proteínas corretamente dobradas de proteínas anormais, incapazes de adquirirem uma conformação nativa e funcional. Este mecanismo impede que as proteínas anormais prossigam pela via secretora e assegura que apenas proteínas funcionais alcancem seu destino final (ODA et al., 2003), sendo esses processos auxiliados e monitorados por chaperones moleculares.

A proteína BiP, também denominada GRP78 (HAAS E MEO, 1988), é um dos chaperones moleculares do retículo endoplasmático mais bem caracterizados (DENECKE, 1996) que associa-se a polipeptídios recém-sintetizados para assistir o enovelamento correto e à oligomerização de proteínas secretórias. BiP é claramente uma proteína multifuncional (PILLON E SCHEKMAN 1999), exercendo importante papel na translocação de proteínas recém-sintetizadas, através da membrana do retículo endoplasmático (GEHTING, 1999). BiP é capaz de ligar-se a cadeias polipeptídicas na conformação estendida, reconhecendo preferencialmente peptídeos com alto conteúdo de resíduos hidrofóbicos (BLOND-ELGUINDI et al., 1993).

Embora a capacidade de interação entre BiP e proteínas de reserva já tenha sido demonstrada, o papel de BiP na síntese e acúmulo de proteínas de reserva em sementes ainda não está totalmente esclarecido. Este trabalho teve como objetivo primordial analisar o efeito da atividade de chaperone molecular de BiP na síntese e acúmulo de proteínas de reserva das sementes de soja e de tabaco. Nesse sentido, propôs-se avaliar especificamente o nível de BiP e o acúmulo de proteínas de reserva durante diferentes estádios de desenvolvimento, demonstrar a interação entre BiP e proteína de reserva e avaliar se a atividade de BiP está diretamente correlacionada com o acúmulo de proteínas de reserva de sementes.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Acúmulo de BiP no desenvolvimento de sementes**

As proteínas secretórias são co-traducionalmente transportadas para o lúmen do retículo endoplasmático. Imediatamente após a entrada nessa organela, os polipeptídeos nascentes podem sofrer uma série de processamentos pós-traducionais, como incluem adição covalente de carboidratos e clivagem por enzimas proteolíticas; enovelamento nas estruturas secundárias e terciárias apropriadas, as quais são estabilizadas por ligações dissulfídicas; e, em alguns casos, aquisição de estruturas quaternárias em complexos multiméricos (YANJUN et al., 2003). O retículo endoplasmático também possui um mecanismo de controle de qualidade que discrimina proteínas corretamente dobradas das proteínas incorretamente dobradas. Esse mecanismo assegura que somente proteínas corretamente dobradas e montadas prossigam para seu destino final (ODA et al., 2003). Estes processos são auxiliados e monitorados por chaperones do retículo endoplasmático, dentre os quais BiP exerce função de destaque.

BiP é uma proteína de 78 kDa, pertencente à família dos chaperones Hsp70 (HAAS E MEO, 1988) sendo um dos chaperones mais bem caracterizados do retículo endoplasmático (DENECKE, 1996). Como as outras proteínas Hsp70, BiP tem dois domínios importantes, um amino-terminal, que contém um sítio catalítico, e um de ligação ao substrato no carboxi-terminal da

proteína (MCKAY, 1993). Esses domínios comunicam-se para regular afinidade e tempo de ligação a polipeptídeos (KNARR, et al., 1995). BiP interage com seus substratos de maneira dependente de ATP (KNARR et al., 2002). Assim que os polipeptídeos recém-sintetizados são translocados para o lúmen do retículo endoplasmático, BiP é capaz de ligar-se e manter um estado competente para subsequente dobramento e oligomerização (GEHTING, 1999). BiP liga-se a cadeias polipeptídicas na conformação estendida, reconhecendo preferencialmente peptídeos com alto conteúdo de resíduos hidrofóbicos. A extensão mínima de um polipeptídeo reconhecido por BiP foi um heptapeptídeo, com resíduos hidrofóbicos presentes em pelo menos quatro posições alternadas (BLOND-ELGUINDI et al., 1993).

BiP é uma proteína multifuncional, envolvida na regulação de diversos processos celulares associados ao retículo endoplasmático (PILLON E SCHEKMAN 1999; NGUYEN et al. 1991). Além de participar no enovelamento de cadeias polipeptídicas nascentes, BiP auxilia a translocação dessas cadeias polipeptídicas para o lúmen do retículo endoplasmático e funciona como um vedante do translocon durante os estágios iniciais de translocação protéica. Dessa forma, a barreira de permeabilidade entre o retículo endoplasmático e o citosol é conservada, e o nível de cálcio conseqüentemente é mantido (HAMMAN et al., 1998; HAIGH E JOHNSON, 2002), posicionando BiP em um local estratégico para ligar-se a cadeias nascentes assim que entram no retículo endoplasmático (SANDERS et al., 1992). BiP também exerce uma função importante no controle de qualidade dessa organela. Proteínas anormais e incapazes de adquirirem a conformação nativa e funcional são reconhecidas pelo controle de qualidade do retículo endoplasmático e endereçadas para degradação, prevenindo seu acúmulo no lúmen da organela evitando, assim, a formação de agregados insolúveis que podem tornar-se tóxicos para a célula. Este mecanismo de *turnover* é denominado degradação associada ao retículo endoplasmático (ERAD) (HAMPTON, 2002), no qual BiP está diretamente envolvido, auxiliando na identificação e endereçamento destes substratos para degradação (MOLINARI et al., 2002).

O tempo de interação entre BiP e uma proteína defeituosa tem sido relacionado à estabilidade desta proteína. Sugere-se que a exposição de regiões não dobradas de proteínas liberadas de interações com chaperones

pode regular o endereçamento destas para degradação (SKOWRONEK et al., 1998). BiP também funciona como sensor da via UPR, sendo capaz de induzir a ativação transcricional dos genes envolvidos nesta via, provendo respostas para garantir a sobrevivência celular (LIU E KAUFMAN, 2003).

O acúmulo de BiP está associado ao momento de síntese das proteínas de reserva. Durante o desenvolvimento dos corpos protéicos de prolamina, a proteína BiP foi detectada em todos os estágios de desenvolvimento, havendo maior concentração nos estádios iniciais e, então, decréscimo gradual até a semente atingir sua maturidade (MUENCH et al., 1997). Similarmente, o acúmulo de BiP em cotilédones de soja é mais acentuado durante os estádios iniciais de desenvolvimento das sementes (KALINSKI et al., 1995). Uma relação entre o nível de BiP e o teor de proteínas de reserva do glúten, durante o desenvolvimento do endosperma, já foi também constatada (DUPONT et al., 1998), em que, assim como confirmado no trigo, BiP apresentou acúmulo superior nos estágios iniciais de desenvolvimento e reduzido nos estágios mais avançados (SHIMONINI et al., 1995). Além disso, foi demonstrado existir uma tendência de correlação positiva entre o acúmulo de BiP e o teor de proteína total acumulada em diferentes variedades de sementes de soja (CAROLINO, 1997).

BiP é capaz de interagir com uma grande variedade de ligantes, incluindo diversas proteínas secretórias (SHUSTA et al., 1998). Para isso, ensaios funcionais foram estabelecidos, usando essas proteínas, para testar a atividade de BiP *in vivo* em células de tabaco. Uma redução na síntese de proteínas foi observada durante tratamento com tunicamicina. Esse efeito foi resultante da depleção de BiP no retículo endoplasmático, sendo a co-expressão de BiP capaz de restaurar eficientemente a síntese em condições de estresse (LEBORGNE-CASTEL et al., 1999). O restabelecimento é observado nas proteínas, o que indica que BiP está envolvido nos passos iniciais da síntese de proteínas no retículo endoplasmático (VITALE E DENECKE, 1999).

Plantas transgênicas superexpressando BiP mostraram um aumento significativo no nível do mRNA de BiP, entretanto o aumento no nível dessa proteína BiP foi modesto (LEBORGNE-CASTEL et al. 1999). Esse aumento diferencial no acúmulo do mRNA de BiP e proteína sugere que mecanismos pós-traducionais podem regular a síntese de BiP em células de plantas.

## 2.2. Proteínas de reserva de sementes

As proteínas de reserva são particularmente importantes porque determinam não somente o teor de proteína total contido nas sementes, mas também a composição aminoacídica (SHEWRY et al., 1995). A qualidade nutricional de algumas plantas tem sido recentemente aprimorada por meio de expressão de genes responsáveis por codificar a superexpressão dos aminoácidos lisina ou mesmo metionina (GALILI et al. 2002). Esta estratégia tem sido efetiva para melhoria do perfil nutricional destes aminoácidos limitantes na composição aminoacídica das proteínas de reserva, e conseqüentemente, eleva o teor de proteínas totais acumulado é aumentado. Altos níveis de aminoácidos essenciais em tecidos de sementes resultam em um aumento da qualidade nutricional das proteínas de reserva da semente (MOLVIG et al., 1997, MUNTZ et al. 1998). O aumento do teor protéico, sem superexpressar um aminoácido específico, leva ao aumento proporcional na composição de todos os aminoácidos, mantendo a proporção original entre estes.

A classificação de proteínas dos grãos foi desenvolvida por Osborne (1924), com base na sua solubilidade em uma série de solventes. São proteínas de reserva, em sua maioria, albuminas, globulinas e prolaminas. Apesar de o fracionamento proposto por Osborne ser ainda o mais utilizado, atualmente as proteínas de sementes são classificadas com base funcional nos seguintes grupos: proteínas de reserva, proteínas estruturais e metabólicas e proteínas de defesa (SHEWRY E HALFORD, 2002).

As globulinas são facilmente solúveis em soluções salinas e são pouco solúveis em água. Essas proteínas são geralmente de alto peso molecular e têm coeficiente de sedimentação variando de 7 a 13 S (DERBYSHIRE et al., 1976). As globulinas 7S, que possuem coeficiente de sedimentação em torno de 7, apresentam, além de homologia das seqüências, estruturas tridimensionais e propriedades similares (KRIZ, 1999). São estocadas em corpos protéicos e parecem funcionar somente como proteínas de reserva. Contudo, elas não são necessárias para o funcionamento normal das sementes (KRIZ E WALLACE, 1991). As globulinas 11 S, com um coeficiente de sedimentação por volta de 11, são menos solúveis em soluções salinas

(SHOTWELL, 1999; TAKAIWA et al., 1999) e capazes de formar uma estrutura hexamérica (SINGH et al., 1988).

As prolaminas constituem grande parte das proteínas de reserva dos grãos. Embora tenham sido definidas como solúveis em álcool, algumas também ocorrem em polímeros insolúveis em álcool em seu estado reduzido. São muito mais variáveis em estrutura do que as globulinas (SHEWRY E TATHAN, 1998).

As albuminas, solúveis em água, possuem coeficiente de sedimentação em torno de 2 (YOULE E HUANG, 1981). Apesar das diferenças em suas subunidades estruturais, todas as albuminas 2 S são proteínas globulares compactas com resíduos de cisteína conservados (MENÉNDEZ-ARIAS et al., 1987).

Apesar de todas as proteínas de reserva de sementes apresentarem uma variação ampla de estruturas, elas possuem muitas propriedades em comum, como altos níveis de síntese em tecidos específicos e em certos estádios de desenvolvimento e armazenamento em depósitos discretos denominados corpos protéicos, nas sementes maduras (SHEWRY et al., 1995). As proteínas de reserva acumulam-se principalmente nos vacúolos de proteínas de reserva e como corpos protéicos originados diretamente do retículo endoplasmático. A síntese de proteínas de reserva e a formação de vacúolos especializados ocorrem após divisão celular completa seguida do crescimento adicional por expansão celular e acúmulo de substâncias de reserva (THOMAS, 1993; NIELSEN et al., 1997; SHEWRY E TATHAN, 1998; MARTY, 1999). Os corpos protéicos formam-se em consequência do desenvolvimento de eventos regulados que induzem a síntese de proteínas de reserva em organelas específicas (BOLLINI E CHISPEELS, 1979, revisados por CHISPEELS, 1991).

As proteínas de reserva são inicialmente sintetizadas na superfície das membranas do retículo endoplasmático e co-traducionalmente transportadas para o lúmen do retículo endoplasmático, onde podem permanecer ou serem transportadas via complexo de Golgi para os vacúolos de proteínas de reserva (VITALE E DENECKE, 1999).

