

LARISSA PEREIRA MIGUEL

**A FUNÇÃO DO CHAPERONE MOLECULAR BiP NA RESPOSTA A
ESTRESSES ABIÓTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Miguel, Larissa Pereira, 1992-

M636f
2019 A função do chaperone molecular BiP na resposta a estresses abióticos / Larissa Pereira Miguel. – Viçosa, MG, 2019. x, 59 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Pedro Augusto Braga dos Reis.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Chaperonas moleculares. 2. Plantas - Desenvolvimento. 3. Fisiologia vegetal. 4. Stress (Fisiologia). 5. Balanço hidrológico. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 572.6

LARISSA PEREIRA MIGUEL

**A FUNÇÃO DO CHAPERONE MOLECULAR BiP NA RESPOSTA A
ESTRESSES ABIÓTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 1 de fevereiro de 2019.



Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Coorientadora)



Maximiller Dal Bianco Lamas Costa



Murilo Siqueira Alves



Pedro Augusto Braga dos Reis
(Orientador)

Aos meus pais, Romulo e Maria Rosalina,
ao meu irmão Rodolfo,
ao meu amor Luiz Fernando,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado força, saúde e perseverança para chegar até aqui, por providenciar tudo que sou e que tenho;

Agradeço aos meus pais, Romulo e Maria Rosalina, e ao meu irmão, Rodolfo, por sempre sonharem comigo os meus sonhos e me auxiliarem na conquista deles. Obrigada por todo amor e por sempre estarem do meu lado;

Ao Luiz Fernando, pelo exemplo de dedicação. Pelos momentos de ensinamento e persistência nos experimentos. Por estar sempre do meu lado, inclusive nos períodos noturnos, finais de semana e feriados, sempre confiando em mim e me mostrando o meu potencial enquanto pesquisadora. Te Amo!

Aos meus avós, tios, primos e amigos por sempre rezarem e torcerem pelas minhas conquistas, estando sempre presentes em todas elas;

Ao professor Pedro Augusto pela orientação, paciência e confiança. Agradeço por cada cobrança de resultados, que me permitiram chegar aqui;

À professora Elizabeth Fontes por me permitir fazer parte do seu laboratório e por todos os ensinamentos;

Aos meus queridos “degas”, por terem sido minha família aqui em Viçosa e tornarem meus dias mais alegres e divertidos. Por toda dedicação e boa vontade em ajudar;

Aos demais membros do LBMP, agradeço a boa convivência, os momentos de conversa e diversão e também de ensinamento;

À melhor rep possível, Moitas, obrigada por todo carinho, por me darem um lar em Viçosa, por sempre me escutarem nos desabafos de experimentos, mesmo sem entenderem nada. Pela amizade maravilhosa construída e que quero levar para sempre;

À Universidade Federal de Viçosa, ao BIOAGRO e ao INCTIPP pela estrutura disponibilizada para a execução deste trabalho;

À Gláucia e Marlene por cuidarem do laboratório, ao Adriano pela casa de vegetação;

À CAPES pelo apoio financeiro;

E a todos que passaram pela minha vida durante a realização deste trabalho e que deixaram sua contribuição para a concretização do mesmo.

RESUMO

MIGUEL, Larissa Pereira, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **A função do chaperone molecular BiP na resposta a estresses abióticos.** Orientador: Pedro Augusto Braga dos Reis. Coorientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

A manutenção da homeostase em organismos vivos passa por mecanismos de percepção e propagação dos mais diversos sinais dentro da célula e do organismo como um todo por meio de complexas redes de sinalização. Vias de sinalização em planta possuem, muitas vezes, o papel de minimizar os efeitos deletérios de estresses bióticos e abióticos, por meio da ativação e repressão de genes específicos. Estes estresses são responsáveis por prejudicar o desenvolvimento e levar a perdas na produção. Desta maneira, diferentes estudos têm focado em elucidar estas vias de sinalização com a finalidade de obter cultivares superiores. Dentre estas, a via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR) e a via mediada por proteínas ricas em asparaginas (NRPs), que transduzem sinais de morte celular originados de estresse no retículo endoplasmático (RE) e osmótico, exercem um papel de atenuação dos estresses e alterações relacionadas ao desenvolvimento. A chaperona molecular residente do RE, BiP, foi demonstrada retardar a indução de morte celular em condições de estresse e a senescência natural, regulando, assim, ambas as vias de sinalização. No entanto, o mecanismo pelo qual BiP controla estas vias é totalmente desconhecido. Desta forma, os objetivos do presente trabalho foram (I) avaliar o papel do domínio ATPase e da atividade chaperona de BiP no processo de modulação das vias de resposta a estresses no RE, osmótico e de morte celular programada (II) Identificar possíveis candidatos moduladores supressores do mecanismo de tolerância à seca mediado por BiP. Foram geradas mutações no gene de BiPD no sítio de hidrólise do ATP (T44G) e no sítio de ligação ao ATP (G233D), com o propósito de demonstrar se a região chaperona de BiP influencia na sua modulação das vias de sinalização. A partir destes mutantes, diferentes técnicas foram utilizadas para demonstrar que estas mutações levaram à perda de função de BiP. Experimentos de estresse hídrico foram realizados demonstrando que as plantas transformadas com o gene mutado ficaram mais susceptíveis à morte celular. Através do tratamento com tunicamicina (indutor de estresse no RE), o nível de expressão de genes da UPR aumentou nas plantas BiPD-T44G e BiPD-G233D, além do fenótipo de morte celular ter sido mais agravante comprovado pelo experimento de Azul de Evans e de

infiltração. Além disso, o comportamento da indução de genes NRPs foi alterado nestas plantas, uma vez que houve um aumento da indução destes genes quando comparados com a planta superexpressando BiP. Os resultados obtidos indicam que a função chaperone de BiP está relacionada com a forma que BiP atua em resposta a estresse hídrico e estresse no RE. De forma a identificar possíveis moduladores do mecanismo de tolerância mediado por BiP, foram realizadas mutações com EMS em plantas superexpressando BiPD, e por meio do sequenciamento do genoma das mesmas foram selecionados possíveis supressores do mecanismo de tolerância à seca de BiP. Dentre os genes identificados, ZAR1 foi selecionado para estudo. Primeiramente foi demonstrado que ZAR1 apresenta expressão aumentada em plantas superexpressando BiPD. Além disso, foram obtidas plantas superexpressando e silenciadas para o gene ZAR1. Ensaio de infiltração de tunicamicina em *Arabidopsis thaliana* mostrou que plantas superexpressando ZAR1 apresentam menor grau de clorose decorrente do processo de morte celular, enquanto que em plantas knock-down para ZAR1 este processo foi acelerado. Estudos mostraram que o regulador de proteína G, RGS1, possui função de dessensibilizar a sinalização mediada por proteína G, além de estar envolvido na regulação em resposta à seca. Este mecanismo ainda não é totalmente conhecido, entretanto foi identificado que proteínas LRRRLK são responsáveis pela fosforilação de RGS1 ativando sua modulação das proteínas G. ZAR1 possui sítio de ligação à proteína G e pertence à família das LRRRLK, desta maneira ensaio de co-imunoprecipitação e ensaio de complementação de fluorescência bimolecular foram realizados e, a interação entre ZAR1 e RGS1 foi provada. No entanto, posteriores estudos precisam ser realizados para identificar o mecanismo envolvido nesta interação, além de qual resposta é desencadeada após essa interação. Estes resultados indicam uma correlação direta entre ZAR1 e morte celular induzida por tunicamicina e apontam favoravelmente para um envolvimento direto de ZAR1 como supressor do mecanismo de ação de BiP.

ABSTRACT

MIGUEL, Larissa Pereira, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **A function of molecular chaperone BiP in response to abiotic stress.** Advisor: Pedro Augusto Braga dos Reis. Co-advisor: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

The maintenance of homeostasis in living organisms involves a mechanism of perception and propagation of the most diverse signals within the cell and the organism as a whole through complex signaling networks. Signaling pathways in plants often have the role of minimizing the deleterious effects of biotic and abiotic stresses by activating and repressing specific genes. These stresses are responsible for impairing the development of plants leading to losses in production. In this way, different studies have focused on elucidating these signaling pathways in order to obtain superior cultivars. Among these, the pathway to unfolded proteins response (UPR) and the asparagine-rich proteins (NRPs)-mediated pathway, which transduce signs of cell death originating from stress in the endoplasmic and osmotic reticulum, exert a role of attenuation of the stresses and changes. The resident molecular chaperone of RE, BiP, has been shown to delays the induction of cell death under stress conditions and natural senescence, thereby regulating both signaling pathways. However, the mechanism by which BiP controls such pathways is totally unknown. Therefore, the objectives of the present work were (I) to evaluate the role of the ATPase domain and the chaperone activity of BiP in the process of modulating the stress response pathways in the ER, osmotic and programmed cell death (II) to identify possible candidate suppressor modulators of the BiP-mediated drought tolerance mechanism. BiPD gene specific mutations were generated at the ATP hydrolysis site (T44G) and at the ATP binding site (G233D), in order to demonstrate whether the BiP chaperone region influences its modulation of the signaling pathways. From these mutants, different techniques were used to demonstrate that such mutations led to loss of BiP function. Water stress experiment was performed demonstrating that the transgenic plants carrying the mutated gene were more susceptible to cell death. Through the treatment with tunicamycin (stress inducitor in RE), the level of UPR gene expression increased in the BiPD-T44G and BiPD-G233D plants, and the cell death phenotype was more aggravated by the Evans Blue experiment and the infiltration. In addition, the behavior of the induction of NRPs genes was altered in these mutated plants, since there was an increased induction

of these genes when compared to the plant overexpressing BiP. The results indicate that the chaperone function of BiP is related to the way that BiP acts in response to water stress and RE stress. In order to identify possible modulators of the mechanism of tolerance mediated by BiP, mutations with EMS were performed in BiPD overexpressing plants, and through the sequencing of the genome were selected possible suppressors of the mechanism of tolerance to drought of BiP. Among the identified genes ZAR1 was selected for study. First, ZAR1 gene has been shown up-regulate in BiPD overexpressing line. Moreover, ZAR1 overexpressing and silencing lines were obtained. Tunicamycin infiltration in *Arabidopsis thaliana* showed that ZAR1 overexpressing lines showed a lower chlorosis level due to the cell death process, whereas in ZAR1 knock-down plants this process was accelerated. Studies have shown that the G protein regulator, RGS1, has the function of desensitizing the G protein-mediated signaling, besides being involved in regulation in response to drought. This mechanism is not yet fully understood, however it is showed that LRRRLK proteins are responsible for the phosphorylation of RGS1 activating its G protein modulation. ZAR1 has a G protein binding site and belongs to the LRRRLK family, in this way co-immunoprecipitation assay and bimolecular fluorescence complementation assay were performed and the interaction between ZAR1 and RGS1 was proved. However, further studies are necessary to identify the mechanism involved in this interaction, in addition to which response is triggered after this interaction. These results indicate a direct correlation between ZAR1 and tunicamycin-induced cell death and favorably point to a direct involvement of ZAR1 as a suppressor of the BiP action mechanism.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1. Obtenção das construções de DNA	11
2.2. Transformação de planta	11
2.3. Preparo de células competentes e expressão heteróloga	12
2.4. Purificação de proteínas fusionadas a GST e expressas em <i>E. coli</i>	12
2.5. Cromatografia de afinidade com resina ATP-agarose.....	13
2.6. Experimentos de Tolerância à seca	13
2.7. Estresse em plântulas de <i>Arabidopsis</i>	14
2.8. Ensaio de morte celular pelo método de coloração com azul de Evans	14
2.9. Extração de RNA de plântulas de <i>Arabidopsis</i> e síntese de cDNA	14
2.10. PCR em tempo real.....	15
2.11. Análise do efeito das mutações em morte celular induzida.	15
2.12. Técnicas de Biologia Molecular.....	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4. CONCLUSÃO	29
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
FIGURAS SUPLEMENTARES	33
ANEXO.....	35
CAPÍTULO 2	38
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1. Mutagênese	41
2.2. Obtenção das construções de DNA	41
2.3. Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	42
2.4. Localização subcelular e microscopia confocal.	43
2.5. Ensaio de Complementação de Fluorescência Bimolecular (BiFC).	44
2.6. Coimunoprecipitação	44
2.7. Transformação de <i>Arabidopsis</i> e seleção de transformantes independentes	45
2.8. Extração de RNA de plântulas de <i>Arabidopsis</i> e síntese de cDNA	46

2.9. PCR em tempo real	46
2.10. Técnicas de Biologia Molecular	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4. CONCLUSÃO	57
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

Introdução Geral

As plantas são organismos sésseis e estão constantemente submetidas a variações ambientais e a condições adversas. Desta forma, estão sujeitas a uma variedade de estresses bióticos (causados por microrganismos, herbívoros ou vírus) e de estresses abióticos (disponibilidade de água, nutrientes, variação de temperatura). Estes estresses são responsáveis por prejudicar o crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas, induzindo a perda de produção de grandes culturas voltadas para o agronegócio.

O estudo da fisiologia molecular dos vegetais frente às diferentes condições de cultivos e estresses ambientais é de grande relevância para a melhoria da produtividade e manejo de culturas. A fim de minimizar os efeitos deletérios nas células, uma das formas utilizadas pelas plantas para lidar com os estresses é a ativação de vias de sinalização com consequente alteração na expressão de genes específicos, cuja função seja garantir a sobrevivência da planta. Portanto, entender estas vias de sinalização tem sido fundamental para obtenção de cultivares superiores, visando aumentar a produtividade, diminuir o custo no cultivo e tornar as plantas mais tolerantes aos estresses.

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela essencial envolvida em diversas respostas a estresse. O RE contém chaperones moleculares os quais aparentemente funcionam como sensores de alterações na quantidade e qualidade de proteínas que atravessam a organela. As plantas podem potencialmente utilizar esta maquinaria de reconhecimento para estimular respostas rápidas durante condições de estresses (Cascardo *et al.*, 2000; Reis *et al.*, 2011; Valente *et al.*, 2009; Howell, 2013; Srivastava *et al.*, 2013). O potencial de BiP como modulador da via UPR (Bertolotti *et al.*, 2000; Howell, 2013; Xu *et al.*, 2013; Srivastava *et al.*, 2013) e a sua capacidade de aumentar a tolerância de plantas transgênicas sob condições de déficit hídrico (Alvim *et al.*, 2001; Valente *et al.*, 2009) evidenciam que a via UPR e a via de sinalização a estresse osmótico convergem molecularmente ou compartilham respostas integradas de defesa dependentes de BiP.

A sobreposição do transcriptoma de soja, induzido por PEG (estresse osmótico) e por tratamentos com tunicamicina e AZC (agentes indutores da via UPR), identificou uma série de genes que codificam proteínas regulatórias com o potencial de integrar as duas vias de sinalização a estes estímulos abióticos em uma resposta

potencializada (Irsigler *et al.*, 2007). Estas respostas fisiológicas representam uma via de sinalização mediada por proteínas ricas em asparagina (NRPs), que transduz sinais de morte celular originados por estresses no RE e estresse osmótico. Esta é uma via de sinalização de morte celular programada (PCD) específica de plantas e tem sido caracterizada como uma relevante resposta adaptativa a estresses e a eventos de desenvolvimento, como senescência natural de folhas (Costa *et al.*, 2008; Faria *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2011; Mendes *et al.*, 2013; Reis *et al.*, 2012; Pimenta *et al.*, 2016; Reis *et al.*, 2016). Esta resposta é acionada como medida protetora contra condições extremas de estresses em que são submetidas as células vegetais.

NRP-A e NRP-B são proteínas marcadoras do processo de morte celular programada induzida por estresse osmótico e do RE, que apresentam na região C-terminal o domínio conservado DCD (Development and Cell Death), além de um domínio adicional rico em asparagina (Ludwig e Tenhaken 2001; Irsigler *et al.*, 2007, Costa *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2011, 2012). Assim como NRP, GmNAC81 é um fator de transcrição que tem sua expressão aumentada em condições de estresse osmótico e do RE, apresentando resposta sinérgica a ambas induções, além de ter sido provado sua atuação jusante dos NRPs (Faria *et al.*, 2011). Da mesma forma, o transfator GmNAC30 é induzido em plantas de soja submetidas a ambos os estresses e também atua *downstream* a NRPs na via de morte celular (Mendes *et al.*, 2013). O componente *upstream* da via de morte celular mediada por NRP, GmERD15 (*Glycine max* Early Responsive to Dehydrate 15), é um fator de transcrição localizado no núcleo das células e é induzido por estresses osmótico e do RE, o qual se liga no promotor de NRP-B e induz a expressão deste gene (Alves *et al.*, 2011). No núcleo de células vegetais estressadas, GmNAC30 interage com GmNAC81 para se ligar em promotores e ativar expressão de genes codificadores de enzimas hidrolíticas, principalmente VPE (vacuolar processing enzyme; Mendes *et al.*, 2013). VPE é uma proteína com atividade *caspase-1-like*, que atua como um executor da resposta de morte celular induzida por stress no RE e osmótico (Mendes *et al.*, 2013) (Figura 1).

A chaperona molecular residente do RE, BiP, possui importante papel nesta via de sinalização. A atuação de BiP se dá pela modulação da indução de marcadores de morte celular, como NRP-A, NRP-B e GmNAC81, os quais estão envolvidos na transdução de sinais para o processo de morte celular originado do RE e por estresse osmótico (Valente *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2011)

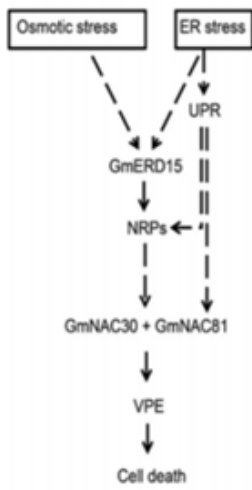


Figura 1. Via de sinalização de morte celular mediada por NRP/DCDs em resposta aos estresses osmótico e do retículo endoplasmático. O esquema ilustra a propagação de um sinal de morte celular, derivado da exposição da planta a estresses osmótico e do retículo por um período prolongado, através da ativação da via de sinalização de PCD mediada por NRP/DCDs. Setas tracejadas indicam um efeito na expressão do gene, enquanto setas cheias indicam que o gene é um alvo imediato a jusante. UPR, unfolded protein response (Mendes *et al.*, 2013).

