

Estudo de Modelagem Molecular por Homologia para Análise Genômica Funcional

I – BiP (Binding Protein)

José Edson Fontes Figueiredo¹

Wanderson Duarte da Rocha²

Vagner Augusto Benedito³

Vinício Tadeu da Silva Coelho⁴

As informações geradas por seqüenciamento de DNA não permitem prever com precisão as modificações pós-traducionais (epigenéticas) e, de modo algum, as interações epistáticas que podem ocorrer com as proteínas celulares. Após a síntese da cadeia primária, a maioria das proteínas passa por modificações antes de assumir a conformação nativa (O'Donovan *et al.*, 2001).

A acelerada determinação de seqüências DNA e sua interpretação (genômica) criaram um dos maiores desafios para a moderna biociência: a concomitante determinação da estrutura, função e expressão das proteínas codificadas por essas novas seqüências. Entender a estrutura e função, bem como as alterações epigenéticas e interações epistáticas, são fundamentais para determinar a contribuição individual das proteínas para o processo vital de um organismo. A realização

desses estudos requer quantidade relativamente grande da proteína alvo purificada e esse constitui um dos maiores entraves para os avanços no estudo de proteoma. Isso decorre principalmente das dificuldades para obter e processar grande quantidade de amostra e das limitações das técnicas cromatográficas atualmente em uso. Vários métodos computacionais que utilizam seqüências primárias de aminoácidos para predição da estrutura 3-D e função de proteínas (modelagem molecular) foram desenvolvidos com a finalidade de contornar o problema.

A modelagem molecular consiste em estudar a geometria e a propriedade das moléculas utilizando técnicas computacionais e tem contribuído de forma decisiva para elucidar interações intra/inter moleculares, mecanismos de reações químicas e estrutura e função de

¹Biólogo, Doutor, Embrapa Milho e Sorgo. Caixa Postal 151, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG. E-mail: jeff@cnpms.embrapa.br

²Eng. Agr. PhD, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG, Caixa Postal 373, CEP 30.000, Belo Horizonte, MG

³Eng. Agr. PhD, Wageningen University, Bornsesteeg, 1-9A-0016708-AA, The Netherlands

⁴Estudante do Curso de Ciências Biológicas, Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix, Caixa Postal 46, CEP 30.160-012, Belo Horizonte, MG

proteínas difíceis de serem purificadas em grande escala. Nesse método, a construção do modelo de uma proteína utiliza padrões de geometria de átomos e de ligações químicas, (especialmente tamanho e ângulos), informações sobre a geometria de peptídeos (eles devem ser corrigidos posteriormente por algum método de otimização do modelo construído) e dados obtidos de experimentos físicos, geralmente cristalografia com difração de raios-X, difração de nêutrons ou estruturas deduzidas de ressonância nuclear magnética (NMR). Contudo, esse método é muito trabalhoso e demanda muito tempo para ser realizado.

Empregando abordagem um pouco diferente, a modelagem molecular por homologia utiliza dados cristalográficos conhecidos para determinar a estrutura e prever função de proteínas desconhecidas. Esse procedimento é bem mais simples, pois utiliza dados estruturais existentes, para a construção dos modelos. As etapas para utilização desse método incluem: a) identificação do *template* (molde) para modelagem da proteína alvo; b) alinhamento da seqüência-alvo com a seqüência *template*; c) construção do esqueleto carbono do modelo; d) construção de *loops* não conservados; e) ajuste do esqueleto carbono da molécula; f) adição de cadeias laterais; g) refinamento do modelo, que consiste principalmente em ajustar a molécula, para que assuma menor estado de energia livre (minimização de energia), utilizando programas como CHARM, AMBER OU CROMOS. A modelagem molecular por homologia foi empregada com o objetivo de obter informações sobre a proteína codificada pelo gene cBiP, isolado de uma biblioteca de cDNA de sementes de soja (Figueiredo *et al.*, 1997; Figueiredo, 1998a,b).