As globulinas 7 S e 11 S e outras proteínas de reserva formam dímeros, trímeros e tetrâmeros no lúmen do retículo endoplasmático logo após a síntese

(CHISPEELS ET AL., 1982A, 1982B; CERIOTTI et al., 1995). Oligômeros das globulinas 7 S e 11 S são solúveis e transportados através do sistema de endomembranas, via complexo de Golgi, para vacúolos de proteínas de reserva. Em contraste, as prolamínas geralmente formam grandes agregados oligoméricos no retículo endoplasmático (LI et al., 1993a e 1993b).

Os corpos protéicos podem ser seqüestrados em pró-vacúolos que eventualmente se fundem formando um ou mais de um grande vacúolo central contendo grande acúmulo de proteínas (LEVANONY et al. 1992; GALILI et al., 1993). Existem duas rotas em que os corpos protéicos seguem para vacúolos. Uma envolve o transporte de proteínas através do complexo de Golgi por meio de vesículas que podem ser seqüestradas em pró-vacúolos que se fundem formando um ou mais de um grande vacúolo central (SANDERFOOT E RAIKHEL, 1999). A outra pode ser particularmente alternativa para proteínas de reserva e ocorre por autofagia (ROBINSON et al., 1998). Autofagia é a rota primária pela qual células vegetais dispõem de constituintes citoplasmáticos e materiais internalizados do espaço extracelular por endossomos multivesiculares (revisado por HERMAN, 1994; ROBINSON et al., 1998). Em alguns vegetais, autofagia é também usada para acumular proteínas de reserva, não passando pelo mecanismo de etiquetamento mediado pelo Complexo de Golgi e pelo transporte para vacúolo (LEVANONY et al., 1992)

As principais proteínas de reserva da soja são  $\beta$ -conglícinina e glicínina que correspondem às globulinas 7 S e 11 S, respectivamente, e representam em torno de 70% do total de proteínas de reserva (DERBYSHIRE et al. 1976; SHEWRY et al., 1995). Os polipeptídios constituintes da glicínina e  $\beta$ -conglícinina diferem em seus conteúdos de metionina, sendo estes mais altos na fração 11 S que na fração 7 S (MOREIRA et al. 1979, COATES et al. 1985). Além disso, tanto a fração 7 S quanto a fração 11 S são constituídas de subunidade protéicas, os polipeptídicos, que também diferem em seus conteúdos de metionina (MEDEIROS, 1982; MOREIRA et al., 1979).  $\beta$ -conglícinina é uma proteína trimérica, composta por 3 subunidades,  $\beta'$  (76 kDa),  $\beta''$  (72 kDa) e  $\beta'''$  (53 kDa). Cada subunidade é processada durante a biossíntese por modificações co-traducionais e pós-traducionais (LADIN et al., 1987; UTSUMI, 1987). Todas subunidades de  $\beta$ -conglícinina são glicosiladas, e as subunidades  $\beta'$  e  $\beta''$  são processadas nas regiões amino-terminais (UTSUMI,

1987; DOYLE et al., 1986). Essas subunidades  $\alpha'$  e  $\alpha$  possuem dois e três resíduos de metionina, respectivamente, enquanto a subunidade  $\beta$  não possui esse aminoácido (COATES et al. 1985).

Glicinina é uma proteína hexamérica. Suas subunidades são compostas por polipeptídios ácidos (A1a, A1b, A2, A3, A4, A5) e básicos (B1a, B1b, B2, B3, B4) unidos por ligações dissulfídicas e não glicosilados. A homologia das seqüências entre subunidades de um mesmo grupo está em torno de 90%, mas quando membros de grupos diferentes são comparados, esta apresenta somente 50% de (NIELSEN, 1989).

### **2.3. Interação entre BiP e proteínas de reserva de sementes**

Existem diferentes classes de chaperones moleculares, incluindo as chaperoninas, as proteínas de choque térmico (Hsp) da família Hsp70 e Hsp110 e as Hsps de baixo peso molecular (BOSTON et al., 1996). A função essencial do chaperone molecular é prevenir a formação de estruturas incorretamente dobradas (HARTL, 1996). Como um membro da família Hsp70, a atividade chaperone de BiP tem sido elucidada em diversos sistemas (VITALE et al., 1993).

BiP transientemente liga-se a polipeptídios no lúmen do retículo endoplasmático e aumenta a eficiência de dobramento e montagem adequada de proteínas, desfavorecendo a formação de agregados irreversíveis dos intermediários da via de dobramento de proteínas no retículo endoplasmático (GETHING, 1999). BiP também exerce papel fundamental no reconhecimento de proteínas incorretamente dobradas e associa-se permanentemente a elas, formando complexos estáveis que serão reconhecidos pelo sistema proteolítico da célula (HURTLEY et al., 1989). É capaz de interagir mais extensivamente com esses polipeptídios defeituosos estruturalmente, exercendo um papel chave na sua retro-translocação para o citosol. Assim, BiP evita a agregação daquelas proteínas defeituosas no interior do retículo endoplasmático, provavelmente facilitando sua retro-translocação através de pequenos poros (NISHIKAWA et al., 2001), embora possa tornar-se parte de agregados estáveis quando a síntese massiva de proteínas maldobradas acontece (SPARVOLI et al., 2000).

A síntese de uma forma variante de uma proteína de reserva do tipo zeínas, no mutante *floury-2*, que contém uma seqüência sinal não-clivável, está associada com o aumento no acúmulo de BiP (BOSTON et al., 1991; Fontes et al., 1991). Uma vez que o transporte intracelular de proteínas depende da aquisição de estruturas terciárias e quaternárias corretas, BiP tem sido descrito como importante componente de função constitutiva do retículo endoplasmático (HURTLEY et al. 1989).

A associação de BiP com proteínas de reserva tem sido demonstrada *in vivo*. BiP associa-se transientemente com monômeros de faseolina (a proteína de reserva 7 S comum do feijão) de maneira sensível a ATP, mas não com os trímeros de faseolina que aguardam exportação do retículo endoplasmático (VITALE et al., 1995). Então, somente monômeros de faseolina servem como ligantes de BiP. Similarmente, faseolinas mutantes incapazes de se oligomerizarem em trímeros mostraram prolongada interação com BiP no retículo endoplasmático antes de serem degradadas pelo controle de qualidade (PEDRAZZINI et al., 1997; FRIGERIO et al., 2001b). Essa interação estável mostra que sítios de ligação a BiP, normalmente ocultos nos trímeros, encontravam-se expostos nos monômeros com dobramento defeituoso (OMBRETTA, 2003). Outras formas recém sintetizadas de proteínas de reserva de feijão são também encontradas em associação com BiP de modo dependente de ATP.

Prolaminas de arroz, como de milho, formam corpos protéicos que se acumulam no retículo endoplasmático. BiP associa-se com as prolaminas que emergem dentro do lúmen do retículo endoplasmático quando estas ainda encontram-se associadas aos ribossomos e quando estão na superfície dos corpos protéicos formados (LI, 1993; MUENCH et al., 1997). Somente quando os polipeptídios de prolaminas são totalmente incorporados em corpos protéicos é que seus sítios de ligação a BiP são cancelados. Em soja, a associação de BiP com  $\alpha$ -conglícinina e subsequente montagem do complexo trimérico das subunidades de  $\alpha$ -conglícinina ocorrem com alta eficiência (FONTES et al., 1996). Tem sido demonstrado que a oligomerização de glicininas *in vitro* é dependente de ATP e da presença de chaperones moleculares (NAM et al., 1997).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal

Para análise do acúmulo de BiP, foram utilizadas sementes das linhagens transgênicas de *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana homozigotas, expressando um gene BiP de soja nas orientações senso [T3-35S-BiPS7.2 (I, IV, VII), T3-35S-BiPS1.1 (II, VII)] e anti-senso [T3-35S-BiPAS3.2 (III)], bem como sementes controle de plantas não transformadas. Sementes da variedade CAC-1 de soja que apresentam teor protéico normal e sementes das isolinhas CC3 PTA 198 com teor protéico maior também foram usadas. Foram coletadas 5 amostras de cada variedade em cada estágio de desenvolvimento.. A coleta e a classificação das 5 amostras distintas foram feitas com base no peso da semente: até 75 mg, estágio 1; de 76 a 150 mg, estágio 2; de 151 a 225 mg, estágio 3; de 226 a 300 mg, estágio 4; de 301 a 375 mg, estágio 5; de 376 a 450 mg, estágio 6; e semente madura, estágio 7 (LANNA, 2002). Para a classificação, foi utilizada balança analítica. O material vegetal, depois de coletado e classificado foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em *freezer* a -80 °C até o processamento das amostras.

### 3.2. Expressão e purificação da proteína BiP recombinante

O clone pUFV 293, contendo a região codificadora de BiP em pET16b sob o controle do promotor da T<sub>7</sub> RNA polimerase, foi obtido previamente (BUZELI et al., 2002). A expressão da proteína BiP foi conduzida em *Escherichia coli* BL21(DE<sub>3</sub>), que contém um gene da T<sub>7</sub> RNA polimerase sob o controle do promotor *lac* (NOVAGEN). A indução da síntese das proteínas recombinantes com IPTG, em meio de cultura, foi conduzida conforme as recomendações do *pET System Manual* (NOVAGEN). Células de *Escherichia coli* expressando a proteína BiP inteira, pUFV 293, foram crescidas a 30 °C, em meio LB contendo ampicilina 50 µgL<sup>-1</sup>, até atingirem A<sub>600nm</sub> 0,6 a 0,8, quando foram submetidas à indução com IPTG 0,5 mM, por quatro horas. Como controle, foi utilizada a estirpe de *Escherichia coli* BL21(DE<sub>3</sub>) não transformada.

Para obtenção dos extratos de proteínas totais, solúveis e insolúveis, foram utilizados 5 mL de cultura das células. Destes, 1 mL foi centrifugado a 10000 x g por 1 min a 4 °C. O pélete foi ressuscitado em 100 µL de PBS (tampão fosfato salino), ao qual foram adicionados 100 µL de tampão da amostra-SDS 2X (LAEMMLI, 1970). Em seguida foi sonicado sob gelo em amplitude entre 60 e 80, Pulser (>6), por três vezes e correspondeu ao extrato contendo a proteína total. Os 4 mL de células previamente separados foram centrifugados a 6500 x g por 15 min a 4°C. O pélete foi ressuscitado em 500 µL de tampão de extração (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 2 mM) e incubado a 30 °C por 15 min, depois de adicionados 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> de lisozima Triton x-100 (0,1%) (v/v) seguindo-se ultrassonicação por três vezes e centrifugação a 12000 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante corresponde à fração solúvel. A fração insolúvel foi obtida ressuscitando-se o pélete em 100 µL de tampão da amostra SDS. Os três extratos foram utilizados como amostra para o desenvolvimento de SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970).

A purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade foi realizada seguindo-se basicamente as recomendações do fabricante (NOVAGEN). As células induzidas com IPTG (isopropil- -thiogalactopyranosídeo), a partir de 500 mL de cultura, foram coletadas por centrifugação a 5.000 x g, por 5 min, e ressuscitadas em 5 mL de tampão de ligação (Tris-HCl 40 mM, pH 7,9, Imidazol 5 mM, NaCl 0,5 mM) adicionado de

PMSF (fenilmetilsulfonilfluorido) 1 mM. As células foram rompidas mecanicamente por ultrassonicação em *Ultrasonic Homogenizer 4710 Series* (COLE PARMER), seguindo-se incubação no gelo por 1 h e centrifugação a 39.000 x g por 20 min. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 µm e aplicado em coluna de cromatografia contendo a resina *Chelating Sepharose* (*Pharmacia*) ativada por Ni<sup>++</sup>.

Para empacotamento da coluna cromatográfica, a resina *Chelating Sepharose* (*Pharmacia*), quelante de metais, foi homogeneizada por inversão e, em seguida, 3mL empacotada por gravidade em uma coluna de polipropileno (10 x 0,5 cm). Após a drenagem do etanol 20% (p/v), a resina foi lavada com 3 volumes de H<sub>2</sub>O deionizada e equilibrada com 5 volumes de tampão de troca (NiSO<sub>4</sub> 50 mM), seguido de 3 volumes de tampão de ligação (Tris-HCl 40 mM, pH 7,9, Imidazol 5 mM, NaCl 0,5 M, PMSF 0,5 mM). O extrato bruto de proteínas foi aplicado à coluna de *Chelating Sepharose*, equilibrada com o tampão de ligação, sob gravidade. A seguir, a coluna foi lavada com 10 volumes de tampão de ligação e 5 volumes de tampão de lavagem (Tris-HCl 40 mM, pH 7,9, Imidazol 60 mM, NaCl 0,5 M), antes da eluição da proteína com 6 volumes de tampão de eluição (Tris-HCl 20 mM, pH 7,9, Imidazol 1 M, NaCl 0,5 M), em frações de 1,5 mL. Frações contendo BiP foram analisadas por SDS-PAGE e *immunoblotting*. As frações com maior concentração de BiP foram reunidas e dialisadas contra o tampão Tris-acetato 20 mM, pH 7,5, NaCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, EDTA 0,1 mM e 2-mercaptoetanol 15 mM e, a seguir, quantificadas de acordo com o método de Bradford (1976). As frações enriquecidas para a proteína recombinante foram reunidas e mantidas a -80 °C.