Esta via de morte celular programada mediada por proteínas NRPs é conservada em plantas. No genoma de *Arabidopsis thaliana* estão presentes ortólogos dos componentes da via, como AtNRP-1 e AtNRP-2 ortólogos de GmNRP-A e GmNRP-B, ANAC036 ortólogo de GmNAC081 e gVPE ortólogo de VPE. Assim como em soja, estes genes são induzidos em condições de estresse osmótico e do RE e quando expressadas transientemente em folhas de *Nicotiana benthamiana* foram capazes de induzir morte celular. Também foi demonstrada, que assim como em soja, a chaperona molecular BiP modula a via, regulando negativamente a expressão gênica desses genes indutores de morte celular. (Reis *et al.*, 2016).

Em plantas, a expressão de BiP é induzida em resposta a uma variedade de estresses bióticos e abióticos, exibindo uma regulação da expressão complexa, com múltiplos mecanismos reguladores de controle (Cascardo *et al.*, 2001; Reis *et al.*, 2011; Srivastava *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013; Valente *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2014; Reis *et al.*, 2016).

Assim sendo, a proteína BiP parece ter uma função protetora geral contra uma diversidade de estresses impostos pelas condições adversas do meio ambiente. Embora o papel de BiP seja considerado de relevância em eventos de tolerância a seca, o mecanismo pelo qual BiP controla a via de morte celular mediada por NRPs é totalmente desconhecido. Assim, este presente trabalho teve como objetivos (I) avaliar o papel do domínio ATPase e da atividade chaperona de BiP no processo de modulação das vias de resposta a estresses no RE, osmótico e de morte celular programada (II) Identificar possíveis candidatos moduladores supressores do mecanismo de tolerância à seca mediado por BiP. O primeiro objetivo será abordado no primeiro capítulo

intitulado “A atividade chaperona de BiP é essencial para a tolerância a estresses em Arabidopsis”. O segundo objetivo será apresentado no capítulo II intitulado “ZAR1 possível supressor do mecanismo de tolerância mediado por BiP”.

Referências Bibliográficas

Alves, M. S. *et al.* A novel transcription factor, ERD15 (Early Responsive to Dehydration 15), connects endoplasmic reticulum stress with an osmotic stress-induced cell death signal. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 22, p. 20020-20030, 2011

Alvim F. C. *et al.*, Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiol* 126: 1042-1054, 2001.

Bertolotti A, Zhang YH, Hendershot LM, Harding HP, Ron D, Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2:326–332, 2000.

Carvalho HH, Brustolini OJB, Pimenta MR, Mendes GC, Gouveia BC, *et al.* The Molecular Chaperone Binding Protein BiP Prevents Leaf Dehydration-Induced Cellular Homeostasis Disruption. *PLoS ONE* 9(1): e86661, 2014.

Cascardo J. C. M. *et al.*, The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses. *J Biol Chem* 275: 14494-14500, 2000.

Costa, M. D. L. *et al.* A new branch of endoplasmic reticulum stress signaling and the osmotic signal converge on plant-specific asparagine-rich proteins to promote cell death. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, p. 20209–20219, 2008.

Faria, J. A. Q. A. *et al.* The NAC domain-containing protein, GmNAC6, is a downstream component of the ER stress- and osmotic stress-induced NRP-mediated cell-death signaling pathway. *BMC Plant Biology*, v. 11, n. 129, p. 1-14, 2011.

Howell SH. Endoplasmic reticulum stress responses in plants. *Annu Rev Plant*; 64:477–99, 2013.

Irsigler, A. S. T. *et al.* Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways. *BMC genomics*, v. 8, n. 431, 2007.

Ludwig AA, Tenhaken R., A new cell wall located N-rich protein is strongly induced during the hypersensitive response in *Glycine max* L. *Eur J Plant Pathol* 107:323–336, 2001.

Mendes, G. C. *et al.* GmNAC30 and GmNAC81 integrate the endoplasmic reticulum stress–and osmotic stress–induced cell death responses through a vacuolar processing enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 110, p. 19627–32, 2013

Pimenta, M. R. *et al.* The Stress-Induced Soybean NAC Transcription Factor GmNAC81 Plays a Positive Role in Developmentally Programmed Leaf Senescence. *Plant Cell Physiol.*, v. 57, n. 5, p. 1098-1114, 2016.

Reis, P. A. B. *et al.* The Binding Protein BiP Attenuates Stress-Induced Cell Death in Soybean via Modulation of the N-Rich Protein-Mediated Signaling Pathway. *Plant Physiology*, v. 157, n. 4, p. 1853–1865, 2011

Reis, P. A. B.; FONTES, E. P. B. N-rich protein (NRP)-mediated cell death signaling: a new branch of the ER stress response with implications for plant biotechnology. *Plant Signaling & Behavior*, v. 7, n. 6, p. 628-632, 2012.

Reis, P. A. B. *et al.*, Functional and regulatory conservation of the soybean ER stress-induced DCD/NRP-mediated cell death signaling in plants. *BMC Plant Biology (Online)*, v. 16, p. 156, 2016

Srivastava R, Deng Y, Shah S, Rao AG, Howell SH. BINDING PROTEIN is a master regulator of the endoplasmic reticulum stress sensor/transducer bZIP28 in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 25:1416–29, 2013.

Valente M. A. S. *et al.*, The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. *J Exp Bot* 60: 533-546, 2009.

Xu, H., Xu, W., Xi, H., Ma, W., He, Z., and Ma, M., The ER luminal binding protein (BiP) alleviates Cd²⁺-induced programmed cell death through endoplasmic reticulum stress-cell death signaling pathway in tobacco cells. *J. Plant Physiol.* 170, 1434–1441, 2013.

Capítulo 1

A atividade chaperona de BiP é essencial para a tolerância a estresses em Arabidopsis

1. Introdução

O controle da qualidade da célula pode ser alterado, promovendo uma situação de estresse, quando ocorre o acúmulo de proteínas incorretamente enoveladas devido a alterações das funções do RE (Trombetta e Parodi, 2003).

Tais condições de estresse podem atuar diretamente sobre a homeostase do RE, organela que está altamente envolvida em processos como síntese de proteínas, dobramento, processamento e controle de qualidade de proteínas secretoras recentemente sintetizadas, além da manutenção da homeostase de Ca^{2+} (Silva *et al.*, 2015).

O estresse gerado no RE ativa a via de resposta a proteínas mal dobradas (*unfolded protein response*, UPR). Para minimizar o acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen do RE, uma via de degradação de proteínas (ERAD) é ativada por um sistema de controle de qualidade de proteína (PQC). Além deste mecanismo de degradação de proteínas mal dobradas, durante uma situação de estresse e elevada síntese destas, ocorre degradação de RNA mensageiros que codificam proteínas secretoras com o propósito de reduzir as demandas dos dobramentos de proteínas (Liu *et al.*, 2016).

Enquanto que em mamíferos a ativação da UPR ocorre por meio da ativação de três tipos de transdutores de sinal associados à membrana do RE, duas proteínas quinases, PERK (*protein kinase RNA-like ER kinase*) e Ire1 (*inositol-requiring protein-1*), e um fator de transcrição ATF6 (*activating transcription factor-6*), em plantas, esta ativação consiste de fatores de transcrição associados à membrana e uma enzima de processamento de RNA (Ire1). Em Arabidopsis, os análogos de ATF6 são os bZIP17 e bZIP28 e os ortólogos de Ire1 são Ire1a e Ire1b (Liu *et al.*, 2016).

A chaperona molecular residente do RE, BiP, se encontra conectada bZip28 durante condições normais. Em situações de estresse, Ire1 reconhece e provoca o *splicing* de RNAm bZip60, que é importado para o núcleo e ativa a transcrição de genes da UPR e, bZip28 se desloca para o complexo de Golgi onde é clivado por proteases e então direcionado para o núcleo para também ativar a transcrição de genes da UPR (Li *et al.*, 2017).

A superexpressão de BiP em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), soja (*Glycine max*) e Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) aumenta a tolerância a estresse hídrico, provoca um atraso no processo de senescência e atenua o estado de

estresse do RE, sugerindo um papel para BiP na regulação da ativação da UPR. Além disso, demonstrou modular a via a partir da resposta mediada por proteínas ricas em asparaginas (NRP) (Alvim *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2008; Valente *et al.*, 2009, Reis *et al.*, 2016).

A via de sinalização mediada por NRPs é específica de plantas sendo ativada quando estresse osmótico e estresse no RE são integrados, por meio da ativação de proteínas ricas em asparaginas com domínio de morte celular (DCD/NRP), fatores de transcrição (GmNAC81 e GmNAC30), enzima de processamento vacuolar (VPE) o qual possui atividade de caspase e induz morte celular por colapso do vacúolo. Esta via de sinalização mediada por NRPs também é ativada por estresse hídrico (Reis *et al.*, 2012).

BiP é responsável por modular esta via, uma vez que a sua superexpressão atrasa a resposta de morte celular por estresse osmótico, estresse no RE e durante eventos de seca, promovendo melhor adaptação de linhagens transgênicas durante estresse hídrico. Em soja, BiPD atua modulando o nível de expressão e a atividade de genes relacionados com a via de mediada por NRP, como GmNRP-A, GmNRP-B, GmNAC81 e VPE (Reis *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2014).

Esta sinalização de morte celular é conservada em outras plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas, sendo assim conservada em *Arabidopsis* (Reis *et al.*, 2016). Os genes *AtNRP1* e *AtNRP2* transduzem sinal de morte celular em *Arabidopsis*, uma vez que a perda de função de *AtNRP1* e *AtNRP2* aliviou a morte celular induzida por estresse no RE, enquanto que a superexpressão de *AtNRP2* aumentou o processo de morte celular. Além disso, a modulação da via a partir da chaperona BiP também é conservada em *Arabidopsis* (*BiP1* e *BiP2*).

Pertencente à família Hsp70, BiP interage com proteínas nascentes prevenindo o enovelamento incorreto destas. Foram identificadas quatro isoformas de BiP em soja (Kalinski *et al.*, 1995; Figueredo *et al.*, 1997), oito em tabaco e três em *Arabidopsis* (Snowden *et al.*, 2007).

BiP consiste em um domínio de ligação de proteína C-terminal e um domínio de ligação ao ATP N-terminal. A habilidade de BiP se ligar e desligar das proteínas mal dobradas é regulada por ciclos de ligação de ATP, hidrólise e troca de nucleotídeos, os quais são controlados por diversos co-fatores. Quando BiP está ligada com o ATP, seus domínios estão próximos e sua afinidade com o substrato é fraca. Co-chaperonas, como

ERdj3, são responsáveis por introduzir os substratos em BiP aumentando sua atividade ATPase. Deste modo, com a hidrólise do ATP, os domínios de BiP se distanciam e a ligação do substrato com BiP se torna forte. Para liberar o substrato e disponibilizar BiP para outro ciclo, o ADP deve ser trocado por ATP, o qual ocorre mediante fatores de troca de nucleotídeo (NEFs), como Grp170 e Sil1 (Behnke et al., 2015). Portanto, a atividade ATPase e a ligação do ATP são críticas para a atividade chaperona de BiP, pois regulam os ciclos de ligação e liberação da proteína com o peptídeo (Snowden et al., 2007).

O mecanismo molecular para modulação de BiP em resposta a estresses no RE, osmótico e de morte celular programada, ainda é incipiente. Assim, no referido trabalho evidenciamos a importância da atividade chaperone de BiP no mecanismo de resposta a estresse. Com base na homologia de sequência foram geradas mutações no sítio de hidrólise de ATP e no sítio de ligação ao ATP do gene de BiPD de soja. Estas mutações mostraram alteração na capacidade de ligação e hidrólise de ATP. Além disso, plantas transformadas com estes genes mutados não apresentaram as respostas moleculares características da superexpressão do gene de BiPD intacto. Sugerindo a importância da atividade chaperona de BiP em mecanismos de tolerância a estresse.

2. Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, o qual se localiza no Instituto de Biotecnologia aplicada à Agropecuária – BIOAGRO na Universidade Federal de Viçosa e está associado ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) em Interações Planta-Patógeno.

2.1. Obtenção das construções de DNA

Para obter as mutações de BiPD, pDONR221 contendo a sequência de BiPD foi utilizado para amplificar o DNA utilizando primers de BiPD mutado (T44G e G233D). Os vetores amplificados com as mutações foram purificados e, depois, usados na reação de ligase (Promega). A reação de ligase foi utilizada para transformar *E.coli* DH5 α , para gerar pDONR221-BiPD-T44G e pDONR221-BiPD-G233D. Esses vetores de entrada foram utilizados para transferir, por reação de LR clonase, para o vetor de destino pK7WG2, originando pK7WG2-BiPD-T44G e pK7WG2-BiPD-G233D (Reis, 2014). Os DNAs plasmidial BiPD, BiPD-T44G e BiPD-G233D foram previamente extraídos por Reis (2014). A partir destes DNAs, foi realizada a clonagem em vetor de expressão em bactéria, pDEST15, em DH5 α , obtendo os clones BiPD-pDEST15 (pUFV3164), BiPD-T44G-pDEST15 (pUFV3165) e BiPD-G233D-pDEST15 (pUFV3166), e posteriormente foram transferidos para a linhagem BL21 *pLysS*.

2.2. Transformação de planta

Para obtenção de linhagem transgênica de *Arabidopsis*, o DNA plasmidial dos clones pK7GW2-BiPD-T44G e pK7GW2-BiPD-G233D foi extraído e utilizado para transformar *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101 por eletroporação (2500 mV, 3-4 ms). O transformante foi plaqueado e selecionado em meio de cultura LB contendo gentamicina (50mg/L) e espectomicina (100mg/L) e confirmado via PCR. A colônia confirmada foi inoculada em meio LB contendo os mesmos antibióticos de seleção a 28°C até atingir a OD_{600nm} = 0,6-0,8. A cultura foi centrifugada por 6000 x g por 10 min

a 25°C. O *pellet* foi ressuspensionado em solução sacarose 5% (m/v) contendo Silwet-L77 0,02% (v/v). *Arabidopsis Col-0* foi transformada pelo método do mergulho do pendão floral por três semanas consecutivas (Bent et al, 2006). Duas linhagens independentes de cada mutação, BiPD-T44G pl1, BiPD-T44G pl5, BiPD-G233D pl1, BiPD-G233D pl3 foram selecionadas para análises posteriores.

2.3. Preparo de células competentes e expressão heteróloga

As células da *E. coli* da estirpe BL21:DE3 (*pLys*) foram cultivadas em 5mL de LB contendo o antibiótico de seleção cloranfenicol (35 mg/mL). A cultura foi centrifugada a 6000 g por 2 minutos e o *pellet* foi ressuspensionado em 1000 µL de CaCl₂ 0,1M. Esta solução foi novamente centrifugada e o *pellet* ressuspensionado em 150 µL do CaCl₂ 0,1 M (Sambrook *et al*, 1989). As alíquotas de 75 µL foram transformadas com cada plasmídeo, pelo método de choque térmico, e a cultura crescida foi plaqueada em meio LB sólido contendo os antibióticos de seleção, ampicilina (100 mg/L) e cloranfenicol (35 mg/mL). Os transformantes foram confirmados por PCR e o produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1% (p/v). Os transformantes selecionados foram pré-inoculados em 5 mL meio LB acrescido dos antibióticos de seleção por 16 horas. Em seguida foram diluídos em 500 mL de meio LB contendo os mesmos antibióticos e a cultura foi incubada a 37°C, 150 rpm até atingir OD_{600nm}= 0,4 - 0,6. Em seguida, foi adicionado isopropil-β-Dthiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 1,0 mM e a cultura foi incubada a 20°C, 120 rpm por 16 horas. A cultura foi centrifugada a 10000 x g por 10 minutos a 4°C e submetidas ao protocolo de purificação.

2.4. Purificação de proteínas fusionadas a GST e expressas em *E. coli*.

As células sedimentadas de *E. coli*, expressando as proteínas de interesse, foram ressuspensionadas em tampão de lise (NaCl 150 mM, Tris pH7,4 50mM, EDTA 2mM e DTT 2mM) com adição de inibidores de protease, PMSF 30 µM, Benzamidina 1 µg/mL e Thiourea 1µg/mL. Nesta solução, foram também adicionados 300 µg.mL⁻¹ de lisozima, mantendo-se por 30 minutos no gelo. A lise celular foi obtida por

ultrassonicação com os padrões de pulso 5, amplitude 60/80, por 15 segundos. Em seguida, o material foi centrifugado a 10000 x g por 30 minutos e filtrado em membrana 0,45 µm, para a remoção de restos celulares e obtenção do sobrenadante. Ao sobrenadante, foi adicionado a resina Glutathione Sepharose 4B (GE HealthCare), previamente equilibrada com o tampão PBS 1X. Após 4 horas sob agitação lenta, as proteínas aderidas à resina foram eluídas com o tampão de eluição contendo glutathione reduzida (L-glutathione reduzida (Sigma), Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). Uma alíquota do eluato foi analisada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% (m/v) e quantificado pelo método de Bradford (1976) para verificar a eficiência da expressão e purificação.

2.5. Cromatografia de afinidade com resina ATP-agarose

Ensaio de cromatografia de afinidade utilizando resina de ATP foi realizado para determinar a ligação das proteínas mutadas com a molécula de ATP. As amostras de proteínas purificadas foram separadas em duas alíquotas de mesmo volume. Uma amostra foi determinada fração total e a outra fração foi incubada por 16 horas a 4°C com a resina de ATP. Após as 16 horas foi centrifugada, o qual o sobrenadante foi designado fração não ligante e, o pellet após 3 lavagens com tampão de equilíbrio (20mM Tris-HCL pH 7,8, 20 mM NaCl, 10 mM MgSO₄) foi denominado fração ligante.