O clone cBiP codifica para o chaperone molecular residente no retículo endoplasmático, conhecido como Hsp70 ou BiP (binding protein). Análises de seqüências de DNA e proteína, utilizando o programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994), revelaram diferenças

entre cBiP e proteínas Hsp70 e BiP de outras espécies (Figueiredo, 1998a,b). Uma dessas diferenças é particularmente interessante, pois consiste em uma mutação na posição 234, em que o resíduo D (aspártico), presente no sítio de ligação de ATP de todos os chaperones moleculares, foi substituído por G (glicina) (Figueiredo *et al.*, 1997). Vários estudos revelaram que o resíduo D234 de chaperones moleculares é importante, pois interage com moléculas de água no citoplasma, mantendo a proteína em solução (Milarski & Marimoto, 1989; Prodromou *et al.*, 1997; Wilbanks *et al.*, 1994). Identificar possíveis efeitos dessa mutação sobre a estabilidade e função da proteína cBiP é importante para ajudar a entender o papel desempenhado por várias cópias de genes BiP identificadas em soja (Kalinski, *et al.*, 1995; Figueiredo 1998a,b).

As diferentes proteínas da classe Hsp70 existentes em uma única célula apresentam grande similaridade de seqüências e tentativas de purificar uma determinada proteína são muito difíceis, pois outros membros da classe são também co-purificados. Neste caso particular, a modelagem molecular pode fornecer informações sobre a funcionalidade de proteínas Hsp70 deduzidas do seqüenciamento de DNA.

A pesquisa no banco de dados, por homologia de domínios de proteína (EMOTIF), revelou a existência de dois sítios potenciais de ligação de ATP na proteína cBiP. Esses domínios também estão presentes em proteínas cinases e em ATPases. O primeiro sítio potencial de ligação de ATP está localizado na extremidade carboxi-terminal de cBiP e o alinhamento de seqüências de aminoácidos com proteínas Hsp70 e o consenso de ligação de ATP de proteínas cinases é mostrado na Figura 1. O consenso para ligação do nucleotídeo foi identificado tanto em proteínas Hsp como em BiP e consiste da seqüência L-G-X-G/V-X-X-G-X-K, seguida de 13 resíduos de aminoácidos e uma Lisina (K), no final da seqüência. Esse domínio é bastante similar àqueles identificados em proteínas cinases e proteínas

que ligam ATP, como lactato desidrogenase, glutationa redutase e álcool redutase (Gaut & Hendershot, 1993; Hanks *et al.*, 1988; Wierenga & Hol, 1983). Contudo, em proteínas da classe Hsp70 e BiP, esse domínio (LGIETVGGVMTKLIPRNTVIPTKK) parece não ser funcional, pois foi demonstrado que a região carboxi-terminal da proteína BiP de humanos foi incapaz de ligar-se à coluna de ATP-agarose (Bork *et al.*, 1992).

O segundo sítio de ligação de ATP na proteína deduzida do clone cBiP está localizado na região amino-terminal (Figura 1). É nessa região de cBiP que se encontra a mutação G234 (Figura 2). Esse domínio é equivalente ao sítio amino-terminal de ligação de ATP de chaperones moleculares, cujas estruturas cristalográficas foram resolvidas (Flaherty *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1996). Maior identidade de seqüências pode ser verificada entre cBiP e o fragmento de 44 kDa de Hsp70 de bovinos e, por esse motivo, foi utilizada como referência para iniciar a modelagem molecular. O domínio completo de ligação de ATP do polipeptídeo deduzido do clone cBiP consiste de 284 resíduos de aminoácidos, sendo que os resíduos que participam na interação com ATP são

conservados e estão localizados na mesma posição no domínio, em relação à proteína Hsp70 de bovinos (Figura 2). A única exceção consiste do resíduo G em BiP de soja, na posição equivalente ao resíduo D, em Hsp70 de bovinos. Essa seqüência da proteína cBiP foi utilizada para realizar o estudo preliminar de modelagem por homologia com a proteína Hsp70 de bovinos, usando o programa de modelagem do Swiss-Model (Peitsch, 1996). É interessante destacar que, anteriormente, as análises comparativas de seqüências de aminoácidos não indicaram qualquer identidade entre a proteína cBiP e hexocinases e outras ATPases. Isso ocorreu, provavelmente, devido ao fato de que o alinhamento de seqüências primárias não pode ser usado para revelar relações entre proteínas muito distantes sem que informações adicionais sejam fornecidas, pois o alinhamento se torna impossível de ser realizado abaixo de 25% de identidade quando mais de 80 resíduos são considerados (Altschul *et al.*, 1990; Bork *et al.*, 1992).