### **3.3. Extração e quantificação de proteínas**

Para obtenção de extrato protéico das sementes de tabaco (senso, anti-senso e controle), aproximadamente 160 mg de sementes foram pulverizadas em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido e homogeneizadas em 1 mL de tampão de extração (NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 2,5 mM, uréia 6M, PMSF 1 mM e Tris HCl 0,1 M, pH 6,8), a 0 °C por no mínimo 1 h. Após o período de incubação, a fração insolúvel foi descartada por centrifugação a

20000 x *g* por 20 min, a 4 °C, e o sobrenadante coletado e acondicionado em *freezer* a -80 °C.

Proteínas totais também foram extraídas das sementes de grãos de soja da variedade CAC-1 (teor protéico normal) e da isolinha CC3 PTA198 (teor protéico superior). Para isso, as sementes de soja dessas variedades nos diferentes estádios de desenvolvimento foram maceradas em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido e com o tampão de extração (Tris HCl 50 mM pH 7,5 e PMSF 1 mM) na proporção 3:1. Em seguida, os restos celulares foram descartados por centrifugação, a 15.000 x *g* por 20 min, a 4 °C. A porção solúvel foi coletada e transferida para microtubos novos e o extrato protéico obtido foi então acondicionado a -80 °C.

Os extratos protéicos das sementes foram quantificados de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando-se BSA como padrão. O teor de proteína total das sementes também foi determinado pelo método Kjeldhal (*Assosiation of Official Analytical Chemistis -AOAC- 1975*), na base de base úmida, quantificando-se o nitrogênio total e multiplicando-se o valor obtido pelo fator 6,25 para conversão do teor de nitrogênio em teor de proteína. Foram analisadas três repetições para cada amostra das sementes de tabaco e três repetições das sementes de soja em cada estágio de desenvolvimento.

### **3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida e *immunoblotting***

Os extratos protéicos das sementes de soja e tabaco foram analisados por SDS-PAGE (gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato) com concentração de acrilamida + bis 10% (p/v) como descrito por Laemmli (1970). A eletroforese foi conduzida por aproximadamente 1,5 h a 100 V, no tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM, EDTA 1 mM e SDS 3,5 mM). Após este procedimento, os géis foram revelados em solução corante [metanol 45%(v/v), etanol 9% (v/v) e *coomassie brilliant blue* R250 0,01% (p/v)], por 2 h e, em seguida, descorados em solução descorante [metanol 25% (v/v) e ácido acético glacial 7,5% (v/v)].

Quantidades iguais de proteínas totais (30 µg) para os extratos de sementes e diferentes da proteína BiP purificada (25 ng e 100 ng) foram aplicadas em gel SDS-PAGE. 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 (1 h a 350 mA), as membranas de nitrocelulose foram incubadas com o reagente de bloqueio *Blotting Grade Blocker, Non-Fat Dry Milk* (BIORAD) por no mínimo 1 h à temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas com TBS-T [Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, NaCl 0,015 mM, Tween-20 0,1% (v/v)] três vezes, por 15 min cada lavagem. Para imunodeteção de BiP, foi utilizado um anticorpo policlonal contra BiP em diluição de 1:1.000. Como segundo anticorpo foi utilizado o comercial de cabra contra IgG conjugada com a fosfatase alcalina (SIGMA), em diluição de 1:5.000. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada utilizando-se os substratos NBT (azul-nitro tetrazolio) e BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) da SIGMA.

### **3.5. Quantificação da proteína BiP em sementes**

A concentração da proteína BiP nas sementes transgênicas das linhagens de tabaco [(T3-35S-BiPS7.2 (I, IV, VII), T3-35S-BiPS1.1 (II, VII) e T3-35S-BiPAS3.2 (III))] e controle (não transformada), bem como das sementes de soja CAC-1 e CC3, nos diferentes estádios de desenvolvimento, foi determinada por densitometria por meio dos *immunoblottings* realizados. A análise densitométrica, realizada em um densitômetro da *Molecular Dynamics* (modelo 445-P90) forneceu o valor da área de cada banda na membrana por meio do programa *Image Quant*, tomando como padrões de concentração conhecida a proteína BiP purificada, nas quantidades de 25  $\eta$ g e 100  $\eta$ g.

### **3.6. Análise estatística**

Os resultados obtidos foram submetidos à ANOVA, seguida do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

### 3.7. Clonagem da seqüência que codifica a subunidade $\alpha$ de $\beta$ -conglucina em pBSII-KS

O cDNA que codifica a subunidade  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina (aproximadamente 1800 pb) foi isolado de uma biblioteca de expressão de soja e designado clone 2soy ou pUFV 532. As células de *Escherichia coli* competentes, estirpe JM 109, foram preparadas de acordo com Sambrook et al. (1989) e transformadas com o DNA recombinante pUFV 532. Para seleção dos transformantes, as células competentes foram crescidas em placas contendo meio LB (sólido) e ampicilina 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . O DNA plasmidial, isolado de bactérias transformadas, foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *SalI* e separado por eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação do clone de interesse. As colônias recombinantes foram armazenadas em glicerol 40% a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para serem usadas como molde em reações de PCR (reação de polimerização em cadeia) com *primers* específicos.

### 3.8. Clonagem da subunidade $\alpha$ de $\beta$ -conglucina em pAD-GAL4 sob controle do domínio de ativação de GAL4

A região codificadora da subunidade alfa de  $\beta$ -conglucina foi amplificada por PCR, utilizando o DNA recombinante pUFV 532 como molde, oligonucleotídeos específicos e Pfu DNA polimerase (Stratagene). Os oligonucleotídeos específicos foram desenhados de forma a criar sítios únicos para as enzimas de restrição *SalI* e *PstI*. O *primer forward* ConSL87F cria um sítio *SalI* (em destaque) na posição 87 5'CTGTTGCTGGG**TCGACT**TTTTCCTGGCT e o *primer reverse* ConPsR 5'AGCATCAT**CTGCAG**TCGANTTT gera um sítio de *PstI* (em destaque) após o *stop codon*. A reação de amplificação foi conduzida em um termociclador MJ RESEARCH Peltier Thermal Cycler PTC 2000. Após a reação, o fragmento amplificado foi dessalinizado, digerido com as enzimas *SalI* and *PstI* e inserido em pAD-GAL4 (Stratagene), previamente digerido com as mesmas enzimas e defosforilado de acordo com técnicas-padrão de clonagem molecular em plasmídeo (SAMBROOK et al., 1989). Esse clone resultante da clonagem da

subunidade  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina pAD-GAL4, fusionada em *frame* com o domínio de ativação de GAL4, foi denominado pUFV 560.

### 3.9. Clonagem de BiP em pBD-GAL4

O fragmento de DNA que codifica a proteína BiP (aproximadamente 2000 pb), designado SoyBiPD (acesso no *genebank* número AF031241) foi amplificado por PCR, utilizando Pfu DNA polimerase (Stratagene) e os *primers* FNBiPSMA30 (GGCTGGCTCCCGGGCACGCCGTTC, sítio *SmaI* sublinhado) e RCBiPsT2090 (AAAAGCAAGCTGCAGGGGACTTCTTA). A reação de amplificação foi conduzida em um termociclador MJ RESEARCH Peltier Thermal Cycler PTC 2000. Os produtos das amplificações foram dessalinizados e inseridos ao vetor de clonagem pBD-GAL4, previamente digerido com a enzima de restrição *SmaI* e defosforilado de acordo com técnicas-padrão de clonagem molecular em plasmídeo (SAMBROOK et al.; 1989), resultando no clone pUFV 324.

### 3.10. Propagação em *Saccharomyces cerevisiae* YR2, estirpe YRG-2

Os clones pUFV 560, contendo a seqüência da subunidade de  $\beta$ -conglucina fusionada ao domínio de ativação de GAL4, e o clone pUFV 324, contendo a seqüência completa de BiP fusionada ao domínio de ligação de GAL4, foram utilizados para transformação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, estirpe YRG-2. Essa estirpe possui um duplo sistema de seleção com os genes repórteres *lacZ* e *HIS3* para detecção das interações proteína-proteína *in vivo*. Os marcadores auxotróficos leucina e triptofano indentificam leveduras transformadas com plasmídeos nos domínios AD e BD, respectivamente. E o marcador auxotrófico histidina indentifica a interação entre as proteínas fusionadas aos domínios de GAL4, enquanto o nível de expressão do gene *lacZ* permite quantificar essa interação.

Aproximadamente 200  $\mu$ L de uma suspensão de células competentes foram transformadas com 100 ng do plasmídeo em 800  $\mu$ L de polietilenoglicol 40% (v/v), acetato de lítio 1M e 100  $\mu$ L de ssDNA (DNA de esperma de salmão) na concentração 2.0 mg/ml. A mistura foi incubada a 30 °C por 30 min e,

posteriormente, a 42 °C por 8 min 42°C. A seguir foi mantida no gelo por 8 min e novamente incubadas a 42 °C por 8 min. Foram adicionados 10 mL de meio SD (meio para levedura sem dextrose e aminoácido) seletivo para cada transformação. As células em suspensão foram mantidas a 30 °C por 1 h, sob agitação. Essa suspensão celular foi concentrada por centrifugação, ressuspendida em 500 µL de meio SD (6,7% de meio para leveduras sem dextrose e sem aminoácido – YNB, BIO) e plaqueada em meio seletivo SD sem o aminoácido triptofano para o clone pUFV 324 e sem o aminoácido leucina para o clone pUFV 560.

As células de leveduras co-transformadas foram plaqueadas em meio SD sem leucina e triptofano e em meio SD sem leucina, triptofano e histidina, para avaliar a capacidade de ativação do gene repórter histidina. A interação entre as proteínas foi confirmada por meio de avaliação quantitativa da atividade da enzima β-galactosidase utilizando o-nitrofenol β-D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato, conforme descrito por Uhrig et al., 1999. Nesse ensaio, células transformadas com a construção apropriada foram crescidas em meio líquido seletivo durante 24 h, e as absorvâncias ( $A_{600}$ ) foram ajustadas para 1,0 em 100 µL do tampão Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  60 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  40 mM, pH 7,0, KCl 10 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 mM). Em seguida, a suspensão celular foi rompida em nitrogênio líquido. Foram adicionados às amostras 700 µL de tampão Z com β-mercaptoetanol e 160 µL de uma solução de o-nitrofenol β-D-galactopiranosídeo 14,6 mM diluído em tampão Z. As amostras foram incubadas a 30 °C até que houvesse o aparecimento da cor amarela, resultado da atividade da enzima β-galactosidase, e, em seguida, a reação foi bloqueada usando 400 µL de uma solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M e, então determinada a atividade enzimática.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Indução e purificação da proteína BiP

A proteína BiP, em condições normais de crescimento, é sintetizada intracelularmente em baixos níveis (GETHING, et al., 1992). No entanto, o sistema de expressão de proteínas em bactéria constitui ferramenta eficiente na produção de proteínas de interesse em quantidades elevadas, o que facilita sua purificação a partir de extrato protéico bacteriano.