2.6. Experimentos de Tolerância à seca

O ensaio de tolerância à seca foi realizado com linhagens superexpressando BiPD, BiPs mutadas e Col-0, de 3 semanas após a germinação. Após a germinação em placas de meio MS, as plantas de 14 dias de idade foram transplantadas para potes, previamente pesados com um solo misto e bem irrigado. Os potes foram distribuídos aleatoriamente nas bandejas, e as bandejas rotacionadas frequentemente durante o estresse. Após 15 dias de adaptação, as plantas foram cultivadas em estufa (22 °C, 8 h de luz / 14 h de ciclo escuro) por 18 dias, com irrigação suspensa. Após o estresse, foi adicionada a mesma quantidade de água em todas as bandejas. Após 2 dias foi analisada a taxa de sobrevivência.

2.7. Estresse em plântulas de Arabidopsis

Para os ensaios de indução de estresse no retículo endoplasmático, inicialmente plântulas de Arabidopsis foram germinadas em meio MS (½ força) (MURASHIGE & SKOOG, 1962). Transcorridos 15 dias, estas foram transferidas para placas de 12 poços contendo meio MS (¼ força) líquido, e deixadas aclimatando por 24 h. O tratamento foi iniciado pela substituição do meio por uma solução de Tunicamicina (TUN) 2,5 µg/mL em meio MS (¼ força) líquido. Foram utilizadas 4 repetições, sendo cada uma composta por 5 plântulas para o experimento de qRT-PCR. Para o controle (tempo de 0 h), utilizou-se meio MS (¼ força) líquido acrescido de DMSO (para o tratamento com tunicamicina). Os tempos de tratamento foram de 0 h e 8 h.

Indução de morte celular por tunicamicina também foi feita por infiltração em folhas 5 semanas após a germinação, conforme descrito por Cai *et al.* (2007). Tunicamicina a 15 µg/mL (ou DMSO) foi infiltrada com uma seringa em folhas de plantas de Arabidopsis de cinco semanas.

2.8. Ensaio de morte celular pelo método de coloração com azul de Evans

As plântulas de Arabidopsis foram induzidas em condições de estresse no retículo endoplasmático, a partir do tratamento com uma solução de Tunicamicina (TUN) 10 µg/mL em meio MS (¼ força) líquido por 24 e 48 horas. Após a indução, as plântulas foram coradas com azul Evans a 2% (p / v) durante 5 min e depois foram lavadas extensivamente com água.

2.9. Extração de RNA de plântulas de Arabidopsis e síntese de cDNA

A extração de RNA das linhagens transgênicas foi conduzida pelo método do Trizol (Invitrogen), seguido por precipitação com isopropanol. A qualidade e a integridade do RNA foram monitoradas, respectivamente, por espectrofotômetro e por eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,5 %. Cerca de 4 µg de RNA foram tratados com DNase livre de RNase (Invitrogen) e utilizados para obtenção do cDNA,

usando a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) e oligo-dT, de acordo com determinação do fabricante.

2.10. PCR em tempo real

Todos os procedimentos de PCR em tempo real, incluindo testes, validações e experimentos, foram conduzidos seguindo informações contidas nos manuais fornecidos pela Applied Biosystems. As reações foram conduzidas no equipamento ABI7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), usando SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems).

As reações de amplificação foram realizadas utilizando-se 20 ng de cDNA, primers e o protocolo descrito a seguir: 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos a 94°C por 15 s e 60°C por 1 min, seguido da etapa de dissociação. A expressão de genes foi avaliada utilizando o método comparativo de Ct: $2^{-\Delta Ct}$. Os oligonucleotídeos específicos para os cDNAs dos tratamentos foram utilizados (Tabela 1) e o gene da actina foi utilizado como controle endógeno para a normalização dos dados.

2.11. Análise do efeito das mutações em morte celular induzida.

Neste experimento foi avaliada a possível interação dos mutantes de BiP com a via UPR. A expressão de componentes da via BiP3 e bZip28 foi avaliada por qRT-PCR, sob condições de estresse.

2.12. Técnicas de Biologia Molecular

Todas as técnicas de Biologia Molecular, incluindo preparação de plasmídeos, extração de RNA, DNA genômico, DNA plasmidial, transformação de bactérias, síntese de cDNA, dentre outras, foram conduzidas segundo protocolos fornecidos pelo fabricante ou contidos em Sambrook *et al* (1989).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados no trabalho

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')
qRTACTIN FWD	ATGTCGTGAGCCATCCCTGTC
qRTACTIN RVS	ACACCGGATTCGTGCGGCAT
qRTBiP3 FWD	CACGGTTCCAGCGTATTTCAAT
qRTBiP3 RVS	ATAAGCTATGGCAGCCACCGTT
qRTbZiP28 FWD	CAGTCGCTACGAACAACGAA
qRTbZiP28 RVS	AGCTGAGCACTTTCACGGTT
qRTBiP1 FWD	TCACTTGGGAGGTGAGGACTTT
qRTBiP1 RVS	CTCACATTCCCTTCGGAGCTTA
qRTNRP1 FWD	CAAACGCCAGCTTTTCGGATTG
qRTNRP1 RVS	TGAGCACGCTCTTCTTGCTTTCA
qRTNRP2 FWD	TGCTACTGCTTGGGAAGACA
qRTNRP2 RVS	TCCAAGGCTTTGCAGATTTT

de ligação ao ATP. Este resultado oposto pode ser explicado por dois motivos, (1) o autor utilizou expressão transiente em protoplastos, realizando o experimento *in vivo*, podendo existir alguma modificação pós-traducional em BiP realizada pela célula, enquanto que nos experimentos realizados neste trabalho foram utilizadas proteínas purificadas por meio de expressão heteróloga em bactéria, (2) na região conservada da mutação existem 3 resíduos de glicina consecutivos e a mutação foi realizada na primeira glicina, o que não exclui, assim, o potencial efeito dos outros dois resíduos de glicina, (3) interferência da tag-GST no papel de BiP.

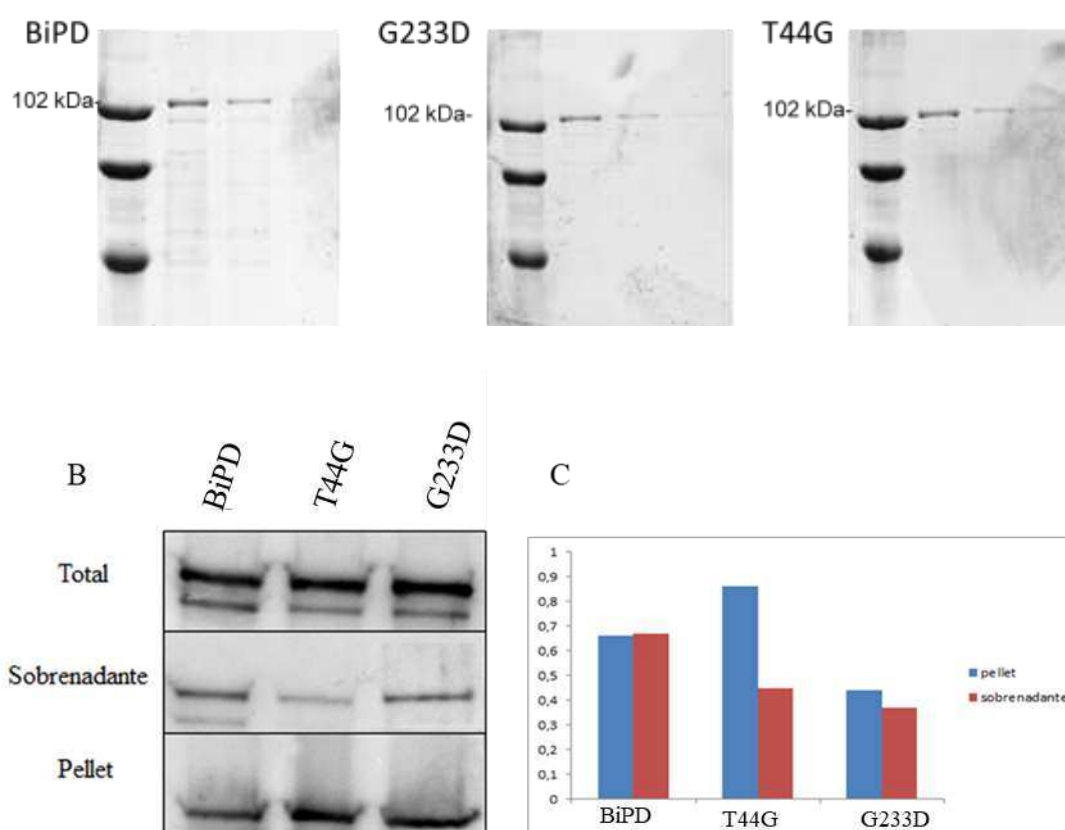


Figura 2: Caracterização de mutantes da proteína de ligação (BiP) com ligação alterada de ATP. (A): Purificações das proteínas expressas em bactéria sob mesmas condições, utilizando resina Glutathione Sepharose 4B. As canaletas 1, 2 e 3 se referem ao 1º, 2º e 3º eluatos. As proteínas purificadas apresentam massa molecular igual a 102 KDa (26 KDa da tag GST + 76 KDa da proteína BiPD). (B): Análise da afinidade ao ATP das proteínas purificadas, de acordo com a intensidade da banda do *western blotting* revelado com anti-BiP. Fração total é a fração retirada antes da cromatografia de afinidade com a resina de ATP, sobrenadante é a fração que não se ligou na resina de

ATP após a cromatografia, e pellet é a fração ligante à resina de ATP após a cromatografia. (C) Quantificação das proteínas detectadas em (B), o qual o pellet está representado em azul e o sobrenadante em vermelho, ambas foram calculadas em relação ao total.

Mutações no domínio de ligação ao ATP promovem a perda da tolerância a seca mediada pelo gene de BiPD

A expressão de BiP de plantas ocorre em resposta a uma variedade de condições de estresse abiótico e biótico, como estresse hídrico, variações de temperatura, ataque de insetos e infestação de fungos (Alvin *et al.*, 2001). BiP está relacionada por conferir tolerância em tabaco, soja e *Arabidopsis* frente diferentes naturezas de estresse (Alvim *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2008; Valente *et al.*, 2009, Reis *et al.*, 2016).

Deste modo, de acordo com a importância do papel de BiP durante o estresse hídrico, plantas jovens de *Arabidopsis Col0* foram transformadas com as construções mutadas BiPD- G233D e BiPD-T44G, para validação da perda da resistência frente a este estresse (Figura complementar.1).

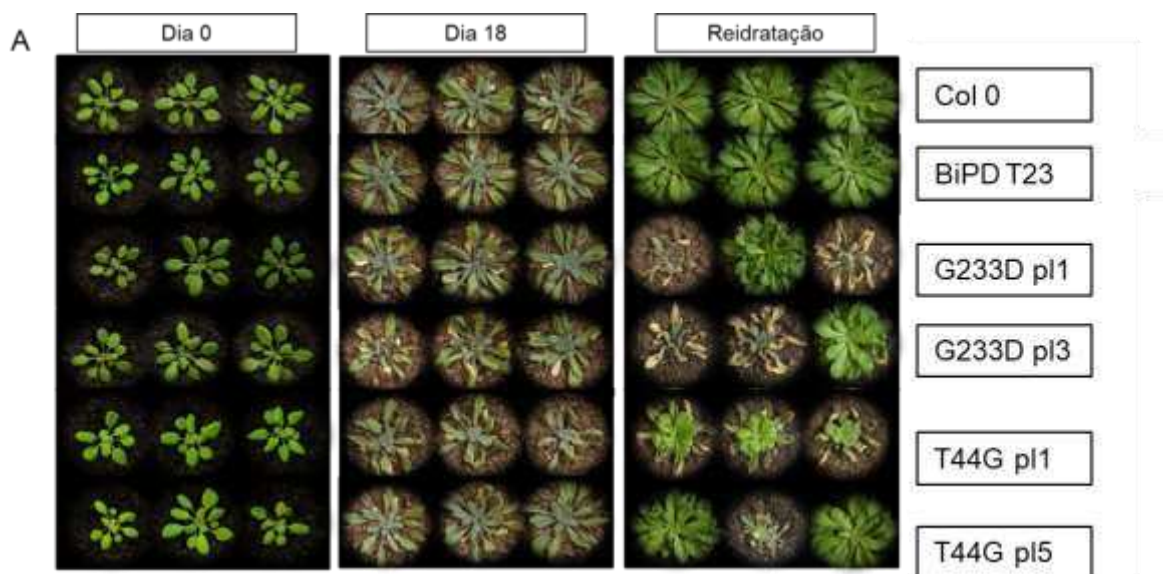
O experimento de estresse hídrico foi realizado utilizando as plantas transformadas com o gene de BiPD com as mutações G233D (Glicina por aspartato) ou T44G (treonina por glicina), planta *wild-type* (Col0) e planta superexpressando BiPD, que foi utilizada como controle uma vez que já é comprovado que esta confere tolerância à seca (Valente *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2016). Plantas de mesma idade (15 dias) foram transplantadas individualmente para potes com mesma quantidade de substrato. Foi colocada a mesma quantidade de água induzindo a homogeneidade para o início do experimento. Neste ponto, a irrigação foi interrompida por 18 dias. Após este período em condição de déficit hídrico as plantas foram reidratadas com a mesma quantidade de água e então, após 3 dias, foi calculada a taxa de sobrevivência (Figura 3).

O fenótipo das plantas foi observado durante o curso do estresse (figura 3A). No início do experimento todas as linhagens apresentavam o fenótipo túrgido, característico de plantas irrigadas. Ao longo do estresse, plantas que superexpressam o gene de BiPD com a mutação T44G ou G233D apresentaram um fenótipo mais sensível

ao déficit hídrico quando comparadas as plantas Col0 e plantas superexpressando BiPD intacto. Após a reidratação, 100% das plantas superexpressando BiPD intacta retornaram ao fenótipo túrgido (sobreviveram ao estresse), enquanto que plantas Col0 (80%), BiPD-T44G (71% e 61%) e BiPD-G233D (55% e 73%) não tiveram a totalidade das plantas retornando ao fenótipo túrgido (Figura 3B).

A superexpressão dos genes BiPD de soja, BiP1 e BiP2 de arabidopsis atenua a indução dos genes sinalizadores de morte celular AtNRP1, AtNRP2, ANAC036 e VPE em condições de estresse hídrico e do RE. Além disso, durante eventos de estresse hídrico, a superexpressão de BiP manteve a turgidez foliar tanto em soja, tabaco e arabidopsis (Reis *et al.*, 2016).

Por meio deste experimento de estresse hídrico realizado com plantas mutadas no gene BiPD, plantas superexpressando BiPD e plantas Col-0, fica evidente que as mutações no domínio de ligação ao ATP alteram a atividade chaperona de BiP causando uma maior sensibilidade das plantas a condições de déficit hídrico, ressaltando a importância da atividade chaperona para o mecanismo de tolerância à seca.



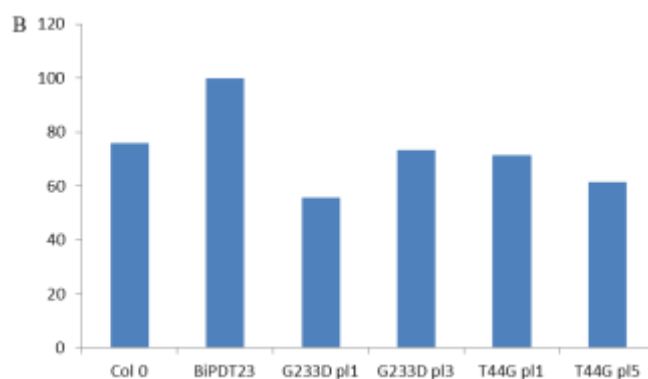


Figura 3: Mutações no domínio ATPase de BiPD prejudicam a função de BiP durante estresse hídrico. (A) Linhagens BiPDox, BiPD-T44G, BiPD-G233D e Col0 foram expostas a déficit hídrico por 18 dias. Após 18 dias de estresse hídrico, as plantas foram reidratadas e avaliadas depois de 2 dias (B) Taxa de sobrevivência das plantas após a reidratação. O experimento foi realizado com duas repetições.

Plantas de BiP mutadas não conferem tolerância a estresse no RE

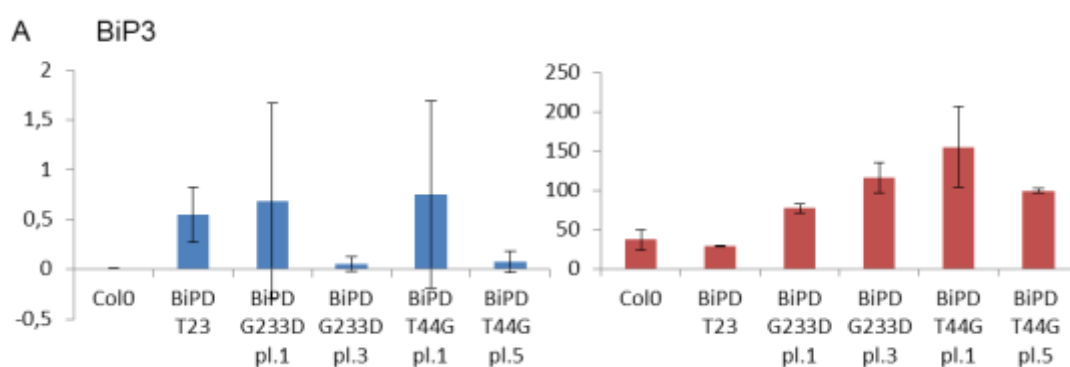
Durante eventos de estresse no RE, ocorre o acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen da organela. Este sinal de estresse é transduzido por meio da via de resposta proteína mal dobrada (UPR).

Em plantas, a ativação da UPR se dá por duas classes de receptores transmembranas: bZIP17 e bZIP28, os quais em condições de estresse no RE são translocados para o complexo de Golgi, clivados por SP1 e SP2, liberando o domínio bZIP, que desloca para o núcleo induzindo a expressão de genes da UPR; e Ire1a e Ire1b os quais quando ativados realizam o *splicing* de bZIP60, originando uma proteína solúvel, que se desloca até o núcleo e induz promotores de genes da UPR. Ambas as respostas promovem a expressão de chaperonas residentes do RE e ativam o sistema de degradação de proteínas associado ao RE (ERAD; Camargos *et al.*, 2018).