Na modelagem molecular por homologia, a confiabilidade nos resultados é maior quando existem várias estruturas 3D disponíveis para

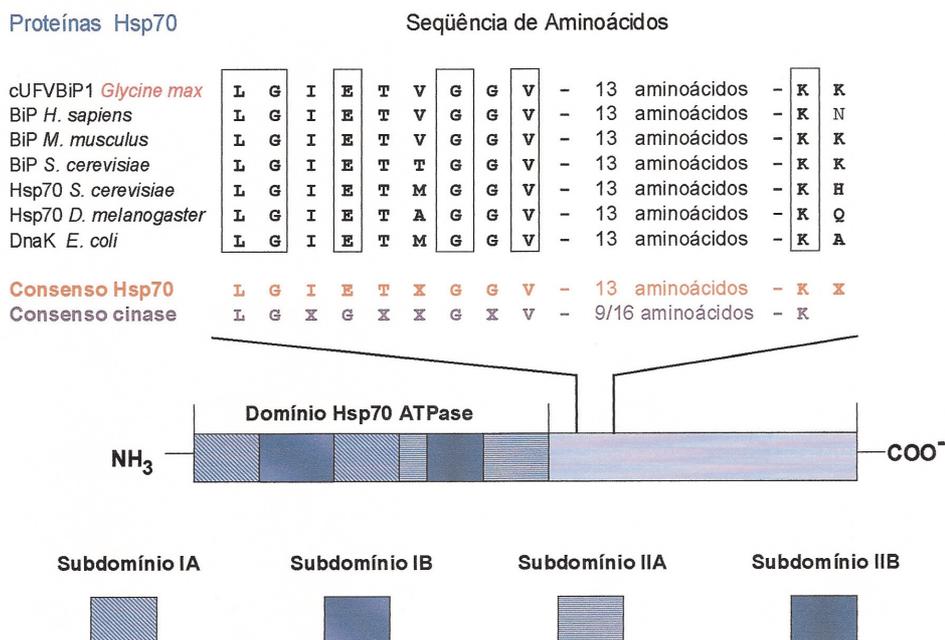


Figura 1. Localização de seqüências consenso para ligação de ATP em proteínas da família Hsp70. A comparação entre proteínas Hsp70 e BiP indicou a presença da seqüência consenso com o sítio carboxi-terminal de ligação de ATP presente em proteínas cinases (Hanks *et alii*, 1988). X, representa qualquer resíduo de aminoácido. Na parte de baixo da figura foi feita a representação linear de BiP, mostrando a localização amino-terminal do sítio potencial de ligação de ATP e, do fragmento de 44 kDa que liga ATP em Hsp70 de bovinos com os respectivos subdomínios.

Hsp70	4	65
cBiP		
Hsp70	66	126
cBiP		
Hsp70	127	188
cBiP		
Hsp70	189	234
cBiP		250
Hsp70	251	312
cBiP		
Hsp70	313	374
cBiP		
Hsp70	375	381
cBiP		

Figura 2. Alinhamento de seqüências de aminoácidos de Hsp70 de bovinos e da proteína deduzida do clone cBiP da soja. Os números indicam as posições dos aminoácidos em Hsp70. Os aminoácidos sublinhados correspondem aos resíduos que interagem com o nucleotídeo. O resíduo sombreado, assinala a substituição D234 de Hsp70 por G234 em cBiP. Em Hsp70, esse resíduo interage com a ribose do nucleotídeo por meio de ligação com H₂O (Flaherty *et al.*, 1990). Essa seqüência de aminoácidos da proteína cBiP foi utilizada para fazer a modelagem molecular por homologia.