A síntese de proteínas recombinantes foi conduzida em *Escherichia coli*, estirpe BL21(DE<sub>3</sub>), que possui um gene da T7 RNA polimerase sob controle do promotor *lac*. Na presença de IPTG, as bactérias transformadas com o DNA recombinante pUFV 293 sintetizaram eficientemente a proteína recombinante BiP na fração solúvel (Figura 1A, linhas 3, 6 e 9). A síntese da proteína BiP foi inicialmente avaliada com base na sua mobilidade eletroforética e na indução com IPTG em comparação com o extrato protéico da bactéria não transformada (Figura 1A, linhas 1, 4 e 7) e com o extrato da bactéria transformada não induzida (Figura 1A, linhas 2, 5 e 6). A proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade a partir de extrato bacteriano (Figura 1B), tendo sido eficientemente retida em resinas de Ni<sup>++</sup>, pela presença da seqüência de histidinas na região amino-terminal, e reconhecida de modo específico pelo anticorpo anti-BiP. Nas frações mais concentradas, observou-se a presença de proteínas de menores pesos moleculares, reconhecidas pelo

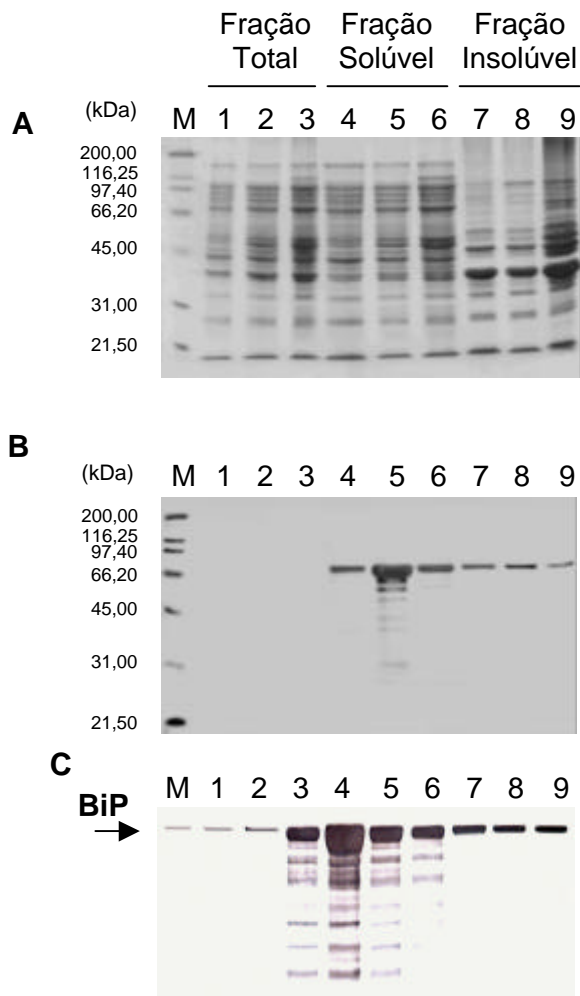


Figura 1 – Purificação de BiP recombinante. A expressão da proteína recombinante BiP em bactérias BL21 transformadas com o clone pUFV 293 foi induzida com IPTG 0,5 mmol/L. Extratos protéicos foram analisados por SDS-PAGE e a proteína recombinante purificada por cromatografia de afinidade.

**A.** SDS-PAGE de extrato protéicos de bactéria. Extratos protéicos das frações solúvel, insolúvel e total de BL21(DE<sub>3</sub>) (linhas 1, 4 e 7), de BL21(DE<sub>3</sub>) transformada com pUFV 293, sem induzir (linhas 2, 5 e 8) e induzida com IPTG (linhas 3, 6 e 9) foram analisados por SDS-PAGE e corados com *Coomassie Brilliant Blue* R-250.

**B.** Purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade. Após fracionamento da proteína BiP por cromatografia de afinidade, as frações eluídas foram resolvidas (24µL de cada fração) em SDS-PAGE e coradas com *Coomassie Brilliant Blue* R-250.

**C.** "Immunoblotting" das frações eluídas. As frações eluídas, como apresentadas em B, foram transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas com anti-BiP.

anticorpo de BiP, e que devem corresponder a produtos de degradação específica dessa proteína e não a contaminantes de purificação. A concentração média obtida de BiP foi  $0,09 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ .

#### **4.2. Determinação da concentração de proteína nas sementes de soja em diferentes estádios de desenvolvimento**

A biossíntese e o acúmulo das proteínas de reserva em soja ocorre após divisão celular completa (THOMAS, 1993; NIELSEN, et al., 1997; SHEWRY E TATHAN, 1998; MARTY, 1999) e, assim como as proteínas de reserva do trigo, dependem da atividade de várias outras proteínas, incluindo chaperones, para o correto processamento no retículo endoplasmático (DUPONT et al., 1998). Com a finalidade de avaliar a correlação entre o acúmulo de BiP e o teor protéico das sementes, foram utilizadas sementes de dois diferentes materiais genéticos, CAC-1 e CC3, que diferem unicamente no teor de proteínas (LANNA, 2002). O teor de proteína total das sementes CAC-1 e CC3 foi determinado em todos os seus estádios de desenvolvimento (Figura 2). As sementes de soja CC3 apresentaram concentração protéica mais elevada do que as CAC-1 em todos os estádios de desenvolvimento, atingindo CC3o teor máximo de 38% e CAC-1 32%, com a maturação da semente, na base úmida.

#### **4.3. Acúmulo temporal de BiP nos diferentes estádios de desenvolvimento de sementes**

BiP é um membro da família das proteínas denominadas HSP70 e, como chaperone molecular, pode ser requisitado para dobramento e montagem de proteínas recém-sintetizadas assim que transportadas para o lúmen do retículo endoplasmático (NORMINGTON et al., 1989; VITALE et al, 1993; OKITA E ROGERS, 1996). Previamente foi demonstrado que o teor de BiP está correlacionado com a concentração de proteína total acumulada em diferentes variedades de soja (CAROLINO, 1997). Além disso, foi demonstrado que o acúmulo de BiP ocorre predominantemente nos estádios de desenvolvimento em que a eficiência da síntese protéica é máxima. Coerente com esses dados, o acúmulo temporal de BiP observado nas sementes de soja

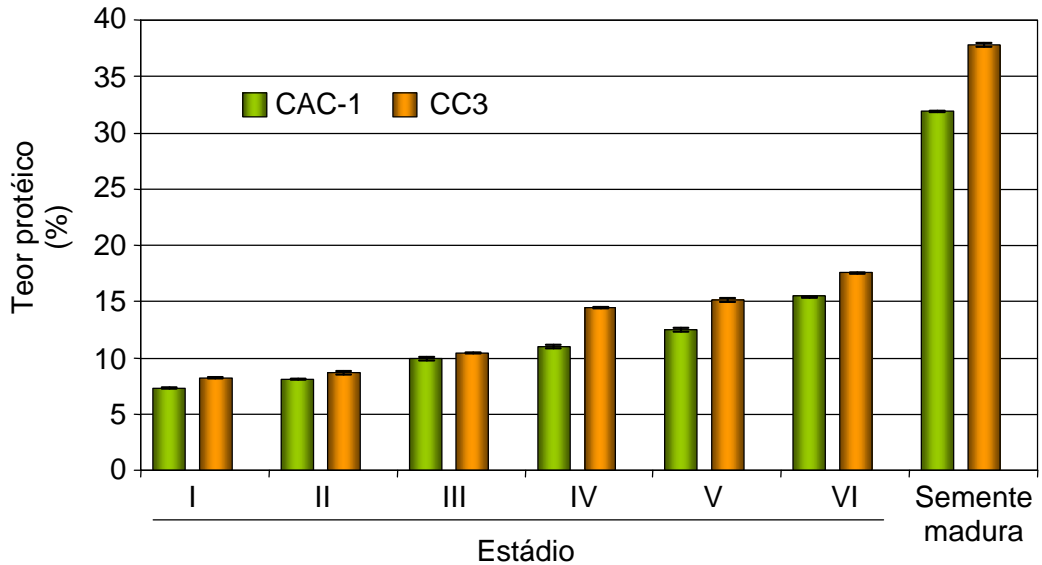


Figura 2 – Acúmulo de proteína em sementes de soja na base úmida. Proteína total das sementes de soja na base úmida foi determinada em diferentes estádios de desenvolvimento da semente de dois diferentes materiais genéticos, CAC-1 e CC3, por meio do método Kjeldhal. Os números indicam os estádios de desenvolvimento: 1º estágio (I), 2º estágio (II), 3º estágio (III), 4º estágio (IV), 5º estágio (V), 6º estágio (VI) e semente madura (VII).

CAC-1 e CC3 foi coordenado com o acúmulo de proteínas de reserva nos diferentes estádios de desenvolvimento (Figura 3). De fato, na variedade CAC-1, BiP acumulou-se predominantemente nos estádios iniciais de desenvolvimento da semente, que coincidem com a síntese ativa de proteínas de reserva (NAITO et al.,1988), decaindo nos estádios mais avançados até a maturação da semente. O perfil eletroforético obtido para o extrato protéico das sementes CAC-1 possibilitou verificar a integridade das proteínas (Figura 3A). O padrão de acúmulo de BiP durante o desenvolvimento das sementes CC3 foi similar ao observado nas sementes CAC-1, acumulando-se mais acentuadamente nos estádios iniciais de desenvolvimento (Figura 3D). Esses resultados justificam o modelo proposto de que BiP associa-se com polipeptídios para facilitar seu dobramento e montagem em corpos protéicos.

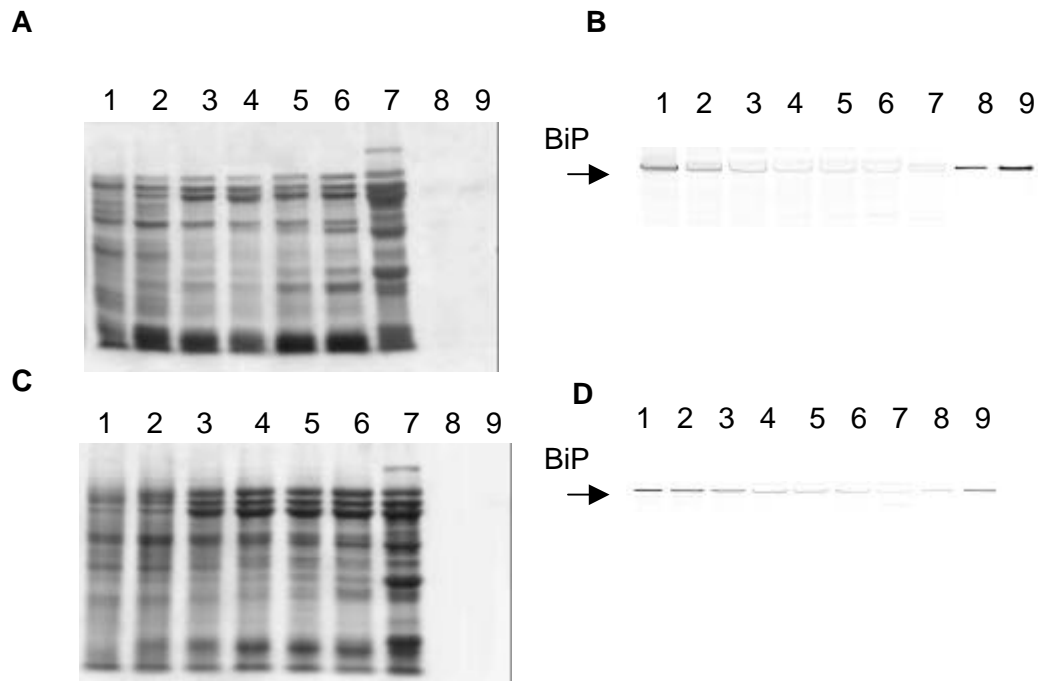


Figura 3 – Acúmulo temporal de BiP nas sementes de soja. **A.** SDS-PAGE dos extratos protéicos de CAC-1. Quantidades idênticas dos extratos de proteínas solúveis das sementes de soja CAC-1 em diferentes estádios de desenvolvimento foram fracionadas por eletroforese (SDS-PAGE), e as proteínas, coradas com *Coomassie blue*. Os números indicam os estádios de desenvolvimento: 1<sup>o</sup> estádio (1), 2<sup>o</sup> estádio (2), 3<sup>o</sup> estádio (3), 4<sup>o</sup> estádio (4), 5<sup>o</sup> estádio (5), 6<sup>o</sup> estádio (6), semente madura (7), e também BiP 25  $\eta$ g (8) e BiP 100  $\eta$ g (9). **B.** *Immunoblotting* dos extratos protéicos de CAC-1. Quantidades idênticas do extrato protéico (30  $\mu$ g) das sementes de soja CAC-1, após resolução em SDS-PAGE, foram transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas com anticorpo contra BiP. A ordem de aplicação do extrato protéico é a mesma apresentada em A. **C.** SDS-PAGE dos extratos protéicos de CC3. Quantidades idênticas dos extratos de proteínas solúveis das sementes de soja CC3 em diferentes estádios de desenvolvimento foram fracionadas por eletroforese (SDS-PAGE) e as proteínas coradas com *Coomassie blue*. Os números indicam, como em A, os estádios de desenvolvimento. **D.** *Immunoblotting* dos extratos protéicos de CC3. Quantidades idênticas do extrato protéico (30  $\mu$ g) das sementes de soja CC3, após resolução em SDS-PAGE, foram transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas com anti- BiP. O ordem de aplicação do extrato protéico é a mesma em C.