Com a proposta de determinar se plantas com mutação na região chaperona de BiP apresentam alteração na indução dos genes relacionados a UPR, estas foram submetidas ao estresse com tunicamicina, um potente indutor de estresse no RE, por 8 horas e a expressão dos genes da via UPR foram analisados. Além disso, plantas col-0 e superexpressando BiPD (BiPDox) foram utilizadas como controle. Assim como DMSO foi utilizado como controle do tratamento.

Plantas superexpressando BiPD em condições normais (figura 4, em azul) apresentam uma maior indução dos genes da via UPR, BiP3 (A), bZip28 (B) e BiP1 (C) quando comparada com plantas Col-0. Em condições de estresse no RE proporcionada pela tunicamicina (gráficos em vermelho), as plantas BiPDox possuem uma repressão destes genes quando comparados com plantas Col-0. No entanto, plantas superexpressando BiPD-T44G e BiPD-G233D apresentaram uma maior expressão de marcadores da UPR: BiP3, bZip28 e BiP1, quando comparado com plantas Col-0, demonstrando a perda de função de BiP devido a mutação.

Além da regulação a nível de expressão genica, em condições de estresse no RE, plantas superexpressando BiP de Arabidopsis previnem a remobilização de bZip28 para o núcleo, ressaltando o papel protetor de BiP (Srivastava *et al.*, 2013). Neste mesmo trabalho, também foram avaliados o efeito da mutação no resíduo de ligação ao ATP semelhante à mutação no resíduo 235 de BiP de tabaco (BiP1 de Arabidopsis e BiPD de soja correspondem ao resíduo 233) na mobilização de bZip28 para o núcleo. A mutação no gene de BiP1 também preveniu a relocação de bZip28 para o núcleo mediante ao tratamento com tunicamicina por 2 horas. Este resultado pode ser explicado pelo fato de a mutação no resíduo de glicina 233 de BiP1 não altera a interação com bZip28, apenas faz com que uma maior carga de BiP1, mesmo apresentando a mutação, seja capaz de prevenir a relocação de bZip28.



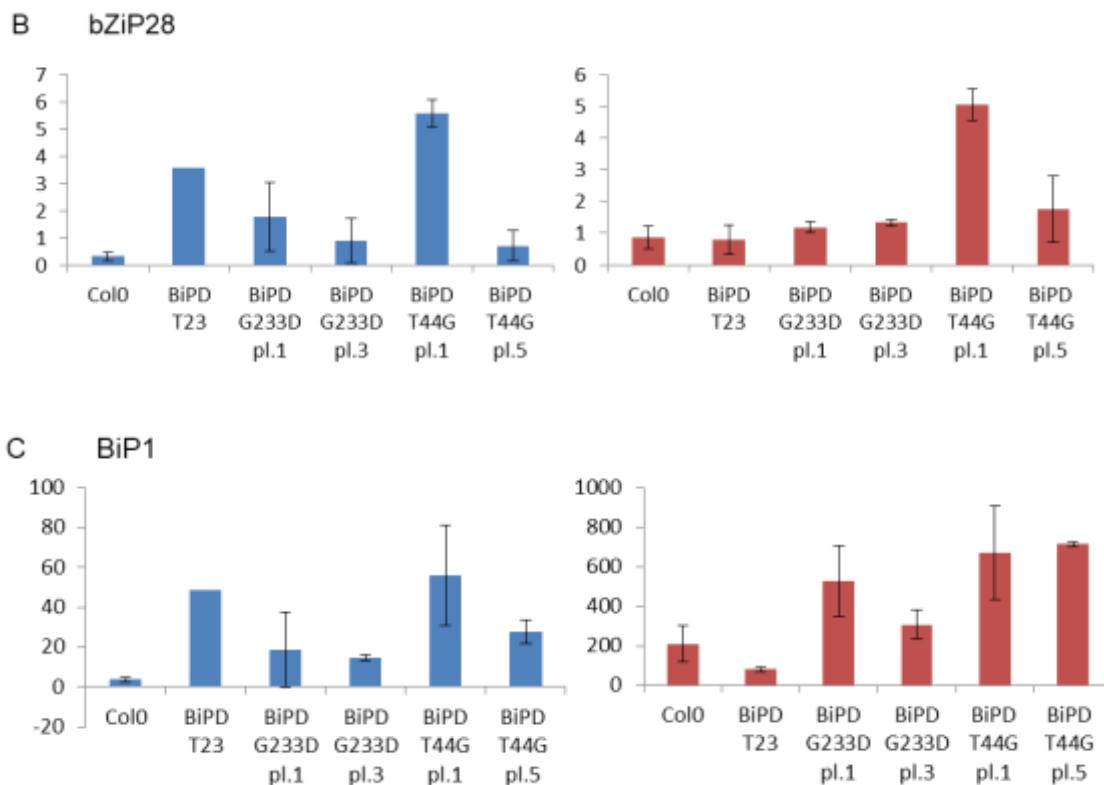


Figura 4: As linhagens BiPD-T44G e BiPD-G233Daumentam a expressão de genes relacionados a UPR, sem tratamento (azul) e sob tratamento (vermelho) de tunicamicina. O RNA total foi extraído de plântulas de Arabidopsis de 15 dias tratadas com tunicamicina (2,5 mg/ml) por 8 horas. DMSO foi utilizado como controle. O nível de transcrito de genes selecionados, BiP3 (A), bZIP28 (B) e BiP1 (C) foram quantificados por qRT-PCR e actina foi utilizada como controle endógeno.

O outro braço da via UPR foi avaliado por meio do monitoramento da forma processada de bZip60. Em condições de estresse no RE, bZip60 sofre um processamento não convencional por meio das proteínas Ire1a/Ire1b (Nagashima *et al.*, 2011). Embora não apresentem maior indução do gene de bZip60 em condições sem estresse, plantas BiPD-T44Gox e BiPD-G233Dox apresentaram uma maior indução do mesmo em condições de estresse por tunicamicina. Além disso, a forma processada também foi aumentada, indicando uma maior severidade da condição de estresse nestas plantas. Plantas superexpressando BiP e Col0 apresentaram o mesmo padrão de expressão e de processamento de bZip60. O mesmo resultado foi mostrado pela superexpressão dos genes de BiP1 e BiP3 de Arabidopsis (Srivastava *et al.*, 2012). Tal efeito indica que a superexpressão de BiP pode não atuar diretamente sobre controle deste processamento.

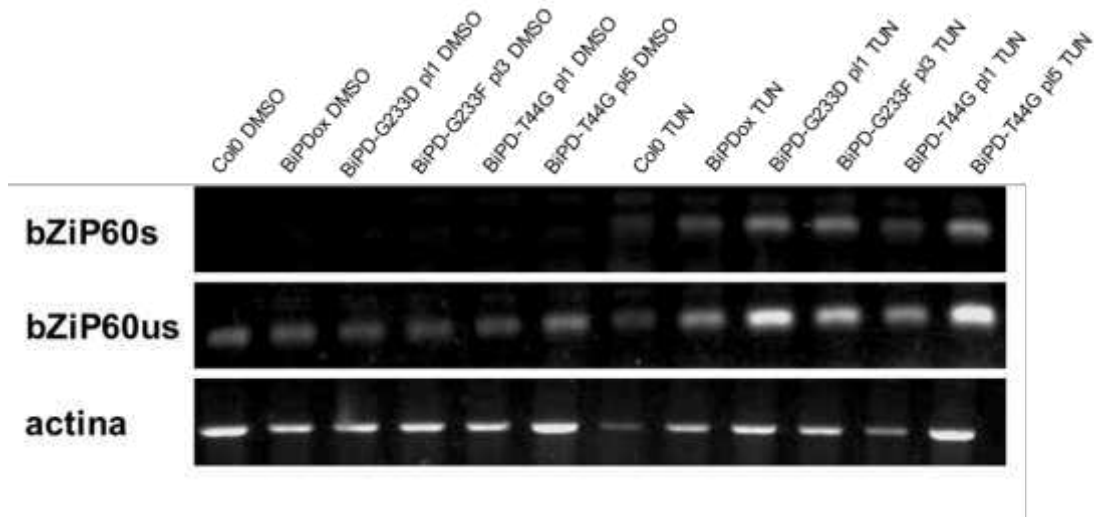


Figura 5. Avaliação do processamento de bZIP60 em condições de estresse no RE. O RT-PCR foi realizado com 50ng de cDNA de plantas Col0, BiPDox, BiPD-T44Gox e BiPD-G233Dox utilizando os primers de actina, da forma não processada de bZIP60 (bZIP60us) e da forma processada (bZIP60s).

Plantas de BiP mutadas alteram a expressão de genes NRPs ricas em asparaginas

A via de morte celular mediada por proteínas ricas em asparaginas (NRPs) é ativada por múltiplos sinais de estresse, como seca. As proteínas NRPs são induzidas por tratamentos que causam estresses osmóticos e RE (Costa *et al.*, 2008). Além disso, esta via é modulada transcricionalmente e pós traducionalmente pela superexpressão da chaperona molecular BiP (Valente *et al.* 2009; Reis *et al.* 2011; Reis *et al.* 2016; Carvalho *et al.* 2014).

A superexpressão de BiP em soja demonstra regulação negativa de genes relacionados com resposta a morte celular. Além disso, plantas de soja superexpressando BiP exibem um atraso na senescência das folhas acompanhado de redução na expressão de genes da sinalização de morte celular mediada por NRP (NRPA e NRPB, GmNAC81 e VPE) (Carvalho *et al.*, 2014). Esta via de sinalização foi demonstrada ser conservada em diferentes espécies de plantas, inclusive em *arabidopsis*, além de demonstrarem que a expressão dos genes AtNRP1 e AtNRP2 também é diminuída em plantas superexpressando BiP (Reis *et al.*, 2016).

Com o intuito de avaliar se as mutações nos sítios de ligação e sítio de hidrólise de ATP alteram a expressão dos genes AtNRP1 e AtNRP2, foi analisada por qRT-PCR, após o tratamento de plântulas de *Arabidopsis* tratadas com tunicamicina.

A indução dos genes AtNRP1 (A) e AtNRP2 (B) nas plantas superexpressando BiP foi consideravelmente menor que em plantas Col0, assim como sugerem os estudos anteriormente citados (figura 6). Do mesmo modo, pode-se observar que as plantas BiPD-G233D e BiPD-T44G obtiveram menor indução dos genes em relação à Col0, porém a indução destes genes teve um aumento significativo quando comparados com as plantas superexpressando BiP, demonstrando que estas mutações alteram a função da superexpressão de BiP em relação a via de morte celular mediada por NRPs.

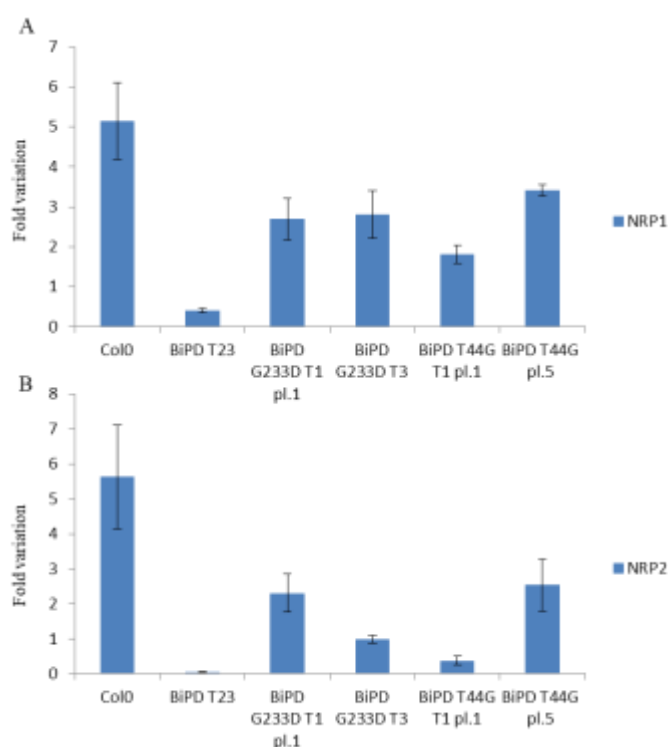


Figura 6: Indução de NRP1 e NRP2 por indutor de estresse no RE em linhagens mutadas (BiPD-T44G e BiPD-G233D), superexpressando BiP (BiPD T23) e Col0. O RNA total foi extraído de plântulas de *Arabidopsis* de 15 dias tratadas com tunicamicina (2,5 mg/ml) por 8 horas. DMSO foi utilizado como controle. O nível de transcrito de NRP1 (A) e NRP2 (B) foram quantificados por qRT-PCR e actina foi utilizada como controle endógeno.

A indução de plântulas de *Arabidopsis* por tunicamicina pode desencadear o processo de morte celular em condições de estresse prolongado. Desta forma, plântulas

de *Arabidopsis* Col0, BiPDox, BiPD-T44Gox e BiPD-G233Dox foram submetidas ao tratamento com tunicamicina por 24 e 48 horas. DMSO foi utilizado como controle. Após este período, foram incubadas com Azul de Evans (corante de marcação de vitalidade de células) seguida de sucessivas lavagens com água. Após as lavagens, foi possível observar onde há retenção do corante, indicando as células mortas. É possível observar que as linhagens mutadas retiveram mais o corante em relação à Col0 e BiPDox indicando terem sido mais afetadas ao tratamento (Figura 7), evidenciando a sensibilidade de plantas BiPD-T44Gox e BiPD-G233D a condições de estresse no RE.

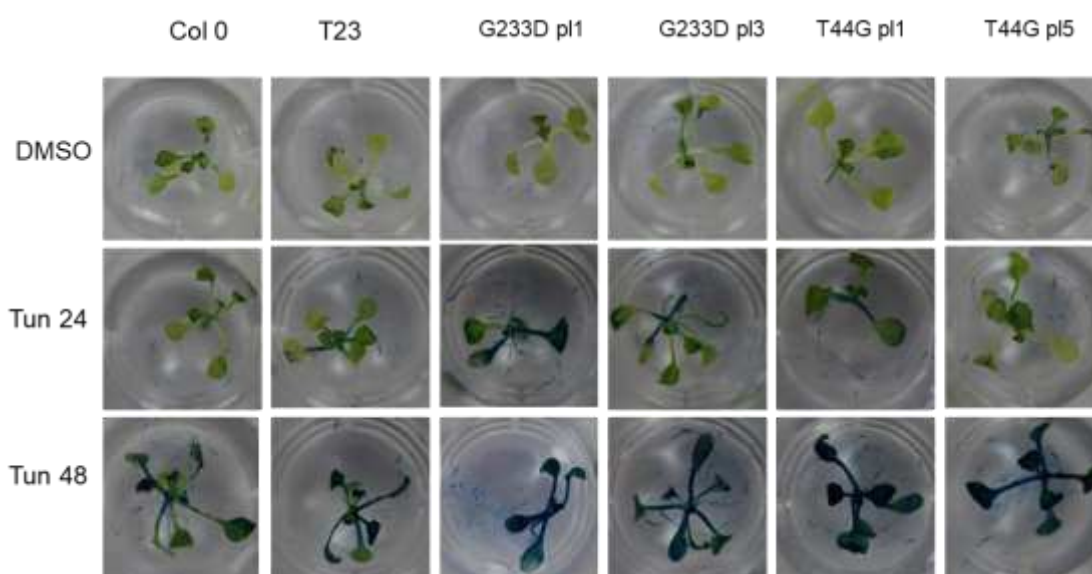


Figura 7: Coloração de Azul de Evans de plântulas de *Arabidopsis* tratadas com tunicamicina ou DMSO. As linhagens Col0, BiPDox, BiPD-T44G, BiPD-G233D foram tratadas com tunicamicina (5 $\mu\text{g/ml}$) por 24 e 48 horas e coradas com Azul de Evans.

De maneira a garantir que o tempo de desenvolvimento não apresenta influência na resposta ao estresse mediada pela superexpressão de BiP, plantas adultas (5 semanas) foram infiltradas com tunicamicina (15 $\mu\text{g/mL}$), utilizando uma seringa, na parte abaxial das folhas. Após 4 dias da infiltração foi observado o fenótipo das folhas. Como controle foi infiltrado DMSO (Figura 8). Podemos observar que tanto BiPD-G233D e BiPD-T44G apresentaram um fenótipo de morte celular mais agravante que Col0. O fenótipo de aceleração de morte celular em indução por tunicamicina apresentado por plantas superexpressando BiPD-T44G e BiPD-G233D se assemelha a

fenótipos de plantas mutantes nulos para genes transdutores de sinal da via UPR (Chen e Brandizzi., 2012). Mutantes nulos para os genes de Ire1a e Ire1b apresentaram um fenótipo de morte celular mais precoce que o apresentado por plantas Col0.

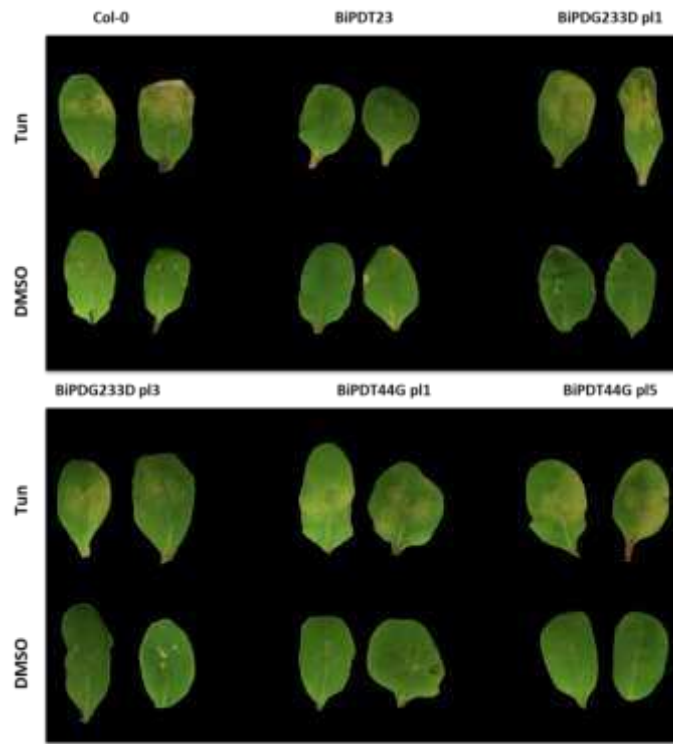


Figura 8: Mutação nos domínios de BiP leva a plantas mais sensíveis. Plantas Col0, BiPDox, BiPDG233D e BiPDT44G de 5 semanas foram infiltradas com tunicamicina (15µg/ml). Após 4 dias, foram analisados os fenótipos de morte celular. DMSO foi utilizado como controle.