comparações. Com a finalidade de obter o refinamento da estrutura 3D de cBiP, foi realizada a comparação das seqüências primárias de aminoácidos do sítio de ligação de ATP, das proteínas cBiP e Hsp70 de bovinos com actina e hexocinase (Figura 3). Apesar de possuírem funções biológicas bastante diferenciadas, as proteínas actina, Hsp70 de bovinos e hexocinases apresentam estruturas tridimensionais similares. Essas proteínas catalisam a hidrólise do ATP ligado (Hsp70) ou a transferência do grupo fosforil (ATPases) por meio de mudança conformacional em dois domínios (I e II) com topologia $\beta\beta\beta\alpha\beta\alpha$ circundando o nucleotídeo (Bork *et al.*, 1992; Flaherty *et al.*, 1990; 1991). Cada domínio é composto pelos subdomínios IA e IIA, que apresentam

essencialmente a mesma estrutura: folha β circundada por hélices conectadas por "loops" de topologia idêntica, que provavelmente devem ter surgido por duplicação gênica (Figura 3) (Flaherty *et al.*, 1990; 1991; Kabsch *et al.*, 1990). O fosfato do ATP é ligado nos resíduos localizados em dois " β -hairpin", um em cada subdomínio IA e IIA. Turnos β_1, β_2 de cada domínio formam pontes de hidrogênio com fosfatos do ATP e resíduos conservados Asp, Glu ou Gln coordenam Mg²⁺ e Ca²⁺ por meio de ligações com água (Gaut & Hendershot, 1993; Ramakrishnan *et al.*, 1997).

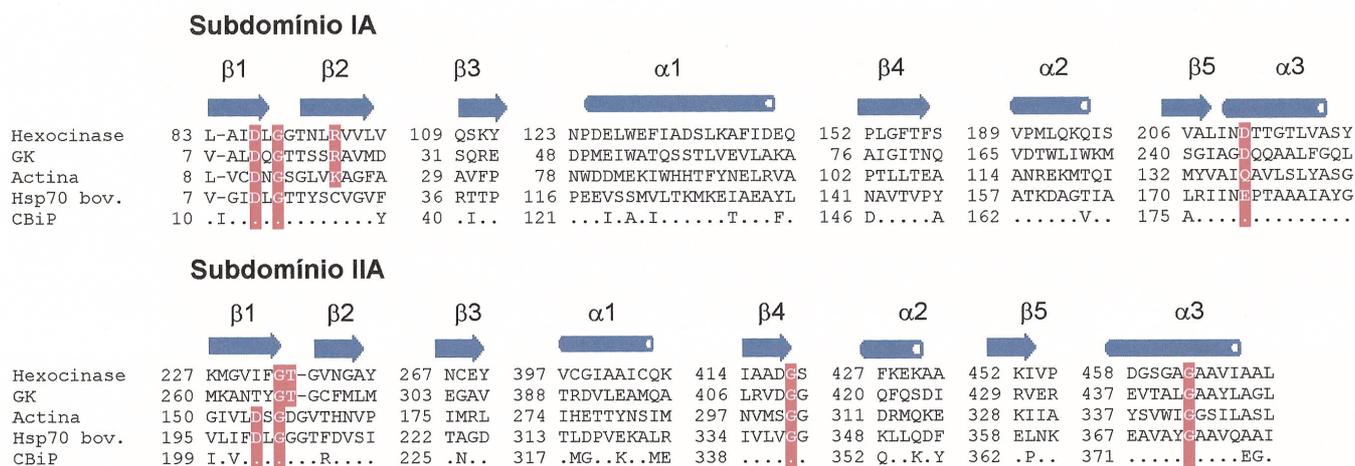


Figura 3. Seqüência das regiões conservadas nas proteínas da superfamília com topologia bbbababa. A seqüência de hexocinase está numerada a partir da seqüência traduzida do gene hexocinase B de levedura (Frohlick *et al.*, 1985), e cBiP, a partir da proteína madura (sem peptídeo sinal). O alinhamento foi baseado apenas na equivalência da estrutura tridimensional (Flaherty *et al.*, 1991). Somente as regiões que são estruturalmente equivalentes nas cinco proteínas são mostradas. As regiões sombreadas na cor rosa, indicam os resíduos que são idênticos em todas as seqüências, ou que possuem equivalência estrutural e funcional para ligação do nucleotídeo no sítio de ATP. Os pontos na seqüência da proteína cBiP, indicam os resíduos de aminoácidos idênticos à Hsp70 de bovinos. Na figura, os símbolos e indicam estruturas em folha b e a-hélice, respectivamente. GK, glicerol cinase (baseado em Huley, 1996).