#### 4.4. Relação entre as concentrações da proteína BiP e de proteínas de reserva de sementes de soja

A concentração da proteína BiP foi determinada por densitometria nos diferentes estádios de desenvolvimento das sementes de soja (Figura 4). Essa análise confirmou que o teor específico de BiP na linhagem CC3, que possui teor superior de proteína total, foi significativamente maior do que nas sementes CAC-1, em todos os estádios de desenvolvimento. Tanto as sementes CC3 quanto as sementes CAC-1 acumulam elevados níveis de BiP nos estádios de desenvolvimento 1 e 2, não havendo diferença significativa entre eles. Entretanto, a partir do estágio 3, ocorre uma redução significativa no acúmulo de BiP com o desenvolvimento da semente. Esses resultados confirmam que o acúmulo de BiP está temporalmente coordenado com a síntese de proteínas de reserva, conforme observado anteriormente (FONTES et al., 1996).

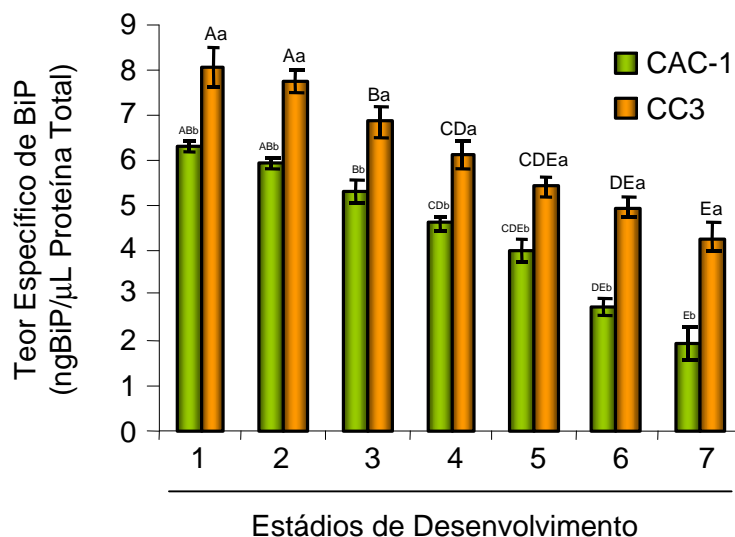


Figura 4 – Teor específico de BiP nas sementes de soja. Quantificação do teor de BiP por densitometria por meio do programa *Image Quant*, nos diferentes estádios de desenvolvimento das sementes de soja CAC-1 e CC3 (teor protéico absoluto mais elevado) a partir dos *immunoblottings* em que o acúmulo temporal de BiP foi analisado (Figura 3). Médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula dentro da linhagem e minúscula entre linhagens não diferem entre si pelo teste de TUKEY, a 5% de probabilidade.

#### 4.5. Interação entre BiP e proteína de reserva

Uma vez verificada por Carolino (1997) a correlação positiva entre o acúmulo de BiP e o teor de proteínas de reserva nas sementes, a associação entre BiP e a subunidade  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina foi funcionalmente avaliada pelo sistema duplo-híbrido.

Para examinar a capacidade de interação entre as proteínas BiP e a proteína  $\beta$ -conglucina, células de leveduras foram co-transformadas com essas proteínas fusionadas nos domínios de ligação e de ativação, respectivamente, e, transformadas com as proteínas isoladamente. O plasmídeo recombinante pBD-BiP foi mantido em levedura, usando o meio seletivo na ausência do aminoácido triptofano, enquanto o plasmídeo pAD- $\beta$ -conglucina foi propagado em levedura na ausência de leucina (Figura 5A). As células de leveduras co-transformadas com pBD-BiP e pAD- $\beta$ -conglucina cresceram na ausência de histidina, confirmando que as referidas proteínas interagem e promovem a indução do gene repórter *HIS3* (Figura 5A) e do promotor *lacZ* (Figura 5B), ambos sob o controle de GAL4. O valor elevado da atividade de  $\beta$ -galactosidase nos extratos de leveduras co-transformadas com as proteínas quiméricas confirmou a natureza eficiente da interação entre BiP e a subunidade  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina.

Esses resultados demonstraram que BiP interage com a proteína de reserva  $\beta$ -conglucina em leveduras. A interação entre BiP e essas proteínas já foi previamente demonstrada em ensaios de co-imunoprecipitação, a partir de extratos de semente (FONTES, 1996). Nesses ensaios foi demonstrado que a associação entre BiP e  $\beta$ -conglucina, sensível a ATP, é um dos aspectos bioquímicos de associações funcionais mediadas por chaperones moleculares. Claramente, esses resultados indicam que BiP associa-se com proteínas de reserva de soja e, provavelmente, facilita o enovelamento dessas proteínas no retículo endoplasmático.

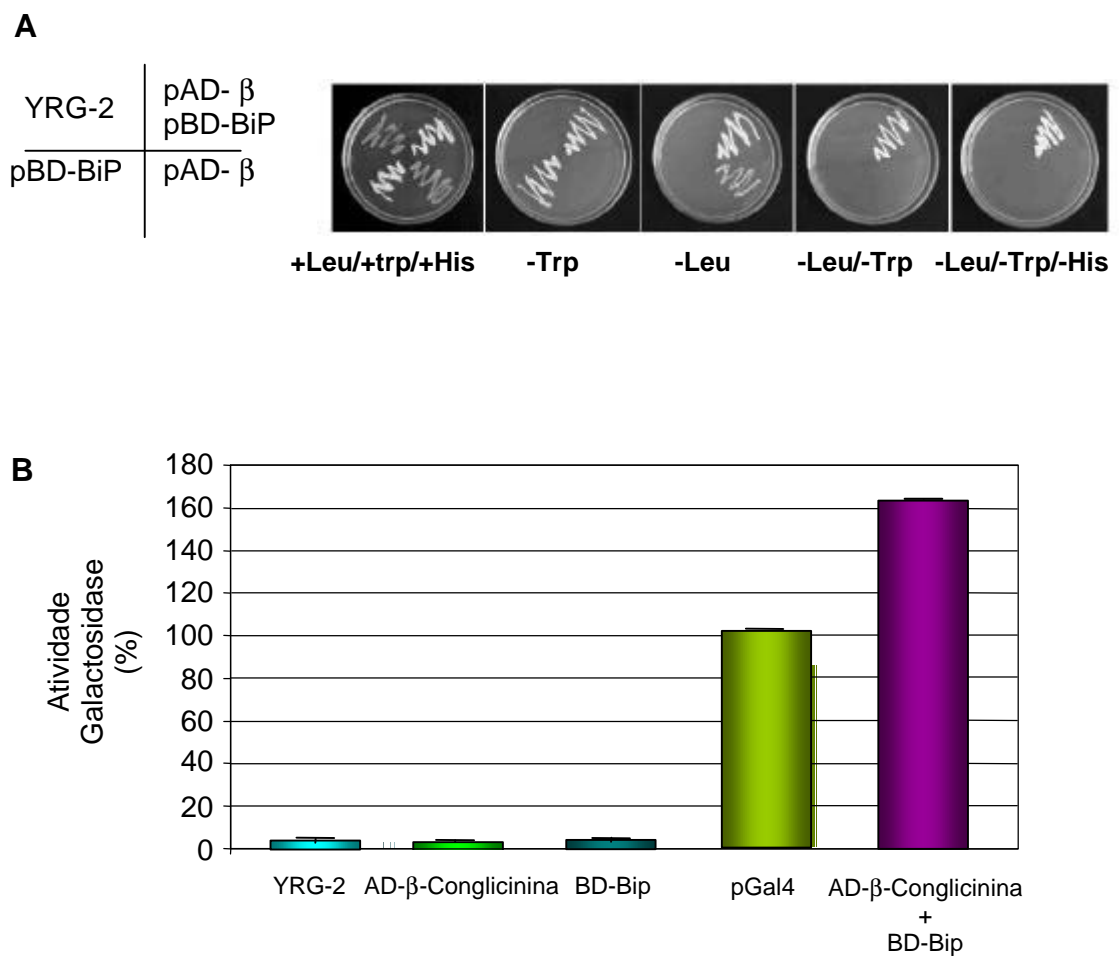


Figura 5 – Interação entre as proteínas BiP e  $\beta$ -conglucina. **A.** Fenótipo dos clones de interação obtidos em *Saccharomyces cerevisiae*, estirpe YRG-2. Células de *Saccharomyces cerevisiae*, estirpe YRG-2, expressando as proteínas recombinantes indicadas (isoladas ou em pares) foram inoculadas por 2 dias em meio seletivo desprovido dos aminoácidos indicados. **B.** Avaliação quantitativa da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase. Após os clones terem crescido em meio líquido seletivo a 28 °C, a atividade enzimática foi quantificada, utilizando-se o o-nitrofenol- $\beta$ -D-galactopiranosídeo como substrato para a enzima  $\beta$ -galactosidase.

#### 4.6. Análise da Expressão de BiP em sementes de *Nicotiana tabacum* transgênicas

Tendo-se estabelecido que o acúmulo de BiP está coordenado com o acúmulo de proteínas na semente de soja, bem como que BiP interage com proteínas de reserva, foi avaliado se o aumento intencional de BiP acarretaria aumento do teor protéico das sementes de *Nicotiana tabacum*. Essa hipótese foi levantada porque as sementes de vegetais sintetizam predominantemente proteínas de reserva que são co-traducionalmente processadas no retículo endoplasmático.

Para essa análise, foram utilizadas sementes transgênicas de *Nicotiana tabacum* em homozigose, superexpressando BiP (geração T3). As plantas de *Nicotiana tabacum* foram transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* com o cDNA do gene BiP, nas orientações senso e anti-senso, sob o controle do promotor CAMV-35S e o sinal de poliadenilação 3' do gene da nopalina sintetase (*nos*) (Figura 6). Os transformantes primários (T0) foram selecionados *in vitro* em função da resistência à canamicina e, posteriormente, tiveram a incorporação do gene *nptII* testada por meio de PCR e *Southern blots* (ALVIM et al., 2001). Sementes T3 provenientes de plantas T2 selecionadas foram submetidas à análise de segregação para o gene *nptII* (VAEZ, 2003). Sementes das plantas individuais da linhagem T3-35S-BiPS7.2 em homozigose (I, IV, VII), da linhagem T3-35S-BiPS1.1 (II, VII) e da linhagem T3-35S-BiPAS3.2 (III) foram escolhidas para análises da expressão da proteína BiP.

Os extratos protéicos obtidos de sementes transgênicas de tabaco foram quantificados, e a integridade das proteínas avaliada por SDS-PAGE (Figura 7A). Os níveis da proteína BiP nas sementes senso T3-35S-BiPS7.2 e T3-35S-BiPS1.1 foram superiores aos observados nas sementes controle, não transformadas (Figura 7B). Esses resultados são consequência do nível de expressão da proteína BiP obtido em extratos protéicos de folhas de plantas transgênicas senso da linhagem T3-35S-BiPS7.2 (VAEZ, 2003). Em contraste, o nível de expressão de BiP observado nas sementes anti-senso foi inferior ao nível de BiP nas sementes controle.

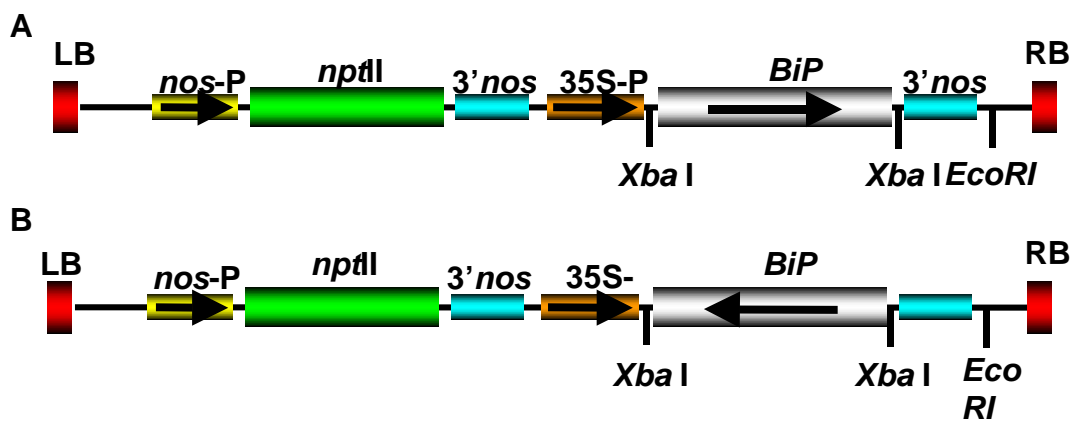


Figura 6 – Diagrama esquemático das construções quiméricas de BiP usadas para a transformação de *Nicotiana tabacum*. O gene de BiP da soja, nas orientações senso (A) e anti-senso (B), estão sob controle do promotor constitutivo CAMV 35S (35S-P) e do sinal de poliadenilação 3' nos (3'nos). A expressão do gene *nptII* é dirigida pelo promotor *nos* (nos-P). LB e RB correspondem às bordas esquerda e direita do T-DNA, respectivamente. As posições de alguns sítios de enzimas de restrição estão indicadas.