4. Conclusão

Mutações no domínio de ligação do ATP da chaperona molecular BiP, tanto na atividade de ATPase como na ligação de ATP, prejudicam a atividade chaperona da molécula e fortalecem sua ligação com o ligante devido ao bloqueio da liberação do peptídeo substrato

Mutações na região chaperona de BiP foram demonstradas possuírem uma ligação permanente como o ligante, além de interferir na produção de proteínas secretoras.

Desta maneira, por várias linhas de evidência comprovamos a importância da atividade chaperona de BiP no processo de tolerância a estresse. Primeiro, as mutações geradas (BiPD-G233D e BiPD-T44G) são funcionais e alteram o padrão de ligação ao ATP quando comparadas ao gene de BiPD intacto. Embora no ensaio de afinidade ao ATP a mutação G233D não tenha sido abolida à ligação ao ATP, mostramos que esta mutação é funcional em plantas. Condições de déficit hídrico e estresse no RE por tunicamicina, tanto em plântulas quanto em plantas adultas, evidenciaram a sensibilidade de plantas BiPD-T44Gox e BiPD-G233Dox mediante a estas condições. Além disso, os mutantes deficientes em hidrólise de ATP (T44G) ou deficientes em ligação a nucleotídeos (G233D) perderam a capacidade de modular negativamente a expressão de genes da via de resposta a proteínas mal dobrada em resposta a condições de estresse do ER, além de alterarem a indução de genes da via de NRP. Estes resultados indicam que a função protetora de BiP contra estresse hídrico e estresse no RE está provavelmente ligada à sua propriedade chaperona.

5. Referências Bibliográficas

Alvim, F.C. *et al.* Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiology*. 126: 1042-1054, 2001.

Behnke J., Feige M.J., Hendershot L.M., BiP and its nucleotide exchange factors Grp170 and Sil1: mechanisms of action and biological functions. *J. Mol. Biol.* 427:1589–1608, 2015.

Bent, A. *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 343(1), 87–103, 2006.

Camargos, L.F., Fraga, O.T., Oliveira, C.C., Silva, J.C.F., Fontes, E.P.B., Reis, P.A.B., Development and cell death domain-containing asparagine rich protein (DCD/NRP): an essential protein in plant development and stress responses. *Theor.Exp. Plant Physiol*, 2018.

Carvalho HH, Brustolini OJB, Pimenta MR, Mendes GC, Gouveia BC, *et al.* The Molecular Chaperone Binding Protein BiP Prevents Leaf Dehydration-Induced Cellular Homeostasis Disruption. *PLoS ONE* 9(1): e86661, 2014.

Cai, Y. M. *et al.* Two proteases with caspase-3-like activity, cathepsin B and proteasome, antagonistically control ER-stress-induced programmed cell death in *Arabidopsis*, *New Phytologist*, in press, doi: 10.1111/nph.14676, 2007.

Chen Y. and Brandizzi, F., AtIRE1A/AtIRE1B and AGB1 independently control two essential unfolded protein response pathways in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 69: 266-277, ISSN 1365-313X, 2012.

Costa, M.D.L. *et al.* A new branch of endoplasmatic reticulum stress signaling and the osmotic signal converge on plant specific asparagine rich proteins to promote cell death. *Journal of Biological Chemistry*. 283: 20209-20219, 2008.

Figueiredo JEF, Cascardo JCM, Carolino SMB, Alvim FC, Fontes EPB. Water-stress regulation and molecular analysis of the soybean BiP gene family. *Braz J Plant Physiol* 9: 103–110, 1997.

Kalinski A, Rowley DL, Loer DS, Foley C, Buta G, Herman EM. Binding-protein expression is subject to temporal, developmental and stress-induced regulation in terminally differentiated soybean organs. *Planta* 195: 611–621, 1995.

Li, L.M., Lü, S.Y. and Li, R.J. The Arabidopsis endoplasmic reticulum associated degradation pathways are involved in the regulation of heat stress response. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 487, 362–367, 2017.

Liu J.X., Howell S.H., Managing the protein folding demands in the endoplasmic reticulum of plants. *New Phytol.*, 211, pp. 418-428, 2016.

Nagashima, Y. *et al.* Arabidopsis IRE1 catalyses unconventional splicing of bZIP60 mRNA to produce the active transcription factor. *Sci. Rep.* 1, 29, 2011.

Reis, P. A. B. *et al.* The Binding Protein BiP Attenuates Stress-Induced Cell Death in Soybean via Modulation of the N-Rich Protein-Mediated Signaling Pathway. *Plant Physiology*, v. 157, n. 4, p. 1853–1865, 2011.

Reis, P. A. B.; FONTES, E. P. B. N-rich protein (NRP)-mediated cell death signaling: a new branch of the ER stress response with implications for plant biotechnology. *Plant Signaling & Behavior*, v. 7, n. 6, p. 628-632, jun 2012.

Reis, P. A. B., Integration of osmotic and ER stress into a cell death response: positive and negative regulators of the signaling pathway are conserved in plants. 2014.

Reis, P. A. B. *et al.*, Functional and regulatory conservation of the soybean ER stress-induced DCD/NRP-mediated cell death signaling in plants. *BMC Plant Biology* (Online), v. 16, p. 156, 2016.

Silva PA, Silva JC, Caetano HD, Machado JP, Mendes GC, Reis PA, Brustolini OJ, Dal-Bianco M, Fontes EP. Comprehensive analysis of the endoplasmic reticulum stress response in the soybean genome: conserved and plant-specific features. *BMC Genomics*.2015; 16: 783.

Srivastava R, Deng Y, Shah S, Rao AG, Howell SH. BINDING PROTEIN is a master regulator of the endoplasmic reticulum stress sensor/transducer bZIP28 in Arabidopsis. *Plant Cell*. 25:1416–29, 2013.

Snowden *et al.* In vivo analysis of the luminal binding proteins (BiP) reveals multiple functions of its ATPase domain. *The Plant Journal*, v.52, p. 987-1000, 2007.

Talamè, V., Ozturk, N.Z., Bohnert, H.J. and Tuberosa, R. Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis *J Exp Bot*, 58: 2, 229-240, 2007

Trombetta, E.S. and Parodi, J.A. Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 649-76, 2003.

Valente M. A. S. *et al.*, The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. *J Exp Bot* 60: 533-546, 2009.

Figuras Suplementares



Figura S1. Expressão de proteínas nas plantas transformadas com os mutantes BiPD-G233D (B e C) e BiPD-T44G (D e E), comparadas com Col0 (A).



Figura S2. Sequenciamento do DNA da planta BiPD-G233D, confirmando a mutação, onde ocorreu troca da glicina por aspartato. Foi sequenciado pelo método de Sanger para a verificação de sua identidade e a sequência contígua foi alinhada com a sequência da ORF disponível no endereço <https://www.arabidopsis.org>

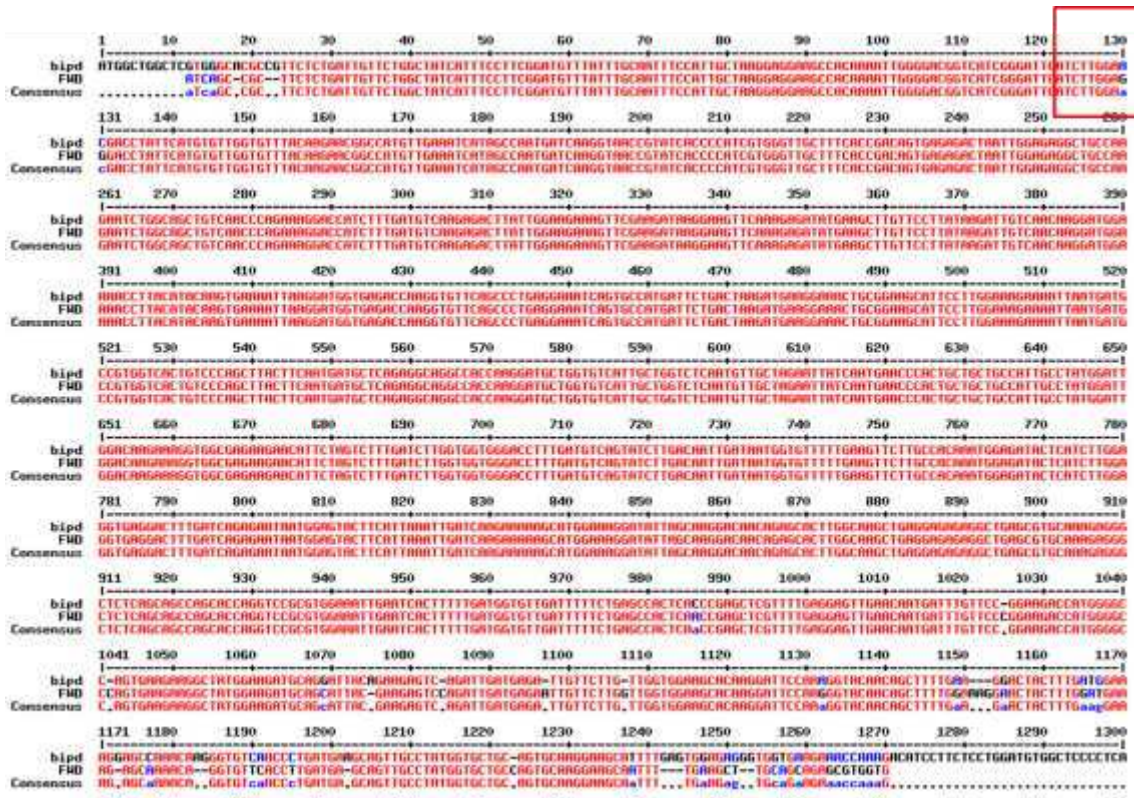


Figura S3. Sequenciamento do DNA da planta BiPD-T44G, confirmando a mutação, onde ocorreu troca da treonina por glicina. Foi sequenciado pelo método de Sanger para a verificação de sua identidade e a sequência contígua foi alinhada com a sequência da ORF disponível no endereço <https://www.arabidopsis.org>

Anexo

Anexo 1: Alinhamento completo das sequências de BiP1, BiP2 e BiP3 de *arabidopsis*, BiPD de soja e BiPT de tabaco. Em destaque região conservada das mutações T44G e G233D geradas no gene de BiPD.

```

BiP1      -----ATGGCTCGC-----TCGTTTGGAGCTAACAGTACCGTGTGTGTTG-GCGATCA
BiP2      -----ATGGCTCGC-----TCGTTTGGAGCAAAACAGCACTGTTGTGCTT-GCGATCA
BiPD      -----ATGGCTGCG-----TCGTGGGCACGCCGTTCTCTGATGTTCTG-GCTATCA
BiPT      -----ATGGCTGGTGGTGCCTGGAATAGACGCACATCCTTGATCGTCTTC-GGGATCG
BiP3      ATGATTTTTATCAAGGAAAACACAGCAAGATGACGAGGAACAAAGCTATTCGCTGTTG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
BiP1      TCTTCTTCGGATGTTTATTG-CGTTGTCCTCTGCAATAGAAGAGGCTACGAAGTTAGGA
BiP2      TCTTCTTCGGATGTTTATTG-CGTTTCCACTGCAAAAGAAGAGGCTACGAAGTTAGGA
BiPD      TTTCTTCGGATGTTTATTG-CAATTTCCATTGCTAAGGAGGAAGCCACAAAATGGGG
BiPT      TCTTGTTCGGGTGCTTGTTCG-CATTTTCTATAGCCACTGAAGAAGCTACCAAGTTGGGA
BiP3      GTTTTTCTGACTGCTTGTGTCAGTTTGGCAATAGAAGCGAAGAGCAGAAACTGGGG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
BiP1      TCAGTGATAGGGATAGATCTGGTACTACTTACTCTTGTGTGGTGTTTACAAGAATGGT
BiP2      TCAGTTATTGGGATAGATCTGGTACCCTACTCTTGTGTGGTGTTTACAAGAATGGT
BiPD      ACGGTCATCGGGATGATCTTGGAAACGACCTATTTCATGTGTGGTGTTTACAAGAAGCC
BiPT      ACAGTTATTGGAATAGATCTTGGAAACACTTACTCATGTGTGGTGTTTACAAGAATGGA
BiP3      ACGGTGATAGGGATCGATCTAGGGACTACATATTTCATGTGTGGTGTCTATCATACAAA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
BiP1      CATGTCGAAATTATTGCCAATGACCAAGGAAACCGTATTACACCTTCATGGGTTGGTTTT
BiP2      CATGTTGAAATTATTGCCAATGACCAAGGAAACCGTATTACACCTTCATGGGTTGGTTTT
BiPD      CATGTTGAAATCATAGCCAATGATCAAGGTAACCGTATCACCCCATCGTGGGTTGGCTTC
BiPT      CATGTTGAAATTATAGCGAATGACCAAGGTAATCGTATCACCCCTTCATGGGTTGGCTTC
BiP3      CATGTGAAATCATAGCAAACGATCAAGGAAACAGAATTACACCATCTTGGGTTGCATTT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
BiP1      ACTGACTCTGAAAGACTCATTGGTGAGGCTGCTAAGAATCAAGCAGCTGTTAATCCAGAG
BiP2      ACTGACTCTGAAAGGCTCATTGGTGAGGCTGCTAAGAATCAGGCGGCTGTTAATCCTGAG
BiPD      ACCGACAGTGAGAGACTAATTGGAGAGGCTGCCAAGAATCTGGCAGCTGTCAACCAGAA
BiPT      ACTGATGGTGAGAGGCTGATTGGTGAGGCAAGAAATTTAGCCGCTGTTAACCAGAG
BiP3      ACTGATACCGAACGCTCTCATCGGGGAAGCTGCTAAGAATCAAGCAGCCAAGAACCAGGAG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
BiP1      AGGACTGTCTTCGACGTTAAGAGATTGATCGGGCGAAAATTTGAGGATAAGGAGGTTCAA
BiP2      AGGACTGTCTTCGACGTTAAGAGATTGATCGGGCGAAAATTTGAGGACAAGGAGGTTCAA
BiPD      AGGACCATCTTTGATGTC AAGAGACTTATTGGAAGAAAGTTCGAAGATAAGGAAGTCAA
BiPT      AGGACCGTCTTCGATGTC AAAAGACTTATTGGAAGAAAGTTCGATGACAAGAAGTCAA
BiP3      CGAACCATCTTCGACCCGAAACGCTGATGGAAGAAAATTTGATGATCCTGATGTACAA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
BiP1      AAGGATAGGAAACTTGTACCTTACCAGATTGTGAACAAGGATGGTAAGCCATACATTCAA
BiP2      AAGGACAGGAAACTTGTACCTTACCAGATTGTGAACAAGGATGGTAAGCCATACATTCAA
BiPD      AGAGATATGAAGCTTGTTCCTTATAAGATTGTCAACAAGGATGGAAAACCTTACATACAA
BiPT      AGGGACATGAAACTTGTTCGTAACAAGATTGTTAACAAGGATGGTAAACCATATATCCAA
BiP3      AGGGATATCAAATCTTGCATACAAGGTTGTGAACAAGATGGGAAGCCTTACATTCAA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
BiP1      GTCAAGATCAAGGATGGTGAAGACTAAGGTTTTCAGTCTGAGGAGATTAGTGTATGATT
BiP2      GTCAAGATCAAGGATGGTGAAGACTAAGGTTTTCAGTCTGAGGAGATCAGTGCCATGATT
BiPD      GTGAAAATTAAGGATGGTGAAGACTAAGGTTTTCAGTCTGAGGAAATCAGTGCCATGATT
BiPT      GTTAAGATTAAGATGGGAGACCAAGATCTTCAGTCTGAGGAGATCAGTGCAATGATC
BiP3      GTGAAGGTTAAGGTTGAAGAGA---AATTGTTTTCAGCCTGAGGAAATAAGTGTATGATA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
BiP1      CTGACTAAGATGAAGGAGACAGCTGAAGCCTACCTTGGAAAAGAAAATCAAGGACGCTGTT
BiP2      CTGACTAAGATGAAGGAGACAGCCGAAGCCTACCTTGGAAAAGAAAATCAAGGACGCTGTT
BiPD      CTGACTAAGATGAAGGAACTGCGGAAGCATTCCCTTGGAAAAGAAAATTAATGATGCCGTG
BiPT      CTGACCAAGATGAAGGAAACAGCTGAAGCTTACCTCGGAAAAGAAAATCAAGGATGCAGTT
BiP3      CTAAACAGATGAAAGAAACAGCTGAAGCTTCTTGGGAAAAGAAATTAAGATGCTGTG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
BiP1      GTCAGTGTCCAGCTTACTTCAATGATGCTCAAAGGCAAGCTACTAAGGATGCTGGTGT
BiP2      GTCAGTGTCCAGCTTACTTCAATGATGCTCAAAGGCAAGCTACTAAGGATGCTGGTGT
BiPD      GTCAGTGTCCAGCTTACTTCAATGATGCTCAGAGGCAGGCCCAAGGATGCTGGTGT
BiPT      GTCAGTGTCCAGCTTACTTCAATGATGCTCAGAGGCAGGCCCAAGGATGCTGGTGT
BiP3      ATCAGGTTCCAGCTTACTTCAATGATGCTCAGAGGCAGGCCCAAGGATGCTGGTGT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
BiP1      ATTGCTGGGCTCAATGTTGCTAGAATCATTAAATGAACCTACTGCTGCTGCTATTGCCTAT
BiP2      ATTGCTGGGCTCAATGTTGCTAGAATCATTAAATGAACCTACTGCTGCTGCTATTGCCTAC
BiPD      ATTGCTGGTCTCAATGTTGCTAGAATTATCAATGAACCCACTGCTGCTGCTATTGCCTAT

```



```

BiPD      TCTCAGGTGTTACCACCTATCAGGACCAGCAGACTACAGTCTCCATTCCAGGTTTTTCGAA
BiPT      TCTCAAGTCTTACCACCTTATCAGGATCAGCAGACAACAGTGACAATCCAGGTCTTTGAA
BiP3      TCTCAGGTGTTCACTACTTACCAAGATCAGCAAACACTACTGTGACTATCAACGCTTACGAA
*****
BiP1      GGTGAACGAAGTCTCACCAAGGACTGCAGGCTACTCGGGAAATTCGACCTCAATGGAATC
BiP2      GGTGAAAGAAGTCTCACCAAGGACTGCAGGCTACTCGGGAAATTCGACCTCACTGGAGTC
BiPD      GGCAGAGAGTCTCACAAAGGATTCGCCGCTTCTTGGGAAATTTGATCTGCTCGGAATT
BiPT      GGTGAACGCAGTCTCACAAAGGACTGCAGACTGCTGGGGAAATTTGATTTAACCGGAATA
BiP3      GGCAGAGAAGCATGACGAAAGATAACCGCGAGCTTGGAAAATTCGATCTCACAGGCATT
*****
BiP1      CCACCGGCCCAAGAGGAACCCCTCAAATCGAGGTCACATTCGAAAGTGGACGCCAACGGT
BiP2      CCACCGGCCCAAGAGGAACCCCTCAAATCGAGGTCACATTTGAAGTGGACGCCAACGGT
BiPD      CCTCCAGCCCAAGGGGTACGCCCTCAAATGGAAGTGACCTTCGAAAGTGTATGCCAACGGC
BiPT      GCTCCAGCTCCAAGAGGAACCTCTCAAATCGAGGTTACATTTGAAGTGTATGCAAAATGGT
BiP3      CTTCTGCACCCAGGGGAGTGCACAGATGAGGTTGACTTTCGAAAGTGGACGCAATGGG
*****
BiP1      ATTTCTAATGTGAAAGCAGAGGACAAGGCGAGTGGTAAATCAGAGAAGATTACTATCACA
BiP2      ATTTCTAATGTGAAAGCAGAGGACAAGGCGAGTGGTAAATCAGAGAAGATTACAATCACA
BiPD      ATTTCTAATGTGAAAGCAGAGAACAAGGCAAGGCACTGGTAAATCAGAAAAGATCACCAATGCA
BiPT      ATTTCTAAACGTCAAAGCTGAAGACAAGGCTCTGGAAAATCAGAGAAGATCACAATCACC
BiP3      ATCCTGCAGGTGAAAGCTGAAGACAAGTTGCTAAGACGTCACAATCGATTACAATAACG
*****
BiP1      AACGAGAAGGGTCTGCTGAGCCCAAGAAGAGATTGACCGGATGGTGAAGGAGGCAGAGGAG
BiP2      AACGAGAAGGGTCTGCTGAGCCCAAGAAGAGATTGACCGGATGGTGAAGGAGGCAGAGGAG
BiPD      AACGAAAAGGGACGCTTAGCCAGGAAGAAATTGAGAGAATGGTTCGCGAAGCAGAGGAG
BiPT      AACGACAAAGGTCGCTTAGTCAAGAAGAGATTGAGCGTATGGTCAAGGAGGCTGAGGAG
BiP3      AACGATAAAGGTCGTTTGACAGCAAGAAGAGATTGAGGAAATGATCAGAGAAGCAGAGGAG
*****
BiP1      TTTGCAGAGGAAGACAAGAAGGTAAGGAGAAGATCGACGCCAGGAATGCCTGGAGACA
BiP2      TTTGCAGAGGAAGACAAGAAGGTAAGGAGAAGATCGACGCCAGGAATGCCTGGAGACA
BiPD      TTTGCAGAGGAAGACAAGAAGGTAAGGAGAAGATCGATGCTCGCAACAGTCTCCATAAAC
BiPT      TTTGCAGAGGAGGATAAGAAAAGTAAAAGAAAAGAAATTGATGCCAGAAAACAGCCTGGAGACA
BiP3      TTTGCTGAGGAAGATAAGATTATGAAAGGAGAAGATTGATGCCAGGAACAAGCTTGAACG
*****
BiP1      TACGTGTACAACATGAAGAACCAAGTGAAGCAGACAAGGACAAGCTTCCCGACAAAATTGGAA
BiP2      TACGTGTACAACATGAAGAACCAAGTGAAGCAGACAAGGACAAGCTTGCAGACAAAATTGGAA
BiPD      TATGTATACAACATGAAGAACCAGATCAGTGACAAGGACAAGCTCGCTGACAAGTTGGAG
BiPT      TATGTGTACAATATGAGGAACCAATAAATGACAAGGACAAGCTTGCAGACAAGCTAGAG
BiP3      TATGTGTACAACATGAAAAGTACAGTGCCCGATAAGGAGAAGCTTGCAGAGAAGATAAGT
*****
BiP1      GGAGATGAAAAGGAGAAGATCGAAGCAGCGACGAAAAGAGGCTTTGGAGTGGCTCGACGAA
BiP2      GGAGATGAGAAGGAGAAGATAGAAAGCAGCGACGAAAAGAGGCTTTGGAGTGGCTCGACGAA
BiPD      TCTGATGAAAAGGAGAAAATTGAGACTGCTGTGAAAAGAACACTGGAATGGCTGGATGAC
BiPT      TCTGATGAGAAAAGAGAAGATTGAAACCGCGACAAAAGAAGCGCTTGAATGGTTGGACGAC
BiP3      GATGAAGATAAAGAGAAGATGGAAGGGTTTTGAAAGGAGGCTTTGGAGTGGTTAGAAAG
*****
BiP1      AACCAAACTCAGAGAAAAGAGTACGACGAGAAGCTCAAGGAGGTAGAGGCAGTGTGT
BiP2      AACCAAACTCAGAGAAAAGAGTACGACGAGAAGCTCAAGGAGGTAGAGGCAGTGTGT
BiPD      AACCAAGTATGGAGAAAAGATTTATGAAAGAGAAGCTGAAGGAGGTTGAAGCCGTTTGC
BiPT      AACCAAGTGTGAGAAAGGAAATTTATGAGGAAAAGCTGAAAAGAAGTGAAGCTGTGTGC
BiP3      AATGTGAATGCAGAGAAGGAAAGATTTATGATGAGAAAAGTGAAGGAGGTGGAGTTGGTTGT
*****
BiP1      AACCAATCATCACAGCAGTTTACCAGAGATCTGGCGGAGCACCAGGTGGTGCAGGAGGA
BiP2      AACCAATCATCACAGCAGTTTACCAGAGATCAGGCGGAGCACCAGGTG---CAGGAGGA
BiPD      AACCAATCATTAGTGTGTGTATCAGAGATCTGGAGGAGCCCCAGGCGGT---GGTGGT
BiPT      AACCAATAATCACTGCGGTGTATCAGAAGTCTGGTGGAGCACCAGG-----AGGA
BiP3      GACCCGTTATTAAGTCGGTTTACGAGAAAACCGAGGGAG----AGA-----ATGA
*****
BiP1      GAATCATCGACTGAGGAGGAAGATGAGTCTCACGATGAGCTCTAG
BiP2      GAATCATCGACTGAGGAGGAAGATGAGTCTCACGATGAGCTCTAG
BiPD      GCATCAGGCGAAGAAGACGAGGACGATTTCTCACGATGAGCTCTAG
BiPT      GAATCAGGTGCTAGCGAGGATGATGA---TCATGACGAGCTGTAG
BiP3      GGAC-----GACGATGGAGATGA---TCACGATGAGTTATAG
*****

```

Capítulo 2

ZAR1 possível supressor do mecanismo de tolerância mediado por BiP

1. Introdução

Plantas são organismos sésseis e estão susceptíveis a diferentes estresses bióticos e abióticos, que são responsáveis por danos comprometendo seu desenvolvimento e sua produtividade. A fim de minimizar os efeitos de tais estresses, as plantas desenvolveram mecanismos de respostas, através da ativação e repressão de genes específicos. Estudos buscando entender estes mecanismos de resposta se tornaram fundamental com o objetivo de obter cultivares mais adaptadas a tais estresses.

A chaperona molecular BiP, residente do retículo endoplasmático, possui bastante relevância, uma vez que estudos demonstraram que plantas superexpressando BiP, em condições de estresse osmótico e do RE, promovem atraso na expressão de genes marcadores de morte celular pertencentes a esta via (Reis *et al.*, 2011). Além disso, durante eventos de estresse hídrico plantas superexpressando BiP também conferiram maior tolerância (Cascardo *et al.*, 2000; Valente *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2016).

Embora se saiba que BiP tenha uma relevância frente a resposta das plantas aos estresses, é totalmente desconhecido o mecanismo pelo qual BiP controla a via de morte celular mediada por proteínas NRPs e promove tolerância a seca. Uma vez que estudos confirmaram a conservação desta via em diferentes espécies e a caracterizaram no sistema modelo *Arabidopsis* (Reis *et al.*, 2016), os avanços nas pesquisas se tornaram possíveis.

Com o objetivo de identificar supressores do mecanismo de tolerância à seca mediado por BiP, um estudo de mutagênese em *Arabidopsis* foi conduzido. No presente estudo, durante a análise fenotípica, foram considerados de interesse aquelas plantas que demonstraram perda do fenótipo tolerante de BiP, durante estresse hídrico. Estas tiveram o genoma sequenciado, o que permitiu a identificação de possíveis genes candidatos a supressão do mecanismo de tolerância mediado por BiP. Dentre os possíveis genes candidatos ZAR1 (Zygotic Arrest 1) foi selecionado para caracterização funcional.

ZAR1 é uma proteína com 716 resíduos de aminoácidos, possui um peptídeo sinal na região N-terminal, seguido por sete repetições de LRR, um domínio transmembrana, um motivo de ligação a CaM, um motivo de ligação a G β e um domínio serina/treonina quinase na região C-terminal, constituindo a subfamília (LRR-

RLK) do tipo II. Embora os ensaios de complementação de mutantes não tenham sido finalizados, mostramos neste trabalho que ZAR1 pode ser um supressor do mecanismo de tolerância a seca mediado por BiP. Plantas superexpressando ZAR1 apresentaram-se mais tolerantes a indução por tunicamicina, enquanto que plantas *knock-down* apresentaram maior sensibilidade a este agente. Além disso, mostramos que ZAR1 interage com RGS1 um regulador da sinalização de proteína G e que está envolvido em diferentes respostas a estresse.

2. Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, o qual se localiza no Instituto de Biotecnologia aplicada à Agropecuária – BIOAGRO na Universidade Federal de Viçosa e está associado ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) em Interações Planta-Patógeno.

2.1. Mutagênese

O etanosulfato de metila (EMS) é um agente mutagênico químico que pode proporcionar a troca de bases nitrogenadas G/C por A/T no DNA, podendo causar uma mudança da janela de leitura da sequência gênica. No processo de mutagênese 20000 sementes foram deixadas agitando em água destilada por 24 horas. Após este período foram imersas em solução de EMS (0,5%) e deixadas por agitação por 12 horas, dentro de uma capela de exaustão. Subsequentemente as sementes foram lavadas três vezes com água destilada. Em cada passo da lavagem as sementes foram deixadas agitando por 15 minutos. Após as lavagens as sementes foram colocadas em papel de filtro para que fossem secas. As sementes, então mutagenizadas foram germinadas em solo para geração de M1 plantas. Estas foram então selecionadas por estresse de temperatura e subsequentemente por déficit hídrico.

2.2. Obtenção das construções de DNA

A região codificante (CDS) de At2G01210 (ZAR1) foi isolado mediante amplificação via PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para este gene, ZAR1-Fwd e ZAR1-RVS (Tabela 1). O produto obtido foi submetido a uma segunda reação de amplificação utilizando oligonucleotídeos contendo extensões de recombinação para clonagem através do sistema triplo Gateway (Invitrogen) Attb1-Fwd e Attb2-Rvs, e clonado, por recombinação, nos vetores de entrada (pDONR221 e pDONR207) sem códon de terminação de tradução. Os clones resultantes, ZAR1-pDONR221

(pUFV3126) e ZAR1-pDONR207 (pUFV3127), foram confirmados utilizando os primers pDONR-FWD e ZAR1-RVS. Em seguida, os insertos dos clones de entrada foram transferidos, por recombinação, para vetores de expressão em plantas (pEarleyGate103, pSPYNEGW, pSPYCEGW, pDest15, pK7GWIWG2). Os clones resultantes, ZAR1-SPYNE (pUFV3138) e ZAR1-SPYCE (pUFV3137), o cDNA de ZAR1 está ligado, respectivamente, ao domínio N-terminal (NE) ou ao domínio C-terminal (CE) de YFP, sob controle do promotor 35S, foram confirmados utilizando primers ZAR1-FWD e SPYCE ou SPYNE- RVS. O clone ZAR1-pEarleyGate103 (pUFV3136) contém o cDNA de ZAR1 com GFP fusionado no seu carboxi-terminal, sob o controle do promotor 35S, foi confirmado utilizando o primer MC36-FWD e ZAR1-RVS. O clone ZAR1-pK7GWIWG2 (pUFV3129), confirmado com os primers MC36 e ZAR1-RVS, foi utilizado para silenciamento gênico utilizando a técnica de RNA de interferência.

Utilizando primers específicos, ZAR1-ct-FWD e ZAR1-RVS, foi feita a clonagem, por recombinação, apenas da região citosólica de ZAR1 (ZAR1-ct). Foram obtidos os clones nos vetores de entrada ZAR1-ct-pDONR 221 (pUFV3174) e o ZAR1-ct-pDONR 207 (pUFV3175), os quais foram confirmados com os primers ZAR1-ct-FWD e pDONR-RVS e por recombinação foi transferido para vetor de expressão em bactéria, ZAR1-ct-pDest15 (pUFV3179), confirmado com os primers ZAR1-ct-FWD e ZAR1-RVS ,o qual possui o cDNA de ZAR1 com GST e foi utilizado para transformar *E. coli* para purificação de proteínas.

A proteína RGS1 inteira e também apenas a sua região citosólica (RGS1-ct) foi previamente clonada por recombinação no LBMP nos vetores de entrada, pDONR201 e pDONR221 e também no vetor 6HA (pUFV3043 (RGS1-6HA)). Foi realizada recombinação para vetores de expressão em planta obtendo os clones, pUFV3053 (RGS1-SPYNE), pUFV3054 (RGS1-SPYCE), confirmados com os primers RGS1-FWD e SPYCE ou SPYNE-RVS, e também para vetor de expressão em bactéria, pUFV3187 (RGS1-ct-pDEST15), confirmado com os primers pDEST15-FWD e RGS1-RVS.

2.3. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101

Aproximadamente 50 ng de DNA plasmidial e 50 µL de células competentes foram eletroporadas a 2500 V durante 4 a 5 milisegundos. Em seguida, 800 µL de meio

Luria-Bertani (LB) foi adicionado e prosseguiu-se à incubação durante 2 horas a 28°C. Após o período de incubação, as células recuperadas foram centrifugadas durante 3 min. a 4000xg e concentradas para 100 µL. A solução foi plaqueada em meio LB sólido contendo 40 mg.L⁻¹ de gentamicina e 100 mg.L⁻¹ de espectinomicina ou canamicina, dependendo da resistência característica do vetor. As placas foram incubadas durante dois dias ininterruptos a 28°C e as colônias positivas foram diagnosticadas no final dessa etapa, por meio de PCR, utilizando os primers específicos para os genes de interesse. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídeo 0,1 µg/mL.

2.4. Localização subcelular e microscopia confocal.

A expressão transiente de genes de interesse foi mediada por *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101, transformada segundo descrito no item 2.3, em folhas de *N. benthamiana* por agroinoculação. As culturas carreando a construção ZAR1-pEarleyGate103 foram crescidas em meio LB, contendo os antibióticos adequados, a 28°C por 16 horas. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 2500 x g por 5 minutos e lavadas duas vezes com tampão de infiltração (MgCl₂ 10mM, MES 10mM, pH 5,6 e acetoceringona 100µM). Cada solução de infiltração foi preparada contendo a concentração ideal (O.D.600nm = 0,5) dos transformantes de interesse juntamente com células capazes de promover a expressão de um supressor viral do silenciamento pós-transcricional (HCPro - *helper-component proteinase*). Utilizando seringas estéreis sem agulha, folhas jovens (4 a 5 semanas) de *N. benthamiana* foram infiltradas, por meio de uma leve pressão através dos estômatos da epiderme inferior. A expressão da proteína foi verificada por microscopia de varredura a laser confocal (LSM 510 META invertido – ZEISS), três dias após a agroinoculação. As imagens foram processadas com auxílio do software “LSM Image Browser 4” (ZEISS). A excitação do GFP foi a 488 nm e a emissão foi detectada usando um filtro de 500-530 nm.

2.5. Ensaio de Complementação de Fluorescência Bimolecular (BiFC).

O ensaio de BiFC foi realizado utilizando folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com tampão de infiltração (MgCl₂ 10mM, MES 10mM, pH 5,6 e acetoceringona 100M) para O.D.600nm=1, com as seguintes combinações de plasmídeos:

1. ZAR1-SPYCE + pSPYNE
2. ZAR1-SPYNE + pSPYCE
3. RGS1-SPYNE + pSPYCE
4. RGS1-SPYCE + pSPYNE
5. ZAR1-SPYCE + RGS1-SPYNE
6. ZAR1-SPYNE + RGS1-SPYCE

Fragmentos das folhas foram analisados em microscopia confocal (LSM 510 META invertido – ZEISS), três dias após a agroinoculação, utilizando o laser de argônio, com fluorescência do YFP avaliada com excitação à 514nm e emissão à 560nm. As imagens foram processadas com auxílio do software “LSM Image Browser 4” (ZEISS).

2.6. Coimunoprecipitação

A fim de verificar a interação *in vivo* entre ZAR1 (78KDa) e RGS1 (52 KDa) foi realizado o ensaio de coimunoprecipitação utilizando o kit uMACSTM Epitope tag Protein Isolation (MACS/ Miltenyi biotec). Folhas de plantas jovens de *N. benthamiana* foram agroinfiltradas com as construções AtZAR1-GFP + AtRGS1-HA e AtRGS1-HA + eGFP. Após 72 horas, as folhas foram maceradas em 750 uL do tampão de lise (glicerol 20%, Triton x-100 2%, EDTA 1mM, NaCl 150 mM, Tris 50 mM, pH 7,5) para obtenção do extrato proteico, o qual foi incubado por 2 horas com beads anti-GFP (MACS/ Miltenyi Biotec) a 4°C, sob suave agitação. As beads foram recolhidas em coluna magnética, conforme instruções do fabricante. Após a lavagem da coluna, as

proteínas foram eluídas em 70 µl do tampão de eluição previamente aquecido a 95°C. Foram detectadas por *Western Blotting*, utilizando anticorpos anti-HA e anti-GFP. A ligação do anticorpo foi detectada utilizando-se anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado com HRP, em associação com o sistema de detecção SuperSignal®West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

2.7. Transformação de Arabidopsis e seleção de transformantes independentes

As construções obtidas, contendo os genes expressos no vetor pK7GWIWG2 e pEarleyGate103 foram utilizados na transformação de Arabidopsis via metodologia de mergulho floral (Fontes *et al.*, 2004) mediado por *A. tumefaciens* para obtenção de linhagens silenciadas e superexpressando ZAR1.

A. tumefaciens, estirpe GV3101 contendo as construções supracitadas foram inoculadas, separadamente, em meio LB seletivo (40 mg.L⁻¹ de gentamicina e 100 mg.L⁻¹ de espectinomicina ou canamicina) por 24 h a 28 °C. Em seguida, 1 ml do inóculo foi reinoculado em 200 mL de LB seletivo, que foi incubado 24 h a 28 °C. Após o período de incubação, as células foram sedimentadas por centrifugação, ressuspendidas em 250 mL de sacarose 5% (p/v), contendo Silwett L-77 3% (p/v) e usadas para transformar Arabidopsis pelo método de mergulho floral (Fontes *et al.*, 2004). As plantas recém-transformadas foram mantidas em casa-de-vegetação para a obtenção de sementes. Essas sementes transgênicas foram esterilizadas utilizando tampão de esterilização (1ml de água sanitária, 4 ml de etanol absoluto e 3 ml de água) por 15 min, seguido de três lavagens com etanol absoluto e plaqueadas em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) meia força, contendo canamicina 100 mg.L⁻¹ ou 100 mg.L⁻¹ de espectinomicina para a seleção dos transformantes independentes.

As placas contendo as sementes foram incubadas por 3 dias a 4 °C antes de serem transferidas para uma incubadora a 22 °C e fotoperíodo de 12 h, para o crescimento das plantas. Após um mês de germinação, os transformantes independentes foram transplantados para vasos e mantidos em casa de vegetação na temperatura de 22°C para a obtenção de sementes da geração F2 (T1). A expressão do transgene foi monitorada por qRT-PCR.

2.8. Extração de RNA de plântulas de *Arabidopsis* e síntese de cDNA

A extração de RNA das linhagens transgênicas foi conduzida pelo método do Trizol (Invitrogen), seguido por precipitação com isopropanol. A qualidade e a integridade do RNA foram monitoradas, respectivamente, por espectrofotômetro e por eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,5 %. Cerca de 4 µg de RNA foram tratados com DNase livre de RNase (Invitrogen) e utilizados para obtenção do cDNA, usando a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) e oligo-dT, de acordo com determinação do fabricante.

2.9. PCR em tempo real

Todos os procedimentos de PCR em tempo real, incluindo testes, validações e experimentos, foram conduzidos seguindo informações contidas nos manuais fornecidos pela Applied Biosystems. As reações foram conduzidas no equipamento ABI7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), usando SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e os oligonucleotídeos específicos para os cDNAs dos tratamentos. Foi utilizado o gene da actina como controle endógeno para a normalização dos dados

2.10. Técnicas de Biologia Molecular

Todas as técnicas de Biologia Molecular, incluindo preparação de plasmídeos, extração de RNA, DNA genômico, DNA plasmidial, transformação de bactérias, síntese de cDNA, dentre outras, foram conduzidas segundo protocolos fornecidos pelo fabricante ou contidos em Sambrook *et al.*(1989).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados no trabalho

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')
ZAR1-FWD	AAAAAGCAGGCTTCACAATGTTGGCCTCGCTGATCATC
ZAR1-RVS	AGAAAGCTGGGTCATCGCCGGCCACGGGTAATC
Attb1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
Attb2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
pDONR-FWD (3397)	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATC
MC36	TCCTTCGCAAGACCCTTCCTC
SPYCE	TTACTTGTACAGCTCGTCCA
SPYNE	TTAGGCCATGATATAGACGT
ZAR1-ct-FWD	AAAAAGCAGGCTTCACAATGTACTGCTACTCAAAGTTCTG
RGS1-FWD	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGCGAGTGGATGTGC
RGS1-RVS	AGAAAGCTGGGTCACCGGGACTACTGCAT
pDEst15	CCAATGTGCCTGGATGCGTTCC
qRTACTIN FWD	ATGTCGTGAGCCATCCCTGTC
qRTACTIN RVS	ACACCGGATTCGTGCGGCAT
qRTZAR1 FWD	GGATTGCTACAGGGCTTGTT
qRTZAR1 RVS	GAATGTTGCTTGGCTTGAGA

3. Resultados e Discussão

Identificação do gene supressor do mecanismo de tolerância mediado por BiP, provavelmente envolvido na via de resposta a proteínas NRPs.

Uma importante ferramenta molecular para a identificação de intermediários de vias de sinalização é a utilização de screening genético baseado em mudanças fenotípicas. Sementes de Arabidopsis superexpressando BiPD foram submetidas ao processo de mutagênese ocasionado pelo composto mutagênico EMS. Para tentar identificar intermediários da via de sinalização de resposta a estresse hídrico mediada por BiPD um *screening* genético foi realizado (30 mil sementes M1 superexpressando BiPD), no qual em um primeiro *screening* foi avaliado o fenótipo de não crescimento de hipocótilo de plantas superexpressando BiPD em condições de estresse térmico (figura 1). As plantas selecionadas foram submetidas a um segundo *screening* no qual se avaliou a perda da tolerância de plantas superexpressando BiPD ao déficit hídrico (figura 2). As plantas que apresentaram o fenótipo de perda de tolerância foram mapeadas para identificar os genes responsáveis por tal efeito.

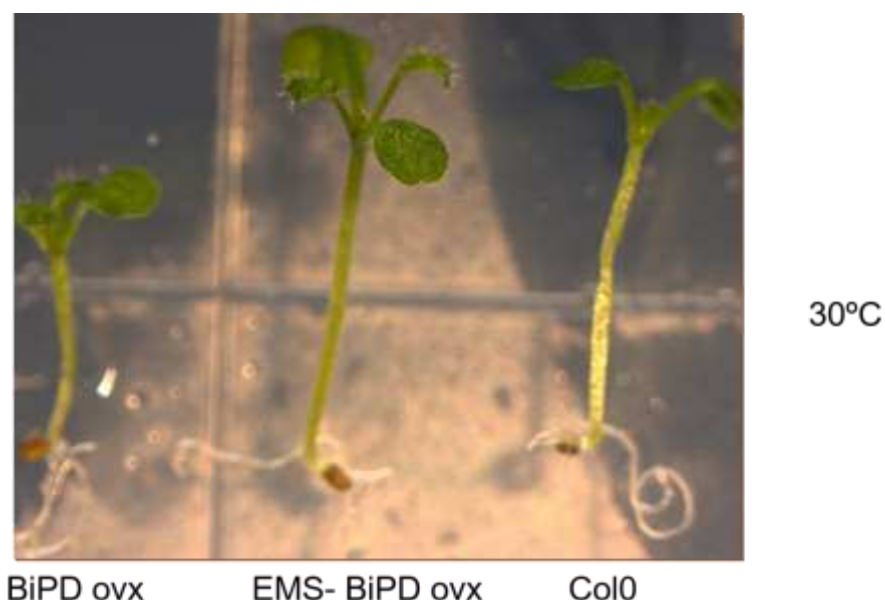


Figura 1- Avaliação fenotípica de plantas superexpressando BiPD mutagenizadas germinadas a 30°C.

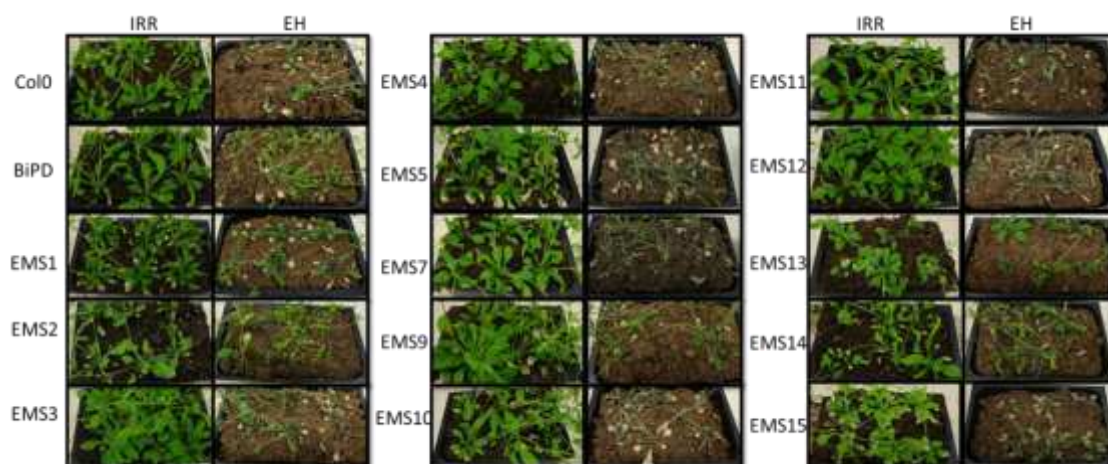


Figura 2- Plantas superexpressando BiPD mutagenizadas submetidas a déficit hídrico.

Genes candidatos a reverter o fenótipo de tolerância conferido pela superexpressão do gene de BiPD foram identificados por meio de sequenciamento de nova geração. Assim, foram identificadas possíveis mutações no genoma das plantas geradas pelo tratamento com EMS em comparação às plantas superexpressando BiPD sem tratamento. Dentre os possíveis genes mutados, foi selecionado o gene *AtZAR1* para validação do fenótipo encontrado e possível determinação da função deste gene nas vias de respostas a estresse mediadas por BiPD. A partir da análise do sequenciamento foi possível identificar que uma mutação no códon 144 promove uma troca do aminoácido glutamina por um códon de parada, levando a formação de uma proteína truncada.

Estudos demonstraram que *ZAR1* é um receptor de membrana plasmática, e que possui capacidade para interagir com calmodulina (CaM) na membrana plasmática por meio de seu motivo de ligação a CaM, além de interagir também com AGB1, subunidade β da proteína G de planta, por meio do seu motivo de ligação a $G\beta$, do mesmo modo na membrana plasmática. O complexo *ZAR1*, AGB1 e CaM pode ser formado em células vegetais e a atividade quinase de *ZAR1* apenas é ativada pela ligação de um ou ambos os compostos (Yu *et al.*, 2016).

A perda das proteínas G torna as plantas menos resistentes a estresses (Ullah *et al.*, 2002; Ullah *et al.*, 2001; Lease *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2015). Plantas knockout para a subunidade β da proteína G, AGB1, quando tratadas com tunicamicina aumentam a expressão dos genes responsivos ao estresse no RE, além de perderem o fenótipo de tolerância ao estresse (Cho *et al.*, 2015). Além disso, AGB1 também apresenta um papel

na tolerância/sensibilidade a seca. Plantas mutantes para a subunidade β (*agb1-2*) foram mais tolerantes a seca que plantas WT (Xu *et al.*, 2015).

Devido ao domínio de ligação de ZAR1 com AGB1 e os efeitos de AGB1 na via de resposta a proteínas mal dobradas e de tolerância à seca, ZAR1 pode ser um importante receptor de membrana envolvido nestas vias de sinalização, as quais BiP também pode estar envolvido. Além disso, em dados de microarranjos de plantas de soja superexpressando BiP o gene de ZAR1 apresenta-se induzido em condições normais quando comparado a plantas WT (Carvalho *et al.*, 2014)

Desta maneira, com o propósito de analisar o possível envolvimento de AtZAR1 nas vias de sinalização moduladas por BiP, analisamos o nível de expressão de ZAR1 em plantas Col0 e plantas superexpressando BiPD. O nível de expressão de ZAR1 é aumentado em plantas BiPDox em relação a plantas Col0 (Figura 3), dando indícios de ZAR1 ser um possível receptor dessas vias de sinalização.

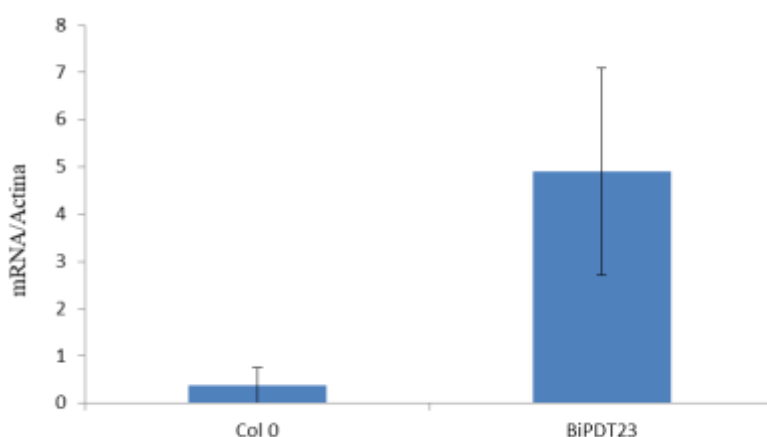


Figura 3: Aumento da indução de ZAR1 em plantas superexpressando BiP. O RNA total foi extraído de plântulas de Arabidopsis. O nível de ZAR1 foi quantificado por qRT-PCR e actina foi utilizada como controle endógeno.

O gene de ZAR1 foi clonado em vetor de expressão em plantas que permite a fusão da proteína à proteína GFP. De maneira a confirmar se a construção ZAR-1 fusionada a GFP seria funcional a localização subcelular de ZAR1 foi comprovada por meio de microscopia confocal. A fluorescência emitida pela proteína química apresentou-se na membrana plasmática (Figura 4).

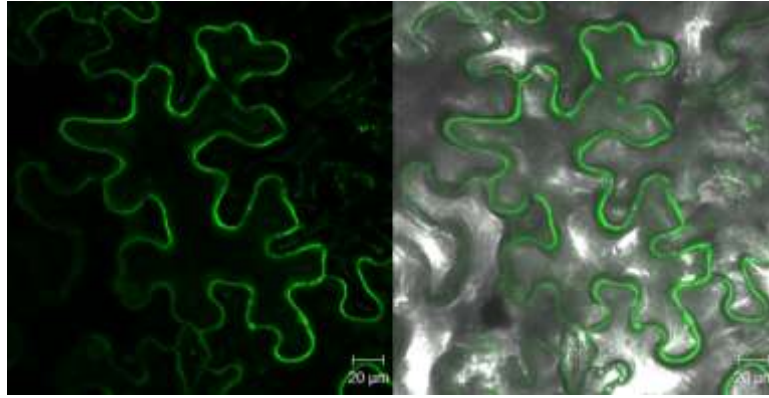


Figura 4: Localização subcelular de ZAR1 em folhas de *N. benthamiana*. GFP-ZAR1 localiza-se na membrana plasmática das células de folhas de *N. benthamiana* transfetadas. Folhas de *N. benthamiana* foram infiltradas com *A. tumefaciens* carregando a construção ZAR1-GFP, após 72 horas a localização da proteína recombinante foi analisada por microscopia confocal.

Estudos de embriologia demonstraram que na inativação de ambos os alelos do gene ZAR1 a primeira divisão do zigoto não é realizada, ou seja, o mutante nulo é letal (Yu *et al.*, 2016). Deste modo, linhagens superexpressando e knockdown (silenciadas) para o gene ZAR1 foram obtidas como ferramenta biotecnológica (Figura 5).

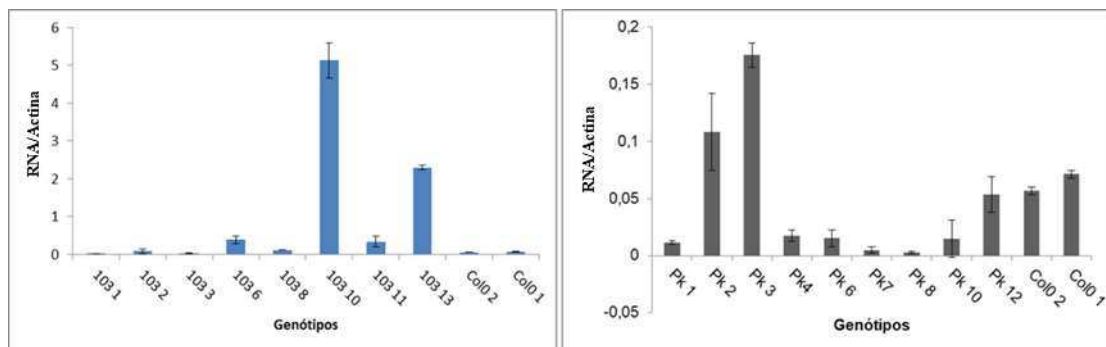


Figura 5: Linhagens obtidas superexpressando e silenciando o gene ZAR. (A) Plantas Col0 de Arabidopsis foram transformadas com a construção ZAR1-pEarleyGate103, obtendo linhagens superexpressando o gene ZAR1. A partir de qRT-PCR foram selecionadas as plantas 6, 10, 11 e 13. (B) Plantas Col0 de Arabidopsis foram transformadas com a construção ZAR1-PK7GWIWG2, obtendo linhagens

silenciadas para o gene ZAR1. A partir de qRT-PCR foram selecionadas as plantas 1, 4, 6, 7, 8, 10.

As linhagens selecionadas, superexpressando e silenciadas, foram utilizadas para o experimento de infiltração de tunicamicina, com o objetivo de visualizar o fenótipo de morte celular, ou seja, relacionar ZAR1 com a resposta ao estresse no RE (figura 6). Foi possível observar que a superexpressão de ZAR1 teve um fenótipo menos agravante de morte celular, quando comparado com Col0 e linhagens silenciadas. A superexpressão de ZAR1 apresentou um fenótipo similar ao de plantas superexpressando o gene de BiPD, evidenciando um fenótipo de maior tolerância a condição de estresse no retículo. No entanto, plantas ZAR1 silenciadas apresentaram um fenótipo de morte celular mais proeminente quando comparado a plantas Col0, BiPDox e ZAR1ox.

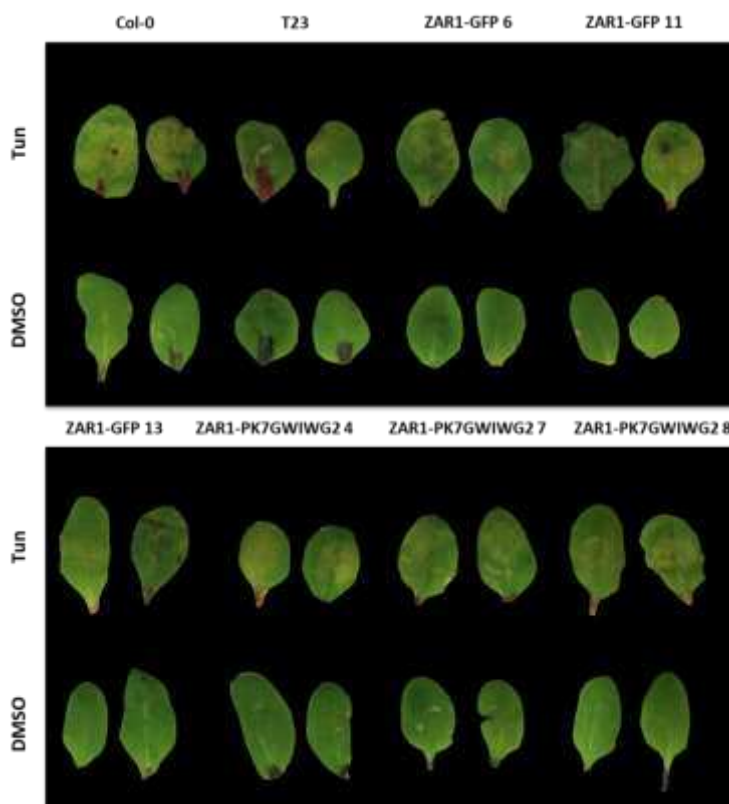


Figura 6: Inativação de ZAR1 leva a plantas mais sensíveis. Plantas ZAR1ox, ZAR1 silenciadas, BiPDox e Col0 de 5 semanas foram infiltradas com tunicamicina (15µg/ml). Após 4 dias, foram analisados os fenótipos de morte celular. DMSO foi utilizado como controle.

Interação de ZAR1 com RGS1

Proteínas G heterotriméricas são chaves moleculares importantes em vias de sinalização e estão envolvidas em respostas intracelulares como controle do crescimento, resposta ao desenvolvimento, resposta a hormônios e resposta a estresses. Em *Arabidopsis*, existem apenas uma forma da subunidade α (AtGPA1), uma β (AtAGB1) e três γ (AtAGG1, AtAGG2, AtAGG3) (Yu *et al.*, 2016). A sinalização mediada por proteína G consiste em muitos componentes, como as subunidades α , β e γ em conjunto, regulador da proteína G (RGS) e outros efetores que atuam ajusante (Chen *et al.*, 2006).

O regulador da proteína G identificado em *Arabidopsis*, o AtRGS1, possui na sua estrutura na região N-terminal 7 domínios transmembranas e RGS presente na região C-terminal apresentando atividade GTPase. Uma das suas funções é dessensibilizar a sinalização mediada por proteína G através da conversão da forma ativa $G\alpha$ -GTP para a forma inativa $G\alpha$ -GDP (Chen *et al.*, 2003). Estudos realizados demonstraram que AtRGS1 está envolvido na resposta de germinação de sementes a açúcares e ácido abscísico (ABA) (Chen *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que AtRGS1 está envolvido na regulação em resposta a seca, porém este mecanismo ainda é desconhecido (Chen *et al.*, 2006).

Quando fosforilado, AtRGS1, sofre endocitose, se desligando do complexo e assim ocorre a ativação da sinalização da proteína G (Tunc-Ozdemir *et al.*, 2016). A identificação de como ocorre esta regulação da proteína G através da fosforilação de RGS1 é importante, uma vez que ao se controlar RGS1 se torna possível controlar a velocidade de atividade em resposta ao estresse.

Existem evidências que AtRGS1 serve como substrato para as RLKs envolvidas no crescimento, desenvolvimento, imunidade inata, morte celular e desenvolvimento. Outra evidência é que as RLKs também podem servir como receptores ou co-receptores na sinalização acoplada à proteína G em plantas, sendo então claramente envolvidas na sinalização da proteína G em planta (Tunc-Ozdemir *et al.*, 2016).

LRR-RLKs podem modular diretamente a sinalização de proteína G por meio da fosforilação de AtRGS1, para induzir sua endocitose e, conseqüentemente desligando-o da proteína G e ativando a sinalização (Tunc-Ozdemir *et al.*, 2016).

Com o objetivo de substanciar este argumento, ensaios de co-imunoprecipitação foram inicialmente conduzidos para verificar se ZAR1 possui algum tipo de interação com RGS1 *in planta*. Para isto, foram utilizados extratos protéicos de folhas de *N. benthamiana* expressando transientemente ZAR1-GFP e RGS1-HA (Figura 7). Os extratos protéicos expressando transientemente ZAR1-GFP + RGS1-HA e RGS1-HA + eGFP (controle) foram co-imunoprecipitados utilizando beads anti-GFP, e detectada por *Western Blotting* com o anticorpo anti-HA, comprovando a interação *in vivo* entre ZAR1 e RGS1.

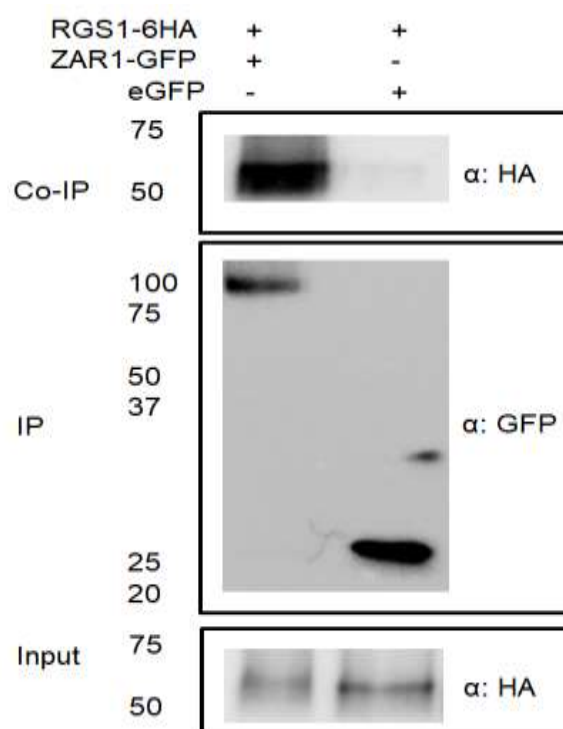


Figura 7: ZAR1 e RGS1 interagem *in vivo*. Extrato protéico de folhas de *N. benthamiana* agroinoculadas com ZAR1-GFP + RGS1-HA e RGS1-HA + eGFP. A banda da co-imunoprecipitação (Co-IP) de aproximadamente 58 KDa (RGS1 52 kDa + HA 6 KDa), representa a interação entre ZAR1 e RGS1. O input representa uma amostra antes de co-imunoprecipitar, detectada com anticorpo anti-HA, mostrando a presença e integração da proteína RGS1 em ambas as alíquotas. O imunoprecipitado (IP) representa a amostra após passar pelas beads anti-GFP, porém revelado com anticorpo anti-GFP, mostrando o nível de expressão da ZAR1-GFP e do eGFP. O eGFP foi utilizado como controle, mostrando que o GFP não influencia na interação.

A interação *in vivo* entre ZAR1 e RGS1 foi também avaliada pelo ensaio de BIFC (Figura 8). Além de detectar a interação *in vivo* entre proteínas candidatas, esta técnica permite identificar a localização subcelular da interação. Inicialmente, as proteínas ZAR1 e RGS1 foram fusionadas às porções N-terminal e C-terminal não fluorescentes, da proteína amarelo fluorescente (YFP). Culturas de *A. tumefaciens*, estirpe GV3101, carreando as combinações das construções foram agroinoculadas em folhas de *N. benthamiana*. Após 72 horas, fragmentos das folhas infiltradas foram analisados em microscopia confocal. A fluorescência emitida por YFP foi reconstituída na membrana das células coexpressando ZAR1-SPYNE e RGS1-SPYCE (Figura 8A), bem como em folhas coexpressando ZAR1-SPYCE e RGS1-SPYNE (Figura 8B). Nenhuma fluorescência foi detectada quando ZAR1 e RGS1 foram coinfiltradas com o vetor complementar vazio (Figura 7C, D,E,F). Estes resultados demonstram que a interação entre ZAR1 e RGS1 ocorre *in vivo* acontecendo nas membranas plasmáticas das células.

Embora comprovada a interação entre ZAR1 e RGS1, estudos posteriores devem ser realizados para identificar o mecanismo envolvido nesta interação e qual a resposta desencadeada por esta interação.

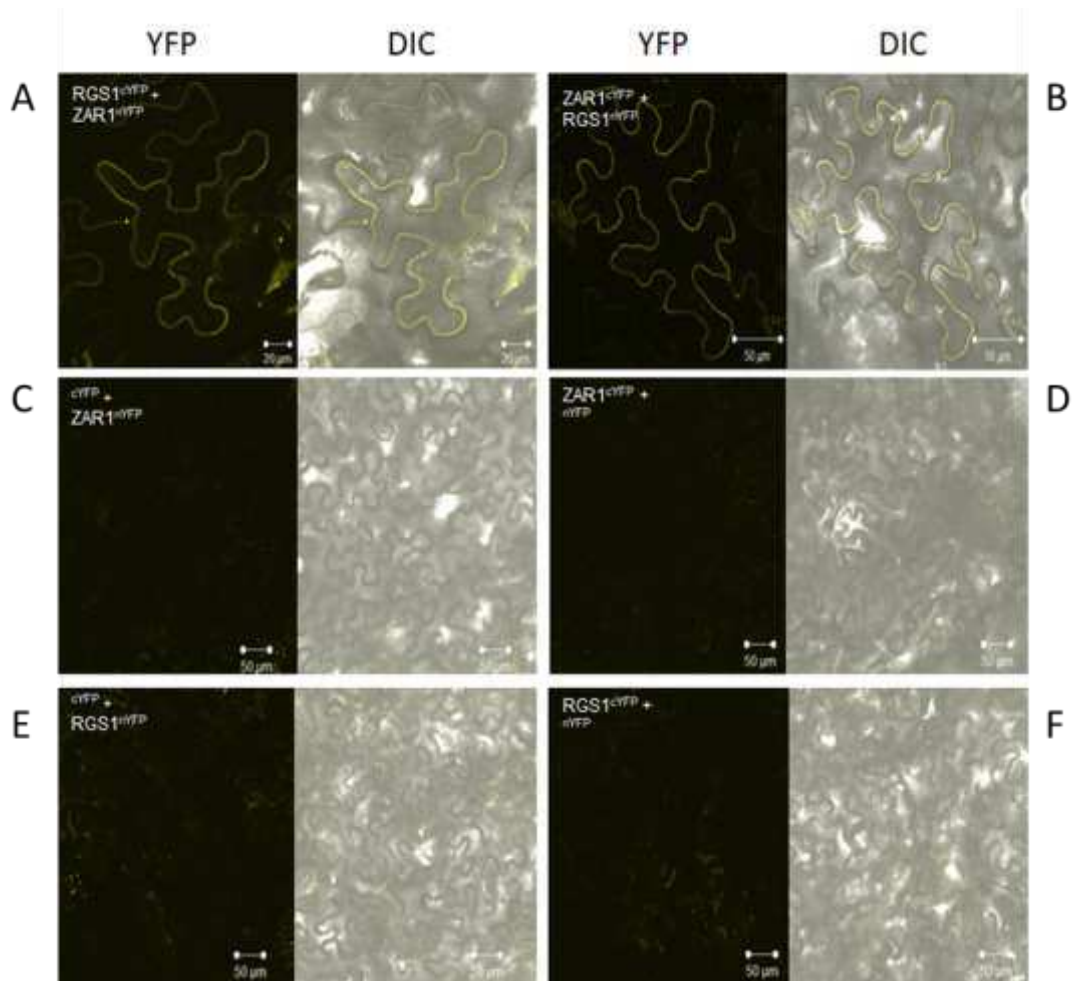


Figura 8: A interação entre ZAR1 e RGS1 ocorre na membrana plasmática. Fragmentos não fluorescentes da proteína amarela fluorescente (YFP), NE e CE, foram fusionados a ZAR1 e RGS1. Diferentes combinações das construções, conforme indicado, foram agroinfiltradas em folhas de *N. benthamiana* e analisadas por microscopia confocal, 72 h após agroinfiltração.

4. Conclusão

A partir do ensaio de mutagênese realizado com sementes de plantas superexpressando BiPD, foram identificados possíveis genes candidatos a supressores no mecanismo de tolerância mediado por BiPD. Dentre estes, ZAR1 se demonstrou um possível candidato a ser supressor do mecanismo de tolerância mediado por BiP.

A superexpressão de ZAR1 demonstrou através do ensaio de infiltração de tunicamicina possuir maior resistência quando comparado com linhagens silenciando ZAR1 e Col0. De acordo com estes resultados, experimentos futuros deverão determinar a relação de ZAR1 com via de resposta a estresse hídrico, através de um ensaio de estresse hídrico e da detecção do nível de expressão de genes na via em condições de estresses em ambas as linhagens (superexpressando e silenciadas) através de qRT-PCR.

Além disso, foi demonstrada que a interação *in vivo* de ZAR1 com RGS1 ocorre na membrana plasmática das células. RGS1 é o regulador da sinalização de proteína G, uma vez que sua fosforilação o desliga da proteína G, ativando a via de sinalização, além de possuir papel importante durante experimentos de estresse hídrico, onde sua superexpressão torna as plantas mais tolerantes. Desta maneira ZAR1 pode estar relacionada com a via de sinalização por meio da fosforilação de RGS1.

5. Referências Bibliográficas

- Carvalho HH, Brustolini OJB, Pimenta MR, Mendes GC, Gouveia BC, *et al.* The Molecular Chaperone Binding Protein BiP Prevents Leaf Dehydration-Induced Cellular Homeostasis Disruption. PLoS ONE 9(1): e86661, 2014.
- Cascardo J. C. M. *et al.*, The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses. J Biol Chem 275: 14494-14500, 2000.
- Chen JG, Willard FS, Huang J, Liang J, Chasse SA, Jones AM, Siderovski DP. A seven-transmembrane RGS protein that modulates plant cell proliferation. Science 301,1728–1731, 2003.
- Chen Y, Ji F, Xie H, Liang J, Zhang J. The regulator of G protein signaling (RGS) proteins involved in sugar and abscisic acid signaling in Arabidopsis seed germination. Plant Physiology 140, 302–310, 2006.
- Chen Y, Ji F, Xie H and Lian J. Overexpression of the regulator of G-protein signaling protein enhances ABA-mediated inhibition of root elongation and drought tolerance in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany. Vol. 57, No. 9, pp. 2101–2110, 2006.
- Cho, Y. *et al.* Heterotrimeric G protein subunits differentially respond to endoplasmic reticulum stress in Arabidopsis. Plant Signaling & Behavior, v. 10, n. 10, 2015.
- Lease KA, Wen J, Li J, Doke JT, Liscum E, Walker JC. A mutant Arabidopsis heterotrimeric G-protein β -subunit affects leaf, flower, and fruit development. Plant Cell 13, 2631–2641, 2001.
- Reis, P. A. B. *et al.* The Binding Protein BiP Attenuates Stress-Induced Cell Death in Soybean via Modulation of the N-Rich Protein-Mediated Signaling Pathway. Plant Physiology, v. 157, n. 4, p. 1853–1865, 2011
- Reis, P. A. B. *et al.*, Functional and regulatory conservation of the soybean ER stress-induced DCD/NRP-mediated cell death signaling in plants. BMC Plant Biology (Online), v. 16, p. 156, 2016

Tunc-Ozdemir, M.; Urano, D.; Jaiswal, D.K.; Clouse S.D.; Jones, A.M. Direct Modulation of a Heterotrimeric G protein-coupled Signaling by a Receptor Kinase Complex. *J Biol Chem*, 2016.

Ullah H, Chen J.G., Wang S., Jones A.M., Role of a heterotrimeric G protein in regulation of Arabidopsis seed germination. *Plant Physiol.* 129, 897–907, 2002.

Ullah H, Chen JG, Young JC, Im KH, Sussman MR, Jones AM. Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in Arabidopsis. *Science* 292, 2066– 2069, 2001.

Valente M. A. S. *et al.*, The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. *J Exp Bot* 60: 533-546, 2009.

Xu, D., Chen, M., Ma, Y., Xu, Z., Li, L., Chen, Y., *et al.* A G-protein b subunit, AGB1, negatively regulates the ABA response and drought tolerance by down-regulating AtMPK6-related pathway in Arabidopsis. *PLoS ONE* 10:e0116385, 2015.

Yu, T. Y., Shi, D. Q., Jia, P. F., Tang, J., Li, H. J., Liu, J., & Yang, W. C. The Arabidopsis receptor kinase ZAR1 is required for zygote asymmetric division and its daughter cell fate. *PLoS genetics*, 12(3), e1005933, 2016.