Pode ser verificado que essas três classes de proteínas não são apenas similares em suas estruturas tridimensionais, mas também em alguns aspectos do mecanismo de funcionamento (Bork *et al.*, 1992; Hurley, 1996). O sítio ativo dessas proteínas contém resíduos idênticos ou similares e a estrutura geral dos subdomínios sugere a possibilidade de movimento dos interdomínios das moléculas que, provavelmente, estariam associadas com a atividade ATPásica. De fato, é necessário que se faça uma rotação de aproximadamente 30° para obter a superposição ótima das imagens tridimensionais de actina ou Hsp70 com ATP ligado, e da hexocinase sem ATP (Bork *et al.*, 1992). Esse dado indicou que, no primeiro caso, as estruturas estariam no estado fechado (actina e Hsp70) e, no segundo, estariam no estado aberto (hexocinase). Os resultados de cristalografia da proteína hexocinase reforçaram essa idéia, por demonstrarem a ocorrência de grande mudança na conformação da proteína, antes (aberto) e após a ligação do ATP (Bennett & Steitz, 1980; Steitz *et al.*, 1976).

De modo semelhante à estrutura do domínio de ligação de ATP de Hsp70 de bovinos e de ATPases, cBiP apresenta os domínios I e II e respectivos subdomínios IA e IIA, IB e IIB, formando uma díade quase simétrica (Figuras

2 e 4), sugerindo que as substituições de aminoácidos ocorridas na proteína deduzida do clone cBiP não alteram de forma significativa a sua estrutura no domínio de ligação de ATP. Contudo, conforme pode ser observado na Figura 2, a presença do resíduo G em BiP de soja é particularmente importante, pois ocupa posição equivalente ao resíduo D234 de Hsp70. Esse resíduo está diretamente envolvido na interação da proteína com a ribose do nucleotídeo, sendo, portanto, importante para a estabilização da ligação do ATP (Flaherty, *et al.*, 1994).

O modelo 3D de cBiP, com os resíduos de aminoácidos envolvidos nas ligações com ATP, são mostrados na Figura 4. Salienta-se que todas as proteínas Hsp70 descritas até o momento apresentam o resíduo D na mesma posição do resíduo G da proteína deduzida do clone cBiP (Figueiredo, 1998a, b). Ao passo que, em Hsp70, a ligação com o ATP é mediada por três pontes de hidrogênio, na proteína actina, somente duas ligações desse tipo são suficientes para manter o nucleotídeo ligado. Por esse motivo, foi cogitada a possibilidade de cBiP também manter a estabilidade de ligação do ATP com a formação de apenas duas pontes de hidrogênio com a ribose do nucleotídeo. Para testar essa hipótese, procedeu-se à

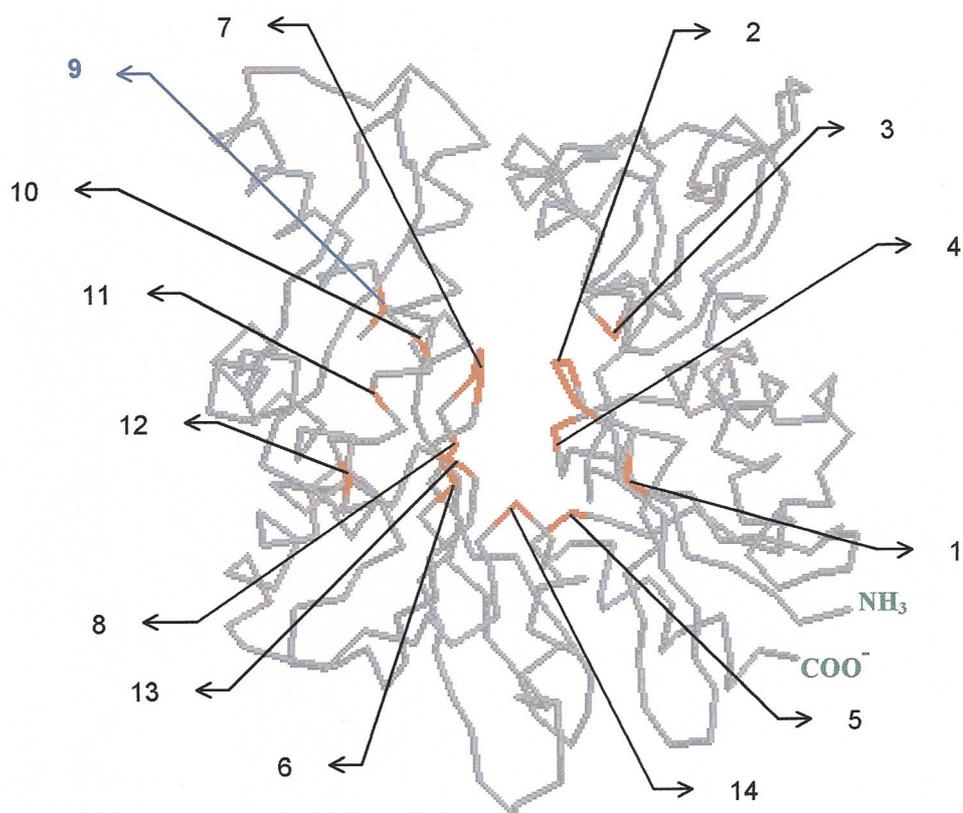
modelagem molecular por homologia da proteína Hsp70 de bovinos, substituindo apenas o resíduo D234 por G234. O resultado revelou que a energia livre necessária para manter a estrutura nativa da proteína é de +5,6 kCal. Valores positivos e tão elevados de energia livre são termodinamicamente incompatíveis com os sistemas biológicos; portanto, foi possível concluir que o gene cBiP não é funcional.