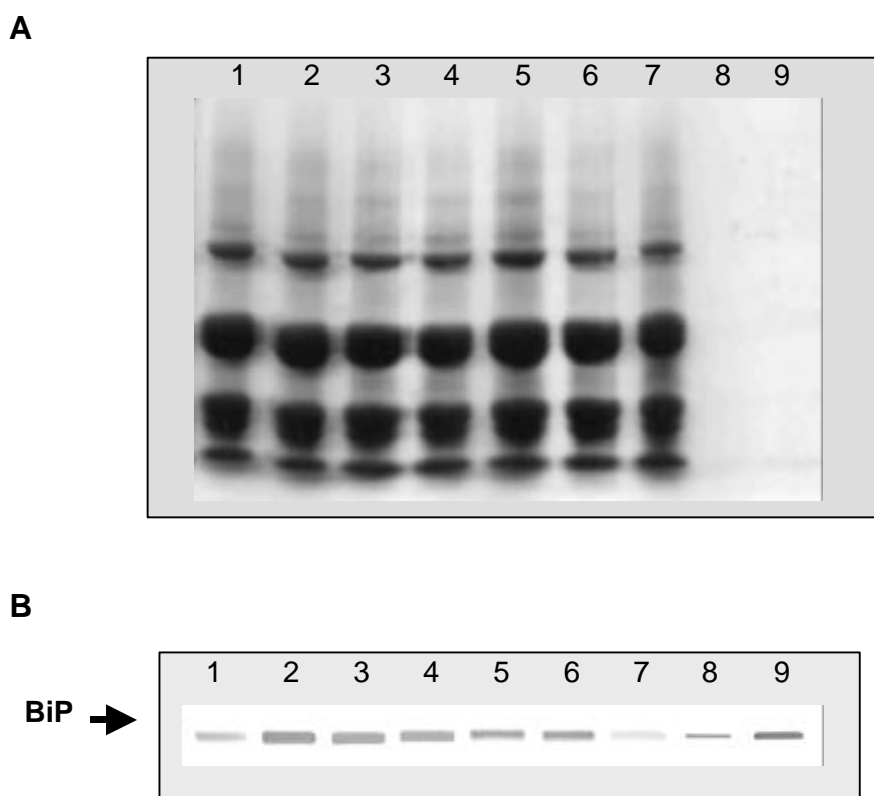


Figura 7 – Análise da expressão de BiP em sementes de *Nicotiana tabacum* transgênicas. **A-** SDS-PAGE do extrato protéico das sementes de *Nicotiana tabacum*. Quantidades iguais (30  $\mu$ g) de proteínas totais solúveis das sementes transgênicas homozigotas (geração T4), BiP senso (S) e anti-senso (AS), e controle (sementes não transformadas) foram resolvidas em SDS-PAGE e coradas em *Coomassie blue*. Os números referem-se aos respectivos extratos protéicos: controle (1), S7.2 I (2), S7.2 IV (3), S 7.2 VII (4), S1.1 II (5), S1.1 VII (6), AS 3.2 (7), BiP 25  $\eta$ g (8), BiP 100  $\eta$ g (9). **B-** *Immunoblotting* do extrato protéico das sementes de *Nicotiana tabacum*. Quantidades iguais (30  $\mu$ g) de proteínas totais solúveis foram fracionadas em SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas com anticorpo policlonal anti-BiP. Os números referem-se, como em A, aos extratos protéicos aplicados.

A concentração da proteína BiP determinada por densitometria foi similar aos níveis de expressão observados. Os níveis de BiP nas sementes de *Nicotiana tabacum* senso T3-35S-BiPS7.2 e T3-35S-BiPS1.1 foram, respectivamente, 2 e 1,27 vezes superior aos das sementes controle (Figura 8).

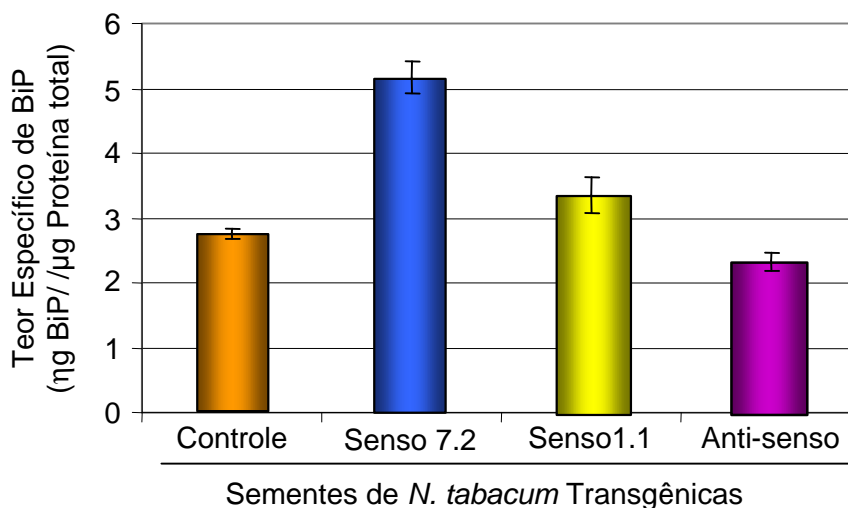


Figura 8 – Concentração de BiP nas sementes transgênicas de *Nicotiana tabacum*. Quantificação do teor de BiP por densitometria utilizando o programa Image Quant a partir dos *immunoblottings* em que a expressão de BiP nas sementes de *Nicotiana tabacum* foi analisada (Figura 7).

#### 4.7. Determinação do teor protéico das sementes de *Nicotiana tabacum* transgênicas

Em virtude da superexpressão de BiP nas sementes senso, foi determinado o teor de proteína total das sementes de *Nicotiana tabacum* previamente selecionadas para análise. Ao contrário do esperado, as sementes senso apresentaram teor protéico inferior (Figura 9) às sementes controle. Esse resultado pode ter sido alcançado em decorrência do modelo usado para análise, uma vez que o teor protéico médio das sementes de tabaco é muito inferior ao teor das sementes de soja e, provavelmente, a capacidade de processamento do retículo endoplasmático na semente de tabaco não constitui fator limitante na biogênese de corpos protéicos.

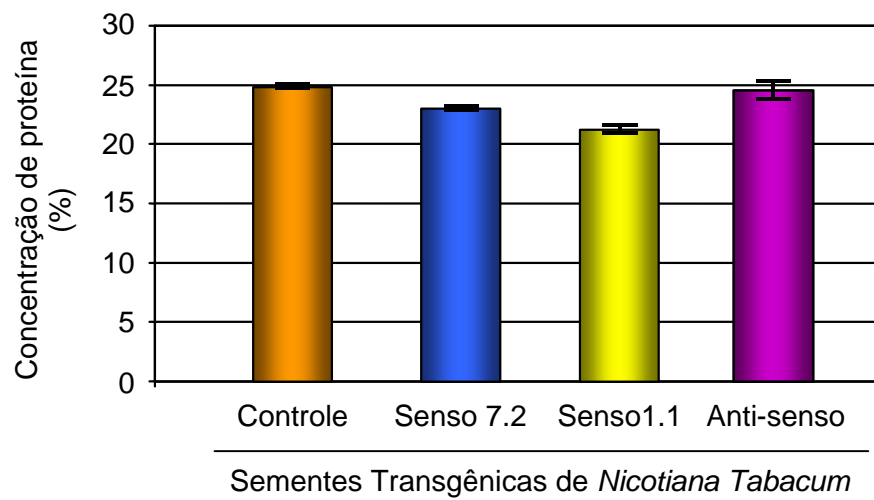


Figura 9 – Teor de proteína total nas sementes transgênicas de *Nicotiana tabacum*. O teor protéico total das sementes transgênicas senso e anti-senso em homozigose de *Nicotiana tabacum*, e de sementes controle (não transformada) foi determinado por meio do método Kjeldahl.

## 5. DICUSSÕES E CONCLUSÕES

As proteínas armazenadas em sementes e tecidos vegetativos correspondem à maior fonte de proteínas consumidas na alimentação humana e de animais. Sendo assim, é natural que existam os interesses econômico e nutricional na obtenção de grãos com maior teor protéico. Em sementes, as proteínas de reserva se acumulam predominantemente em vacúolos de corpos protéicos de células diferenciadas do embrião e do endosperma e em corpos protéicos diretamente originados do retículo endoplasmático (HERMAN, 1999). Em qualquer situação, a biogênese dos corpos protéicos inicia-se a partir da síntese das proteínas de reserva no retículo endoplasmático rugoso. Tão logo as proteínas de reserva alcancem o lúmen dessa organela, elas sofrem uma série de processamentos pós-traducionais, incluindo o enovelamento e a oligomerização dos polipeptídeos recém-sintetizados, em um processo facilitado por chaperones moleculares (YANJUN et al., 2003).

Uma série de evidências, na literatura, indicam que o chaperone molecular BiP está diretamente envolvido nesse processo (CAROLINO et al., 2003). Consistente com esta hipótese, foi demonstrado, nesta investigação, que o teor de BiP está diretamente correlacionado com o teor de proteínas em sementes de soja. Além disso, foi demonstrado que a síntese de BiP é temporalmente coordenada com a síntese de proteínas de reserva nas sementes e que BiP interage com a subunidade de  $\beta$ -glicinina de soja, com

propriedades bioquímicas características de interações funcionais mediadas por chaperones moleculares.

A fim de avaliar quantitativamente a correlação entre teores de BiP e proteínas de reserva de sementes, foram selecionadas as variedades de soja CC3 e CAC1 que apresentaram os teores protéicos de 38% e 32%, respectivamente, em suas sementes maduras. Em todos os estádios de desenvolvimento dos grãos avaliados, os teores de BiP foram superiores na variedade CC3, demonstrando haver uma oscilação coordenada entre os níveis de proteínas e BiP durante o desenvolvimento da semente. A formação de oligômeros da glicinina 11 S de soja *in vitro* requer a presença de ATP e de chaperones moleculares (NAM et al., 1997).

Também tem sido demonstrado, em extratos de sementes de soja, que as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  de  $\beta$ -conglucina interagem com BiP de uma maneira dependente de ATP, o que caracteriza as associações funcionais mediadas por chaperones moleculares (FONTES et al., 1996). Coletivamente, esses resultados suportam o argumento de que a concentração de BiP está diretamente relacionada com a capacidade de processamento de proteínas de reserva no retículo endoplasmático e, conseqüentemente, com o teor de proteínas na semente. De fato, tem sido demonstrado que a concentração de BiP livre no retículo endoplasmático coordena a taxa de tradução e a capacidade de processamento dessa organela. Em células de mamíferos, alterações na disponibilidade de BiP afetam a iniciação de tradução e o grau de fosforização de eIF-2 (MORRIS et al., 1997; LAITUSIS et al., 1999). Similarmente, em protoplastos de tabaco (LEBORGNE-CASTEL et al., 1999) e em tabaco transgênico (Alvim et al., 2001), a superexpressão de BiP confere tolerância à inibição de tradução causada por agentes que provocam estresses no retículo endoplasmático, como os inibidores de glicosilação.

Tanto na variedade CC3 quanto na variedade CAC-1, BiP acumula-se predominantemente nos primeiros estádios de desenvolvimento da semente, que coincidem com a síntese ativa de proteínas de reserva (NAITO et al., 1988). Consistente com estes resultados, tem sido demonstrado que a expressão dos genes BiP é regulada por eventos de desenvolvimento associados com alta atividade secretora das células (KALINSKI et al., 1995; FONTES et al., 1996, FIGUEIREDO et al., 1997, BUZELI et al., 2002).

