

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA GTP-BINDING PROTEIN ESPECÍFICA DA MEMBRANA PLASMÁTICA DE SOJA

CONTIN, L. A. S., PIROVANI, C. P.; e FONTES, E. P. B.
(Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - BIOAGRO/UFV - Viçosa-MG - 36.571.000)

Previamente, usando como sonda anticorpos contra proteínas de membrana parcialmente purificadas, isolou-se de uma biblioteca de expressão um cDNA que codifica uma proteína, S-64, específica da semente de soja. O clone foi totalmente sequenciado. A estrutura primária da proteína codificada possui 489 aminoácidos e peso molecular calculado em 64.000. A proteína possui um peptídeo sinal no terminal amino, uma sequência consenso de glicosilação e um sítio de ligação à ATP/GTP. O cDNA marcado com F-12-dUTP foi usado como sonda e os transcritos foram detectados exclusivamente na semente, exibindo um acúmulo crescente durante a fase de estocagem e decrescendo com a desidratação das sementes. Um fragmento do cDNA foi clonado no sítio Bam HI do vetor de expressão em bactéria pEt-16b, sob o controle do promotor da t7 RNA Polimerase. Uma versão truncada da proteína foi expressa em bactéria mediante indução com IPTG. A proteína recombinante foi purificada de extrato bacteriano e utilizada na imunização de coelhos para a produção de anticorpos policlonais específicos. Frações celulares de cotilédones foram analisadas por meio de "imunoblotting" e a proteína S-64 foi identificada na fração membranosa. Em ensaios de imunoprecipitação utilizando-se extratos protéicos de células cultivadas em meio líquido e resina de GTP-agarose, foi verificado que S-64 possui habilidade de ligar à GTP. A funcionalidade da sequência de glicosilação está sendo analisada por meio de imunoprecipitação com concanavalina-A, uma vez que proteínas glicosiladas possuem habilidade em ligar à esta resina.

CNPQ - CAPES - FAPEMIG

ANALYSIS OF BiP GENE EXPRESSION FROM SOYBEAN (*Glycine max*) UNDER SELECTIVE STRESS CONDITIONS SHOWS POS-TRANSLATIONAL MODIFICATION FOR DIFFERENT ISOFORMS

BUZELI, R. A. A., CASCARDO, J. C. M., CAROLINO, S. M. B., ARAUJO, A. F. & FONTES, E. P. B.
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR/BIOAGRO, UFV, 36571-000 VIÇOSA-MG

The ER-resident molecular chaperone, known as binding protein (BiP), is a HSP70-related protein which has been implicated in sorting and control of protein exit from the ER. BiP functions primarily to promote folding and assembly of newly synthesized proteins as they enter into the ER lumen. This activity involves transient binding because BiP is released when proper folding or assembly into oligomers is achieved. Permanent binding of BiP reflects failure of the proteins to achieve a proper conformation, thereby preventing their exit from the ER. By successive chromatography on DEAE-sepharose and ATP-agarose we have purified a 78 KDa ATP-binding protein from water soluble proteins of soybean seeds, which cross-reacted with a maize BiP antibody. We have prepared antibody against the purified protein and a truncated version of BiP. The carboxy-terminus of the cDNA was expressed in *E. coli* and the truncated protein was affinity-purified and used to prepare antibodies. We have also analysed the BiP induction under stress conditions in soybean cell suspension cultures and plants in greenhouse. Treatments of the cells with tunicamycin, salicylic acid and PEG promote a remarkable induction of BiP synthesis. To investigate the biological significance for the difference in gene copy number in higher plants we have used immunoblottings of two dimensional gel electrophoresis to identify the soybean BiP isoforms. Protein extracts from different organs of soybean demonstrate the presence of BiP isoforms. The synthesis of BiP isoforms on leaf are induced in response to water stress, a property of soybean BiP. Treatment of the protein extracts from soybean organs with phosphatase alcaline and analysis used immunoblottings of two dimensional gel electrophoresis shows post-translational modification for different binding protein isoforms. We are currently analysing the individual contribution of each member of the BiP family to the pattern of BiP gene expression in separated stresses.

Supported by: PADCT/CNPq, FAPEMIG, FINEP and CNPq.

MOLECULAR CLONING OF A NOVEL BIP GENE FROM SOYBEAN (*Glycine max*): POSSIBLE REGULATORY PROMOTER ELEMENTS

PEDRA, J.H.F., DELÚ-FILHO, N., FRANCO, D.M.C.O., AND FONTES, E.P.B. Depto de Bioquímica e Biologia Molecular, BIOAGRO, UFV, 36571-000 - Viçosa - MG

The HSP70-related proteins constitute a family of ubiquitous proteins which share a remarkable conservation of primary structure. Members of the HSP70 class of stress proteins have been described as molecular chaperones which are involved in normal cell maintenance functions such as protein folding, assembly, disassembly and degradation. We have previously isolated a soybean cDNA from a lambda gtl1 expression library which encodes a class of stress proteins implicated as a key mediator of protein folding and assembly in the ER. Isolation of the corresponding genomic clone was conducted by screening a soybean EMBL3 genomic library using the BiP cDNA as a probe. Full length genomic sequences were isolated and three putative positive clones were further selected by Southern blot analysis. From the three positive clones two has been classified as different members of BiP genes, on the basis of size, restriction pattern and partial sequencing. Analysis comparison of these clones shows a high homology with isoforms B and C of the BiP gene family from soybean. We are currently analyzing the sequences of clones to identify possible regulatory promoter elements.

Supported by PADCT/CNPq, FAPEMIG, FINEP and CNPq

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE MILHO (*Zea mays* L.) MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens*. Maria José V. Vasconcelos, Mauricio S. Antunes, Douglas Barduche, Luciano V. Paiva, Edilson Paiva, Fernando H. Valicente, José Edson F. Figueiredo, Carlos Henrique S. Carvalho, Mauricio A. Lopes. Núcleo de Biologia Aplicada, CNPMS/EMBRAPA, Sete Lagoas, MG, 35701-970.

Até recentemente, não era possível transformar plantas de milho (*Zea mays* L.) por meio da técnica de *Agrobacterium*, pois nenhuma cepa conhecida desta bactéria de solo infectava eficientemente esta gramínea. Trabalhos utilizando a cepa LBA 4404 (pTOK233) de *Agrobacterium tumefaciens* (Japan Tobacco Inc.) demonstraram seu grande potencial para utilização em experimentos de transformação genética de milho. Visando avaliar o potencial de transformação de genótipos tropicais de milho por esta cepa, embriões imaturos (15-16 dias após a polinização) de cinco linhagens tropicais foram assepticamente excisados do grão e inoculados em meio de cultura. Os embriões se desenvolveram durante onze dias e foram co-cultivados em meio líquido com a cepa LBA 4404 (pTOK233). Ensaio histoquímicos e fluorimétricos confirmaram a transferência do T-DNA para os embriões. Calos transformantes desenvolveram-se em meio de seleção contendo o antibiótico higromicina B como agente de seleção, demonstrando a integração do DNA plasmidial ao genoma dos embriões.

Apoio financeiro: EMBRAPA, CNPq/RHAE, FINEP/PADCT.