Em vários organismos, ficou demonstrado que BiP é essencial para manter a viabilidade celular. Várias mutações letais foram descritas na única cópia de BiP em leveduras. Em soja, foram identificadas quatro isoformas do gene BiP (Kalinski *et al.*, 1995; Figueiredo *et al.*, 1997; Figueiredo, 1998a,b), indicando a existência de uma família multigênica codificando a proteína. Em tabaco (Denecke *et al.*, 1991), milho (Boston, comunicação pessoal) e feijão (Figueiredo e Goulart Filho, dados não publicados), o gene que codifica BiP também foi descrito como uma família multigênica enquanto que, em espinafre, leveduras e animais existe apenas uma cópia de BiP por genoma (Anderson *et al.*, 1994; Ting & Lee, 1988). O significado exato de algumas espécies de plantas possuírem várias cópias do gene BiP, enquanto que outras apresentam apenas uma cópia, não é compreendido. Tem sido especulado que os diferentes membros da família multigênica codificam isoformas contendo pequenas diferenças de especificidade com o substrato e, por isso, desempenham funções diferentes, ou, ainda, que apresentam padrões de expressão diferentes para resposta aos estímulos ambientais.

O número de cópias de BiP em tabaco e soja poderia ser parcialmente explicado pelo caráter autotetraplóide dessas espécies. Também em milho, uma espécie considerada por muitos anos como sendo diplóide, a existência de várias cópias de BiP no genoma pode ser decorrente de poliploidia, a julgar pelas evidências recentes de sua origem alotetraplóide (Gaut & Doebley, 1997). Contudo, em

espinafre, uma espécie triplóide, a existência de apenas um gene BiP indicou que o número de cópias de BiP em uma espécie não se deve apenas à ocorrência de poliploidia. Além disso, no caso da soja, uma espécie autotetraplóide e de autofecundação, o isolamento de três isoformas de BiP em uma única variedade (Kalinski *et al.*, 1995) mostra claramente a existência de mais de dois *loci* para os genes BiP no genoma dessa espécie. Do mesmo modo, procedeu-se à modelagem molecular por homologia, dos genes identificados por Kalinski e colaboradores (1995) e novamente os resultados indicaram a presença de dois pseudogenes (dados não mostrados).

O conjunto dos resultados da análise por modelagem molecular de proteínas BiP da soja revelou que as várias cópias de BiP representam pseudogenes, e portanto, não representam alternativas evolutivas para atividade diferencial para resposta a diferentes tipos de estresse. Também em humanos, foram identificadas duas cópias de genes BiP, mas apenas uma era funcional, a outra era um pseudogene (Ting & Lee, 1988). Os resultados obtidos nesse estudo indicaram, ainda, a importância do método de modelagem molecular por homologia para estudos de genômica funcional. Atualmente, estamos empregando essa abordagem para analisar as diferentes isoformas deduzidas de cópias múltiplas do gene BiP, descritas em tabaco e milho, para verificar a possibilidade de ocorrência de pseudogenes de BiP nessas espécies.