Similarmente, em endosperma de milho (BOSTON et al., 1991; FONTES et al., 1991) e em cotilédones de abóbora (HATANO et al., 1997), foi demonstrado que a síntese de BiP está coordenada com o processo de síntese ativa de proteínas de reserva. Coletivamente, essas observações correlacionam a alta atividade secretora de células do endosperma e de cotilédones durante a biogênese de corpos protéicos com a concentração de BiP. Além disso, sugerem que de fato BiP participa diretamente no enovelamento e na oligomerização de proteínas de reserva no retículo endoplasmático. Como corolário dessa hipótese, foi demonstrado aqui que BiP interage com a subunidade de  $\beta$ -conglucina em leveduras, confirmando resultados anteriores de interação de proteínas em extratos de cotilédones de soja (GILLINKI et al., 1995; FONTES et al., 1996).

Com a finalidade de avaliar diretamente se um aumento constitutivo dos níveis de BiP no retículo endoplasmático acarretaria aumento no teor de proteínas na semente, foram analisados tabacos transgênicos superexpressando o gene BiP sob controle do promotor CaMV 35S. O sistema modelo tabaco foi escolhido para estes estudos basicamente devido à facilidade de transformação por *Agrobacterium tumefaciens* e também porque tem sido demonstrado que proteínas de reserva de milho e soja são corretamente processadas e armazenadas em sementes de tabaco (BELLUCCI et al., 2000). Os níveis de BiP em sementes homozigotas de tabaco linhagens T3-35S-BiPS7.2 e T3-35S-BiPS1.1 foi, respectivamente, 2 e 1.5 vezes superiores ao nível de BiP nas sementes de plantas controle não transformadas. Entretanto, os níveis de proteína total não acompanharam o aumento constitutivo de BiP e, ao contrário, as sementes das linhagens senso T3-35S-BiPS7.2 e T3-35S-BiPS1.1 apresentaram um teor protéico ligeiramente inferior àquele das sementes controle. Embora estes resultados indiquem que BiP por si só não constitui um caráter genético para melhoria do teor protéico de grãos, eles devem ser interpretados com cautela.

Uma vez que as sementes vegetais sintetizam proteínas de reserva com alta eficiência, durante a biogênese de corpos protéicos as células de cotilédones ou endospermas naturalmente mantêm alta atividade secretora e, conseqüentemente, altos níveis basais de BiP. Entretanto, as eficiências de síntese, processamento pós-traducional e armazenamento de proteínas de

reserva em grãos diferem entre as espécies vegetais, o que reflete no teor protéico final das sementes. Por exemplo, enquanto sementes de soja possuem em torno de 40% da matéria seca em proteínas, sementes de tabaco apresentam no máximo um teor protéico em torno de 20% (SHEWRY, et al., 1995). Isso indica que, durante a biogênese de corpos protéicos, provavelmente, as células de cotilédones de soja operam em condições saturantes de processamento de proteínas secretoras, enquanto sementes de tabaco mantêm um nível basal na taxa de processamento do retículo endoplasmático. Assim sendo, provavelmente, os níveis de BiP endógeno em sementes de tabaco estão acima do limite que poderia comprometer a capacidade de processamento do retículo endoplasmático em coordenação com a taxa de tradução de proteínas de reserva. Não sendo fator limitante do processo, justifica-se, em termos de engenharia metabólica, porque a superexpressão de BiP de soja no sistema heterólogo de tabaco não foi efetiva em aumentar a eficiência de processamento de proteínas de reserva que refletisse em um aumento no teor protéico da semente transgênica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVIM, F.C.; CAROLINO, S.M.B.; CASCARDO, J.C.M.; NUNES, C.C.; MARTINEZ, C. A.; OTONI, W.C.; FONTES, E.P.B. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water eestresseee. **Plant Physiol**, v.126, p.1024-1054, 2001.

BELLUCCI, M.; ALPINI, A.; PAOLOCCI, F.; CONG, L.; ARCIONI, S. Accumulation of Maize  $\gamma$ -zein and  $\gamma$ -zein: KDEL to high levels in tobacco leaves and differential increase of BiP synthesis in transformants. **The Appl Genet.**, v. 101, p. 796-804, 2000.

BLOND-ELGUINDI, S.; CWIRLA, S.E.; DOWER, W.J.; LIPSHUTZ,, R.J., SPRANG, S.R., SAMBOOK, J.F., GETHING, M.J. Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveal the binding specificity of BiP. **Cell**, v. 75, p. 717-728, 1993.

BOLLINI, R; CHISPEELS, M.J. The rough endoplasmic reticulum is the site of reserve-protein synthesis in developing *Phaseolus vulgaris* cotyledons. **Planta**, v. 146, p. 487-501, 1979.

BOSTON, R.S.; FONTES, E.P.B.; SHANK, B.B.; WROBEL, R.L. 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.; VITTANEM P.V.; VIERLING, E. Molecular chaperones and protein folding in plants. **Plant Mol. Bio.** , v.32, p.191-222, 1996.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p. 248-254, 1976.

BUZELI, R.A.A.; CASCARDO, J.C.M.; RODRIGUES, L.A.Z.; ANDRADE, M.O.; LOUREIRO, M.E.; OTONI, W.C.; FONTES E.P.B. Tissue specific regulation of *Bip/Grp78* genes: a cis-acting regulatory domain is required for *BiP* promoter activity in plant meristems. *Plant Mol. Biol.* 50:757-771, 2002.

CAROLINO, S.M.B. **Caracterização Biológica e Purificação da Proteína BiP da Soja ( Glicine Max (L.) Merrill)**. Viçosa, MG: Impr Univ., 1997. 65 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CAROLINO, S.M B.; VAEZ, J.R.; IRSIGLER, A .S.T.; VALENTE, M. A. S.; RODRIGUES, A Z.; ZEBRAL, L.A.; FONTES, E.P.B. Plant *BiP* gene family: differential expression, stress induction and protective role against physiological stresses. **Braz. J. Plant Physiol.**, v.15(2), p.59-66, 2003.

CHISPEELS, M.J. Sorting of proteins in the secretory system. *Annu. Rev. plant Physiol.* **Plant Mol. Biol.**, v. 42, p. 21-53, 1991.

CHISPEELS, M.J.; HIGGINS, T.J.V., CRAIG, S., SPENCER, D. Role of the endoplasmic reticulum in the synthesis of reserve proteins and the kinetics of their transport to protein bodies in developing pea cotyledons. **J. Cell. Biol.**, v. 93, p. 5-14, 1982a.

CHISPEELS, M.J.; HIGGINS, T.J.V.; SPENCER, D. Assembly of storage protein oligomers in the endoplasmic reticulum and processing of the polypeptides in the protein bodies of developing pea cotyledons. **J. Cell. Biol.**, v. 93, p. 306-313, 1982b.

CERIOTTI, A.; PEDRAZZINI, E.; BIELLI, A., GIOVINAZZO, G.; BOLLINI, R.; VITALE, A. Assembly and intracellular transport of phaseolin, the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* L. **J. Plant Physiol.**, v. 313, p. 64-67, 1995.

COATES J. B.; MEDEIROS J. S.; THANH V.H.; NIELSEN, N.C. Characterization of the subunits of  $\beta$ -conglitin. **Biochemistry and Biophysics**, v 243(1), p. 184-194, 1985.

DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D.J.; BOULTER, D. (1976) Legumin and vicilin storage proteins of legume seed. **Phytochem.**, v.15, P.3-24, 1976.

DENECKE, J. Soluble endoplasmic reticulum resident proteins and their function in protein synthesis and transport. **Plant Physiol. Biochem.**, v.34, p.197-205, 1996.

DOYLE, J.F.; SCHULER, M.A.; GODETTE, W.D.; ZENGER, V.; BEACHY, R.N.; SLIGHTON, J.L.; The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 9228, 1986.

DuPont, F.M.; HURKMAN, W.J.; TANAKA, C.K.; CHAN, R. BiP, HsP70, NDK and PDI in wheat endosperm. I. Accumulation of mRNA and protein during grain development. **Physiol. Plant.** 103:70-79, 1998.

FIGUEIREDO, J.E.F.; CASCARDO, J.C.M.; CAROLINO, S.M.B.; ALVIM, F.; FONTES, E.P.B. Water-estresse regulation and molecular analysis of the soybean BiP gene family. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.** 9:103-110, 1997.

FONTES, E.P.B.; SHANK, B.B.; WROBEL, R.L.; MOOSE, S.P.; O'BRIAN, G.R.; WURTZEL, E.T.; BOSTON, R.S. Characterization of an immunoglobulin binding protein homolog in the maize floury-2 endosperm mutant. **Plant Cell**, v.3, p. 483-496, 1991.

FONTES, E.P.B.; SILVA, C.J.; CAROLINO, S.M.B.; FIGUEIREDO, J.E.F.; BATISTA, D.P.O. A soybean binding protein (BiP) homology is temporally regulated in soybean seeds and associates detectably with normal storage proteins in vitro. **Braz. J. Genet.**, v.19 (2), p. 305-312, 1996.

FRIGERIO, L.; PASTRES, A.; PRADA, A.; VITALE, A. Influence of KDEL on the fate of trimeric or assembly-defective phaseolin: Selective use of an alternative route to vacuoles. **Plant Cell**, v. 13, 1109-1126, 2001b.

GALILI, G.; ALTSCHULER, Y; LEVANONE, H. Assembly and transport of seed storage proteins. **Cell Biol.** V.3, p. 437-442, 1993.

GALILI, G.; GALILI, S.; LEWINSOHN E.; TADMOR, Y. Genetic, Molecular and Genomic Approaches to improve the value of plant foods and feeds. **Plant Sciences**, v. 21(3), p. 167-204, 2002.

GETHING, M.J.; SAMBROOK, J. Protein Folding in the Cell. **Nature**, v. 355, p. 33-45, 1992.

GETHING, M.J. Role and regulation of the ER chaperone BiP. **Developmental Biology**, v 10, p. 465-472, 1999.

GILLINKI, J.M.; FONTES, E.P.B.; BOSTON, R.S. Protein-protein interactions in the endoplasmic reticulum. In GALBRAITH, D.; BOURQUE, D.; BOHNERT, D. (eds), p 309-323, **Methods in Cell Biology Part B**, Academic press, NY, 1995.

HAAS, I.G.; MEO, T. cDNA cloning of the immunoglobulin heavy chain binding protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, . v.85, p. 2250-2254, 1988.

HAIGH, N.G.;JOHNSON, A.E.; A new role for BiP: closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane. **Cell Biology**, v. 156, p. 261-270, 2002.

HAMMAN, B.D.; HENDERSHOT, L.M.; JOHNSON, A.E. BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. **Cell**, v. 92, p. 747-758, 1998.

HAMPTON, R.Y., 2002. ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v.14(4), p. 476-482, 2002.

HATANO, K.; SHIMADA, T.; HIRAIWA, N.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. A rapid increase in the level of binding protein (BiP) is accompanied by synthesis and degradation of storage proteins in pumpkin cotyledons. *Plant Cell Physiol.*; v. 38, p. 344-351, 1997.

HARTL, F.V. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, v. 381, p. 571-580, 1996.

HERMAN, E.M. and LARKINS, B.A. Protein storage bodies and vacuoles. *Plant Cell*. v. 11, p. 601-613, 1999.

HERMAN, E.M. Multiple origins of intravacuolar protein accumulation of plant cells. *Adv. Struct. Res.* 3, 243-283, 1994.

HURTLEY, S.M.; BOLE, D.G.; HOOVER-LITTY, H.; HELENIUS, A.; COPELAND, C.S. Interaction of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein BiP. *J. Cell. Biol.*, v.108, p. 2127-2136, 1989.

KALINSKI, A.; ROUWLEY, D.L.; LOER, D.S.; FOLE, C.; BUTA, G.; Herman, E.M. Binding-protein expression is subject to temporal, developmental and estresse-induced regulation in terminally differential soybean organs. *Planta*, v.195, p. 611-621, 1995.

KNARR, G.; KIES, U.; BELL, S.; MAYER, M. Interaction of the Chaperone BiP with an Anyibody Domain: Implications for the Chaperone Cycle. *J. Mol. Biol.* v. 318, p. 611-620, 2002

KNARR, G.; GETHING, M.J.; MODROW, S.; BUCHNER, J. BiP-binding sequences in antibodies. *J. Biol. Chem.*, v.270, p. 27589-27594, 1995.

KRIZ, AL. 7S globulins of cereals. In: SHEWRY, P.R.; CASEY, R. EDS. Seed proteins. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 477-478, 1999.

KRIZ, AL; WALLACE, N.H. Characterization of the maize globulins-2 gene and analysis of two null alleles. *Biochemical Genetics*, v. 29, p. 241-254, 1991.

LADIN, B.F.; TIERNEY, M.L.; MEINKE, D.W.; HOSANGADI, P.; VEITH, M.; BEACHY, R.N.; Developmental regulation of  $\alpha$ -conglycinin in soybean axes and cotyledons. *Plant Physiol.*; v. 84, p. 35-41, 1987.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, n. 227, p. 680-685-1970.

LAITUSIS, A.L.; BROSTOM, M.A.; BROSTOM, C.O. The dynamic role of GRP78/BiP in the coordination of mRNA translation with protein processing. *J. Biol. Chem.* 274:486-493, 1999.

LANNA, A. C. Efeito da temperatura sobre a regulação da síntese de ácidos graxos polinsaturados em soja. Viçosa, MG, Impr. Univ.2002. 84p. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Vegetal)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

LEBORGNE-CASTEL, N.; JELLITO-BAN DOORE, E. P. W. M.; COFTS, A. J.; DENECKE, J. Overexpression of BiP in tobacco alleviates endoplasmic reticulum estresse. **Plant Cell**, v 11, p. 459-469, 1999.

LEVANONY, H.; RUBIN, R.; ALTSCHULER, Y.; GALILI, G. Evidence for a novel route of wheat storage proteins to vacuoles. **J. Cell Biol.**, v. 119, p. 1117-1128, 1992.

LI, X; FRANCESCHI, V.; OKITA, T.W. Segregation of storage protein mRNAs on the rough endoplasmic reticulum membranes of rice endosperm cells. **Cell**, v. 72, p. 869-879, 1993a.

LI, X; WUY; ZHANG, D Z; GILLIKIN, J W; BOSTON, RS; FRANCESCHI, V R; OKITA, T W. Rice prolamine protein body biogenesis: A BiP mediated process. **Science**, v. 262, p.1054-1056, 1993b.

LIU, S.Y.; KAUFMAN, R.J. The unfolded protein response. **Cell science**, v. 116, p. 1861-1862, 2003.

MARTY, F. Plant vacuoles. **Plant Cell**, v. 11, p.587-599, 1999.

McKay, D.B. Structure and mechanism of 70-kDA heat-shock-related proteins. **Adv Prot. Chem.**, v. 44, p. 67-80. 1993.

MEDEIROS, N.S. **Characterization of the subunits of -conglycinin**. Ph. D. Thesis Purdue University, West Lafayette IN, 1982.

MENÉNDEZ-ARIAS, L.; MONSALVE, R.I.; GAVILANES, J.G.; RODRIGUEZ, R. Molecular and spectroscopic characterization of a low molecular weight seed storage protein from yellow mustard (*sinapis alba l.*). **Int. J. Biochem.**, v. 19, p. 899-907, 1987.

MOLINARI, M.; GALILI, C., PICCALUGA, V.; PIEREN, M.; PAGANETTI, P. Sequential assistance of molecular chaperones and transient formation of covalent completes during protein degradation from the ER. **J. Cell. Biol.**, v. 158 (2), p. 247-257, 2002.

MOLVIG, L.; TABE, L.M.; EGGUM, B.O.; MOORE, A.E.; CRAIG, S.; SPENCER, D.; HIGGINST, J.V. Enhanced methionine levels and increase nutritive value of seeds of transgenic lupins ( *Lupinus angustifolins* L.) expressing a sunflower seed albumin gene. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 94, p. 8393-8398, 1997.

MOREIRA, M.A.; HERMADSON, M.; LARKINS, B.A. Partial characterization of the acidic and basic polypeptides of glycinin. **J Biol. Chem.**, v. 254 (20), p. 9921-9926, 1979.

MORRIS J.A.; DORNER, A.J., EDWARDS, C.A.; Hendershot, L.M., KAUFMAN, J. Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum estresse but is not required for the secretion of selective proteins. **J. Biol. Chem.** 272:4327-4334, 1997 .

MUENCH, D.G.; Wi, Y.; ZHANG, Y.; Li, X.; Boston, R.S; Okita, T.W. Molecular cloning, expression and sub celular localization of a BiP homolog from rice endospem tissue. **Plant Cell Physiol.**, v. 38:404-412, 1997.

MUNTZ, K.; CHIRITOV, V.; SAALBACH, G.; SAALBACH, I.; WADDELL, D.; PICKARDT, T.; SCHIEDER, O.; WUSTENHAGEM, T. Genetic engineering for high methionine grain legumes. **Nahrung**, v.42, p. 125-127, 1998.

NAM, Y.W., JUNG, R., and NIELSEN, N.C. Adenosine 5'-tri-phosphate is required for the assembly of 11S seed proglobulins in vitro. **Plant Physiol.** 115:1629-1639, 1997.

NAITO, S.; DUBÉ, P.H.; BEACHY, R.N. Differential expression of conglycin 'and subunit genes in trangenic plants. **Plant Mol. Biol.**, v. 11, p. 109-123, 1998.

NGUYEN, T.H.; LAW, D.T.S. AND WILLIAMS, D.B. Binding protein BiP is required for the translocation of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.88, p. 1565-1569, 1991.

NIELSEN, N.C., BASSUNER, R., BEANAN, T. **The biochemistry and cell biology of embryo storage proteins. In Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development.** v.4 B.A. Larkins and I.K. Vasil, eds (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), p. 151-220, 1997.

NIELSEN, N.C.; DICKINSON, C.D.; CHO, T J.; THANH, V. H.; SCALLON, B.J.; FISHER, R L.; SIMS, T.L.; DREWS, G.N.; GOLDBERG, R.B. Characterization of the glycinin gene family in soybean. **The Plant Cell**, v.1 (3), p. 313-328, 1989.

NISHIKAWA, S.I.; FEWEL, S.W.; KATO, Y.; BRODSKY, J.L.; ENDO,T.; Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. **J. Cell. Biol.**, v. 153, p. 1061-1070, 2001.

NORMINGTON, K.; KOHNO, K.; KOZUTSUMI, Y.; GETTING, M.-J.; SAMBROOK, J. *S. cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. **Cell**, v. 57- p. 1223-1236, 1989.

ODA Y.; HOSOKAWA N.; WADA I.; NAGATA K. EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. **Science**, v.299, p.1394-1397, 2003.

OKITA, T.W. & ROGERS, J.C. Compartmentation of proteins in the endomembrane system of plant cells. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 47, p. 327-350, 1996.

OMBRETTA, F.; LORENZO, F.; HEIDI, H; MADDALENA DE V.; STEFANO, V AND ALESSANDRO. V. A phaseolin domain involved directly in trimer assembly is a determinant for binding by the chaperone BiP **Plant Cell**, v.15, p. 2464-2475, 2003.

OSBORNE, T.B. **The vegetable proteins**. (London Longsman-Green), 1924.

PEDRAZZINI, E.; GIOVINAZZO, G.; BOLLINI, R.; CERIOTTI, A.; VITALE, A. Binding of BiP to an assembly-defective protein in plant cell. **Plant J.**, v. 5, p. 103-110, 1997.

PILON M.; SHECHEKMAN R. Protein translocation: how Hsp 70 pulss it off. **Cell**, v.7, p. 679-682, 1999.

ROBINSON, D.G.; GALILI, G.; HERMAN, E.; HILMER, S. Topical aspects of vacuolar protein transport: autophagy and prevacuolar compartments. **J. Exp. Bot.**, v.49, p. 1263-1270, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning- A laboratory manual**. 2. Edition. New York: Cold Spring harbor Laboratory press, 1989. 202p.

SANDERS, S.I.; WHITFIELD, K.M.; VOGEL, J.P.; ROSE, M.D.; SCHCKMAN, R.W. Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. **Cell**, v. 69, p. 353-365, 1992.

SANDERFOOT, A.A.; RAIKHEL, N.V. The specificity of vesicle trafficking: coat proteins and SNAREs. **Plant Cell**, v.11, p. 629-641, 1999.

SHEWRY, P.R.; HALFORD, N.G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. **J. Experimental Botany**, v.53, n. 370, p. 947-958, 2002.

SHEWRY, P.R.; TATHAM, A.S. Structural and evolutionary relationships of prolamins.. In: SHEWRY, P.R.; CASEY R., eds. Seed proteins. Dordrecht: **Kluwer Academic Publishers**, 1998.

SHEWRY, P.R.; NAPLER, J.A.; TATHAN]M, A.S. Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. **Plant Cell**, v. 7, p. 945-956, 1995.

SHEWRY, P. R. Plant storage proteins. **Biol. Rev.** v.70, p. 375-426, 1995.

SHIMONINI, Y.; GALILI, G. Intramolecular disulfide bonds between conserved cysteines in wheat gliadins control their deposition into protein bodies. **J. Biol Chem.**, v.271, p. 18869-18874, 1996.

SHIMONIN, Y.; ZHU, S., LEVANONY, H.; SEGAL, G.; GALILI, G. Purification, characterization, and intracellular localization of glycosylated protein disulfide isomerase from wheat grains. **Plant Physiol.**, v. 108, p. 327-335, 1995.

SHOTWELL, M.A. Oat globulins. In.; SHEWRY, P.R.; CASEY R., eds. Seed proteins. Dordrecht: **Kluwer Academic Publishers**, p 389-400, 1999.

SHUSTA, E.V.; RAINES, R.T., PLÜCKTHUN, A.; WIRTRUP, K.D. Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments. **Nat Biotechnol.**, v. 16, p. 773-777, 1998.

SINGH, N. K.; SHEPHERD, K. W.; LANGRIDGE, P.; GRUEN, L. C.; SKERRITT, J.H.; WRIGLEY, C. W. Identification of legumin-like proteins in wheat. **Plant Molecular Biology**, v. 11, p. 633-639, 1988.

SKOWRONEK, M. H., HENDERSHOT, L. M. and HAAS, I.G. The variable domain of nonassembled Ig light chains determines both their half-life and binding to the chaperone BiP. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 95, p. 1974-1578, 1998.

SPARVOLI, F.; AORO, F.; DANMINATI, M.G.; CERIOTTI, A.; BOLLINI, R. Misfolding and aggregation of vacuolar glycoproteins in plant cells. **Plant J.**, v. 24, p. 825-836, 2000.

TAKAIWA, F.; OGAWA, M.; OKITA, T.W. Rich glutelins. In S In.; SHEWRY, P. R.; CASEY R., eds. Seed proteins. Dordrecht: **Kluwer Academic Publishers**, p. 401-425, 1999.

THOMAS, T.L. Gene expression during embryogenesis and germination: An overview. **Plant Cell**, v. 5, p. 1401-1410, 1993.

TIERNEY, M.L.; BRAY, E.A.; ALLEN, R.D.; SLIGTOM, J.L.; DRONG R.F.; YU, Ma, BEACH, R.N. Isolation and characterization of a genomic clone encoding the  $\alpha$ -subunit of  $\alpha$ -conglycinin. **Planta**. V. 172, p. 356-363, 1987.

UTSUMI, S.; KIM, C.S.; KOHNO, M.; KITO, M. Polymorfism and expression of cDNAs encoding glycinin subunits. **Agric. Biol. Chem.**; v. 51, p. 3267-3273, 1987.

UHRIG, J. F.; SOELLICK, T.-R.; MINKE, C. J.; PHILIPP, C.;KELMANN, J. –W, SHEEIER, P. H.. Homotypic interaction and multimerization of nucleocapsid protein of tomato spotted wilt tospovirus: identification and characterization of two interacting domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 96, p. 55-60, 1999.

VAEZ, J.R. **Tolerância ao estresse hídrico mediada pela proteína BiP de soja em plantas transgênicas de tabaco.** Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 2003. 60f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

VITALE, A.; CEIOTTI, A.; DENECKE, J. The role of endoplasmatic reticulum in protein synthesis, modification and intracellular transport. **J. Exp. Botany**, v. 266, p. 1417-1444, 1993.

VITALE, A.; BIELLI, A.; CERIOTTI, A. The binding protein associates with monomeric phaseolin. **Plant Cell**, v. 11, p. 1411-1418, 1995.

VITALE, A.; DENECKE, J. The endoplasmic reticulum-gateway of the secretory pathway. **Plant Cell**, v. 11, p. 615-628, 1999.

VOELTZ, G.K.; ROLLS, M.M.; RAPOPORT, T.A. Structural organization of the endoplasmic reticulum. **EMBO Reports**, v.3, n. 10, p. 944-950, 2002.

YANJUN, M; HENDERSHOT, L. M. ER chaperone functions during normal and estresse conditions. **Journal of Chem. Neuroanatomy**, p. 1-13, 2003.

YOULE, R.J.; HUANG. A.H.C. Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oil-seeds of diverse species. **Am. J. Bot.**, v. 68, p. 44-48, 1981.