número	posição	aminoácido	número	posição	aminoácido
1	1	Asp (D)	8	210	Asp(D)
2	17, 18 e 19	Thr(T), Thr(T) e Tyr(Y)	9	238	Gly(G)
3	75	Lys(K)	10	272	Glu(E)
4	154	Tyr(Y)	11	275	Lys(K)
5	180	Glu(E)	12	279	Ser(S)
6	203	Asp(D)	13	343	Gly(G)
7	206, 207 e 208	Gly(G), Gly(G) e Thr(T)	14	370	Asp(D)

Figura 4. Diagrama do domínio de ligação de ATP da proteína deduzida do clone cBiP. As regiões em vermelho mostram as posições dos resíduos de aminoácidos (relacionados na tabela) que interagem com ATP. A substituição do resíduo D (D234 em Hsp70 de bovinos), presente em todas as proteínas da família Hsp70, por G na proteína cBiP, foi destacada em azul. As extremidades N-terminal e carboxi-terminal estão representadas em verde. A estrutura tridimensional foi gerada usando ProMod/Swiss-Model (Peitsch, 1996) e processada no programa RasWin Molecular Graphics (Copyright© 1993, 1994; R. Sayle).

Referências Bibliográficas

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.

ANDERSON, J. V.; LI, Q. B.; HASKELL, D. W.; GUY, C. L. Structural organization of the spinach endoplasmic reticulum-luminal 70 kilodalton heat-shock cognate gene and expression of 70-kilodalton heat-shock genes during cold acclimation. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 104, p.1359-1370, 1994.

- BENNETT, W. S.; STEITZ, T. A. Structure of a complex between yeast hexokinase A and glucose. I. Structure determination and refinement at 3.5 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, London, v.140, p.183-209, 1980.
- BORK, P.; SANDER, C.; VALENCIA, A. An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin and hsp70 heat shock proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 89, p. 7290-7294, 1992.
- DENECKE, J.; GOLDMAN, M. H. S.; DEMOLDER, J.; SEURINCK, J.; BOTTERMAN, J. The tobacco luminal binding protein is encoded by a multigene family. **Plant Cell**, Rockville, v. 3, p.1025-1035, 1991.
- FIGUEIREDO, J. E. F.; CASCARDO, J. M.; CAROLINO, S. M. B.; FONTES, E. P. B. Water-stress regulation and molecular analysis of the soybean BiP gene family. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 9, n. 2, p.103-110, 1997.
- FIGUEIREDO, J. E. F. BiP-storage protein interactions and isolation of BiP cDNA and BiP genomic clones from soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, p. 579-580, 1998a..
- FIGUEIREDO, J. E. F. **Determinação da Interação BiP (Binding Protein)-Proteína de Reserva e Isolamento de Clones de cDNA e Genômicos de BiP da Soja [*Glicine max* (L.) Merrill]**. 1998b. 237 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte
- FLAHERTY, K. M.; DeLUCA-FLAHERTY, C.; MCKAY, D. B. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. **Nature**, London, v. 346, p. 623-628, 1990.
- FLAHERTY, K. M.; MCKAY, D. B.; KABSCH, W.; HOLMES, K. C. Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 88, p. 5041-5045, 1991.
- FLAHERTY, K. M.; WILBANKS, S. M.; DeLUCA-FLAHERTY, C.; MCKAY, D. B. Structural basis of the 70-kilodalton heat shock cognate protein ATP hydrolytic activity. II. Structure of the active site with ADP or ATP bound to wild type and mutant ATPase fragment. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 17, p.12899-12907, 1994..
- GAUT, B. S.; DOEBLEY, J. F. DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 94, p. 6809-6814, 1997.
- GAUT, J. R.; HENDERSHOT, L. M. Mutations within the nucleotide binding site of immunoglobulin-binding protein inhibit ATPase activity and interfere with release of immunoglobulin heavy chain. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, n.10, p. 7248-7255, 1993.
- HANKS, S. K.; QUINN, A. M.; HUNTER, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. **Science**, Washington, v. 241, n. 4861, p. 42-52, 1988.
- HURLEY, J. M. The sugar kinase/heat shock protein 70/actin superfamily: implications of conserved structure for mechanism. **Annual Review Of Biophysics and Biomolecular Structure**, Palo Alto, v. 25, p. 137-162, 1996.
- KABSCH, W.; MANNHERZ, H. G.; SUCK, D.; PAI, E. F.; HOLMES, K. C. Atomic structure of the actin: DNase I complex. **Nature**, London, v. 347, p. 37-44, 1990.

KALINSKI, A.; ROWLEY, D. L.; LOER, D. S.; FOLEY, C.; BUTA, G.; HERMAN, E. M. Binding-Protein expression is subject to temporal, developmental and stress-induced regulation in terminally differentiated soybean organs. **Planta**, Berlin, v. 195, p. 611-621, 1995.

MILARSKI, K. I.; MORIMOTO, R. I. Mutational analysis of the human HSP70 protein: distinct domains for nucleolar localization and adenosine triphosphate binding. **Journal of Cell Biology**, New York, v.109, p.1947-1962, 1989.

O'DONOVAN, C.; APWEILER, R.; BAIROCH, A. The human proteomics initiative (HPI). **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 19, p.178-81, 2001.

PEITSCH, M. C. ProMod and Swiss-Model. Internet based tools for automated comparative protein modelin. **Biochemical Society Transactions**, Assex, v. 24, p. 274-279, 1996.

PRODROMOU, C.; ROE, S. M.; O'BRIEN, R.; LADBURY, J. E.; PIPER, P. W.; PEARL, L. H. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. **Cell**, Cambridge, v. 90, p. 65-75, 1997.

RAMAKRISHNAN, M.; SCHÖNTHAL, A. H.; LEE, A. S. Endoplasmic reticulum stress-inducible protein GRP94 is associated with an Mg²⁺-dependent serine kinase activity modulated by Ca²⁺ and GRP78/BiP. **Journal of Cellular Physiology**, New York, v. 170, p. 115-129, 1997.

STEITZ, T. A.; FLETTERICK, R. J.; ANDERSON, W. F.; ANDERSON, C. M. (1976). High resolution x-ray structure of yeast hexokinase, an allosteric protein exhibiting a non-symmetric arrangement of subunits. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 104, p.197-222, 1976.

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

TING, J.; LEE, A. S. Human gene encoding the 78,000-Dalton glucose-regulated protein and its pseudogene: structure, conservation, and regulation. **DNA**, New York, v. 7, n. 4, p. 275-286, 1988.

WIERENGA, R. K.; HOL, W. G. J. Predicted nucleotide-binding properties of p21 protein and its cancer-associated variant. **Nature**, London, v. 302, p. 842-844, 1983.

WILBANKS, S. M.; DELUCA-FLAHERTY, C.; MCKAY, D. B. Structural basis of the 70-kilodalton heat shock cognate protein ATP hydrolytic activity. I Kinetic analysis of active site mutants. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 17, p. 12893-12898, 1994.

WILKINS, M. R.; LINDSKOG, I.; BAIROCH, A.; SANCHEZ, J. C.; APPEL, R. D. Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS—a World-Wide-Web-accessible tool. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 18, n. 3-4, p. 403-408, 1997.

XU, Z.; HORWICH, A. L.; SIGLER, P. B. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP) chaperonin complex. **Nature**, London, v. 388, p. 741-750, 1997.

ZHU, X.; ZHAO, X.; BURKHOLDER, W. F.; GRAGEROV, A.; OGATA, C. M.; GOTTESMAN, M. E.; HENDRICKSON, W. A. (1996). Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. **Science**, Washington, v. 272, n. 5268, p. 1606-1614, 1996.

Comunicado Técnico, 129

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Endereço: Rod. MG 424 Km 45 Caixa Postal 151
 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: 0xx31 3779 1000
Fax: 0xx31 3779 1088
E-mail: sac@cnpmis.embrapa.br

1ª edição
 1ª impressão (2005) Tiragem: 200

Comitê de Publicações

Presidente: Jamilton Pereira dos Santos
Secretário-Executivo: Paulo César Magalhães
Membros: Camilo de Lélis Teixeira de Andrade, Cláudia Teixeira Guimarães, Carlos Roberto Casela, José Carlos Cruz e Márcio Antônio Rezende Monteiro

Expediente

Supervisor editorial: Clenio Araujo
Revisão de texto: Dilermando Lúcio de Oliveira
Editoreção eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa