

PEDRO AUGUSTO BRAGA DOS REIS

**ANÁLISES MOLECULARES DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO
DE MORTE CELULAR ORIGINADAS NO RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

PEDRO AUGUSTO BRAGA DOS REIS

**ANÁLISES MOLECULARES DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO
DE MORTE CELULAR ORIGINADAS NO RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO**

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

APROVADA: 11 de fevereiro 2010.

Prof. Luciano Gomes Fietto
(Coorientador)

Prof^a Claudine Márcia Carvalho
(Coorientadora)

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro

Dra. Anésia Aparecida dos Santos

Prof^a Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus, por tudo que fez por mim. Por ter me dado saúde, força e disposição para conduzir este trabalho. Agradecer a Nossa Senhora, por sempre interceder a Deus nas horas que eu mais precisei.

Agradeço aos meus pais, pelo exemplo que são em minha vida e pelo apoio que sempre me deram. Aos meus irmãos, tios, primos e avós que torceram e rezaram por mim neste período.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização de uma Pós-Graduação gratuita e de excelente qualidade

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À Professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes por toda dedicação, apoio e compreensão que teve comigo durante todos estes anos de trabalho. Incentivando-me a crescer cada vez mais.

Ao Departamento de Bioquímica, professores e funcionários pela boa convivência e o bom aprendizado.

Ao professor Luciano, pela amizade, companheirismo durante todo o trabalho, me ajudando e dando força na realização dos experimentos e solução dos problemas encontrados.

A Claudine por toda a dedicação que teve em me ajudar em experimentos de confocal. Ao professor Marcelo pelos conselhos referentes aos experimentos realizados.

Ao Murilo, grande amigo, que me aturou, teve paciência e que muito me ajudou.

À Rejane e João Paulo, pela amizade e toda ajuda em todos os momentos deste trabalho.

Aos membros do LBMP, antigos e novos. Aos primeiros por todo o ensinamento e amizade que dura até hoje. Aos novos por toda a felicidade proporcionada a cada dia no laboratório.

Aos meus estagiários, Luciana e Gustavo, que me ajudaram a conduzir este trabalho.

Aos amigos da BQI 2003 pela amizade e companheirismo por mais estes anos.

Aos amigos da minha republica pela grata convivência durante estes anos.

Aos funcionários da estufa de soja e ao Newton, pela ajuda.

À Marlene e Gláucia pela presteza. A todos os funcionários do BIOAGRO que indiretamente contribuíram para o trabalho.

E a todos que de alguma forma me ajudaram e me incentivaram. Muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	ix
Introdução Geral	1
Revisão de LITERATURA	3
Retículo Endoplasmático	3
Chaperones moleculares e a proteína BiP (Binding Protein)	4
Via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR)	5
UPR em mamíferos e leveduras	5
UPR em plantas	7
Estresse osmótico	9
Morte celular programada	10
Estresse osmótico e estresse típico do retículo endoplasmático	11
Proteínas ricas em asparagina (NRPs)	12
Universal stress protein (USP)	13
CAPÍTULO I	15
Introdução	16
Material e Métodos	19
Clonagem de NRPs em vetores de expressão em bactérias, leveduras e plantas	19
Extração de mRNA e síntese de biblioteca de cDNA de soja	19
Escrutínio de cDNAs pelo sistema duplo híbrido de leveduras	22
Extração de RNA de folhas de soja e síntese de cDNA	25
PCR em tempo real	25
Material vegetal, condições de crescimento e tratamentos	27
Expressão transiente em folhas de tabaco por agroinoculação	27
Microscopia confocal	27
Preparo das células competentes e transformação de E. coli BL21(DE3)	28
Purificação de NRP-B fusionada à cauda de histidina	29
Produção de anticorpos contra NRP-B	29
Isolamento da Fração Microssomal	30
Western blot	30
Técnicas de Biologia Molecular	31
Resultados	32
Construção de uma biblioteca duplo-híbrido de cDNA de soja enriquecida para genes induzidos por tunicamicina e PEG	32
Identificação de proteínas que interagem com NRPs através do sistema de duplo-híbrido	34
NRP-B interage especificamente com o carboxi-terminal da proteína GmUspA	36
A proteína GmUspA é localizada no citosol	41
A expressão de GmUspA é controlada positivamente por indutores de estresses no RE e osmótico.	42
GmuspA é reprimido por indutor de morte celular	46
Localização subcelular das proteínas NRP-A e NRP-B.	48
Discussão	50
Conclusões	53
CAPÍTULO II	54
ABSTRACT	55

INTRODUCTION	56
MATERIAL AND METHODS	60
Plant growth and stress treatments.....	60
RNA extraction and cDNA synthesis	60
Real time PCR.....	61
Transient overexpression in <i>Nicotiana tabacum</i> by <i>Agrobacterium tumefaciens</i> infiltration.....	63
Determination of chlorophyll and carotenoid content	64
Results and discussion	65
BiP-overexpressing transgenic lines have increased resistance to the death- promoting effects of Tunicamycin.....	65
BiP also interferes with the osmotic stress- induction of the cell death NRP-A and NRP-B genes	72
BiP overexpression delays cell death induced by cycloheximide	74
BiP attenuates NRP-A- and NRP-B-induced PCD in agroinfiltrated tobacco leaves.....	77
CONCLUSION	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

RESUMO

REIS, Pedro Augusto Braga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Análises moleculares das vias de sinalização de morte celular originadas no retículo endoplasmático.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientadores: Luciano Gomes Fietto e Claudine Márcia Carvalho.

Estresses bióticos e abióticos são responsáveis por grandes perdas da produção vegetal em todo o mundo. Conseqüentemente, a elucidação dos mecanismos pelos quais estes organismos respondem e se adaptam a tais condições tem se tornado fundamental para o desenvolvimento de plantas melhor adaptadas. Recentemente, foi identificada uma via de sinalização inédita, mediada por proteínas ricas em asparagina (NRPs), que transduz sinais de morte celular originados por estresses no retículo endoplasmático (RE) e estresse osmótico. Esta via de resposta a estresses foi designada via integrativa por integrar sinais de estresses no RE e osmótico em uma resposta adaptativa comum e potencializada. Os objetivos da presente investigação foram (i) identificar componentes da via integrativa e (ii) analisar a função de BiP, um regulador de vias de resposta a estresses no RE, como atenuador de morte celular programada em plantas e sua possível conexão com a via integrativa. Inicialmente, foi construída uma biblioteca de cDNA duplo-híbrido de soja, preparado de folhas estressadas por tunicamicina, um indutor de estresse no RE, e PEG (estresse osmótico). Por meio de varredura de bibliotecas duplo-híbrido de cDNA, foi identificada uma proteína de soja, pertencente à família USP (universal stress protein) e aqui designada GmUspA, pela sua capacidade de interagir com NRP-B. Interação de GmUspA com NRP-B é mediada pela região carboxi-terminal da proteína, enquanto que a proteína GmUspA completa perde a habilidade de interagir com NRP-B no sistema duplo híbrido de

leveduras, sugerindo que a formação do complexo *in vivo* pode ser dependente de mudança de conformação induzida por ligantes. O gene *GmuspA* exibe um padrão de expressão similar aos genes NRP-A e NRP-B, sendo regulados positivamente por estresses do RE e osmótico, embora com cinética de indução diferenciada. Além disso, foi demonstrado por microscopia confocal que a proteína GmUspA fusionada a GFP localiza-se no citoplasma, possibilitando interações com a proteína NRP-B associada a membranas, o que foi demonstrado por “immunoblottings” de frações microssomais. Coletivamente, estes resultados indicam que a interação entre NRP-B e GmUspA pode potencialmente ocorrer *in vivo* e ser biologicamente relevante. Para avaliar a função de BiP como modulador de morte celular programada (PCD) em plantas, os níveis de BiP foram manipulados em plantas transgênicas desafiadas com indutores químicos de morte celular. Foi demonstrado que a superexpressão de BiP atenuou morte celular induzida por estresse no RE, estresse osmótico e por cicloheximida. Expressão ectópica de BiP em plântulas transgênicas de soja reduziu as lesões necróticas de folhas cotiledonárias causadas pelos indutores de morte celular, tunicamicina e cicloheximida, e manteve o turgor foliar sob condições de desidratação induzida por PEG. A atenuação de morte celular mediada por BiP foi confirmada pela falta de indução e, em alguns casos, pelo atraso na expressão de genes associados à senescência em plântulas transgênicas super expressando BiP. Este fenótipo de morte celular atenuada foi coordenado com decréscimo ou atraso na indução dos marcadores de morte celular NRP-A e NRP-B que estão envolvidos em transduzir um sinal de PCD emanado do estresse no RE e estresse osmótico. Um direto envolvimento de BiP na modulação da resposta de sinalização de morte celular mediada por NRPs foi examinado por meio de um ensaio de expressão transiente por agroinoculação em folhas de tabaco de linhagens transgênicas com expressão aumentada (linhagem senso) ou reduzida (linhagem antiseno) de BiP. Super

expressão de BiP preveniu clorose induzida por expressão de NRPs em setores foliares agroinoculados, enquanto que silenciamento de BiP endógeno em linhagens antisense acelerou o processo de senescência. Estes fenótipos de morte celular foram confirmados pelo teor de clorofila e pelo padrão de indução de genes associados à senescência em linhagens senso e antisense. Coletivamente, estes resultados indicam uma correlação direta entre os níveis de BiP e senescência induzida por NRPs e apontam favoravelmente para um envolvimento direto de BiP como modulador da resposta de morte celular programada mediada por NRPs.

ABSTRACT

REIS, Pedro Augusto Braga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2010. **Molecular analyses of cell death pathways signalling originated in the endoplasmic reticulum.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-advisers: Luciano Gomes Fietto and Claudine Márcia Carvalho.

Abiotic and biotic stresses are responsible for major losses in agricultural productivity world wide. Therefore, the understanding of mechanisms of plant stress response and adaptation to such conditions should provide the foundation for engineering plant stress tolerance and hence maximizing the yield of crops growing under adverse environmental conditions. Recently, we identified a novel signaling pathway, mediated by the asparagine –rich proteins (NRPs), that transduces cell death signals emanated from ER and osmotic stresses. This novel signaling response was designated integrative pathway since it integrates the ER- and osmotic-stress signals into a common adaptive response. The goals of the present investigation were two-fold: (i) to identify components of the integrative pathway and (ii) to analyze the BiP function, a regulator of ER-stress response pathways, as a modulator of cell death in plants and its possible connection with the integrative pathway. Initially, we constructed a two-hybrid cDNA library of soybean mRNAs prepared from leaves stressed with tunicamycin, a potent inducer of ER-stress, and PEG that mimics osmotic stress. By screening the cDNA library with NRP-B as bait, we identified a soybean protein that belongs to the UspA (universal stress protein) family that was designated here as GmUspA. GmUspA-NRP-B interaction was mediated by the carboxyl-terminal of the protein and full-length GmUspA failed to interact with NRP-B by the two-hybrid system in yeast. This result suggests that complex formation *in vivo* may be dependent on induced-conformational changes

mediated by bound proteins. Like *NRP-A* and *NRP-B*, *GmuspA* was up-regulated by ER- and osmotic-stress although with a different induction kinetics. Furthermore, we demonstrated by confocal microscopy that GmUspA fused to GFP is located to the cytoplasm favoring the possibility of interactions with membrane-associated proteins, like NRP-B. The previously identified membrane localization of NRP-B was further confirmed here by immunoblottings of microsomal fractions. Taken together, these results indicate that NRP-B - GmUspA interaction may occur *in vivo* and may be biologically relevant. In order to evaluate the role of BiP as modulator of programmed cell death (PCD) in plants, the BiP levels were manipulated in transgenic lines challenged with chemical inducers of cell death. We demonstrated that BiP overexpression attenuated cell death caused by ER stress, osmotic stress and cycloheximide-induced stress. Ectopic expression of BiP in soybean transgenic lines reduced cotyledon leaf necrotic lesions promoted by the cell death inducers tunicamycin and cycloheximide, and maintained shoot turgidity under PEG-induced dehydration. The BiP-mediated attenuation of cell death was confirmed by the lack of induction and in some cases by delayed expression of senescence-associated genes in BiP-overexpressing transgenic lines. This phenotype of attenuated cell death was coordinated with a decrease or delay in the induction of the cell-death genes *NRP-A* and *NRP-B*, which are involved in transducing a PCD signal emanated from ER stress and osmotic stress. The possible involvement of BiP in modulating NRPs-mediated cell death responses was directly examined through transient expression assays mediated by agroinoculation in tobacco leaves with enhanced (sense lines) or suppressed (antisense lines) expression of BiP. BiP overexpression in sense lines prevented NRPs-induced chlorosis in agroinoculated leaf sectors, whereas silencing of BiP in antisense lines accelerated the onset of leaf senescence. These cell death phenotypes were confirmed by measuring chlorophyll loss and expression of

senescence-associated genes in sense and antisense lines. Collectively, these results indicate a direct co-relation between the levels of BiP and NRPs-induced senescence and argue favorably for an involvement of BiP in modulating the NRPs-mediated PCD response.

Introdução Geral

As plantas são constantemente submetidas a variações ambientais e a condições adversas e, em função disso, apresentam mecanismos de resposta a danos e doenças, que são imediatamente ativados diante de uma situação de estresse. Uma das respostas celulares desencadeada pelas plantas é a ativação ou repressão de alguns genes, cuja função seja garantir a sobrevivência da planta e minimizar os efeitos do estresse.

O grande alvo de estudos de interação planta-ambiente é a obtenção de plantas geneticamente modificadas ou melhoradas que garantam uma maior tolerância às diferentes condições a que são submetidas. Estudos mostram uma gama de genes que estão relacionados às respostas de plantas a estresses sofridos (Kawasaki et al., 2001; Rabbani et al., 2003) e que são possíveis alvos de processos de resistência engenheirada em plantas.

As condições às quais as plantas são submetidas podem desencadear alterações na homeostase celular, levando ao estresse celular que, por sua vez, desencadeia vias de resposta nas plantas, visando diminuir os danos causados e restaurar a homeostase celular.

O estresse osmótico sofrido pelas plantas desencadeia uma série de respostas moleculares que culminam na expressão de genes responsáveis pelo controle de perda de água, manutenção do aparato fotossintético e de fixação de carbono (Xiong et al., 2002), além de ativar a expressão de genes que atuam na proteção celular e que regulam diversas vias de sinalização

O estresse no retículo endoplasmático (RE) é sentido quando ocorre uma alteração na sua homeostase, ocasionando um acúmulo de proteínas que não adquiriram um perfeito enovelamento, sendo incapazes de desempenhar sua função celular. Diante de tal processo, as plantas desenvolveram respostas

coordenadas que atuam minimizando os efeitos deste acúmulo e restaurando a homeostase do RE. A via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR) é uma das vias ativadas quando as condições do RE não são satisfatórias (Urade, 2007), levando à ativação de genes regulatórios, com consequente redução da tradução, aumento de proteínas residentes do retículo e de proteínas auxiliares que atuam no enovelamento protéico.

A chaperone molecular BiP é demonstrada atuar em respostas a estresse no RE e a estresse osmótico (Ron e Walter., 2007; Urade 2009; Leborgne-Castel et al., 1999; Valente et al., 2009), demonstrando uma possível conexão entre os estresses osmótico e do RE. Recentemente foi mostrada a convergência destas vias em uma nova via de sinalização (Irsigler et al., 2007), sendo identificados 10 genes que respondem a ambos os estresses. Dentre estes genes identificados destacam-se os da família NRP (*N-rich protein*), os quais apresentam uma indução sinérgica e que desencadeiam o processo de morte celular programada, por meio de uma nova via de sinalização (Costa et al., 2008). Assim, o entendimento desta via se torna de extrema importância para a obtenção de plantas mais resistentes a condições de estresse.

O presente trabalho teve como objetivo identificar um novo componente da via integrativa, capaz de interagir com as NRPs por meio do sistema de duplo-híbrido em leveduras e avaliar o papel de BiP nesta via e no processo de atenuação do estresse sofrido por plantas superexpressando essa chaperone molecular.

Revisão de Literatura

Retículo Endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é uma das maiores organelas celulares, possuindo um sistema de membranas que lhe confere versatilidade e grande flexibilidade, devido à grande área de superfície de membrana disponível para a incorporação de diferentes grupos de proteínas integrais e periféricas. Esta rede de membranas tem facilidade de expansão, contração, diferenciação espacial e organização (Staehelin, 1997). O RE se estende pelo citosol e pode ser contíguo ao envelope nuclear. É o local onde ocorre o dobramento e as modificações pós-traducionais de todas as proteínas secretórias e integrais de membrana. Além disso, participa na regulação da homeostase de Ca^{2+} e na biossíntese de lipídeos (Naidoo, 2009). Esta organela possui uma gama de chaperones, foldases, lectinas e enzimas que promovem a adição de carboidratos às proteínas. O ambiente no interior do RE é muito complexo e altamente concentrado, o que pode causar a agregação de moléculas (Stevens e Argon, 1999). No entanto, a existência de um rigoroso controle de qualidade das proteínas residentes no RE evita que ocorra um colapso celular. Tal controle suprime a formação de agregados, por garantir o correto enovelamento das proteínas formadas ou a degradação de proteínas defeituosas (Elgaard e Helenius, 2003).

Estresses que perturbam a homeostase do RE e promovem o acúmulo de proteínas mal dobradas desencadeiam uma via de sinalização, conhecida como via de resposta a proteínas mal dobradas (*Unfolded Protein Response* – UPR). Esta via de sinalização regula coordenadamente a expressão de uma

série de genes, visando contornar o estresse e garantir a homeostase celular (Schroder e Kaufman, 2005).

Chaperones moleculares e a proteína BiP (Binding Protein)

O dobramento de proteínas segue o princípio do auto-enovelamento, no qual a sequência de aminoácidos determina a conformação a ser seguida pelos peptídeos. Este processo requer a participação de proteínas auxiliares, como as chaperones moleculares, presentes no RE, mitocôndrias e citosol. As chaperones auxiliam no enovelamento de proteínas recém-sintetizadas (Frydman, 2001), atuando de maneira a impedir a agregação de proteínas mal enoveladas. Entretanto, caso ocorra o dobramento incorreto de proteínas, os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos expostos são reconhecidos pelas chaperones, levando à formação de um complexo relativamente estável, que só é dissociado com gasto de energia (Ellis, 1990). As chaperones são agrupadas em famílias, de acordo com a atividade desempenhada. Dentre elas estão HSP40 (*heat shock protein 40KDa*), HSP60, HSP70 e HSP90.

A chaperone molecular BiP (GRP78) é uma proteína de 78 KDa, pertencente à família HSP70, que possui um domínio ATPase amino-terminal e um domínio carboxi-terminal de ligação ao substrato (McKAY, 1993). Atua nos processos de dobramento de proteínas nascentes e na translocação de proteínas do citosol para o RE. A ligação de BiP ao substrato é dependente de gasto energético, mediado pela atividade do domínio ATPase (Flynn et al., 1989, Schroder e Kaufman, 2004). Durante a síntese de proteínas, peptídeos contendo o sinal de localização do RE são translocados, para que a tradução seja acoplada ao RE. Neste processo, as proteínas nascentes são reconhecidas por BiP, que facilita o seu enovelamento (Nguyen et al., 1991; Sanders et al., 1992). No caso das proteínas não conseguirem adquirir uma conformação adequada,

BiP desencadeia uma via de sinalização para remoção destas proteínas, através de degradação, ou ativa a via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR).

Em plantas, BiP tem sua expressão aumentada em condições de estresse, tanto bióticos quanto abióticos, tendo sido mostrado que a superexpressão de BiP aumenta a tolerância a estresses (Kalinski et al, 1995, Figueiredo et al, 1997, Alvim et al., 2001; Valente et al, 2009). Isso evidencia o papel de BiP nas vias de sinalização e sua atuação na manutenção da homeostase celular (Leborgne-Castel et al., 1999).

Via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR)

O RE possui um sistema de controle de qualidade das proteínas sintetizadas. Assim, proteínas mal dobradas são retidas no RE, para que adquiram a conformação ideal, ou são eliminadas, via degradação, após serem translocadas para o vacúolo ou, ainda, são retranslocadas para o citosol através da membrana no RE (Bonifacino and Weissman, 1998; Mori, 2000).

O acúmulo de proteínas mal dobradas desencadeia uma série de vias de resposta celular, destacando-se a via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR). É uma via de sinalização intracelular que transmite a informação sobre a qualidade das proteínas para o citosol e o núcleo. Quando ativada, leva à indução transcricional de genes responsivos à UPR, à atenuação da tradução global de proteínas e à ativação da via de degradação associada ao RE (ERAD; Liu e Kaufman, 2003).

UPR em mamíferos e leveduras

Mamíferos e leveduras possuem três tipos de proteína transmembrana responsáveis pela propagação do sinal de acúmulo de proteínas mal dobradas provenientes do RE: IRE1, PERK e ATF6. O processo de ativação da UPR via IRE1, PERK e ATF6 está condicionado à dissociação da proteína BiP destas proteínas. Na presença de estresse, BiP se desliga e promove uma mudança conformacional em tais proteínas, levando à ativação de domínios responsáveis pela propagação da cascata de sinalização (Oikawa et al., 2009; Shen et al., 2002).

IRE1 é uma proteína transmembrana do tipo I, capaz de interagir com BiP. Possui um domínio cinase e um domínio ribonuclease na região citoplasmática (Cox et al., 1993). O estresse no RE desencadeia o desligamento de BiP de IRE1, resultando na sua autofosforilação e, conseqüentemente, gerando uma mudança conformacional que ativa o domínio ribonuclease (Shamu e Walter, 1996). A atividade de ribonuclease de IRE1 cliva regiões intron-exon específicas do mRNA do fator de transcrição XBP1 (*X-box-binding protein 1*) em mamíferos (Calfon et al., 2002) e Hac1p em leveduras (Kawahara et al., 1998). Esta clivagem promove o *splicing* alternativo independente do espliciossomo que lidera a expressão do fator de transcrição ativo e atua na indução de genes responsáveis pela expansão do RE, maturação de proteínas, dobramento e exportação de proteínas do retículo e a exportação e degradação de proteínas mal dobradas (Calfon et al., 2002; Lee et al., 2003; Lee et al., 2002; Yoshida et al., 2003; Yoshida et al., 2001). Concomitante a essas atividades, IRE1 pode atuar na degradação de mRNAs alvo e, assim, promover a diminuição da tradução de proteínas no RE (Pirot et al., 2007).

Outra molécula sinalizadora encontrada no retículo é a PERK, uma proteína transmembrana tipo I, que apresenta um domínio serina-treonina cinase (Harding et al., 2000). Sob condições de estresse, BiP se dissocia de PERK, que sofre uma mudança conformacional, promovendo sua dimerização e

autotransfosforilação (Harding et al., 2000). Uma vez fosforilada, PERK promove a fosforilação do fator de iniciação da tradução eIF2 α que, por sua vez, inibe o processo de tradução global de proteínas, por impedir que eIF2 β (fator de troca do nucleotídeo de guanina) recicle o complexo eIF2, mantendo-o na forma ligada à GTP (Harding et al., 1999). Embora a fosforilação de eIF2 α iniba a tradução global, ela é capaz de promover a tradução seletiva de vários mRNAs, dentre eles, ATF4 -*Activating Transcription Factor* (Ron, 2002). Este fator é requerido na indução da expressão de genes responsivos à estresse oxidativo, biossíntese de aminoácidos, apoptose e de função de transporte (Harding et al., 2003; Ma et al., 2002).

A proteína transmembrana ATF6, com domínio zíper de leucina (bZIP), também está associada à proteína BiP no RE. No entanto, quando um sinal de estresse é percebido no retículo, como em situações de acúmulo de proteínas mal dobradas, BiP se dissocia de ATF6, que sofre uma mudança conformacional, seguida da translocação para o Complexo de Golgi (Haze et al., 1999). Uma vez nessa organela, ATF6 é clivada proteoliticamente, dando origem a ATF6 α e ATF6 β , que são translocados para o núcleo, onde se ligam a elementos responsivos ao estresse no RE (ERSE-1; Yoshida et al., 2001).

UPR em plantas

Em plantas, as vias de sinalização desencadeadas pelo controle de qualidade de síntese de proteínas no RE são análogas às de mamíferos e leveduras, embora os detalhes destes mecanismos moleculares não sejam muito bem caracterizados (Urade, 2007). As proteínas bZIP60 e bZIP28 (duas proteínas que contêm domínio zíper de leucina) e Ire 1-like, apresentam homologia com proteínas transdutoras da UPR de mamíferos e leveduras,

contendo uma região C-terminal conservada, com atividade de autofosforilação, com domínios cinase e ribonuclease. A região N-terminal, não-conservada entre outros organismos, está relacionada à função de percepção do estresse proveniente do RE, promovendo a indução de genes responsivos à UPR. No entanto, a sua atividade reguladora da transcrição durante estresse no RE e o alvo de sua atividade de ribonuclease ainda não foram elucidados (Urade, 2009).

As proteínas Ire 1-like têm a expressão aumentada quando as plantas são submetidas à estresse no RE (Koizumi et al., 2001). Em *Arabidopsis*, apresentam uma expressão tecido-específica, sendo relacionadas ao estágio de desenvolvimento das plantas.

O genoma de *Arabidopsis* apresenta 75 genes preditos com domínio zíper de leucina (bZIP) de fatores de transcrição, sendo que AtbZIP17, AtbZIP28, AtbZIP49, e AtbZIP60 apresentam domínio transmembrana. AtbZIP28 e AtbZIP60 são similares à ATF6 de leveduras e mamíferos, estando envolvidas na resposta a proteínas mal dobradas (Jakoby et al., 2002). Quando ocorre a percepção de estresse no RE, AtbZIP60, que está integrada à membrana na forma inativa, sofre uma clivagem proteolítica, sendo então induzida (Iwata et al., 2008). AtbZIP28 é uma proteína N-glicosilada que apresenta um domínio bZIP na região N-terminal e um domínio transmembrana na região C-terminal. Na ausência de estresse, encontra-se associada à membrana, mas quando ocorre acúmulo de proteínas mal dobradas, AtbZIP28 é clivada e liberada da membrana do RE (Liu et al., 2007). Entretanto, o seu possível e putativo processamento no Complexo de Golgi ou no RE ainda não foram determinados.

Os genes responsivos à UPR em plantas apresentam em sua região promotora seqüências cis-regulatórias conservadas, P-UPRE (*plant UPR element*) e ERSE (*ER stress response element*). Tais cis-elementos são reconhecidos pelos domínios zíper de leucina de bZIP60 e bZIP28, sendo, portanto, cruciais na indução de genes responsivos à UPR (Tajima et al., 2008).

Embora grande parte dos componentes da UPR em plantas não tenha sido elucidada, sabe-se que as proteínas Ire1s, bZiP60, bZiP28 e BiP desempenham funções de destaque nesta cascata de sinalização (Urade, 2009; Leborgne-Castel *et al.*, 1999).

Estresse osmótico

Plantas sob condições de estresse osmótico e iônico são capazes de adequar a quantidade de água para o seu crescimento e desenvolvimento, desenvolvendo respostas adaptativas que visam minimizar a perda de água, através do fechamento de estômatos, e a manutenção do aparato fotossintético e de fixação de carbono (Xiong *et al.*, 2002). Vários estudos de análise de expressão gênica têm identificado os genes envolvidos nas respostas a estresse osmótico e salino (Bohnert e Zhu, 2001; Kawasaki, 2001). Os mecanismos de resposta a esses estresses abióticos incluem a indução de genes que atuam na proteção das células e de genes que regulam vias de transdução de sinal. Estes, por sua vez, podem agir independentemente ou ter uma conexão com outras vias, amplificando a resposta de defesa celular.

Em plantas submetidas ao déficit hídrico ou estresse salino, ocorrem a redução do potencial osmótico do citosol celular e o acúmulo de osmólitos que tendem a prevenir o incorreto enovelamento das proteínas e aliviar os efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio – ROS (Xiong e Zhu, 2001; Hong *et al.*, 2000).

O íon Ca^{2+} participa na sinalização celular em resposta a estresses abióticos. Assim, em condições de estresse, a concentração de Ca^{2+} no citosol aumenta, devido ao influxo a partir do apoplasto ou à liberação de estoques internos (Sanders *et al.*, 1999). Este primeiro aumento desencadeia uma

resposta, estimulando mensageiros secundários, que iniciam outras cascatas de sinalização em resposta aos estresses sofridos (Knight, 2000).

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio rapidamente induzido em resposta a estresse, regulando a expressão de vários genes responsivos ao estresse (Rock, 2000). ABA atua na tolerância a estresse hídrico pela indução de genes de tolerância celular à desidratação. Os genes responsivos ao ABA têm em sua região promotora o cis-elemento responsivo ao ABA (*ABRE*). Sua sequência conservada, (C/T)ACGTGGC, é reconhecida por diversos fatores de transcrição que contêm motivo bZIP, os quais ativam genes responsivos à desidratação (Uno et al., 2000).

Morte celular programada

Organismos multicelulares apresentam um intrínseco programa de morte celular, que visa à preservação do organismo em detrimento à morte de uma célula (Kimchi, 2007). A morte celular programada em plantas (PCD) ocorre em auxílio ao crescimento e desenvolvimento normais (Azeez et al., 2007), e em resposta a estímulos abióticos (Harrak et al., 2001 e Koukalova et al., 1997). O controle sobre a decisão de levar à morte celular programada é realizado por proteínas anti ou pró-apoptóticas.

Apoptose refere-se a mudanças sofridas pelas células em função da sua morte, pela ativação de um programa de morte celular programada endógeno. Em animais, a morte celular está associada aos processos de condensação de cromatina, clivagem do DNA, formação de corpos apoptóticos e redução celular (Kerr et al., 1972), que envolvem a atuação de caspases, uma família de cisteíno-proteases ativadas em processos de morte celular programada (Li et al., 1997). Necrose é um processo de morte celular que ocorre após a exposição a condições fisiológicas extremas, às quais os níveis de tolerância celular não

conseguem responder. Neste caso, as células sofrem perda de integridade da membrana, degradação aleatória do DNA, descompartimentalização das organelas e extravasamento celular (Proskuryakov et al., 2002).

A morte celular programada em plantas envolve a ativação de marcadores bioquímicos semelhantes aos de animais, como clivagem e fragmentação do DNA, ativação de proteases caspase-like e formação de corpos apoptóticos (Ryerson e Heath, 1996; Navarre e Wolpert, 1999; Li e Dickman, 2004). No entanto, apresenta características únicas que diferenciam este processo do de animais, como a presença de uma rígida parede celular, cloroplastos e vacúolos com alta concentração de enzimas degradativas, a capacidade de totipotência, e a falta de um sistema de fagocitose (Lim et al., 2007).

Estresse osmótico e estresse típico do retículo endoplasmático

As vias de sinalização desencadeadas por estresse osmótico e estresse no RE não foram ainda totalmente caracterizadas. O estresse no RE é caracterizado pelo rompimento da sua homeostase, que promove o acúmulo de proteínas mal dobradas e a ativação de vias que visam minimizar o estresse gerado. O estresse osmótico pode ser causado por déficit hídrico ou por altas concentrações de sal, liderando a indução de vários genes osmoprotetores, chaperones e enzimas detoxicantes.

Experimentos realizados com plantas de soja evidenciaram a existência de uma via comum ao estresse no RE e ao estresse osmótico (Irsigler et al., 2007). Alguns genes tiveram a expressão coordenadamente aumentada em resposta a ambos os estresses, tendo sido observado um aumento sinérgico no acúmulo de seus transcritos quando as plantas foram submetidas ao tratamento simultâneo dos dois estresses. Estes dados indicam que a transferência de

informação entre as vias de sinalização compartilham uma resposta integrada, com potencial para alterar ou intensificar as respostas. Dentro dessa conexão de vias, 10 genes foram encontrados, sendo dois cDNAs correspondentes à família NAC (homólogos a NAM e ATAF2, mas que correspondem ao mesmo gene ATAF2), dois que codificam proteínas ricas em asparagina (*N-rich protein*), dois que codificam a enzima glutationa-S-transferase, um gene da proteína UBA, o fator eIF5, um cDNA da família AP2 e um cDNA com função desconhecida (Irsigler et al., 2007). A cinética de resposta e o efeito sinérgico da indução destes genes regulados positivamente sugerem que a sinalização de estresse osmótico e do RE convergem em alvos específicos, em nível de ativação gênica.

Proteínas ricas em asparagina (NRPs)

N-rich protein (NRP-A, proteína rica em asparagina) foi inicialmente identificada como uma proteína induzida durante a resposta hipersensível, servindo como marcador para morte celular programada (Ludwig e Tenhaken, 2001). Este gene não responde diretamente ao ácido salicílico, mas sua transcrição pode ser amplificada na presença de sinais dessa molécula, que é essencial para morte celular programada. NRP-A apresenta um domínio N-terminal extremamente rico no aminoácido asparagina (25%), o que derivou a sua designação (Ludwig e Tenhaken, 2001), e um domínio C-terminal, denominado DCD (*development and cell death*), relacionado com o desenvolvimento e morte celular em plantas (Tenhaken et al, 2005). Da mesma forma, NRP-B também possui os dois domínios característicos, apresentando massa molecular e ponto isoelétrico próximos aos de NRP-A (Costa et al., 2008; Ludwig e Tenhaken, 2001). Ambas têm os níveis aumentados quando as células são tratadas com indutores de estresse no RE e estresse osmótico (Irsigler et al.,

2007; Costa et al., 2008) e desencadeiam o processo de morte celular programada (Costa et al., 2008).

DCD é um domínio exclusivo de plantas. Os genomas de arroz e *Arabidopsis*, que foram primeiramente sequenciados, contêm onze e sete membros que apresentam o domínio DCD, respectivamente. Pelo menos quatro subgrupos de proteínas podem ser identificados por comparação filogenética do domínio DCD em arroz e *Arabidopsis*, diferindo na localização do domínio DCD na proteína. Enquanto no subgrupo I, o domínio DCD é encontrado no C-terminal da proteína, no subgrupo II, é mais central. O terceiro subgrupo é mais variável, sendo que as proteínas são principalmente caracterizadas pelo domínio DCD na região N-terminal e, neste caso, é encontrado um domínio adjacente ParB. O quarto subgrupo tem o domínio DCD na região N-terminal, mas contém várias repetições KELCH na parte C-terminal da proteína (Tenhaken et al., 2005).

Universal stress protein (USP)

Proteínas universais de estresse (USP), inicialmente encontradas em bactérias, estão envolvidas em condições de estresse e privação de nutrientes (Bogelen et al., 1990). Em *E.coli*, seis famílias gênicas estão presentes: *uspA*, *uspC*, *uspD*, *uspE*, *uspF* e *uspG*. As proteínas *usp* podem ser divididas em duas subfamílias, com base na similaridade de sequência do domínio USP. *UspA*, *UspC* e *UspD* pertencem à mesma subfamília, enquanto *UspF* e *UspG* pertencem à segunda subfamília. *UspA* é uma serina treonina cinase com capacidade de autofosforilação, usando ATP ou GTP como doadores de grupo fosfato (Freestone, 1997).

Análises em banco de dados mostraram que diversos organismos apresentam proteínas similares à *UspA* de bactérias. O domínio USP está presente em eucariotos e, assim como em bactérias, parece ter grande

importância. Em plantas, proteínas da família Usp apresentam o domínio USP associado a outros domínios funcionais. Estudos mostraram a indução de proteínas com domínio USP mediante tratamento com etileno, que, por sua vez, está envolvido em diversos processos fisiológicos, como senescência, alongação celular, abscisão foliar e resposta a estresses ambientais (Zegzouti et al., 1999; Abeles et al., 1992). Proteínas UspA que contêm domínio cinase ainda não possuem função conhecida, embora apresentem similaridade com proteínas Pto, que estão envolvidas em vias de sinalização em resposta a doenças bacterianas (Sessa e Martin, 2000).

CAPÍTULO I

IDENTIFICAÇÃO DE UM NOVO COMPONENTE DA VIA QUE CONECTA ESTRESSE NO RETÍCULO E ESTRESSE OSMÓTICO, POR INTERAÇÃO COM NRP-B

Introdução

A agricultura mundial sofre grandes perdas todos os anos devido às condições adversas enfrentadas pelas plantas, sendo a seca, a salinidade e as variações de temperatura os principais causadores destes prejuízos. Mesmo em condições não favoráveis, as plantas tendem a se adaptar e a criar condições para seu desenvolvimento. Para isso, elas desenvolveram mecanismos de respostas moleculares que visam minimizar ou retardar os danos causados por estresses de maneira que possam se recuperar. Os mecanismos bioquímicos utilizados pelas plantas em resposta a estas condições ainda não foram totalmente elucidados. A identificação dos componentes e sua forma de atuação são de grande interesse para pesquisadores que visam à elucidação das bases moleculares que promovem uma interação adaptativa das células vegetais com o meio biótico e abiótico.

O entendimento desses mecanismos moleculares da interação célula vegetal - meio ambiente tem levado ao desenvolvimento de estratégias moleculares para obtenção de plantas transgênicas tolerantes a estresses. Eventos de plantas geneticamente modificadas visando ao aumento de tolerância a estresses têm se baseado em manipulação de genes regulatórios, como fatores de transcrição e proteínas de sinalização, bem como de genes estruturais de proteção como chaperones moleculares e osmoprotetores (Hut et al., 2006; Valente et al, 2009; Jaglo-Ottosen et al., 1998; Hsieh et al., 2002).

Alguns tipos de estresses podem causar um acúmulo de proteínas que não adquirem uma conformação necessária para desempenhar uma função bioquímica. Assim, uma resposta molecular que visa diminuir este acúmulo e manter a homeostase celular deve ser ativada. A via de resposta a proteínas mal

dobradas (UPR) é uma via de sinalização desencadeada no retículo endoplasmático, ativada quando ocorre o acúmulo de proteínas que não adquiriram a conformação adequada e que seriam danosas às células (Urade, 2007). Embora a via de sinalização de proteínas mal dobradas em plantas ainda não tenha sido bem caracterizada, diversos homólogos de componentes da via UPR descritos em mamíferos e leveduras têm sido identificados. Estes homólogos em plantas desempenham funções similares na sinalização ao estresse gerado no retículo endoplasmático (Urade, 2009).

Outros tipos de estresse podem desencadear vias de sinalização diferentes, como as vias de sinalização em resposta ao déficit hídrico e à salinidade, que culminam em mecanismos de manutenção do equilíbrio osmótico celular (Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki e Seki, 2003). Indícios da existência de uma ligação entre vias de estresse osmótico e no RE têm sido demonstrados em plantas. A sobreposição dos transcriptomas induzidos 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). Neste experimento de hibridizações de microarranjo de DNA, foi evidenciado um total de 10 genes que exibem indução sinérgica em resposta à exposição simultânea de plantas a ambos os estresses, osmótico e do RE. Dentre estes genes, destacam os da família NAC (NAM, ATAF e CUC) e os da família NRP (*N-rich protein*).

NRPs são proteínas cuja expressão é aumentada tanto quando tratadas com indutores de estresse no retículo endoplasmático (RE) quanto por estresse osmótico. NRP é codificada por uma pequena família gênica, sendo representada por três cópias no genoma de soja, NRP-A, NRP-B e NRP-C. Tem sido demonstrado que a expressão dos genes NRP-A e NRP-B é aumentada sinergisticamente em resposta à combinação dos estresses osmótico e RE

(Irsigler et al., 2007; Costa, 2008). As proteínas NRP apresentam um papel importante nesta possível via integrativa, pois são capazes de induzir morte celular programada (Costa et al., 2008). Entretanto, a caracterização dessa via inédita de integração e potencialização da resposta de plantas a estresses abióticos ainda não foi conduzida e representa um dos objetivos dessa linha de pesquisa.

Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo a identificação de componentes capazes de interagir com as proteínas NRPs e que participassem das vias sinalização que conectam os sinais de estresse no RE e estresse osmótico. Um possível candidato identificado refere-se à proteína GmUspA, a qual foi isolada em um ensaio de duplo-híbrido, tendo sido induzida sob condições de estresse no RE e osmótico.

Material e Métodos

Clonagem de NRPs em vetores de expressão em bactérias, leveduras e plantas

Os cDNAs de NRP-A e NRP-B foram previamente clonados no vetor de entrada pCR8/GW/TOPO (Invitrogen; Costa et al., 2008) e então transferidos para os vetores pDEST32 (Invitrogen) e pDEST17 (Invitrogen), para expressão em leveduras e bactérias, respectivamente.

Os clones gerados a partir da recombinação com o pDEST32 (denominados pDEST32-NRP-B e pDEST32-NRP-A) permitem a expressão das proteínas NRP-A e NRP-B, respectivamente, fusionadas ao domínio de ligação ao DNA de *Gal4* de leveduras. Por sua vez, o clone gerado por recombinação com o pDEST17 (denominado pDEST17-NRP-B,) promove a expressão das proteínas fusionadas a uma cauda de histidina, em bactérias.

Os clones pK7-NRP-A e pK7-NRP-B foram previamente descritos (Costa et al., 2008). Em ambas as construções de DNA, a expressão do gene em destaque está sob o controle do promotor 35S (35S-NRP-A e 35S-NRP-B).

Extração de mRNA e síntese de biblioteca de cDNA de soja

Para a síntese da biblioteca de cDNA, plantas de soja da cultivar Conquista foram germinadas em solo orgânico (Bioplant), contendo uma mistura de solo, areia e esterco (3:1:1; Pedra et al., 2000). Foram retiradas do solo após uma semana (ou no estágio VC). Após a lavagem das raízes, com água corrente, estas foram transferidas para 15-mL de meio hidropônico

suplementado de Polietilenoglicol 10% (p/v) (PEG; MW 8000) e Tunicamicina (Sigma) 10 µg/mL, por 24 horas.

As folhas foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido. A extração de mRNA foi realizada utilizando-se dois gramas de material vegetal e o kit *FastTrack® 2.0 mRNA Isolation* (Invitrogen). O mRNA extraído foi quantificado (*Evolution 60 Thermo Scientific*) e sua integridade foi avaliada em gel de agarose desnaturante a 1,2%.

A biblioteca de cDNA foi construída utilizando o kit *SuperScript™ Plasmid System with Gateway® Technology for cDNA Synthesis and Cloning* (Invitrogen) com algumas modificações. A ligação do mRNA aos adaptadores de *primers* contendo sítios para a enzima de restrição *Not I* foi realizada incubando 5 µg de mRNA, juntamente com os adaptadores, a 70°C por 15 minutos. Para a síntese da primeira fita, adicionou-se 0,1 M de DTT, 5X *first strand buffer*, 10 mM de dNTPs e 1000 unidades de *SuperScript™ II RT*, seguindo à incubação a 37°C por 90 minutos. A síntese da segunda fita foi realizada como determinado pelo fabricante. Para a ligação dos adaptadores com sítios para a enzima *Sal I*, incubou-se o cDNA dupla fita a 16°C por 16 horas, na presença de T4 DNA ligase. Em seguida, o cDNA dupla fita foi digerido com *Not I* por 2 horas a 37°C e fracionado por cromatografia utilizando a coluna cromatográfica proveniente do Kit (*cDNA Size Fractionation Column*). Para isto, a coluna foi previamente lavada quatro vezes com 800 µL de tampão TEN (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 25 mM NaCl) autoclavado e procedeu-se ao fracionamento de 100 µL do cDNA, pela adição de 100 µL de tampão após cada eluição. Foram coletadas 22 frações de aproximadamente 35 µL (volume de uma gota proveniente da coluna). A integridade do cDNA nas frações coletadas foi avaliada por meio de PCR, utilizando-se os *primers* de NRP-B (Tabela 1) e 1 µL de cada fração como

molde. As frações que apresentaram um padrão de banda mais intenso foram agrupadas e o cDNA foi precipitado, seguindo orientações do fabricante.

O cDNA referente às frações agrupadas foi ligado a 500 ng do vetor pEXAD 502 (previamente digerido com *Not I* e *Sal I*). A reação de ligação procedeu-se a 4°C por 14 horas. O vetor pEXAD 502 ligado ao fragmento de cDNA foi precipitado e ressuspenso em 12 µL de água estéril.

As construções de DNA resultantes foram utilizadas para transformar *E. coli* DH5α, por eletroporação, a 25 µF de capacitância, 100 ohms e 2,50 KV. Foram transformadas 12 alíquotas de células competentes, e recuperadas em 800 µL de LB sem antibióticos. Cerca de 200 µL da transformação foram plaqueados em meio seletivo contendo 100 mg/L de ampicilina, e as 48 placas resultantes foram incubadas a 37°C por 16 horas.

As placas contendo os transformantes foram lavadas com 5 mL de meio LB e a cultura celular obtida foi utilizada para a extração de DNA plasmidial, com o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen). O DNA plasmidial extraído foi quantificado (*Evolution 60 Thermo Scientific*) e usado como molde em reação de PCR, utilizando os *primers* GmNAC2, GmNAC3, GmNAC4, GmNAC5, GmNAC6, GmERD15, GmUspA, Tiorredoxina, NRP-B (Tabela 1), a fim de avaliar a qualidade da biblioteca.

Tabela 1- Oligonucleotídeos específicos para clonagem em diferentes vetores

Oligonucleotídeo	Sequência (5'- 3')	Vetor de destino
FwGt NRP-B	ATGGAGAATAATAATCAGTCGTT	pCR8/GW/TOPO
RvGt NRP-B	TTATGCCGGCAAAGCCTTAAAAG	pCR8/GW/TOPO
FwGtNRP-A	ATGGACAACAACAATGACTTTTG	pCR8/GW/TOPO
RvGtNRP-A	CTATGCTGGAATGGCTTTGAAA	pCR8/GW/TOPO
FwrGt-UspA	AAAAAGCAGGCTTCACAATGACGAGTTTGAC	pDONR201
RvsGt-UspA st	AGAAAGCTGGGTCTTATGGCTGCTTCACGATTAC	pDONR201

RvsGt-UspA ns	<u>AGAAAGCTGGGTCTGGCTGCTTCACGATTAC</u>	pDONR201
FwrGt-Thio	<u>AAAAAGCAGGCTTCACA</u> ATGGCTGAAGAG	pDONR201
RvsGt-Thio st	<u>AGAAAGCTGGGTCT</u> CAAGAAGAAGCAGC	pDONR201
FwrGt-GmNAC2	<u>AAAAAGCAGGCTTCACA</u> ATGGCATCAGAGCTTGA	pDONR201
RvsGt-GmNAC2	<u>AGAAAGCTGGGTCT</u> CAAAAGGACTTGTGGGCCA	pDONR201
Fwr-GmNAC4	<u>TTCACA</u> ATGGGAGTTCCAGAGGAAGA	pCR8/GW/TOPO
Rvs-GmNAC4	TCAATTCCTGAACCCGAACC	pCR8/GW/TOPO
Fwr-GmNAC6	<u>TTCACA</u> ATGGAAGACATGAACAACATG	pCR8/GW/TOPO
Rvs-GmNAC6	TCAGTAGAACTTTAGAATATTGG	pCR8/GW/TOPO
Fwr-GmNAC3	<u>AAAAAGCAGGCTTC</u> ATGGGAGTTCCAGAGAG	pDONR201
Rvs-GmNAC3	<u>AGAAAGCTGGGTCT</u> CAGTCCCTAAACCCGA ACTC	pDONR201
Fwr-GmNAC5	<u>TTCACA</u> ATGGAAAACGTTTCGGTTCTT	pCR8/GW/TOPO
Rvs-GmNAC5	TCAGTAGTTCCACAAGGTAG	pCR8/GW/TOPO
Fwr-GmERD 15	<u>AAAAAGCAGGCTTCACA</u> ATGGAAGTCATTTCTGC	pDONR201
Rvs-GmERD 15	<u>AGAAAGCTGGGTCT</u> CCTACCTGGGCTGGTGAATAGC	pDONR201
Fwr-pEXAD502	<u>CGGTCCGAACCTCATAACAAC</u>	pEXAD502
Rvs-pEXAD502	<u>GTAATTTCTGGCAAGGTAGAC</u>	pEXAD502

* Nucleotídeos em negrito correspondem à *start/stop códon*. Nucleotídeos grifados representam attB parcial para clonagem em sistema *Gateway*.

Escrutínio de cDNAs pelo sistema duplo híbrido de leveduras

As construções pBD-NRP-A e pBD-NRP-B foram utilizadas para transformar levedura da linhagem AH109 (MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ, MEL1, construções repórteres que são expressas somente na presença de GAL4, baseado em interações entre proteínas), juntamente com 2 μg de DNA carreador de esperma de salmão (ssDNA), pelo método de acetato de lítio/polietilenoglicol (PEG). Os transformantes foram plaqueados em meio seletivo com deficiência em leucina e crescidos por três dias a 28°C.

As leveduras transformadas com pBD-NRP-A e pBD-NRP-B foram co-transformadas com 12,5 μg de biblioteca de cDNA em pEXPAD502 e 400 μg de DNA carreador, seguindo o protocolo *Matchmaker Yeast Two-Hybrid System*

(Clontech). As leveduras transformadas foram plaqueadas em meio seletivo com deficiência em leucina, triptofano e histidina, e suplementado com 15 mM de 3-aminotriazol. As placas foram incubadas por cinco dias a 28°C. Os transformantes foram repicados em placas contendo meio com deficiência nos aminoácidos *leucina*, *triptofano* e *histidina* e suplementados com concentrações crescentes de 3-aminotriazol.

As colônias selecionadas foram transferidas para membrana de Nylon sobre meio seletivo com deficiência em *leucina* e *histidina*, para posterior ensaio de β -galactosidase. Para isso, a membrana foi mergulhada em nitrogênio líquido por 15-20 segundos e, após o descongelamento, foi colocada sobre papel de filtro embebido em tampão Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 16,1g/L; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5,5 g/L; KCl 0,75 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,246 g/L), β -mercaptoetanol e X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside). As colônias que apresentaram atividade de β -galactosidase, evidenciada pela coloração azul, foram crescidas em meio líquido com deficiência em *leucina* e *triptofano*. O DNA plasmidial das colônias selecionadas foi extraído pelo *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen), utilizando pérolas de vidro para o rompimento das células de levedura.

O DNA plasmidial extraído foi utilizado para retransformar *E. coli* DH5 α , por meio de eletroporação, e os transformantes foram plaqueados em meio seletivo contendo ampicilina. As colônias selecionadas foram crescidas em meio líquido contendo ampicilina, para extração de DNA plasmidial, que foi utilizado como molde em reação de PCR com os *primers* do pEXPAD 502 (Tabela 1). O DNA foi quantificado por espectrofotometria (*Evolution 60 Thermo Scientific*) e sequenciado.

Clonagem de possíveis cDNAs candidatos completos em vetores de expressão em bactérias, leveduras e plantas

As amostras seqüenciadas foram analisadas com auxílio do programa Phytozome (www.phytozome.com). Após a obtenção das seqüências completas, procedeu-se ao desenho de oligonucleotídeos (Tabela 1) com sítios para o sistema *Gateway* (Invitrogen), visando à amplificação dos cDNAs completos dos genes.

A região codificadora do gene *GmuspA* foi amplificada com oligonucleotídeos contendo uma seqüência *attB* parcial na extremidade 5' (Tabela 1) para posterior amplificação com extensões de recombinação compatíveis com o sistema *Gateway* de clonagem (Invitrogen). Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1% (p/v) e purificados com o kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen). O fragmento foi inserido no vetor de entrada pDONR201, por recombinação, utilizando BP clonase (Invitrogen). Foram gerados os clones pDON-GmuspA-st (pUFV1424), com códon de terminação, e pDON-GmuspA-ns (pUFV1419), sem códon de terminação. O cDNA de *GmuspA-st* foi transferido do pDONR201, por recombinação através de LR clonase, para os vetores de expressão em levedura e em planta, pDEST22 (Invitrogen) e pK7WG2, respectivamente. Os clones resultantes foram denominados pUFV1440 (pAD-GmUspA) e pUFV1438 (pK7-GmUspA), respectivamente. A expressão de pAD-GmUspA em leveduras produz a proteína quimérica AD-GmUspA (GmUspA fusionada ao domínio de ativação de Gal4). O clone pK7-GmUspA (35S-GmUspA) permite a expressão da proteína GmUspA intacta em plantas, sob o controle do promotor 35S. O cDNA do clone pDON-GmuspA-ns foi transferido para o vetor de expressão em planta pK7FWG2 (Invitrogen), gerando o clone pUFV1420 (pK7F-GmUspA). Esta construção permite a expressão da proteína GmUspA fusionada à GFP (*Green Fluorescent Protein*) na região carboxiterminal, sob o controle do promotor 35S.

Extração de RNA de folhas de soja e síntese de cDNA

O processo de extração de RNA consistiu na utilização de Trizol (Invitrogen), seguido por precipitação com isopropanol. A qualidade e a integridade do RNA foram monitoradas, respectivamente, por espectrofotômetro (*Evolution 60 Thermo Scientific*) 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 (18), de acordo com recomendações do fabricante.

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 (Tabela 2).

As condições de amplificação foram: 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. A expressão gênica foi quantificada utilizando o método comparativo de Ct: $2^{-\Delta Ct}$. O RNA da helicase foi usado como controle endógeno, para normalização dos dados.

Oligonucleotídeo	Seqüência (5' – 3')	Gene
HELIC Fw	TAACCCTAGCCCCTTCGCCT	Helicase
HELIC Rv	GCCTTGTCGTCTTCCTCCTCG	
NAM Fw	ACGGAGACTTCAGATTCGGTGC	ATAF
NAM Rv	CATCGTTATTCCACTTGGGGTCGC	
Nac6 Fw	CCAACAAAAGCACTTGTGGCA	Nac6
Nac6 Rv	GGACTATTCAACTGAGCCCAAAG	
CALN Fw	TGATGGGGAGGAGAAGAAAAAGGC	CALN
CALN Rv	CACTTGGGTTTGGGATCTTGGCTC	
NRP Fw	GGCACAAAGACTGGTGCTGAGA	NRP-A
NRP Rv	CTCTGTATCGTGGAGGCAGACC	
NRich Fw	TACAGGCATCCAATTTGGCGAACC	NRP-B
NRich Rv	TGACTTGAAAGAGTTGATCTCACCCC	
GmCYSTP Fw	TGGAAAGCAACTCAATCATGGT	CystP
GmCYSTP Rv	CCCCATGAGTTCTTCACAATCC	
Fwr-USP	AATATGCAGTGCTGTCAAGAAACTAGA	GmUspA
Rvs-USP	GTGCCCTCTTAAAGAATCCATAGC	
SMP Fw	GCCGAACTGAGGAAAAGACGAACC	SMP
SMP Rv	CTTGGGCTGTTTGTGGGTCTTC	

Tabela 2 – Listagem dos oligonucleotídeos para qRT-PCR em soja

Material vegetal, condições de crescimento e tratamentos

Para os ensaios de indução de estresse osmótico, no RE e de morte celular, plantas de soja da cultivar Conquista foram germinadas em terra, em casa de vegetação, e retiradas do solo após uma semana (ou no estádio VC). Após a lavagem das raízes, com água corrente, estas foram colocadas em 15-mL de solução contendo Polietilenoglicol 0,5% (p/v) (PEG; MW 8000) e Tunicamicina (Sigma) 2,5µg/mL e Cicloheximida (Sigma) 5 µg/mL. Como controle, as plantas foram colocadas em H₂O, para o tratamento com PEG, e em DMSO, para o tratamento com Tunicamicina e Cicloheximida. A indução foi conduzida por 48 horas. As folhas das plantas tratadas foram coletadas nos tempos de 8, 24 e 48 horas e armazenadas a -80 °C até o processamento das amostras.

Expressão transiente em folhas de tabaco por agroinoculação

Clones de *Agrobacterium tumefaciens* contendo as construções de DNA de interesse foram crescidos em meio Rhizo a 28°C por 12 horas. Após esse período, procedeu-se à centrifugação a 8000 rpm por 5 min, seguindo-se à ressuspensão das células com 1 mL de meio de infiltração (MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM, pH 5,6, e 100 µM de acetoseringona). Os processos de centrifugação e ressuspensão das células foram repetidos. Em seguida, as células foram diluídas em meio de infiltração para o valor de OD de 0,05-0,2. Folhas jovens de tabaco foram infiltradas vagarosamente, utilizando seringas estéreis, garantindo a difusão uniforme do líquido ao longo da folha.

Microscopia confocal

Folhas de tabaco agroinoculadas com o cassete pK7FWG2-GmUSP foram submetidas à análise de microscopia confocal, três dias após a inoculação. As imagens de confocal foram obtidas utilizando-se o sistema LSM 510 META invertido (ZEISS) com *argon laser*, com a objetiva de imersão de óleo de 40 x 1,4. GFP foi excitada a 488 nm, e sua emissão foi coletada a 500-530 nm. O *pinhole* foi usualmente fixado, fornecendo uma faixa óptica de 1 a 1,5 μm . Foram utilizados controles, a fim de evitar a detecção de autofluorescência. As imagens foram processadas com auxílio do *software* “LSM Image Browser 4” (ZEISS) e posteriormente editadas no Adobe Photoshop.

Preparo das células competentes e transformação de E. coli BL21(DE3)

O cDNA do clone pUVF1166 foi utilizado na transformação de células competentes de *E. coli* BL21DE₃ pelo método do choque térmico (Sambrook et al., 1989).

Para transformação, uma alíquota de células competentes foi misturada com 3 μL (50 ng / μL) de cDNA (pDEST17-NRP-B) e a suspensão mantida em gelo por 30 minutos. Após um choque térmico de um minuto a 42°C, adicionou-se 1 mL de meio LB, seguido de incubação a 37°C, por uma hora. As células foram concentradas por centrifugação, ressuspensas em 100 μL de meio LB e espalhadas em placas contendo LB e ampicilina 100 mg/L, para seleção de colônias transformantes.

Os transformantes foram confirmados via PCR com oligonucleotídeos específicos para a seqüência do gene *NRP-B*, e o produto amplificado separado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). O clone recombinante gerado, pUFV1168, foi armazenado em glicerol 40% (v/v) a -80°C.

Purificação de NRP-B fusionada à cauda de histidina

A proteína recombinante NRP-B fusionada a resíduos de histidina foi purificada por cromatografia de afinidade com resina de Ni²⁺. Para purificação em grande escala, 1 litro de células induzidas foram centrifugadas a 5000 x g por 10 minutos e ressuspensas em tampão de ligação (NaH₂PO₄ 100mM, Tris 10mM, Imidazol 10 mM, e uréia 8 M pH 8,0). O rompimento das células ocorreu mecanicamente por ultrassonicação, utilizando o *Ultrasonic Homogenizer 4710 Series* (Cole Parmer), com os padrões de pulso 5, amplitude 60/80, por 15 segundos. As células foram centrifugadas a 10.000 x g por 20 minutos, para a remoção de restos celulares. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 µm e ligado à resina Ni-NTA Agarose (Qiagen) ativada com Ni²⁺, previamente equilibrada com o tampão de ligação. A purificação foi realizada pelo método Batch, segundo protocolo do fabricante.

Produção de anticorpos contra NRP-B

A proteína NRP-B recombinante purificada foi utilizada como imunógeno para produção de anticorpos em coelhos. Antes da primeira inoculação, foi coletado o soro normal (pré-imune). As imunizações foram feitas por meio de três injeções intramusculares, aplicadas nos músculos posteriores da pata traseira do animal, em intervalos de 12 e 23 dias. Para a primeira imunização, a solução de proteína foi emulsificada com igual volume de adjuvante de "Freund's" completo e para as duas imunizações subsequentes, foi utilizado adjuvante de "Freund's" incompleto. Foram coletadas três frações do anti-soro, sendo a primeira coleta realizada após 14 dias da segunda aplicação de antígeno e as coletas n° 2 e 3 realizadas semanalmente, após a terceira

aplicação. O material foi obtido através de pequenas incisões na veia marginal da orelha do coelho. Para a clarificação do anti-soro, o sangue foi incubado a 4°C por 12 horas, para a formação e remoção do coágulo. O sobrenadante foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 min a 4°C, dividido em alíquotas de 1 mL e armazenado a -80 °C, na presença de azida sódica 0.02% (p/v).

Isolamento da Fração Microssomal

Plantas de tabaco foram agroinoculadas com os clones pUFV968 e pUFV969 (Costa, 2008) e, após três dias, o material foliar foi coletado e congelado em nitrogênio líquido. Para a extração da fração microssomal, 1 g de tecido foliar foi triturado em almofariz e solubilizado em tampão de extração (Hepes pH 7,5 100 mM, sacarose 0,4 M, KCl 10 mM, EDTA 1mM, DTT 2 mM). O extrato foi passado em peneira de 0,64 µm e centrifugado a 6.000 x g por 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi centrifugado a 13.000 x g por 20 minutos a 4°C. Coletou-se uma fração do sobrenadante (fração total) e o restante foi centrifugado a 125.000 x g por 60 minutos. Coletou-se o sobrenadante (fração solúvel) e o *pellet* foi ressuspensão em tampão de ressuspensão (Tris 50 mM, pH7,5 e CaCl₂ 10 mM; fração microssomal). As amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford., 1976) (BioRad), conforme recomendações do fabricante.

Western blot

As proteínas foram separadas em SDS-PAGE com concentração de acrilamida + bis-acrilamida 12% (p/v) (LAEMMLI, 1970), no tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM, EDTA 1 mM e SDS 3,5 mM) e voltagem constante de 100V. Após a eletroforese, os géis foram revelados em solução

corante [metanol 45%(v/v), etanol 9% (v/v) e *coomassie brilliant blue* R250 0,01% (p/v)] por 2 horas e, em seguida, descorados em solução descorante [metanol 25% (v/v) e ácido acético glacial 7,5% (v/v)]. Alternativamente, as proteínas corridas em gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento *Transblot* da BIORAD. A membrana de nitrocelulose foi incubada com o reagente de bloqueio *Blotting Grade Blocker, Non-Fat Dry Milk* (BIORAD) por no mínimo 1 h à temperatura ambiente e lavada com tampão TBS-T [Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, NaCl 0,015 mM, Tween-20 0,1% (v/v)]. Para imunodeteção da proteína NRP-B, foi utilizado o anticorpo policlonal de coelhos contra a proteína NRP-B, na diluição de 1:500. Como segundo anticorpo, foi utilizado o anticorpo comercial de coelho IgG anti-coelho (SIGMA), conjugado à enzima fosfatase alcalina (SIGMA), numa diluição de 1:5000. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada utilizando-se os substratos BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) e NBT (azul-nitro tetrazólio; GIBCO BRL).

Técnicas de Biologia Molecular

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

Resultados

Construção de uma biblioteca duplo-híbrido de cDNA de soja enriquecida para genes induzidos por tunicamicina e PEG.

Uma biblioteca de cDNA de soja foi construída como estratégia de identificação de componentes da via integrativa mediada por proteínas ricas em asparagina (NRPs) (Costa et al., 2008). Esta biblioteca possui os cDNAs fusionados ao domínio de ativação de *Gal4* de levedura, o que permitiu a realização de um ensaio de duplo-híbrido, utilizando NRP-A e NRP-B como iscas.

A biblioteca de cDNA foi preparada utilizando mRNA de plantas submetidas a uma combinação de tratamentos que induzem estresses no RE e osmótico, a fim de enriquecer a representação de transcritos que codificam possíveis componentes da via de sinalização mediada pelas proteínas NRPs e que integra esses sinais de estresses em uma resposta de morte celular potencializada (Irsigler et al., 2007 e Costa et al., 2008). O cDNA sintetizado foi fracionado por tamanho, sendo selecionadas as frações 8 a 13 para construção da biblioteca, de acordo com o resultado do PCR utilizando os *primers* de NRP-B como molde (Figura 1).

A qualidade da biblioteca construída, cujo título é 20000 clones, foi avaliada por PCR, utilizando *primers* de genes que respondem a estresses (Figura 2)

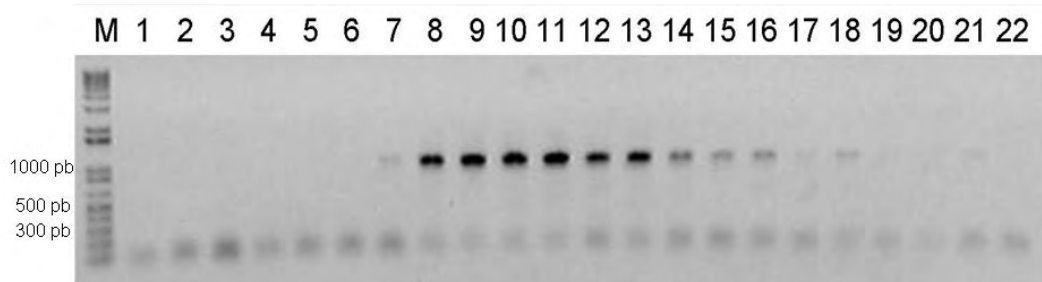


Figura 1- Fracionamento de cDNA sintetizado para construção da biblioteca duplo- híbrido. PCR utilizando como molde as frações de cDNA que foram eluídas da coluna cromatográfica de filtração gélida. Os *primers* de NRP-B foram utilizados na amplificação, gerando um fragmento de aproximadamente 1000 pb. As alíquotas 8-13 foram agrupadas no prosseguimento da construção da biblioteca. M corresponde ao marcador de tamanho de fragmentos de DNA em pb.

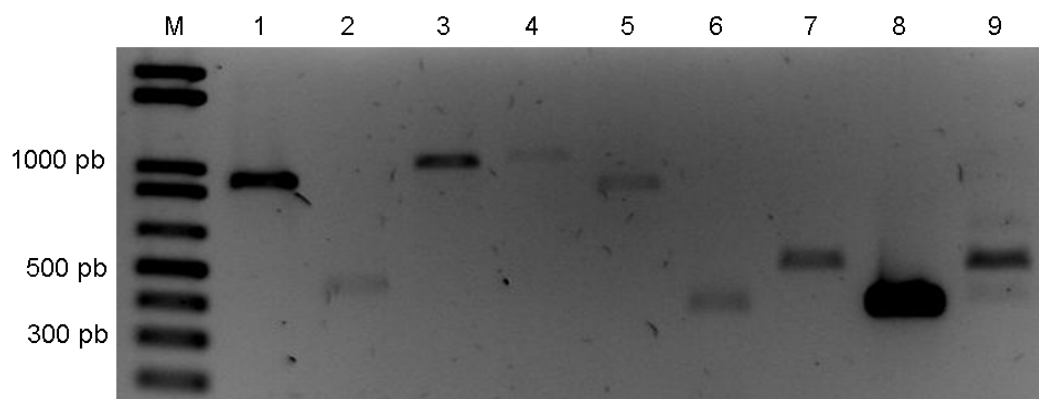


Figura 2- Amplificação de genes específicos a partir da biblioteca de cDNA. Alíquotas da biblioteca de cDNA foram utilizadas como molde em reações de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos de genes definidos. As canaletas representam: 1-NAC2; 2-NAC3; 3-NAC4; 4-NAC5; 5-NAC6; 6-Thiorredoxina; 7-GmuspA; 8-GmERD 15; 9-Domínio *N-rich* de NRP-B. M corresponde ao marcador de tamanho de fragmentos de DNA em pb.

A amplificação dos genes *GmNAC2*, *GmNAC3*, *GmNAC4*, *GmNAC5* e *GmNAC6* (Pinheiro et al., 2009) e do domínio de *N-rich* de NRP-B (Costa et al., 2008) demonstraram que esta biblioteca de cDNA apresenta uma gama de

genes *full-length* e que atuam em resposta a estresses. *GmuspA*, *thiorredoxina* e *GmERD15* são genes que apresentam similaridade com genes de outros organismos e que respondem a situações de estresse (Kariola et al., 2006; Sessa e Martin, 2000). A qualidade desta biblioteca e a abrangência dos genes encontrados permitiram que ela fosse utilizada em ensaios de duplo-híbrido.

Identificação de proteínas que interagem com NRPs através do sistema de duplo-híbrido.

Com a finalidade de identificar possíveis componentes da via integrativa e que fossem capazes de interagir com NRPs, foram utilizadas a biblioteca de cDNA de folhas de soja clonada no vetor pEXAD 502 e as construções pBD-NRP-A e pBD-NRP-B como iscas. Transformantes duplos independentes (2×10^4) foram plaqueados em meio sem *leucina* e *triptofano*, para selecionar pela presença de ambos os plasmídeos isca e da biblioteca de cDNA. Foram também plaqueados em meio na ausência de *leucina*, *triptofano* e *histidina* para selecionar interações entre NRPs e proteínas codificadas pelo cDNA da biblioteca de folhas de soja. Isto possibilitou a identificação de possíveis proteínas que interagem com NRPs, uma vez que foram selecionados os transformantes que mostraram prototrofia à histidina.

Tabela 3- Possíveis candidatos a interagir com as proteínas NRPs

Proteína utilizada como isca	Proteína identificada
NRP-A	Thiorredoxina-like
NRP-A	Piruvato Cinase
NRP-A	Homólogo a OSB3 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
NRP-A	Fator de transcrição / motivo dedo de zinco
NRP-B	Similar à UspA
NRP-B	Clorofila a/b binding protein
NRP-B	Similar ao fator de transcrição bZIP 117

No primeiro processo de varredura, foram identificadas quatro proteínas candidatas a interagir com NRP-A e três a interagir com NRP-B (Tabela 3). A fim de determinar se as proteínas codificadas pelos cDNAs candidatos interagiam especificamente com NRP-A, os plasmídeos da biblioteca foram recuperados destes quatro clones e usados para retransformar a estirpe de seleção original. Entretanto, este ensaio de re-transformação da levedura expressando NRP-A fusionada ao domínio de ligação ao DNA com os cDNAs isolados revelou que os cDNAs isolados pela capacidade de interagir com NRP-A eram falso-positivos e, portanto, foram descartados (dados não mostrados).

Similarmente, as retransformações de leveduras que continham pBD-NRP-B com os cDNAs candidatos (Tabela 3) resultaram em dois falso-positivos. No entanto, um candidato pAD-UspA, codificando uma proteína similar à UspA, apresentou prototrofia à histidina, crescendo em meio seletivo com deficiência de *leucina*, *triptofano* e *histidina* e suplementado com 3-aminotriazol (Figura 3).

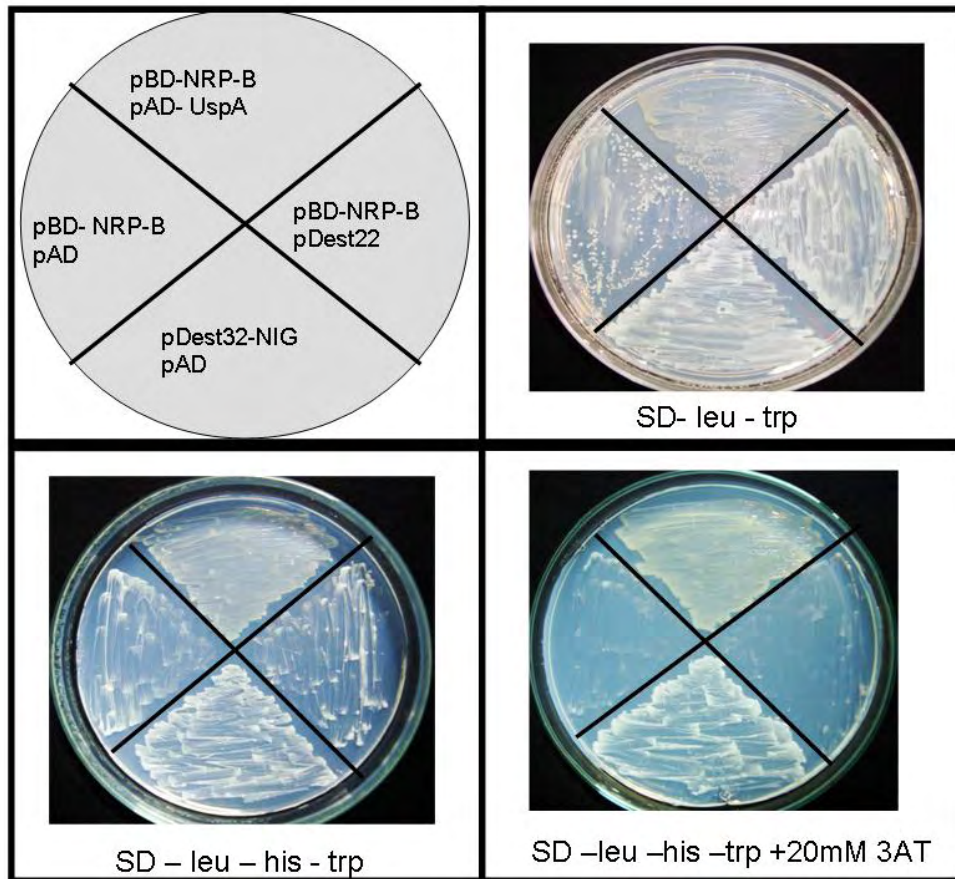


Figura 3- Interação de NRP-B com um homólogo de soja da proteína UspA (*Universal stress protein A*). A levedura que contém o cDNA *GmuspA* no vetor pEXP AD502 foi crescida em meio seletivo deficiente em *leucina*, *histidina* e *triptofano* e suplementado com 3-aminotriazol. O duplo transformante pBD-NRP-B e pEXP AD502 foi utilizado como controle negativo. O controle positivo utilizado foi a proteína NIG clonada em pDEST-32 (Carvalho et al., 2008), que apresenta prototrofia à histidina.

NRP-B interage especificamente com o carboxi-terminal da proteína *GmUspA*

A análise de sequência do cDNA parcial do clone pAD-UspA revelou que esta possui 160 nucleotídeos correspondente a região C-terminal de uma proteína de soja, cuja sequência é conservada quando comparada à de genes da família *uspA* de *E. coli*. Em função disso, o gene em questão foi denominado *GmuspA* (Figuras 4 e 5).

GmUspA: M T S L H F A E M E K K E R K I M V A V D E S Q E S M H A L S W C I T N L I S E T N K L V L L Y V R
Domínio USP: y k k I L V p t D G S e m S e r A l a

GmUspA: P P S A F Y S L D A A G Y N F S S D V V D A M E K Y S M H L A N S V M E R A E A V C R D L N A T N I
Domínio USP:

GmUspA: N M E R V V G V G H A K N V I C S A V K K L E A D T L V M G T H G Y G F F K R A L L G S V S D H
Domínio USP: e e g A D L i V m G S r G r m L L G S V S e k

GmUspA: C A K H A K C P V V I V K Q P
Domínio USP: V i r h A p c P V L v V r

Figura 4- Domínios USP detectados em GmUspA. Na sequência de aminoácidos da proteína GmUspA destaca-se a região onde se encontram os três domínios USP. Em azul está representada a região do fragmento do cDNA isolado no ensaio de duplo-híbrido, usando NRP-B como isca.

A proteína codificada pelo gene *GmuspA* apresenta uma massa molecular estimada de 18039.91 Da e pI 7.24. Análises da sequência de GmUspA (<http://workbench.sdsc.edu>) mostraram que a proteína possui na região N-terminal um domínio homólogo ao da família USP, com um sítio de ligação a ATP, e dois domínios USP na região C-terminal (Figura 4). GmUspA é relacionada a membros da família de proteínas contendo domínio USP, sendo mais similar à proteína de *Arabidopsis* AT3G62550, apresentando 60% de identidade de sequência (Figura 5).


```

      . : : : :
AT3G62550      -----
GmUSP          -----
AT3G58450      -----
AT1G09740      -----
At5g54430      KDE-----
At4g27320      KDE-----
At1g11360      HDASDKQ
At3g03270      -----
Y531_METJA     -----

```

Figura 5- Alinhamento de GmUspA com sequências depositadas em banco de dados (Genbank). GmUspA foi alinhada com sequências de proteínas que contém o domínio USP. As proteínas selecionadas e os respectivos números de acesso são: At5g54430 (18423628), At4g27320 (18416966), At1g11360 (30682191), At3g03270 (30678807), AT3G62550 (825429), AT3G58450 (825014), AT1G09740 (837502) Y531_METJA (32476838). O alinhamento foi realizado no programa ClustalW. Em vermelho: regiões inteiramente conservadas; em verde: fortemente conservadas; em azul: fracamente conservadas; em preto: regiões sem consenso.

A sequência completa de GmUspA, identificada por meio de análise no banco de dados (www.phytozome.com), foi usada como alvo para confecção de oligonucleotídeos usados para isolamento do cDNA completo de GmUspA, que foi fusionado ao domínio de ativação (AD) de *Gal 4*. Enquanto que o carboxi-terminal de GmUspA interage especificamente com NRP-B, conforme demonstrado pela sua capacidade de ativar os genes marcadores *His3* e *lacZ* em leveduras co-transformadas com BD-NRP-B, a proteína completa fusionada a AD de *Gal4* não interage com NRP-B. Leveduras co-transformadas com pBD-NRP-B e pAD-GmUspA não apresentaram a capacidade de crescer em meios seletivos sem histidina e suplementado de 20 mM de 3AT e tampouco de ativar a expressão gene repórter *lacZ*. (Figuras 6 e 7). Estes resultados indicam que a região N-terminal interfere negativamente com a capacidade de GmUspA de interagir com NRP-B, provavelmente devido a interações desfavoráveis entre a região de interação na porção C-terminal e a região do N-terminal que contém um sítio de ligação a ATP. Assim sendo, é razoável supor que a proteína GmUspA deve interagir com NRP-B mediante alguma mudança conformacional

induzida por ligantes na região N-terminal. Esta hipótese foi levantada devido à presença de um sítio de ligação a ATP na região N-terminal da proteína, que não exibe atividade de ATPase dependendo, portanto, de uma possível ligação a outra proteína para sua atividade (Zarembinski et al., 1998).

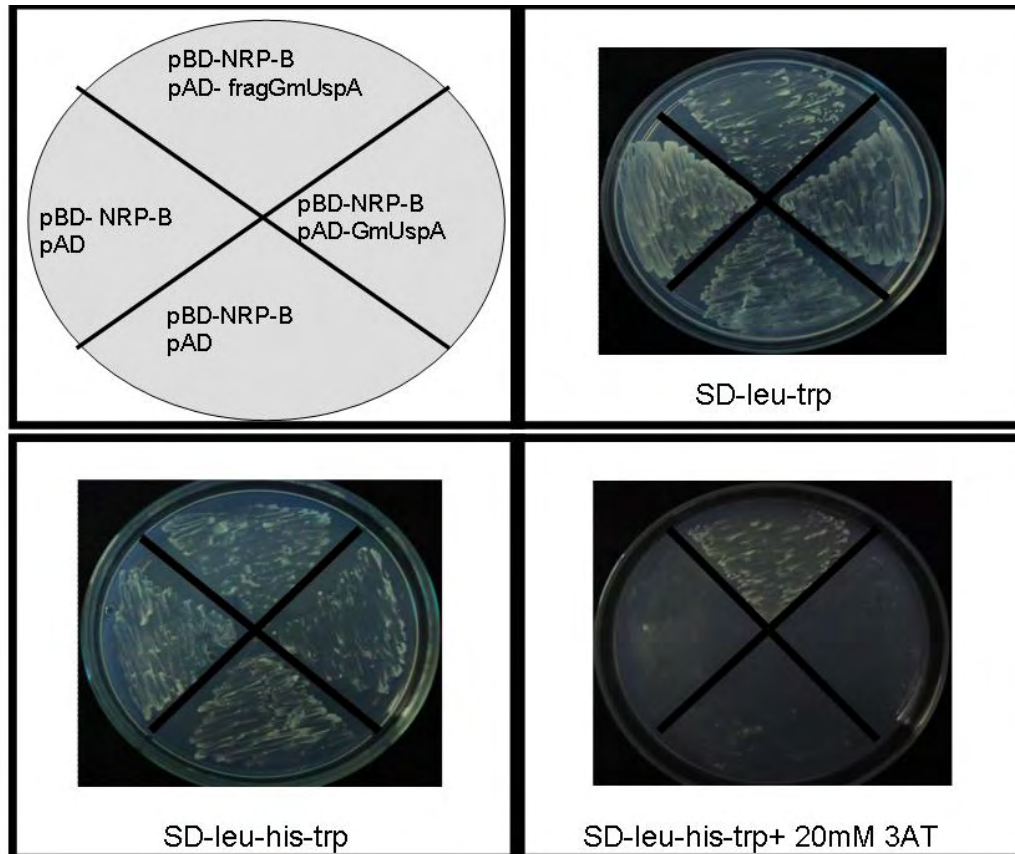


Figura 6- A proteína gmUspA completa fusionada a AD-Gal4 não causa prototrofia à histidina em leveduras co-transformadas com pBD-NRP-B. Colônias de levedura co-transformadas com pBD-NRP-B + pAD-fragGmUspA ou pBD-NRP-B+ pAD-GmUspA foram crescidas em meios seletivos com ausência dos aminoácidos histidina, leucina e triptofano. O meio seletivo deficiente dos aminoácidos His, Trp e Leu e suplementado de 20 mM de 3AT foi utilizado para avaliar a força da interação. pBD-NRP-B + pAD vazios foram utilizados como controles negativos. A levedura que contém pBD-NRP-B é capaz de crescer em meio sem o aminoácido histidina, mas não na presença de 3AT.



Figura 7- Ensaio de β -galactosidase em leveduras. Leveduras co-transformadas com pBD-NRP-B + pAD-fragGmUspA ou pBD-NRP-B+ pAD-GmUspA foram utilizadas no ensaio de β -galactosidase. Como controle negativo, foi utilizada a construção pBD-NRP-B + pAD vazio.

A proteína GmUspA é localizada no citosol.

Com a finalidade de identificar a localização subcelular de GmUspA, foi realizado um ensaio de expressão transiente mediado por *Agrobacterium* em células da epiderme de folhas de tabaco. A localização de GFP-GmUSPA foi observada por microscopia confocal. Como em outros organismos (Kerk et al., 2003), GmUspA é uma proteína citoplasmática, conforme julgado pela intensa fluorescência concentrada ao longo do citoplasma de células epidérmicas (Figura 8). A proteína fusionada também apresentou um sinal de fluorescência no núcleo, indicando a possibilidade de tráfego nucleocitoplasmático de GmUspA. Alternativamente, o sinal de fluorescência no núcleo pode ter sido gerado pela proteína GFP não fusionada, devido a possíveis rupturas da fusão causada pelo processamento das amostras. A realização de um *western blot* demonstrando a estabilidade da proteína fusionada seria necessária para eliminar esta hipótese.

GmUspA-GFP

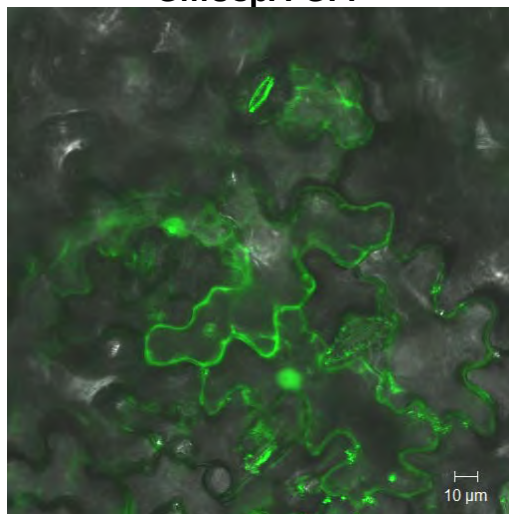


Figura 8- Localização subcelular de GmUspA. A proteína GmUspA fusionada à GFP (*Green Fluorescent Protein*) foi expressa transientemente em folhas de tabaco, por meio de agroinoculação. As imagens foram obtidas, três dias após a inoculação, pelo monitoramento da fluorescência emitida por GFP, no microscópio confocal.

A expressão de GmUspA é controlada positivamente por indutores de estresses no RE e osmótico.

As proteínas NRPs são induzidas por tratamentos que causam estresses osmótico e no RE (Costa et al., 2008). Assim, como possível candidato a interagir com NRP-B e a participar da via integrativa, a expressão de *GmuspA* foi avaliada em resposta a indutores de estresses no RE e estresse osmótico. Plantas de soja foram submetidas ao tratamento com tunicamicina (2,5 $\mu\text{g/mL}$), um potente indutor de estresse no RE e da via UPR, durante 48 horas. Análises de expressão foram conduzidas por RT-PCR quantitativo (Figuras 9 e 10). Similarmente à NRP-A e NRP-B, *GmuspA* foi induzida por tunicamicina, porém com cinética diferenciada. Enquanto que GmUspA atingiu o máximo de indução 8 horas após tratamento, a indução máxima de NRP-A e NRP-B ocorreu 24 horas após o tratamento, quando ocorreu um declínio nos transcritos de

GmUspA. Este declínio não foi devido à falha no tratamento com tunicamicina a 24 horas, uma vez que os transcritos de calnexina (CNX), gene marcador da via UPR e estresse no RE, mantiveram-se aumentados neste período de tratamento (Figura 10).

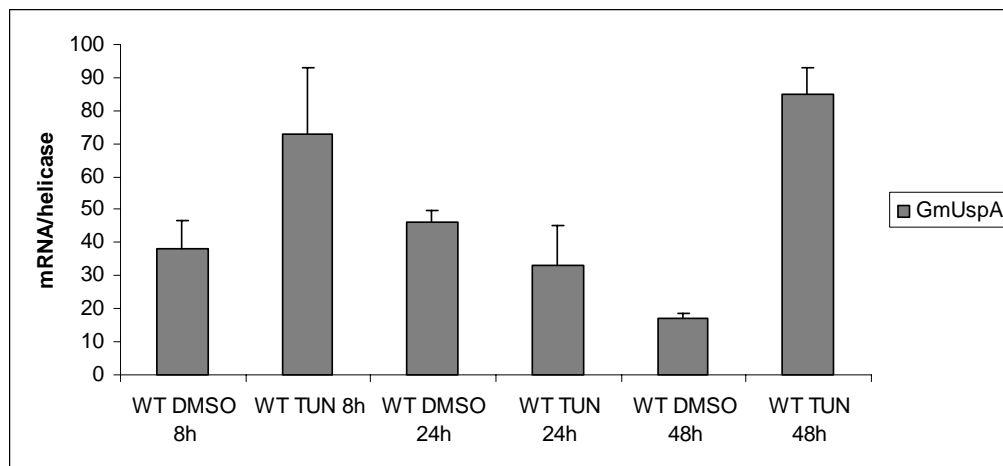


Figura 9- Indução de GmuspA por estresse no RE. Plântulas de soja foram induzidas por tunicamicina (2,5 µg/mL) durante 48 horas, sendo as amostras de folhas coletadas em três períodos de tempo (8, 24 e 48 horas). A avaliação da indução do gene GmuspA foi calculada usando o método $2^{-\Delta C_t}$, utilizando como controle endógeno a Helicase. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de dois pools de três réplicas biológicas validadas individualmente (+DP, n = 2 réplicas biológicas).

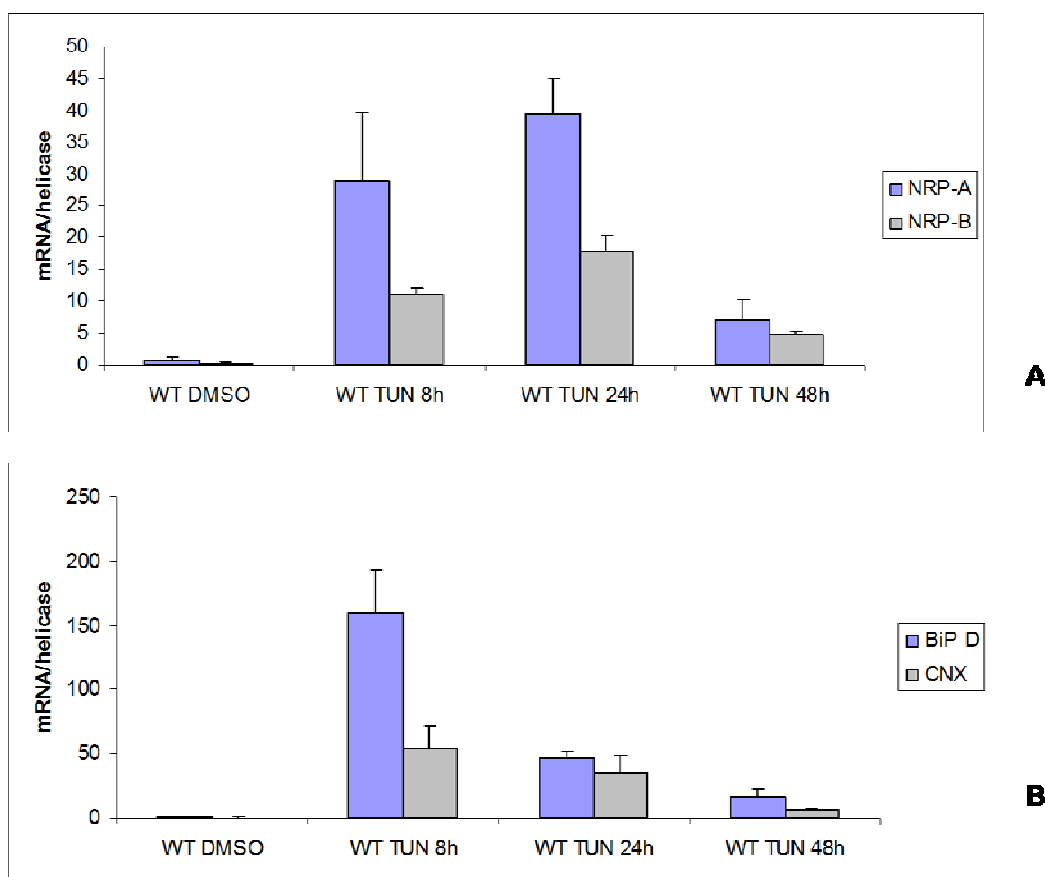


Figura 10- Indução dos genes NRP-A e NRP-B por tunicamicina. Plântulas de soja foram induzidas por tunicamicina (2,5 $\mu\text{g/mL}$) durante 48 horas, e as amostras de folhas coletadas em três períodos de tempo (8, 24 e 48 horas). A avaliação da indução dos genes NRP-A e NRP-B foi calculada usando o método $2^{-\Delta\text{Ct}}$, utilizando como controle endógeno a Helicase. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de dois pools de três réplicas biológicas validadas individualmente (+DP, n = 2 réplicas biológicas). O gene calnexina (CNX) foi usado como controle do tratamento.

Para avaliar a atuação de *GmuspA* em resposta ao estresse osmótico, plântulas de soja foram tratadas com PEG (0,5%) e a indução do gene em diferentes intervalos de tempo foi avaliada por RT-PCR em tempo real (Figura 10). Como NRP-A e NRP-B, o gene *GmuspA* foi induzido por estresse osmótico, porém com uma cinética tardia (Figuras 11 e 12). Enquanto NRP-A e NRP-B são rapidamente induzidos 8 horas após o tratamento, a indução de *GmUspA* somente é detectada 24 horas após o tratamento.

Os resultados da expressão de *GmuspA* sob condições de estresse no RE e estresse osmótico evidenciam a possível atuação desta proteína na via de sinalização integrativa dos sinais de estresses, mediada pelas proteínas NRPs. O gene *GmUspA* exibe uma cinética de indução tardia em resposta aos estresses do RE e osmótico, o que parece condizente com a sua participação na via de transdução de sinal mediada por NRPs que resulta em morte celular programada. Tem sido demonstrado que a ativação prolongada da via UPR pode desencadear processos de morte celular (Rao *et al.*, 2002; Zhang e Kaufman, 2004; Zuppini *et al.*, 2004). Recentemente, foi demonstrado que as proteínas NRPs participam de uma via de sinalização que transduz sinais de morte celular originados de estresses no RE (Costa *et al.*, 2008). Da mesma forma, estresse osmótico prolongado resulta em morte celular por meio da sinalização mediada por NRPs (Costa *et al.*, 2008). Assim, torna-se relevante avaliar se *GmUspA* está envolvida em mecanismos de morte celular e se sua indução tardia por tunicamicina e PEG está ligada a sinais de morte originados por estresses osmótico e do RE.

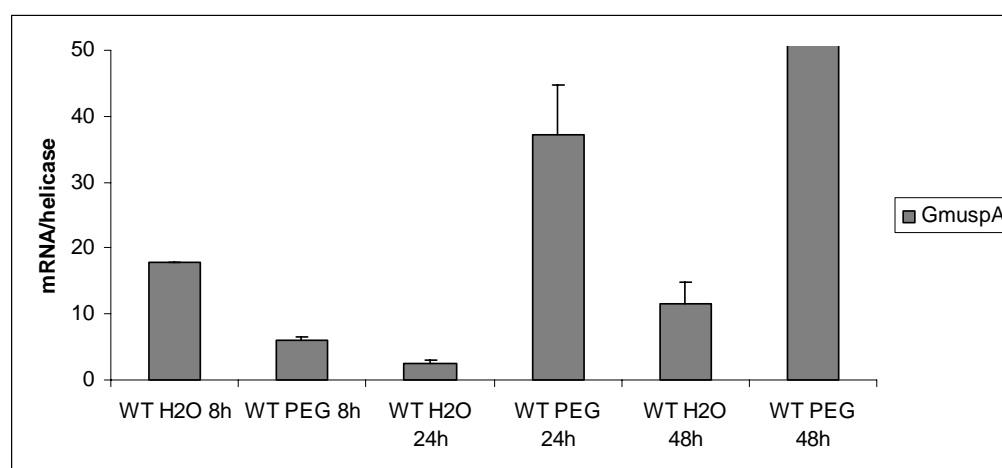


Figura 11- Indução do gene *GmuspA* por estresse osmótico. Plântulas de soja foram induzidas por PEG (0,5%) durante 48 horas, e foram coletadas amostras de folhas em três períodos de tempo (8, 24 e 48 horas). A avaliação da indução do gene *GmUspA* foi calculada usando o método $2^{-\Delta C_t}$, utilizando como controle endógeno a Helicase. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de dois pools de três réplicas biológicas validadas individualmente (+DP, n = 2 réplicas biológicas).

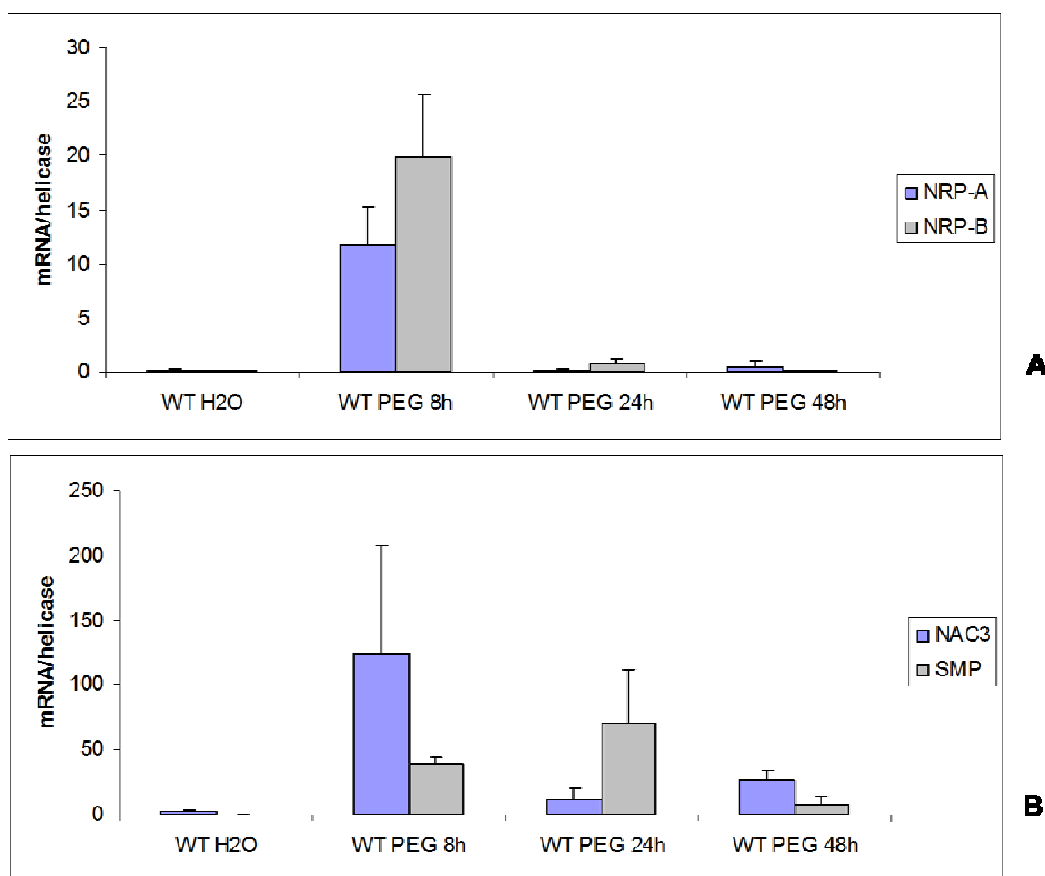


Figura 12- Indução dos genes NRP-A e NRP-B por estresse osmótico. Plântulas de soja foram induzidas por PEG (0,5%) durante 48 horas, e foram coletadas amostras de folhas em três períodos de tempo (8, 24 e 48 horas). A avaliação da indução do gene *GmUspA* foi calculada usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a Helicase. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de dois pools de três réplicas biológicas devidamente validadas individualmente (+DP, n = 2 réplicas biológicas). SMP e NAC3 foram utilizados como controles do tratamento.

GmuspA é reprimido por indutor de morte celular.

As proteínas NRPs mostram-se induzidas por indutores de morte celular e promovem a indução de genes responsivos à morte celular programada (Costa et al., 2008). Assim, para avaliar a possível participação de *GmuspA* nestas vias de sinalização, ensaios com plântulas de soja foram conduzidos promovendo a indução de morte celular. As plântulas de soja foram tratadas com cicloheximida,

indutor de morte celular em células de soja em suspensão (Wertz e Hanley, 1996). Em contraste com os genes NRP-A e NRP-B, que foram induzidos por tratamento com cicloheximida, o gene *GmUspA* foi reprimido (Figuras 13 e 14).

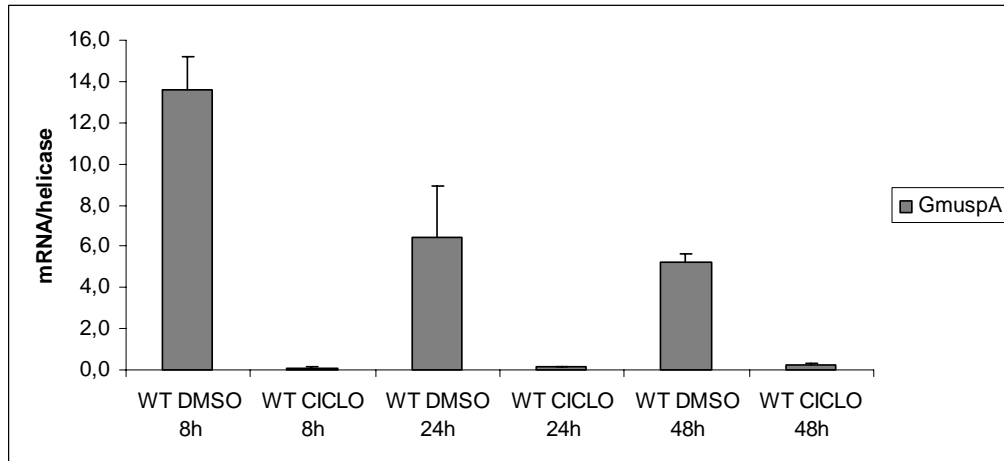


Figura 13- Indução do gene GmUspA por indutor de morte celular. Plântulas de soja foram induzidas por cicloheximida (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 48 horas, e foram coletadas amostras de folhas em três períodos de tempo (8, 24 e 48 horas). A avaliação da indução do gene *GmuspA* calculada usando o método $2^{-\Delta\text{Ct}}$, utilizando como controle endógeno a Helicase. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de dois pools de três réplicas biológicas validadas individualmente (+DP, n = 2 réplicas manuais).

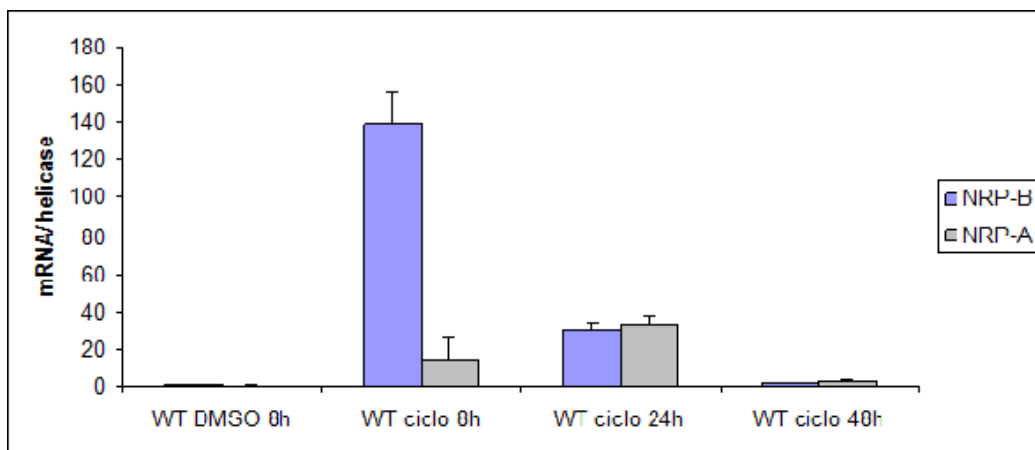


Figura 14- Indução dos genes NRP-A e NRP-B por indutor de morte celular. Plântulas de soja foram induzidas por cicloheximida (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 48 horas, e foram coletadas amostras de folhas em três pontos (8, 24 e 48 horas). A avaliação da indução dos genes NRP-A e NRP-B foi calculada usando o método $2^{-\Delta\text{Ct}}$, utilizando como controle endógeno a Helicase. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de dois pools de três réplicas biológicas validadas individualmente (+DP, n = 2 réplicas manuais).

Localização subcelular das proteínas NRP-A e NRP-B.

A proteína NRP-A foi primeiramente localizada na parede celular, por meio de experimentos de fracionamento celular (Ludwig e Tenhaken, 2001). No entanto, Costa et al. (2008) detectaram, por microscopia confocal, as proteínas NRPs fusionadas à GFP na membrana ou no citoplasma. Com a finalidade de confirmar a localização das proteínas NRPs, foi produzido um anticorpo anti-NRP-B para *immunoblottings* de frações microssomais de extratos foliares de tabaco, expressando a proteína transientemente por agroinoculação.

A proteína NRP-B fusionada à cauda de *histidina* foi expressa em *E. coli* BL21DE₃, purificada por cromatografia de afinidade em resina de Ni²⁺ (Figura 15) e utilizada como antígeno para produção de anticorpos em coelho. O anticorpo produzido apresentou um título de 1:500 (dados não mostrados).

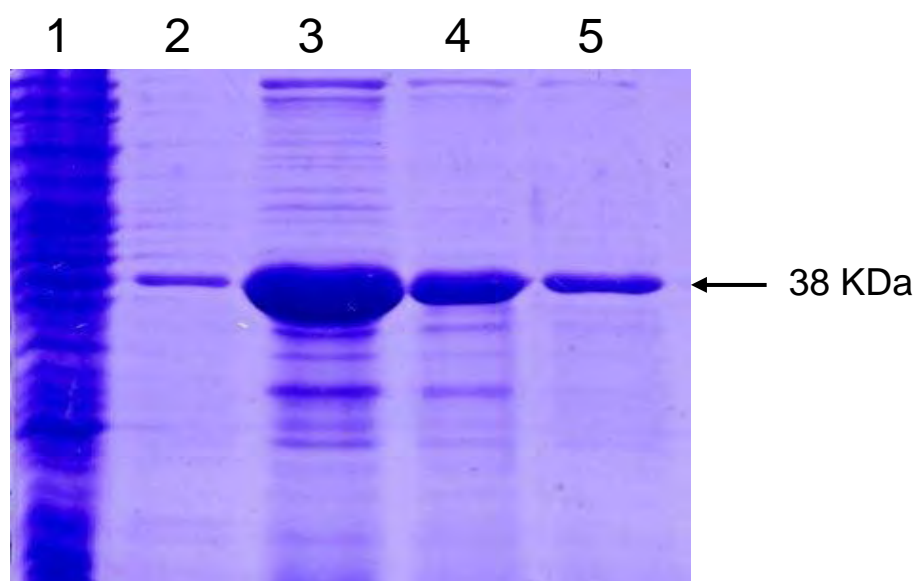


Figura 15- Purificação de NRP-B fusionada à cauda de histidina. A proteína NRP-B foi fusionada à cauda de histidina, expressa em *E. coli* e purificada em coluna cromatográfica contendo uma resina de Ni²⁺. As canaletas representam: 1- Fração Total; 2- Segunda lavagem da resina; 3-Primeira eluição da resina; 4- Segunda eluição da resina; 5- Terceira eluição da resina.

O experimento de fracionamento celular evidenciou a localização das proteínas NRPs na fração microssomal.

Para determinar a localização subcelular de NRP-B, frações microssomais foram preparadas a partir de seções de folhas de tabaco agroinoculadas com as construções 35S-NRP-B ou 35S-NRP-A e sondadas com o anticorpo anti-NRP-B (Figura 16).

Análises de bioinformática mostraram que estas proteínas não possuem domínios transmembrana. No entanto, as proteínas sondadas com o anticorpo anti-NRP-B apresentaram-se na fração microssomal, o que sugere a associação destas proteínas com proteínas integrais de membrana.

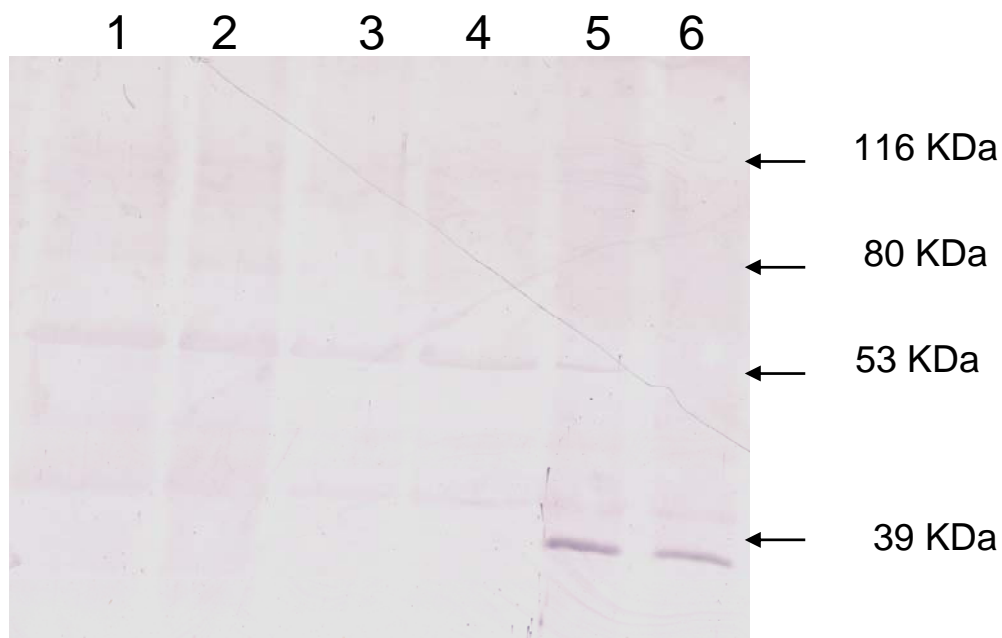


Figura 16- Western Blot do fracionamento celular de folhas de tabaco. Folhas de tabaco, expressando tansientemente NRP-A e NRP-B, foram submetidas à técnica de fracionamento celular, por centrifugação diferencial. As canaletas representam: 1- Fração total NRP-A; 2- Fração total NRP-B; 3- Fração solúvel NRP-A; 4- Fração solúvel NRP-B; 5- Fração microssomal NRP-A; 6- Fração microssomal NRP-B. As setas indicam as massas correspondentes ao padrão de peso molecular.

Discussão

Recentes estudos de vias de sinalização em plantas têm evidenciado a existência de um novo ramo de transdução de sinais originado no retículo endoplasmático, que integra o estresse osmótico em uma resposta potencializada de morte celular. Atuando como transdutores de sinais desta via integrativa destacam-se as proteínas NRPs, que estão associadas à membrana plasmática e que possivelmente sofrem modificações pós-traducionais. A identificação de proteínas celulares que interagem com NRPs constitui uma etapa fundamental na elucidação dos componentes dessa via de sinalização inédita com o potencial de promover adaptação de células vegetais a diferentes condições de estresses abióticos. Nessa investigação, foi identificada a proteína GmUspA, por meio da varredura de uma biblioteca de cDNA de soja, usando NRP-B como isca. A proteína GmUspA foi assim denominada devido à alta conservação de sequências com membros da família Usp (*universal stress protein*) amplamente distribuídos em bactéria, *archae*, e eucariotos (Kerk et al., 2003). Embora a função biológica de GmUspA não seja conhecida, a presente investigação forneceu uma série de evidências que indica que a interação entre NRP-B e GmUspA possa ocorrer *in vivo* e ser biologicamente relevante. Inicialmente foi demonstrado, através do sistema duplo-híbrido, que NRP-B interage especificamente com o domínio C-terminal de GmUspA, conforme julgado pela ativação dos genes repórteres *His3* e *lacZ* em leveduras co-transformadas com as construções BD-NRP-B e AD-C-terminal-GmUspA. Segundo, foi demonstrado que o gene *GmuspA* exibe um padrão de expressão similar aos genes NRP-A e NRP-B, sendo regulados positivamente por estresses do RE e osmótico. Finalmente, a localização subcelular de GmUspA como proteína citosólica favorece a possibilidade de interações com proteínas

sinalizadoras associadas à membrana, como NRP-A e NRP-B. Precedentes na literatura têm demonstrado a atuação de membros da família Usp em cascatas de sinalização acionadas por estresses, por meio de interações proteína-proteína. Em *E. coli*, tem sido demonstrado que UspC interage com KdpD, agindo na cascata de sinalização KdpD/KdpE que é ativada em resposta a estresse salino e limitações de K⁺ (Heermann et al., 2009).

Embora tenha sido demonstrado que NRP-B interage com o domínio carboxi-terminal de GmUspA, não foi possível detectar uma interação estável entre NRP-B e GmUspA completa, por meio do sistema duplo-híbrido de leveduras. Uma explicação possível para a falha em detectar interação com a proteína intacta seria que a proteína quimérica AD-GmUspA adquire uma conformação fechada que previne interações no carboxi-terminal da proteína. Esta hipótese preconiza que a região N-terminal da proteína interfere negativamente com a capacidade de GmUspA de interagir com NRP-B e portanto, interações *in vivo* seriam dependentes de mudança conformacional induzida. A presença de um sítio de ligação a ATP na região do N-terminal sugere que GmUspA pode acionar mecanismos de mudança de conformação mediados por ciclos de ligação a ATP da mesma forma como os interruptores moleculares (Takken, Albrecht e Tameling., 2006). Consistente com esta hipótese, tem sido demonstrado que a proteína MJ0577 da família de proteínas com domínio Usp tem a capacidade de ligar a ATP (Zarembinski et al., 1998). De fato, a primeira estrutura resolvida de um domínio USPA, utilizando a proteína MJ0577 de *Methanococcus jannaschii*, revelou na estrutura de cristal a presença de uma molécula de ATP ligada. Entretanto, apesar de MJ0577 ligar a ATP, a hidrólise do ATP ligado é dependente de proteínas adicionais, presentes em extratos celulares de *Methanococcus jannaschii*. Fundamentado nestes resultados, tem sido proposto que MJ0577 exibe funções dependentes de ATP similarmente a interruptores moleculares. Estas observações favorecem o

argumento de que GmUspA pode ter uma função na via de sinalização de morte celular mediada pelas proteínas NRPs, dependente de mudanças conformacionais induzidas por ciclos de ligação e hidrólise de ATP.

O gene *GmuspA* é induzido por estresse osmótico e por estresse no RE, com uma cinética de indução tardia, que coincide com o aparecimento de eventos de morte celular induzidos por estresses prolongados do RE e osmótico e mediados pelas proteínas NRPs. Entretanto, a expressão do gene GmUspA é reprimida por cicloheximida, enquanto que os genes NRP-A e NRP-B são fortemente induzidos por este indutor de morte celular em soja. Os resultados dessa investigação não permitem reconciliar a aparente contradição entre a indução de GmUspA por tunicammina e PEG e sua repressão por cicloheximida. Estes resultados são ainda mais confusos pela indução coordenada dos genes NRPs em resposta aos três estímulos, já que GmUspA parece participar da via de sinalização mediada por NRP-B que resulta em morte celular. Uma explicação possível seria que GmUspA exerce uma função regulatória distinta no processo de morte celular induzido por cicloheximida. Alternativamente, GmUspA funciona como regulador negativo das atividades de NRP-B, sendo que sua expressão estaria ligada a mecanismos que modulam a extensão de ativação da via de sinalização mediada por NRP-B. Experimentos adicionais serão necessários para resolver entre estas possibilidades.

Conclusões

As respostas a estresses osmótico e do retículo endoplasmático convergem em uma nova via de sinalização mediada pelas proteínas NRPs. Estas proteínas encontram-se associadas à membrana plasmática, possivelmente interagindo com proteínas integrais de membrana, uma vez que as NRPs não apresentam domínios transmembrana. Usando a proteína NRP-B como isca em um ensaio de duplo-híbrido, identificou-se um possível candidato a interagir com a mesma. A proteína identificada foi denominada GmUspA. Apresenta 3 domínios USP conservados, sendo o domínio da região N-terminal um domínio de ligação a ATP. Este domínio pode estar regulando conformacionalmente a proteína GmUspA, uma vez que na presença deste domínio ela não apresentou interação com a proteína NRP-B. Apenas a região C-terminal apresentou esta interação.

O gene *GmuspA* mostrou ser induzido por estresse osmótico e por estresse no RE, e inibido por fatores que provocam morte celular. Além de promover a indução de genes responsivos a processos de morte celular programada (Pinheiro et al., 2009; Costa et al., 2008). *GmuspA* possivelmente tem atuação downstream de *NRP-B*, pois *GmuspA* promove a indução do gene *NRP-B* e não é induzido por indutor de morte celular. Participando, assim, da via conectiva e não da via de morte celular mediada por NRPs. Experimentos posteriores devem ser feitos para ratificar a participação de *GmuspA* nas vias de sinalização por NRPs e sua interação com NRP-B.

CAPÍTULO II

THE MOLECULAR CHAPERONE BINDING PROTEIN ATTENUATES STRESS INDUCED CELL DEATH IN PLANTS BY MODULATING THE NRP-MEDIATED PCD SIGNALING RESPONSE

ABSTRACT

The molecular chaperone BiP is a key regulator of ER function exhibiting protective functions against stresses. Here we investigated the role of plant BiP in protecting cells from stress-induced cell death responses. We found that enhanced expression of BiP attenuates ER-, osmotic- and cycloheximide-induced cell death. Ectopic expression of BIP in transgenic lines attenuated the leaf necrotic lesions caused by the cell death inducers, tunicamycin and cycloheximide, as well as keeping shoot turgidity under PEG-induced dehydration conditions. The BiP-mediated attenuation of cell death was also confirmed by the lack of induction and in some cases by delayed expression of senescence-associated marker genes in BiP-overexpressing lines. These phenotypes were also coordinated with a decrease or a delay in the induction of the cell death marker genes NRP-A and NRP-B that are involved in transducing a PCD signal emanated from the ER-stress and osmotic-stress. We directly assessed the BiP modulation of NRP-mediated cell death signaling response by using an *Agrobacterium* transient expression assay in tobacco lines with enhanced (sense lines) and suppressed (antisense lines) expression of BiP. Enhanced expression of BiP in sense transgenic lines prevented NRP-induced chlorosis in agroinfiltrated sectors, whereas silencing of endogenous BiP in antisense lines accelerated the onset of leaf senescence. Collectively, these results indicate a direct co-relation between BiP mRNA abundance and NRP-induced leaf senescence and argue favorably for a direct involvement of BIP in modulating NRP-mediated cell death response.

INTRODUCTION

Plants do not accept passively environmental stresses such as drought, salinity and variations of temperature or biotic aggressors such as virus, bacteria, insects or fungi. To cope with these environmental stressors they developed coordinated molecular networks for stress signal perception, transduction and adaptation mechanisms in response to stresses.

The stress-responsive gene expression leads to the synthesis of defense proteins that play key roles in the adaptation process of plants against biotic and abiotic stresses (Kalinski et al, 1995, Figueiredo et al, 1997, Alvim et al., 2001; Valente et al, 2009). Therefore, the in-depth and systematic understanding of plant stress responses should provide the foundation for engineering plant stress tolerance and hence maximizing the yield of crops growing under adverse environmental conditions. Accordingly, the identification and functional characterization of stress-responsive genes including transcription factor genes, regulatory genes of signaling cascades and genes encoding cytoprotective proteins in different plant species under different stress conditions have been extensively approached in the last decade (Figueiredo et al, 1997; Hut et al., 2006; Valente et al., 2009).

Exposing cells to environmental stress induces expression of stress proteins in various intracellular compartments including the endoplasmic reticulum (ER). The ER mediates a series of cellular functions such as folding and post-translational modification of secretory proteins, quality control in addition to maintaining the Ca^{2+} homeostasis (Naidoo, 2009). The ER also plays a relevant signaling role in response to conditions that disrupt ER homeostasis and promote the accumulation of misfolded or unfolded proteins in the lumen of the organelle. This ER stress signal is transduced through the unfolded protein

response (UPR) pathway that allows the ER processing and folding capacities to be balanced with the cell secretory activity (Malhotra and Kaufman, 2007). This balance is achieved by shutting down protein synthesis, activating expression of ER-resident processing proteins, such as molecular chaperones and foldases, and inducing the ER-associated protein degradation machinery (Schroder and Kaufman, 2005). Failure to restore the ER homeostasis under stress conditions results in activation of programmed cell death signaling pathways as an ultimate attempt of survival (Malhotra and Kaufman, 2007; Fribley et al., 2009).

The UPR is conserved in eukaryotes, but retains distinct signaling mechanisms across species. In yeast, the UPR appears to signal through a single sensor/transducer, the inositol requiring transmembrane kinase and endonuclease 1 (Ire1), whereas in mammalian cells the UPR signals through three distinct ER-transmembrane sensors, an Ire1 homolog, the basic leucine zipper transcription factor ATF6, and the PKR-like ER kinase (PERK), to fully transduce the unfolded protein response (reviewed in Schroder and Kaufman, 2005; Malhotra and Kaufman, 2007; Kapoor and Sanyal, 2009). In plants, there is evidence that UPR operates at least through a bipartite signaling response, which is represented by Ire1-like receptors and ATAF6 analog transducers (reviewed in Urade, 2009). Plant Ire1-like proteins were identified in *Arabidopsis* (AtIre1-1 and AtIre1-2) and in rice (OsIre1), and based on complementation studies of *ire-1* deficient yeast strains, plant Ire1s are presumed to act as an ER stress sensor similar to yeast or mammalian Ire1 *in vivo*. Like mammalian ATAF6, the plant ER-transmembrane sensor/transducers, AtbZIP60 and AtbZIP28, are basic leucine zipper transcription factors that are activated by regulated intramembrane proteolysis systems which release their DNA binding domain to regulate transcription of the UPR genes in the nucleus of stressed cells. Thus, the transduction of the ER stress signal by the Ire1-like receptors and ATAF6 analog transducers leads to the coordinate up-regulation of genes encoding ER-resident

chaperones and protein-folding enzymes and chaperones, such as protein disulfide isomerase (PDI), calnexin and BiP, as well as vesicle transport proteins and proteins involved in ERAD (Martinez and Chrispeels, 2003; Kamauchi et al., 2005).

However, if the ER stress conditions is sustained, an apoptotic pathway is activated, which in mammalian cells involves the ER-localized caspase-12 enzyme highly specific to the activation of the UPR pathway (Nakagawa et al., 2000). Multiple other pathways can also contribute to ER-stress induced apoptosis. IRE1 can activate the ASK1/JNK mitogen-activated protein kinase pathway (Urano et al., 2000; Xu et al., 2005) or p53 (Li et al., 2006), promoting apoptosis via the classic mitochondria-initiated apoptotic pathway. Furthermore, the proapoptotic BCL-2 family proteins, BAX and BAK, have been found to interact with IRE1a directly on ER (Hetz et al., 2006). In plants, a G β -G γ heterodimer protein located to the ER membrane has been demonstrated to be involved in the signaling events that trigger UPR-associated cell death in *Arabidopsis* (Wang et al., 2007). In addition, we have recently identified a novel branch of the ER-stress signaling that diverges from the molecular chaperone-inducing branch of the UPR and transduces a programmed cell death signal. This pathway integrates the ER-stress and osmotic signals to potentiate synergistically the expression of N-rich proteins (NRP-A and NRP-B), which are critical mediators of osmotic-and ER stress-induced cell death in plants (Irsigler et al., 2007; Costa et al., 2008). These apoptotic roles indicate that the integrated pathway transduces a PCD signal generated by prolonged ER stress and osmotic stress.

The cytoprotective role of the UPR has been linked to the coordinated up-regulation of ER-resident molecular chaperones, which are involved in controlling the major functions of the ER (Malhotra and Kaufman, 2007). These include translocation, folding and assembly of nascent secretory proteins, monitoring the

quality control mechanism and targeting misfolded protein to degradation. The ER-resident molecular chaperone BiP is central to signaling ER stress by sensing alterations in the ER environment that affect protein folding and assembly (Hendershot, 2004; Malhotra and Kaufman, 2007). In addition to this role as molecular chaperone, in mammalian cells, BiP directly regulates the UPR by controlling the activation status of the three transducers, IRE1, PERK, and ATF6 (Hendershot, 2004). As the sole molecular chaperone involved in the activation of UPR, levels of BiP may be monitored by the cells as an indicator of changes in the folding environment and ER processing capacity. Accordingly, overexpression of BiP in mammals and plants attenuates ER stress and suppresses UPR activation (Morris et al., 1997; Leborgne-Castel et al., 1999). Mammalian BiP also exhibits protective properties that prevent oxidative stress, Ca²⁺ disturbances and cell death (Liu et al., 1997; 1998; Gething, 1999; Kishi et al., 2010).

In addition to alleviating ER stress, overexpression of plant *BiP* has also been shown to increase tolerance of plants to water deficit (Figueiredo et al., 1997, Cascardo et al., 2000, Alvim et al., 2001, Valente et al., 2009). The apparent increase in drought tolerance mediated by BiP was neither associated with typical short-term and long-term avoidance responses nor with typical tolerance mechanisms (Valente et al., 2009). The only BiP-induced variations in overexpressing lines are a delay in drought-induced leaf senescence and an inhibition of the drought-mediated down-regulation of ER molecular chaperone transcripts which occur under prolonged osmotic stress. The major goal of these studies was to address the role of plant BiP in stress-induced cell death as related to ER functioning. Our results provide new insights into the protective properties of plant BiP against stresses and indicate that BiP may play an important role in protecting cells from stress-induced cell death signaling mediated by NRPs.

MATERIAL AND METHODS

Plant growth and stress treatments

Soybean seeds of wild type (*Glycine max* cv. Conquista) and BiP-overexpressing transgenic line 35S:BiP-4 (Valente et al., 2009) were germinated in organic soil (Bioplant), containing a mixture of soil, sand and dung (3:1:1; Pedra et al., 2000). One-week-old seedlings (VC stage of development) were transferred to a 2-mL hydroponic medium supplemented with 0.5% (w/v) polyethylene glycol (PEG; MW 8000, Sigma), 2.5 µg/ml tunicamycin (Sigma) or 5 µg/mL cycloheximide (Sigma). DMSO was used as control for tunicamycin and cycloheximide treatments. Stressed leaves were harvest at 8, 24 and 48 h post-treatment, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until processing.

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from frozen leaves with TRIzol (Invitrogen) according to the instructions from the manufacturer and treated with 2 units of RNase-free DNase (Promega). RNA integrity and quality was monitored by electrophoresis on 1.5 % denaturing agarose gel and by spectrofotometry (Evolution 60 Thermo Scientific). First-strand cDNA was synthesized from 4 µg of total RNA using oligo-dT(18) and Trancryptase Reversa M-MLV (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions.

Real time PCR

All the real time PCR procedures including tests, validations and experiments were carried out according to the informations supplied by Applied Biosystems' manual. Real-time RT-PCR reactions were performed on an ABI7500 instrument (Applied Biosystems), using SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) with gene-specific primers (Tables 1 and 2).

The conditions for amplification reactions were as follows: 10 min at 95°C, and 40 cycles of 94°C for 15 sec and 60°C for 1 min. Fold variation in gene expression was quantified using the comparative method $Ct: 2^{-\Delta\Delta Ct}$ and absolute gene expression was quantified using the $2^{-\Delta Ct}$ method. Values were normalized to the endogenous control.

For quantitation of gene expression in soybean seedlings, we used RNA helicase (Irsigler et al., 2007) as the endogenous control gene for data normalization in real-time RT-PCR analysis. For quantitation of gene expression in tobacco leaves, we used actin (Costa et al., 2008) as a control gene.

Table 1 – Primers for qRT-PCR from soybean genes

Primers	Sequence (5' – 3')	Gene
HELIC Fw	TAACCCTAGCCCCTTCGCCT	Helicase
HELIC Rv	GCCTTGTCGTCTTCCTCCTCG	
NAM Fw	ACGGAGACTTCAGATTCGGTGC	ATAF
NAM Rv	CATCGTTATTCCAATTGGGGTCGC	
GmuspA Fw	AATATGCAGTGCTGTCAAGAACTAGA	GmuspA
GmuspA Rv	GTGCCCTCTTAAAGAATCCATAGC	
Nac2 Fw	GGGTGCTTTGCCGTATTTACAA	Nac2
Nac2 Rv	CTCCTCCGCTTTTCAGAATCTC	
GmCYSTP Fw	TGAAAGCAACTCAATCATGGT	CystP
GmCYSTP Rv	CCCATGAGTTCTTCACAATCC	
SMP Fw	GCCGAAGTGGGAAAAGACGAACC	SMP
SMP Rv	CTTGGGCTGTTTGTGGGTCTTC	
GST Fw	CGGTTCTCATCCACAATGGCAAAC	GST
GST Rv	CAGCCCAGAATCTAGCCTGAGC	
Nac6 Fw	CCAACAAAAGCACTTGTGGCA	Nac6
Nac6 Rv	GGACTATTCAACTGAGCCCAAAG	
BiPD Fw	ATCTGGAGGAGCCCCAGGCGGTGG	BiPD
BiPD Rv	CTTGAAGAAGCTTCGTCGTAAAATAAG	
CALN Fw	TGATGGGGAGGAGAAGAAAAAGGC	CALN
CALN Rv	CACTTGGGTTTGGGATCTTGGCTC	
NRP Fw	GGCACAAGACTGGTGCTGAGA	NRP-A
NRP Rv	CTCTGTATCGTGGAGGCAGACC	
NRich Fw	TACAGGCATCCAATTTGGCGAACC	NRP-B
NRich Rv	TGACTTGAAAGAGTTGATCTCACCCC	
BiPD Fw	ATCTGGAGGAGCCCCAGGCGGTGG	BiP transgene
Trans	CATCGCAAGACCGGCAACAGGAT	

Table 2 – Primers for qRT-PCR from tobacco genes

Primers	Sequence (5' – 3')	Gene
TobActin Fw	AGCAAGGAAATTACCGCATTAGC	Actina
TobActin Rv	ACCTGCTGGAATGTGCTGAGA	
CP1 Fw	AGCGAACAGTGAGAAGGCTCTATT	CP1
CP1 Rv	TTAAGCCAAGTGATGCATGATC	
CystP Fw	GTGGACTGTGCTGGAGCTTTTAAT	CystP
CystP Rv	ATAAGCTATTCTTGCTAGTGTATG	

Transient overexpression in Nicotiana tabacum by Agrobacterium tumefaciens infiltration

The DNA expression cassettes pYFP-NRP-A and pYFP-NRP-B, in which NRP-A and NRP-B cDNA are fused to YFP under the control of 35S, have been described (Costa et al., 2008). *Agrobacterium* strain GV3101 carrying pYFP-NRP-A or pYFP-NRP-B were grown for 12 h, and centrifuged for 5 min at 8000 rpm. Pelleted cells were resuspended in 1 mL of infiltration medium (MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM pH 5,6 e acetoseryngone 100 µM), re-centrifuged and resuspended in infiltration medium to an OD= 0.05-0.2. *Nicotiana tabacum* plants were grown in a greenhouse with natural day length illumination. *Agrobacterium* infiltration was performed in the leaves of three-week-old transgenic control (pBI121 vector alone), transgenic sense (35S-BiPS), and transgenic antisense (35S-BiPAS) tobacco lines (Alvim et al., 2001) with sterile syringes allowing diffusion of the *Agrobacterium* cell suspension under manually controlled pressure, as previously described (Carvalho et al., 2008).

Determination of chlorophyll and carotenoid content

The content of carotenoids, chlorophyll a and b was determined spectrophotometrically at 480 nm, 649,1 nm and 665,1 nm, respectively, after quantitative extraction of pigments from individual 1-cm leaf discs with 5 mL of CaCO₃-saturated DMSO for 24 h at room temperature (Wellburn, 1994).

Results and discussion

BiP-overexpressing transgenic lines have increased resistance to the death-promoting effects of Tunicamycin

Compared with animal systems, relatively scarce knowledge is available on the mechanism of ER stress-induced PCD in plants. We have recently shown that manipulation of BiP levels in transgenic lines affects drought-induced senescence in leaves (Valente et al., 2009). However, whether the delay in leaf senescence was a direct effect of BiP overexpression or a result of the absence of stress in BiP-overexpressing transgenic lines remained unsolved. Here we directly addressed this issue by testing the effect of BiP overexpression on a typical ER stress-induced cell-death event. We treated BiP-overexpressing soybean seedlings with tunicamycin, a potent inducer of ER stress and cell death, and examined the evolution of senescence using morphological and molecular markers over a period of 48 h. A reproducible pattern was observed (Figure 1). In wild type seedlings, tunicamycin-induced leaf yellowing started to be visible at 24 h and cotyledon leaves became senescent with necrotic lesions. At 48 hour the chlorotic phenotype was more intense and necrotic lesions were observed all over the cotyledons. The BiP-overexpressing seedlings on the other hand were more resistant to these changes as an attenuated leaf yellowing only starts to be visible at 48 hours in cotyledon leaves.



Figure 1- BiP overexpression increases resistance against ER stress-induced cell death. BiP-overexpressing soybean seedlings (35S-BiP) and untransformed, wild type seedlings (WT) were exposed to treatment with tunicamycin and examined for the development of chlorosis and necrotic lesions. Pictures were taken at 8 (A), 24 (B) and 48 (C) hours after treatment.

To determine if the differences in leaf phenotypes observed between the two genotypes following tunicamycin treatment were also reflected in differences in the onset of leaf senescence, we monitored the expression of the senescence-associated gene marker *GmCystP* (cysteine protease 1; Valente et al., 2009),

during 48 h of tunicamycin treatment by quantitative RT-PCR (Figura 2A). *GmCystP* was strongly induced by tunicamycin at 48 hours in wild type seedlings but not in BiP-overexpressing seedlings, further substantiating the notion that BiP increases resistance of leaf cells to ER stress-induced senescence. The late induction kinetics of the senescence-associated gene parallels the tunicamycin-induced morphological changes in wild type leaves. The effectiveness of the tunicamycin treatment was monitored by analyzing the expression of the ER-stress marker gene BiPD over the period of 48 hours (Figure 2B). At 8-h post-treatment, endogenous BiP is induced by tunicamycin and BiP transcripts accumulated in wild type and overexpressing seedlings to similar extent. However, there is a slight inhibition of UPR activation in overexpressing lines as judged by the fold variation on endogenous BiP gene expression that is lower in overexpressing than in wild type seedlings treated with tunicamycin. This inhibition of UPR activation seems to be relieved as ER-stress persists, because at 48 hours post-treatment the level of BiP transcripts is higher in overexpressing seedlings than in wild type seedlings by both absolute and fold variation measurements of gene expression.

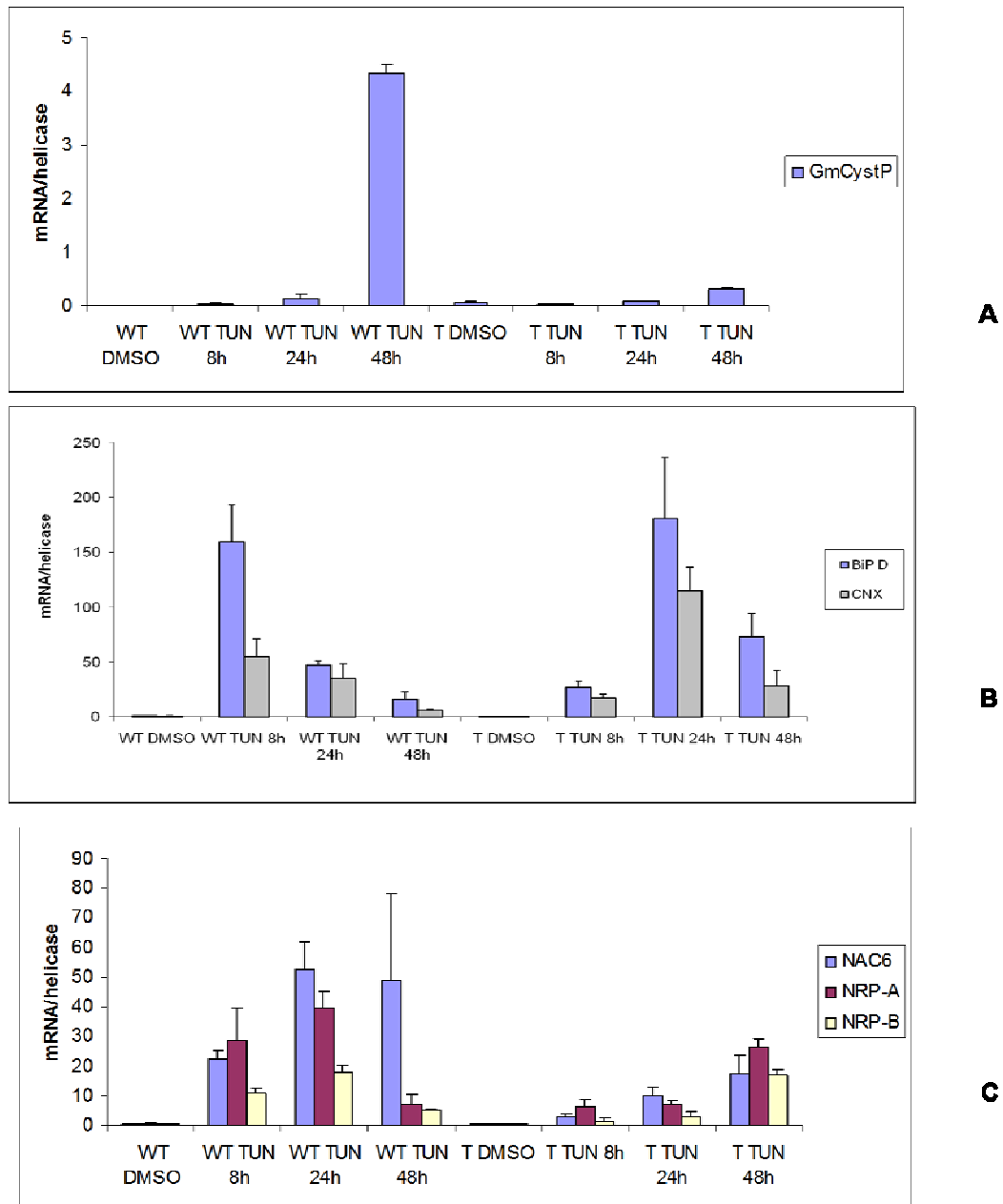


Figure 2. Variations in gene expression of cell death and ER-stress molecular markers in BiP-overexpressing lines in response to tunicamycin. Total RNA was isolated from BiP-overexpressing (T) and wild type (WT) soybean seedlings harvested at 8-h, 24-h and 48-h after tunicamycin treatment. DMSO was used as control. The transcript levels of selected genes (as indicated) were quantified by qRT-PCR. Gene expression was calculated using the $2^{-\Delta Ct}$ method and helicase as endogenous control. cDNAs were obtained from three biological replicates individually validated (n=2 technical replicates).

We also examined the expression of cell death-associated genes, NRP-A and NRP-B (Costa et al., 2008), GmNAC6 (Pineiro et al., 2009), in response to prolonged ER-stress (Figure 2C). These genes have been shown previously to

be induced by both tunicamycin and PEG (Irsigler et al., 2007; Costa et al., 2008; Pinheiro et al., 2009). NRP-A and NRP-B display early induction kinetics and transduce a cell death signal originated from ER- and osmotic-stress (Costa et al., 2008). In wild type and BiP-overexpressing soybean seedlings, prolonged ER stress up-regulates the expression of these genes although with different kinetics. In wild type seedlings, induction of NRPs genes is observed at 8-h after treatment, increases to reach a maximum level at 24-h and declines at 48-h, whereas in BiP-overexpressing lines, induction of NRP genes is delayed and occurs to a lesser extent. A strong induction of GmNAC6 occurs as soon as 8-h after tunicamycin treatment in wild type seedlings and persists over the period of 48-h. In BiP-overexpressing lines, induction of GmNAC6 is barely detected at 8-h, reaches a plateau at 24-h and declines to almost basal levels at 48-h post-treatment. These results may indicate that overexpression of BiP delays ER-stress induction of cell death-associated genes which is consistent with the attenuated tunicamycin-induced cell-death phenotype displayed by overexpressing seedlings.

Cell death in response to osmotic stress is attenuated in BiP-overexpressing soybean seedlings

Wild type and transgenic soybean seedlings were exposed to PEG treatment over a period of 48 hours (Figure 3) and the effectiveness of the stress was monitored by measuring expression of the osmotic-induced SMP gene (Costa et al., 2008; Figure 4A). Consistent with the phenotype of drought tolerance mediated by BiP in tobacco and soybean (Alvim et al., 2001; Valente et al., 2009), overexpressing seedlings maintained leaf turgidity under dehydration conditions promoted by PEG (Compare WT PEG with 35S-BiP PEG at 8-h, 24-h and 48-h). In contrast, at 48-h of PEG-induced osmotic stress, the leaves of wild-

type plants had completely wilted. Furthermore, while PEG accelerated senescence of cotyledon leaves in wild type seedlings, overexpression of BiP in transgenic seedlings delayed PEG-induced leaf senescence, as judged by yellowing of the leaves (Figure 3) and expression of the senescence-associated gene CystP (Figure 4B). The differences in shoot turgidity observed between the two genotypes following PEG treatment have been shown to reflect differences in cell viability (Costa, 2007). Under these conditions cell viability was monitored by the blue Evans dye method that measures membrane integrity. The percentage of dead cell induced by tunicamycin and PEG were much lower in BiP-overexpressing seedlings than in wild type seedlings. This indicates that BiP overexpression is associated with increased viability in cells exposed to tunicamycin and PEG.

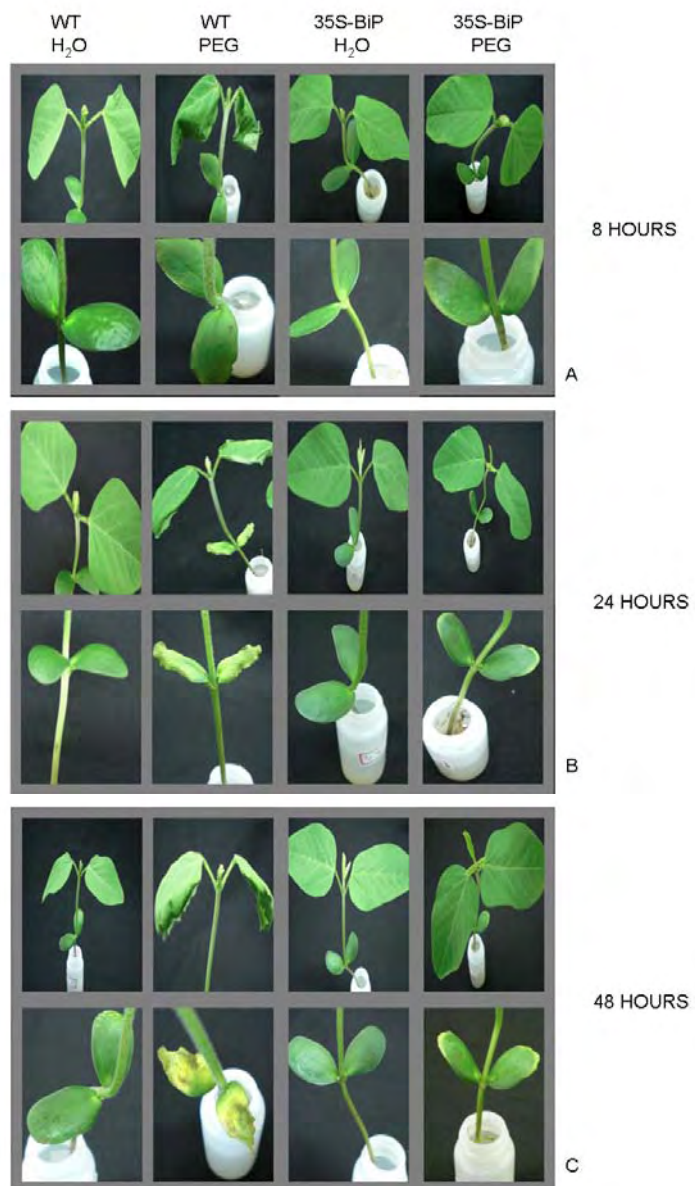


Figure 3. Phenotypes of soybean seedlings exposed to PEG treatment. BiP-overexpressing soybean seedlings (35S-BiP) and untransformed, wild type seedlings (WT) were exposed to treatment with PEG and examined for leaf wilting, chlorosis and necrotic lesions. Photographies were taken at 8, 24 and 48 hours after treatment.

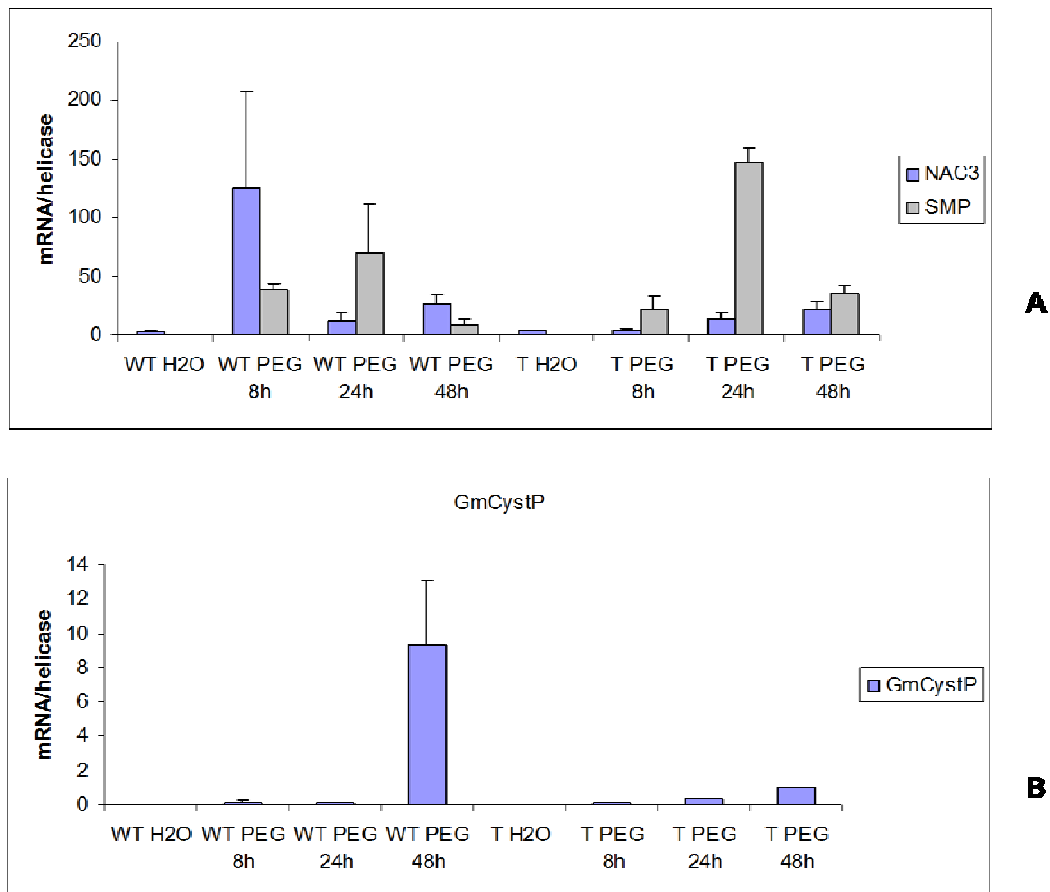


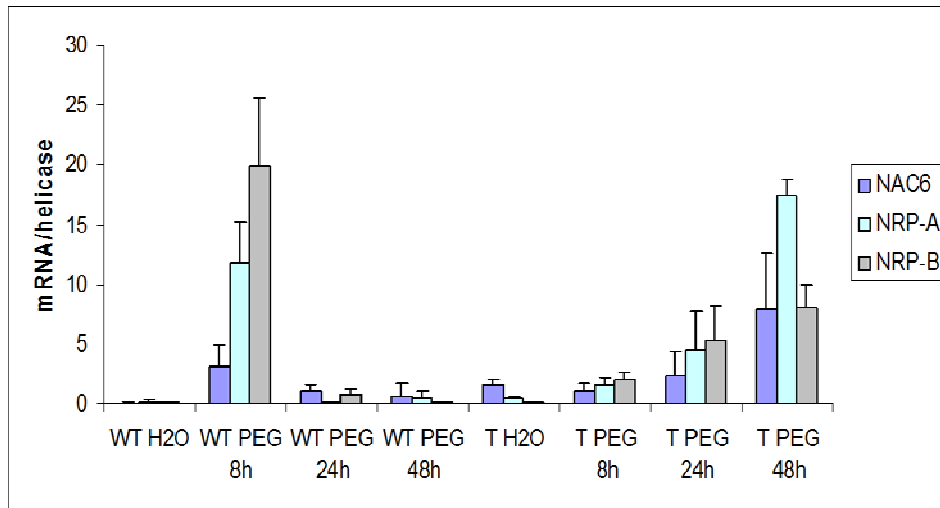
Figure 4. Induction of the senescence-associated gene *GmCystP* by PEG-induced dehydration. Total RNA was isolated from BiP-overexpressing (T) and wild type (WT) soybean seedlings harvested at 8-h, 24-h and 48-h after PEG treatment. The transcript levels of the treatment control genes *SMP* and *NAC3* (A) and senescence-associated gene *GmCystP* (B) were monitored by qRT-PCR. Gene expression was calculated using the $2^{-\Delta Ct}$ method and helicase as endogenous control. cDNAs were obtained from three biological replicates individually validated (n=2 technical replicates).

BIP also interferes with the osmotic stress- induction of the cell death *NRP-A* and *NRP-B* genes

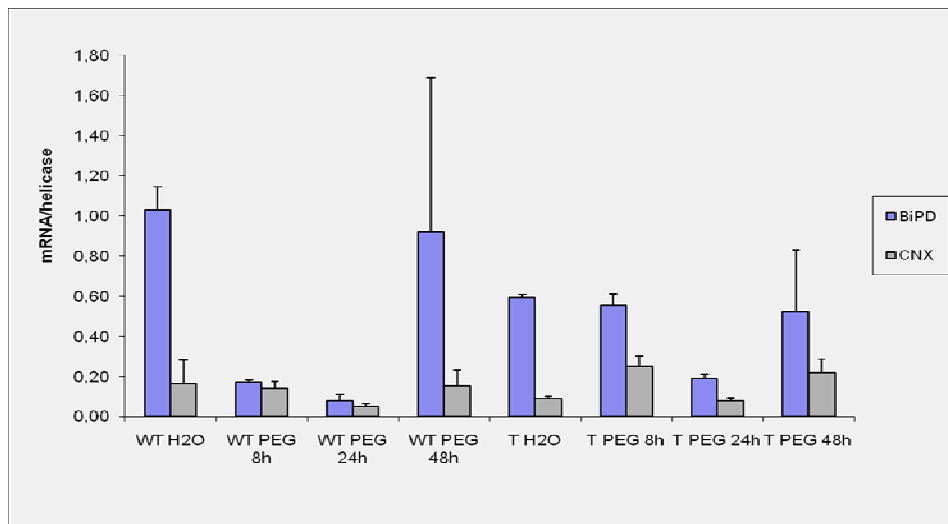
We have previously shown that ER-stress and osmotic signals converge on NRP gene expression to potentiate cell death. This crosstalk between the UPR and osmotic stress signaling may provide the molecular link that would permit the flow of the integrated information to be controlled by a regulator of either one of the stress signals. This hypothesis prompted us to examine whether

BiP, as a regulator of UPR, would also modulate NRP-A and NRP-B up-regulation in response to PEG-induced cell dehydration (Figure 5A). In wilt type seedlings, a robust induction of NRP-A and NRP-B by PEG was observed at 48-h in coordination with the late induction of the senescence-associated gene GmCystP (Figure 4B) and with the appearance of PEG-induced chlorotic phenotype of cotyledon leaves (Figure 3). In overexpressing seedlings, NRP-A, NRP-B and GmNAC6 transcript levels also reached maximum induction at 48-h although to a much lesser extent than in wild type.

As drought and PEG-induced dehydration has been shown to down-regulate genes that encode ER-resident molecular chaperones such as BiP and calnexin (Irsigler et al., 2007; Valente et al., 2009), we also examined the variations of endogenous BiP levels mediated by PEG in wild type and overexpressing lines (Figure 5B). Consistent with previous observations, endogenous BiP is slightly induced by PEG at 8-h and 24-h but the BiP transcript level declines below detection at 48-h. In contrast, the overexpressing lines display higher levels of endogenous BiP than wild type under normal conditions and retain similar levels of transcripts under PEG conditions. These results indicate that overexpression of BiP suppresses the water deficit induced-down-regulation of endogenous BiP. These data might also suggest that changes in BiP levels may serve as a sensing mechanism of cell death. Thus, BiP overexpression may prevent the cell from sensing osmotic stress-induced variations in ER function by keeping ER basic activities to a normal level under persistent stress conditions.



A



B

Figure 5. Osmotic-stress induction of cell death marker genes and endogenous BiP. Total RNA was isolated from BiP-overexpressing (T) and wild type (WT) soybean seedlings harvested at 8-h, 24-h and 48-h after PEG treatment. The transcript levels of the cell death marker genes NRP-A, NRP-B, NAC6 (A) and endogenous BiP gene and CNX (B) were monitored by qRT-PCR. Gene expression was calculated using the $2^{-\Delta Ct}$ method and helicase as endogenous control. cDNAs were obtained from three biological replicates individually validated (n=2 technical replicates).

BiP overexpression delays cell death induced by cycloheximide

We also used cycloheximide, as a general inducer of cell death in soybean (Wertz and Hanley, 1996) that also up-regulates the expression of NRP-

A and NRP-B (Costa et al., 2008) and GmNAC6 (Pinheiro et al., 2009), to examine the effect of BiP overexpression in cycloheximide-induced cell death. Cycloheximide seems to promote intense and accelerated cell death in soybean seedlings as judged by the severity of induced chlorosis and leaf necrotic lesions (Figure 6) and early up-regulation of the senescence-associated gene GmCystP gene (Figure 7A) in wild type soybean seedlings. Induction of GmCystP was detected at 8-h and persisted over the period of 48-h post-treatment. In contrast, in overexpressing seedlings the cell-induced phenotypes were delayed and the GmCystP gene displayed late kinetics of up-regulation, as induction of transcript accumulation was detected at 48-h. The cell death marker genes NRP-A, NRP-B and GmNAC6 followed a similar pattern of early kinetic induction in wild-type seedlings and late kinetics induction in overexpression seedlings (Figure 7B). Collectively, these results indicate that BiP overexpressing delays cell death induced by cycloheximide. The BiP-modulation of cycloheximide-induced cell death may be linked to NRP-A and NRP-B genes at least in part.

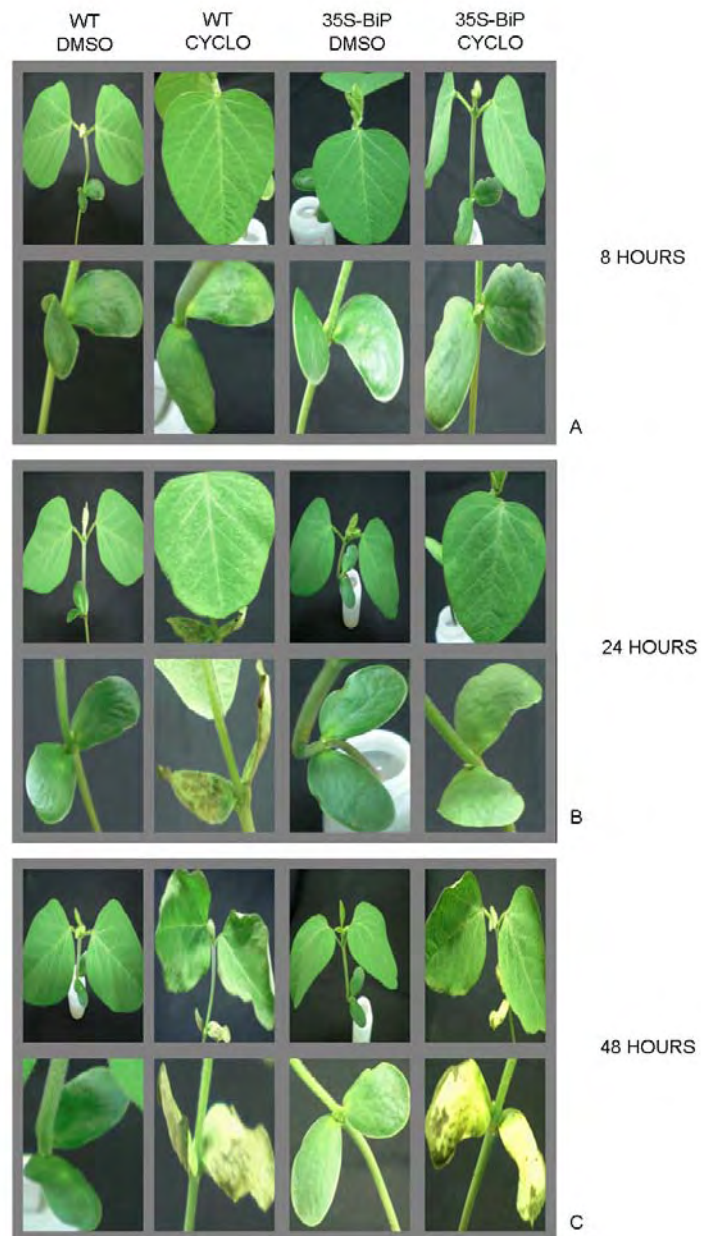


Figure 6. BiP overexpression delays cell death induced by cycloheximide. BiP-overexpressing soybean seedlings (35S-BiP) and untransformed, wild type seedlings (WT) were exposed to treatment with cycloheximide and examined for chlorosis and necrotic lesions. Photographies were taken at 8, 24 and 48 hours after treatment.

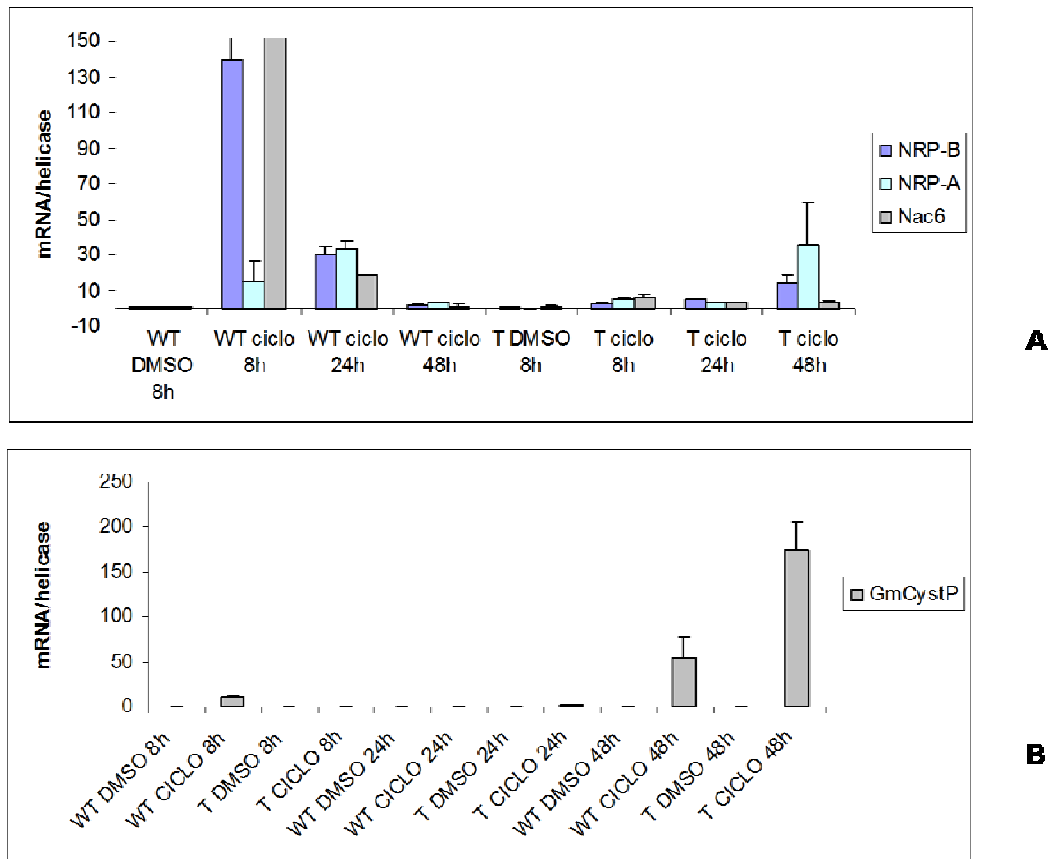


Figure 7. Kinetics of the induction of cell death marker genes by cycloheximide. Total RNA was isolated from BiP-overexpressing (T) and wild type (WT) soybean seedlings harvested at 8-h, 24-h and 48-h after cycloheximide treatment. The transcript levels of the senescence-associated gene *GmCystP* (A) and of the cell death mark genes NRP-A, NRP-B, NAC6 (B) were monitored by qRT-PCR. Gene expression was calculated using the $2^{-\Delta Ct}$ method and helicase as endogenous control. cDNAs were obtained from three biological replicates individually validated (n=2 technical replicates).

BiP attenuates NRP-A- and NRP-B-induced PCD in agroinfiltrated tobacco leaves

We have previously shown with apoptotic-like features (Costa et al., 2008). Here we demonstrated that BiP attenuation of cell death parallels a down-regulation of NRP-B and NRP-A. In order to decipher whether BiP directly modulates NRP-A and NRP-B PCD signaling, we use tobacco transgenic lines in which BiP was overexpressed (sense lines) or suppressed (antisense lines; Alvim

et al., 2001) to transiently express the NRP genes. Tobacco leaves of sense, antisense and untransformed lines were inoculated with *Agrobacterium* carrying NRP-A or NRP-B expression DNA cassettes (Figure 8). Transient expression of both proteins promoted leaf yellowing in untransformed lines (Figure 8, WT, NRP-A and NRP-B infiltrated sectors) that was associated with decreased chlorophyll and carotenoid content as compared to WT sectors agroinfiltrated with *Agrobacterium* alone (Figure 9). However, transient expression of NRPs in leaves of transgenic sense lines (S) did not cause leaf yellowing and chlorophyll and carotenoid content were kept to normal levels (Figure 9). In contrast, in antisense tobacco leaves (AS), the development of chlorosis as a result of NRP-A and NRP-B expression (Figure A2) in infiltrated sectors was more accentuated (Figure 8) with subsequent higher chlorophyll and carotenoid loss (Figure 9) and the onset of senescence was accelerated as compared to wild type control. These phenotypes paralleled the induction of senescence-associated cysteine-protease genes *CP1* (Costa et al., 2008) and *CystP* (Figure 10). In fact, induction of the cysteine protease genes by NRPs expression was more accentuated in antisense leaves as compared to wild type and almost not detectable in sense leaves. These results demonstrate a positive relation between BiP mRNA abundance and NRP-induced leaf senescence and argue favorably for a direct involvement of BIP in modulating NRP-mediated cell death response.

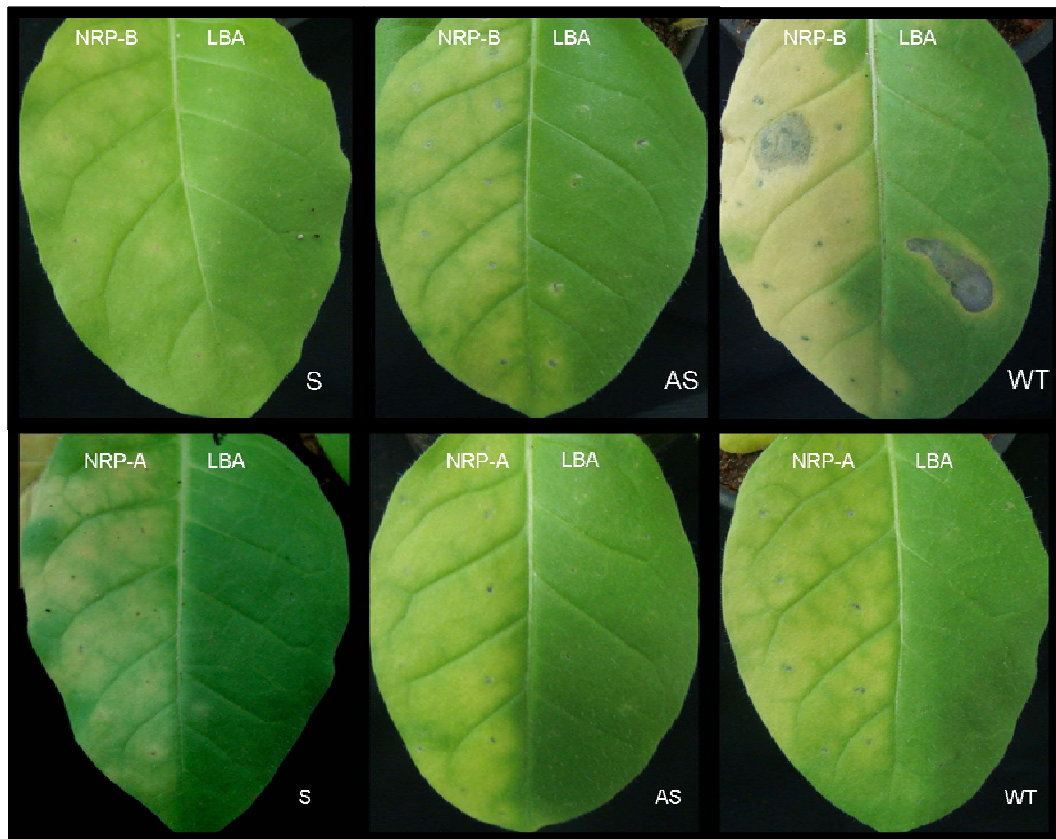


Figure 8. Attenuation of NRP-A and NRP-B induced PCD by BiP. Two-week-old sense (S), antisense (S) and wild type (WT) tobacco leaves were infiltrated with *Agrobacterium* cells alone (LBA 4404) or carrying pYFP-NRP-A, pYFP-NRP-B expression vectors.

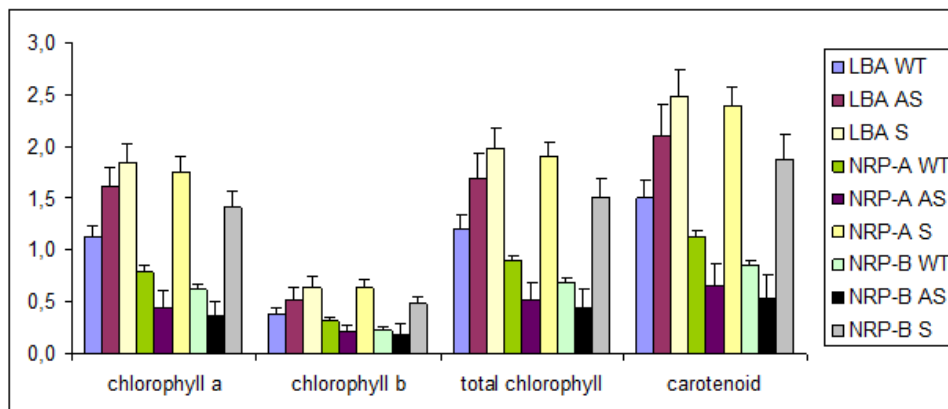


Figure 9. Chlorophyll and carotenoid content of agroinoculated sectors. The content of chlorophyll a and b, and carotenoids was determined from leaf sectors, infiltrated with *Agrobacterium* carrying NRP-A and NRP-B expression cassettes, as indicated in Figure 8.

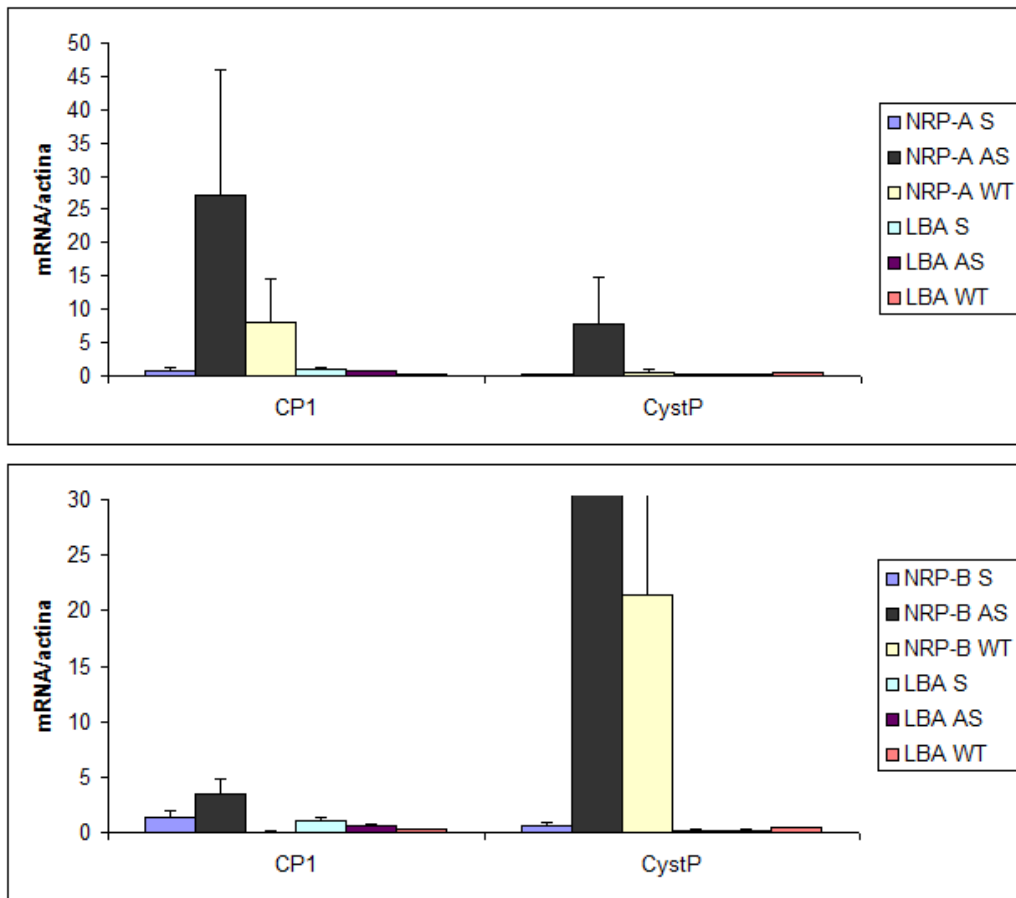


Figure 10. NRPs-mediated induction of cysteine-proteases in agroinoculated tobacco sense and antisense leaves. Two-week-old sense (S), antisense (S) and wild type (WT) tobacco leaves were infiltrated with *Agrobacterium* cells alone (LBA 4404) or carrying pYFP-NRP-A, pYFP-NRP-B expression vectors. The transcript levels of the senescence-associated gene *CP1* and *CystP* were monitored by qRT-PCR. Gene expression was calculated using the $2^{-\Delta Ct}$ method and actin as endogenous control. cDNAs were obtained from three biological replicates individually validated (n=3 biological replicates).

CONCLUSION

We provide several lines of evidence showing that BiP prevents stress-induced cell death in plant cells. Ectopic expression of BIP in transgenic lines attenuates the leaf necrotic lesions caused by treatments with tunicamycin, a potent inducer of ER-stress, and cycloheximide, inducer of cell death in soybean as well as maintaining shoot turgidity under PEG-induced dehydration conditions, whereas control, untransformed leaves wilted under the same PEG conditions. These phenotypes were coordinated with lower and in some cases delayed expression of senescence-associated marker genes. These results are also consistent with previous data showing that the relative content of dead cells is lower in BIP-overexpressing transgenic lines exposed to ER-stress and osmotic stress (Costa, 2008). Furthermore, attenuation of stress-induced cell death by BiP paralleled a delay in the induction of the cell death marker genes NRP-A and NRP-B that are involved in transducing a PCD signal emanated from the ER stress and osmotic stress.

In mammalian cells, ER stress has been shown to trigger both ER stress-specific apoptotic pathways and shared PCD signaling pathways elicited by other death stimuli (Malhotra and Kaufman, 2007). The NRP-mediated PCD signaling fits the concept of a shared pathway induced by ER stress and other stimuli, providing a molecular link that would allow BiP, a regulator of UPR, to control cell death induced by different stimuli. Thus, the control of distinct events of cell death mediated by BiP may be at least partially linked to BiP modulation of NRPs-mediated cell death signaling. Consistent with this model, overexpression of BiP was associated with a delay in NRP-A and NRP-B up-regulation and lower levels of NRP-A and NRP-B stress-induction. To directly assess the BIP involvement in modulating NRP-mediated PCD signaling response, we use an *Agrobacterium*-mediated transient expression assay to monitor NRP-mediated PCD in tobacco

transgenic lines with increased (sense) and suppressed (antisense) BiP expression. Enhanced expression of BiP in sense transgenic lines prevented NRP-induced chlorosis in agroinfiltrated sectors, whereas silencing of endogenous BiP in antisense lines accelerated the onset of leaf senescence. Collectively, these results show a direct co-relation between BiP mRNA abundance and NRP-induced leaf senescence and argue favorably for a direct involvement of BIP in modulating NRP-mediated cell death response.

ANEXOS

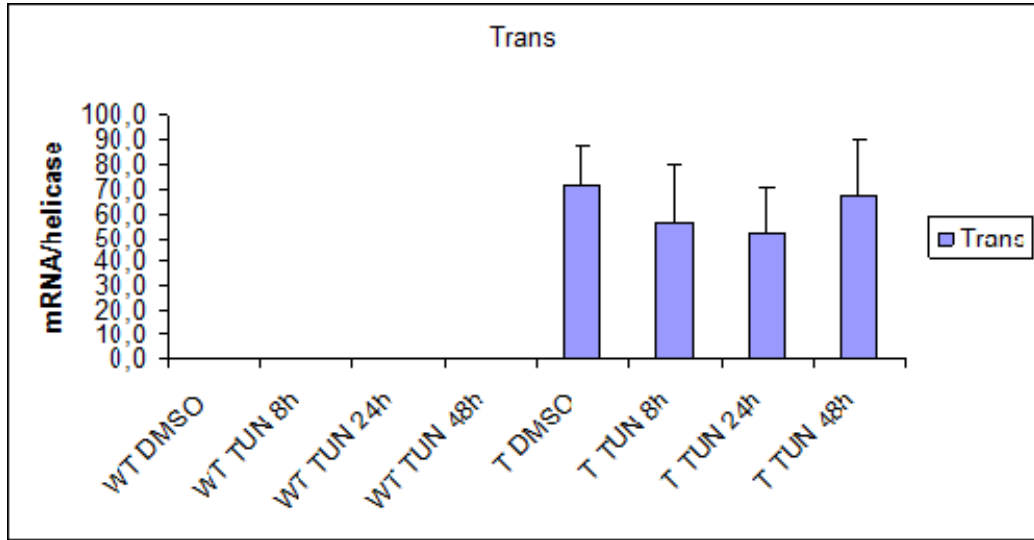


Figure A1. Transcript accumulation of the transgene 35S-soyBIPD-nos during tunicamycin treatment.

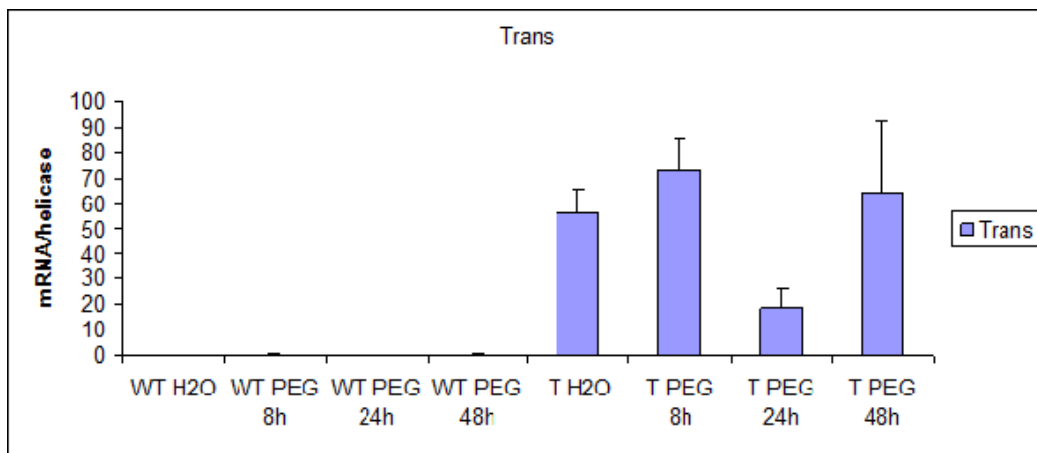


Figure A2. Transcript accumulation of the transgene 35S-soyBIPD-nos during PEG treatment.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELES, F.B., MORGAN, P.W., SALVEIT, M.E. Ethylene in Plant Biology. **Academic Press** 1–432 second edition. 1992.
- ALVIM, F.C., CAROLINO, S.M.B., CASCARDO, J.C.M., NUNES, C.C., MARTINEZ, C.A., OTONI, W.C., FONTES, E.P.B. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. **Plant Physiology**. 126: 1042-1054, 2001.
- BOHNERT, H. J. AND ZHU, J. K. A genomic approach towards salt stress tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**. 39: 295–311, 2001.
- BONIFACINO, J.S., WEISSMAN, A.M. Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. 14: 19–57, 1998.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 171: 248-254, 1976.
- CALFON, M., ZENG, H., URANO, F., TILL, J.H., HUBBARD, S.R., HARDING, H.P., CLARK, S.G., RON, D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA, **Nature**. 415: 92–96, 2002.
- CARVALHO, C.M., FONTENELLE, M.R., FLORENTINO, L.H., SANTOS, A.A., ZERBINI, F.M., FONTES, E.P.B. A novel nucleocytoplasmic traffic GTPase identified as a functional target of the bipartite geminivirus nuclear shuttle protein. **Plant Journal**. 5: 869-80, 2008.
- CASCARDO, J.C.M. ; ALMEIDA, R.S. ; BUZELI, R.A.A. ; CAROLINO, S.M.B. ; OTONI, W.C. ; FONTES, E.P.B. . The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses. **The Journal of Biological Chemistry**. 275: 14494-14500, 2000.

- COSTA, M.D.L., REIS, P.A.B., VALENTE, M.A.S., IRSIGLER, A.S.T., CARVALHO, C.M., LOUREIRO, M.E., ARAGÃO, F.J.L., BOSTON, R.S., FIETTO, L.G., FONTES, E.P.B. A new branch of endoplasmatic reticulum-stress signaling and the osmotic signal converge on plant specific aspragine-rich proteins to promote cell death. **Journal of Biological Chemistry**. 283: 20209-20219, 2008.
- COSTA, M.D.L, Estresse osmótico e do retículo endoplasmático induz morte celular programada de maneira dependente das proteínas NRPs. (Tese de mestrado em Bioquímica Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa, 2007
- COX, J.S., SHAMU, C.E., WALTER, P. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase, **Cell**. 73: 1197–1206, 1993.
- DELESSERT, C., KAZAN, K., WILSON, I.W., VAN DER STRAETEN, D., MANNERS, J., DENNIS, E.S., DOLFERUS, R. The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in Arabidopsis. **The Plant Journal**. 43: 745–757, 2005.
- ELLGAARD, L., HELENIUS, A., 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 4: 181–191, 2003.
- ELLIS, R.J. The molecular chaperone concept. **Seminars in Cell Biology**. 1:1–9, 1990.
- FARIA, J.A.Q.A, Caracterização funcional do fator de transcrição *GmNAC6* de soja (*Glycine Max*) e padrão de expressão de genes *GmNACs* em resposta a estímulos bióticos. (Tese de mestrado em Bioquímica Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa, 2009.
- FIGUEIREDO, J.E.F., CASCARDO, J.C.M., CAROLINO, S.M.B., ALVIM, F.C., FONTES, E.P.B. (1997) Water-stress regulation and molecular analysis of the soybean BiP gene family. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 9: 103–110, 1997.
- FLYNN, G.C., CHAPPELL, T.G., ROTHMAN, J.E. Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. **Science**. 245 : 385–390, 1989.

- FONTES, E.P.B., EAGLE, P., SIPES, P., HANLEY-BOWDOIN. Interaction Between A Geminivirus Replication Protein And Origin DNA Is Essential For Replication. **Journal of Biological Chemistry**. 269: 8459-8465, 1994.
- FREESTONE, P., NYSTROM, T., TRINEI, M., NORRIS, V. The universal stress protein, UspA, of Escherichia coli is phosphorylated in response to stasis. **Journal of Molecular Biology**. 274: 318-324, 1997.
- FRIBLEY, A., ZHANG, K., KAUFMAN, R.J. Regulation of apoptosis by the unfolded protein response. **Methods in Molecular Biology**. 559: 191-204, 2009.
- FRYDMAN, J. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. **Annual Review Biochemistry**. 70: 603–647, 2001.
- GETTING, M.J. Role and regulation of the ER chaperone BiP. **Seminars in Cell and Developmental Biology**. 10: 465-472, 1999.
- HARDING, H.P., ZHANG, Y., BERTOLOTTI, A., ZENG, H., RON D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. **Molecular Cell**. 5: 897–904, 2000.
- HARDING, H.P., NOVOA, I., ZHANG, Y., ZENG, H., WEK, R., SCHAPIRA, M. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. **Molecular Cell**. 6: 1099–108, 2000.
- HARDING, H.P., ZHANG, Y., RON D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. **Nature**. 397: 271-274, 1999.
- HARDING, H.P., ZHANG, Y., ZENG, H., NOVOA, I., LU, P.D., CALFON, M. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. **Molecular Cell**. 11: 619–33, 2003.
- HARRAK, H., AZELMAT, S., BAKER, E.N., TABAEIZADEH, Z. Isolation and characterization of a gene encoding a drought-induced cysteine protease in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Genome**. 44: 368–374, 2001.
- HAZE, K., YOSHIDA, H., YANAGI, H., YURA, T., MORI, K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and

- activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. **Molecular Biology of the Cell**. 10: 3787–99, 1999.
- HEERMANN, R., WEBER, A., MAYER, B., OTT, M., HAUSER, E., GABRIEL, G., PIRCH, T., JUNG, K. The Universal Stress Protein UspC Scaffolds the KdpD/KdpE Signaling Cascade of *Escherichia coli* under Salt Stress. **Journal of Molecular Biology**. 386: 134-148, 2009.
- HENDERSHOT, L.M. The ER function BiP is a master regulator of ER function. **Mount Sinai Journal of Medicine**. 71: 289-297, 2004.
- HETZ, C., BERNASCONI, P., FISHER, J., LEE, A.H., BASSIK, M.C., ANTONSSON, B., BRANDT, G.S., IWAKOSHI, N.N., SCHINZEL, A., GLIMCHER, L.H. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1 α . **Science** 312:572-576, 2006.
- HONG, Z., LAKKINENI, K., ZHANG, Z., VERMA, D.P.S., Removal of feedback inhibition of δ' -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiology**. 122: 1129–1136, 2000.
- HSIEH, T., LEE, J., CHARNG, Y., CHAN, M. Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. **Plant Physiology**. 130: 618-626, 2002.
- HUT, H., DAI, M., YAO J., XIAO, B., LI X., ZHANG Q., XIONG, L. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. **Proceeding of the National Academy of Sciences**. 103: 12987-12992, 2006.
- IRSIGLER, A.S.T., COSTA, M.D.L., ZHANG, P., REIS, P.A.B., DEWEY, R.E., BOSTON, R.S., FONTES, E.P.B. Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER and osmotic-stress pathways. **BMC Genomics**. 8, 431-, 2007
- IWATA, Y., FEDOROFF, N.V., KOIZUMI N. *Arabidopsis* bZIP60 is a proteolysis-activated transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response, **Plant Cell**. 20: 3107-3121, 2008.

- JAGLO-OTTOSEN, K., GILMOUR, S., ZARKA, D., SCHABENBERGER, O., THOMASHOW, M. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. **Science**. 280: 104-106, 1998.
- JAKOBY, M., WEISSHAAR, B., DRÖGE-LASER, W., VICENTE-CARBAJOSA, J., TIEDEMANN, J., KROJ, T., PARCY F. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*, **Trends in Plant Science**. 7: 106-111, 2002.
- KALINSKI, A., ROWLEY, D.L., LOER, D.S., FOLEY, C., BUTA, G., HERMAN, E.M. Binding-protein expression is subject to temporal, developmental and stress-induced regulation in terminally differentiated soybean organs. **Planta** 195: 611–621, 1995.
- KAMAUCHI, S., NAKATANI, H., NAKANO, C., URADE, R. (2005) Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Journal**. 272: 3461-3476, 2005.
- KAPOOR, A., SANYAL, A. Endoplasmic Reticulum Stress and the Unfolded Protein Response. **Clinics in Liver Disease**. 13: 581-590, 2009.
- KARIOLA, T., BRADER, G., HELENIUS, E., LI, J., HEINO, P., PALVA, E.T. Early response dehydration 15, a negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**. 142: 1559-1573, 2006.
- KAWAHARA, T., YANAGI, H., YURA, T., MORI, K. Unconventional splicing of HAC1/ERN4 mRNA required for the unfolded protein response. Sequence-specific and non-sequential cleavage of the splice sites, **Journal of Biological Chemistry**. 273: 1802–1807, 1998.
- KAWASAKI, S. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. **Plant Cell**. 13: 889–905, 2001.
- Kerk, D., Bulgrien, J., Smith D.W., Gribskov M. *Arabidopsis* Proteins Containing Similarity to the Universal Stress Protein Domain of Bacteria1. **Plant Physiology**. 131: 1209–1219, 2003.
- KERR, J.F., WYLLIE, A.H. AND CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Câncer**. 26: 239–257, 1972.

- KIMCHI, A. Programmed cell death: From novel gene discovery to studies on network connectivity and emerging biomedical implications. **Cytokine Growth Factor Reviews**. 18, 435–440, 2007.
- KISHI, S., SHIMOKE, K., NAKATANI, Y., SHIMADA, T., OKUMURA, N., NAGAI, K., SHIN-YA, K., IKEUCHI, T. Nerve growth factor attenuates 2-deoxy-D-glucose-triggered endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis via enhanced expression of GRP78. **Neuroscience Research** 66: 14–21, 2010.
- KNIGHT, H. Calcium signaling during abiotic stress in plants. **International Review of Cytology**. 195: 269–325, 2000
- KOIZUMI, N., MARTINEZ, I. M., KIMATA, Y., KOHNO, K., SANJO, H., CHRISPPEELS M. J. Molecular characterization of two Arabidopsis Ire1 homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases. **Plant Physiology**. 127: 949-962, 2001.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-695, 1970.
- LEBORGNE-CASTEL, N., JELITTO-VAN DOOREN, E.P.W.M., CROFTS, A.J., DENECKE J.. Overexpression of BiP in tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress. **The Plant Cell**.11, 459–470,1999.
- LEE, K., NEIGEBORN, L., KAUFMAN, R.J. The unfolded protein response is required for haploid tolerance in yeast. **Journal of Biological Chemistry**. 278: 11818–11827, 2003.
- LEE, K., TIRASOPHON, W., SHEN, X., MICHALAK, M., PRYWES, R., OKADA, T., YOSHIDA, H., MORI, K., KAUFMAN, R.J. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. **Genes and Development**. 16, 452–466, 2002.
- LI J., LEE B., LEE A.S. Endoplasmic reticulum-stress induced apoptosis: Multiple pathways and activation of PUMA and cNOXA by p53. **Journal of Biological Chemistry**. 281:7260-7270, 2006.
- LI, H., BERGERON, L., CRYNS, V., PASTERNAK, M.S., ZHU, H., SHI, L., GREENBERG, A., YUAN, J. Activation of caspase-2 in apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 21010–21017,1997.

- LI, W., DICKMAN, M.B. Abiotic stress induces apoptotic-like features in tobacco that is inhibited by expression of human Bcl-2. **Biotechnology Letters**. 26: 87–95, 2004.
- LIM, P.O, Hyo Jung Kim, H. J., NAM, H.G. Leaf senescence. **Annual Review of Plant Biology**. 58: 115-136, 2007.
- LIU, H., BOWES III, R.C., VAN DE WATER, B., SILLENCE, C., NAGELKERKE, J.F., STEVENS, J.L. Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca²⁺ disturbances, and cell death in renal epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**. 272: 21751–21759, 1997.
- LIU, H., MILLER, E., VAN DE WATER, B., STEVEN, J.L. Endoplasmic reticulum stress proteins block oxidant-induced Ca²⁺ increases and cell death. **Journal of Biological Chemistry**. 273: 12858–12862, 1998.
- LIU, J.X., SRIVASTAVA, R., CHE, P., HOWELL S.H. An endoplasmic reticulum stress response in Arabidopsis is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28, **Plant Cell** 19, 4111-4119, 2007.
- LIU, J., ZHU, J.K. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. **Science**. 280: 1943–1945, 1998.
- LIU, S.Y., KAUFMAN, R.J. The unfolded protein response. **Cell science**. 116: 1861-1862, 2003.
- LUDWIG, A.A., TENHAKEN, R. A new cell wall located N-rich protein is strongly induced during the hypersensitive response in *Glycine max* L. **European Journal of Plant Pathology**. 107: 323–336, 2001.
- MA, Y., BREWER, J.W., DIEHL, J.A., HENDERSHOT, L.M. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. **Journal of Molecular Biology**. 318:1351–65, 2002.

- MALHOTRA, J.D., KAUFMAN, R.J. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. **Seminars in Cell and Developmental Biology**. 18: 716–731, 2007.
- MARTINEZ, I.M., CHRISPEELS, M.J. Genomic analysis of the unfolded protein response in Arabidopsis shows its connection to important cellular processes. **Plant Cell**. 15: 561-576, 2003.
- MCKAY, D.B. Structure and mechanism of 70-kDA heat-shock-related proteins. **Advances in Protein Chemistry**. 44: 67-80, 1993.
- MORI, K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. **Cell**. 101: 451–454, 2000.
- MORRIS, J.A., DORNER, A.J., EDWARDS, C.A., HENDERSHOT, L.M., KAUFMAN, J. 1997. Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. **Journal of Biological Chemistry**. 272: 4327–4334, 1997.
- NAIDOO, N. ER and aging—Protein folding and the ER stress response. **Ageing Research Reviews**. 8: 150-159, 2009.
- NAKAGAWA, T., ZHU, H., MORISHIMA, N., LI, E., XU, J., YANKNER, B.A., YUAN, J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . **Nature** 403: 98-103, 2000.
- NAVARRE, D.A. AND WOLPERT, T.J. Victorin induction of an apoptotic/senescence-like response in oats. **Plant Cell**, 11: 237–249, 1999.
- NGUYEN, T.H., LAW, D.T.S., WILLIAMS, D.B. Binding protein BiP is required for translocation of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of the Sciences**. 88,1565-1569, 1991.
- OIKAWA, D., KIMATA, Y., KOHNO, K., IWAWAKI, T. Activation of mammalian IRE1 α upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins. **Experimental Cell Research**. 315: 2496-2504, 2009.

- PEDRA, J.H.F., DELU-FILHO, N., PIROVANI, C.P., CONTIN, L.A.S., OTONI, W.C., FONTES, E.P.B. Antisense and sense expression of a sucrose binding protein homologue gene from soybean in transgenic tobacco affects plant growth and carbohydrate partitioning in leaves. **Plant Science**. 152: 87-98, 2000.
- PIROT, P., NAAMANE, N., LIBERT, F., MAGNUSSON, N.E., ORNTOFT, T.F., CARDOZO, A.K., EIZIRIK, D.L. Global profiling of genes modified by endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta cells reveals the early degradation of insulin mRNAs. **Diabetologia**. 50: 1006–1014, 2007.
- PINHEIRO, G.L. Caracterização molecular e funcional de transfator da família NAC de soja (*Glycine max*) (Tese de mestrado em Bioquímica Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- PINHEIRO, G.L., MARQUES, C.S., COSTA, M.D.L., REIS, P.A.B., ALVES, M.S., CARVALHO, C.M., FIETTO, L.G., FONTES, E.B.P. Complete inventory of soybean NAC transcription factors: sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response. **Gene**. 444: 10-23, 2009.
- PROSKURYAKOV, S.Y., KONOPLYANNIKOV, A.G., GABAI, V.L., 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Experimental Cell Research**. 283: 1– 16, 2003.
- RABBANI, M.A., MARUYAMA, K., ABE, H., KHAN, M.A., KATSURA, K., ITO, Y., YOSHIWARA, K., SEKI, M., SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. **Plant Physiology**. 113: 1755-67, 2003.
- RAO, R.V., CASTRO-OBREGON, S., FRANKOWSKI, H., SCHULER, M., STOKA, V., RIO, G., BREDESEN, D.E., ELLERBY, H.M. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. **Journal of Biology Chemistry**. 244: 21826-21842, 2002.
- ROCK, C.D. Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. **New Phytologist**. 148: 357–396, 2000.

- RON, D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. **The Journal of Clinical Investigation**. 110: 1383–8, 2002.
- RON, D., WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 8: 519-529, 2007.
- RYERSON, D.E., HEATH, M.C. Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. **Plant Cell**. 8: 393–402, 1996.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning - A Laboratory Manual, Ed.2, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, 1989.
- SANDERS, D., BROWNLEE, C. AND HARPER, J. F. Communicating with calcium. **Plant Cell**. 11: 691–706, 1999.
- SANDERS, S.L., WHITFIELD, K.M., VOGEL, J.P. Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. **Cell**. 69:353-365, 1992.
- SCHRÖDER, M., KAUFMAN, R.J. ER stress and the unfolded protein response. **Mutation Research**. 569:29-63, 2005.
- SESSA, G., D'ASCENZO, M., MARTIN, G.B. Thr38 and Ser198 are Pto autophosphorylation sites required for the AvrPto–Pto-mediated hypersensitive response. **The EMBO Journal**. 19: 2257–2269, 2000.
- SHAMU, C.E., WALTER, P. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. **The EMBO Journal**. 15: 3028–3039, 1996.
- SHEN, J., CHEN, X., HENDERSHOT, L., PRYWES R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. **Developmental Cell**. 3: 99-111, 2002.
- SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI., K., SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current Opinion of Plant Biology**. 6: 410-417, 2003.

- STAEHELIN, L.A. The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. **The Plant journal: for cell and molecular biology**. 11:1151-65,1997.
- STEVENS, F.J., ARGON, Y. Protein folding in the ER. **Seminars in Cell Biology**. 10:443–454,1999.
- TAJIMA, H., IWATA, Y., IWANO, M., TAKAYAMA, S., KOIZUMI N. Identification of an Arabidopsis transmembrane bZIP transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. **Biochemichal and Biophysical Research Communications**. 374: 242-247, 2008.
- TAKKEN, F.L.W., ALBRECHT, M., TAMELING, W. Resistance proteins: molecular switches of plant defence. **Current Opinion in Plant Biology**. 9: 383–390, 2006.
- TENHAKEN R., DOERKS, T., BORK P. DCD – a novel plant specific domain in proteins involved in development and programmed cell death. **BMC Bioinformatics**. 6:169, 2005.
- UNO, Y., FURIHATA, T., ABE, H., YOSHIDA, R., SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. **Proceedings of the National Academy of the Sciences**. 97: 11632–11637, 2000.
- URADE, R. Cellular response to unfolded proteins in the endoplasmic reticulum of plants. **FEBS Journal**. 274: 1152-1171, 2007.
- URADE, R. The endoplasmic reticulum stress signaling pathway in plants. **BioFactors**. 35: 326-331, 2009.
- URANO, F., WANG, X., BERTOLOTTI, A., ZHANG, Y., CHUNG, P., HARDING, H.P., RON, D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinase by transmembrane protein kinase IRE1. **Science** 287: 664–666, 2000.
- VALENTE, M.A.S., FARIA J.A.Q.A., RAMOS J.R.L.S., REIS, P.A.B., PINHEIRO, G.L., PIOVESAN, N.D., MORAIS, A.T., MENEZES, C.C., CANO, M.A.O., FIETTO, L.G., LOUREIRO, M.E., ARAGAO, F.J.L., FONTES, E.B.P. The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in

- soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. **Journal of Experimental Botany**. 60: 533-546, 2009.
- VAN BOGELEN, R.A., HUTTON, M.E., NEIDHARDT, F.C. Gene-protein database of Escherichia coli K-12: edition 3. *Electrophoresis*. 11: 1131-1166, 1990.
- WANG, S., NARENDRA, S., FEDOROFF, N. (2007) Heterotrimeric G protein signaling in the Arabidopsis unfolded protein response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 104, 3817–3822, 2007.
- WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology** 144:307-313,1994.
- WERTZ, I.E., HANLEY, M.R. Diverse molecular provocation of programmed cell death. **Trends in Biochemical Sciences**. 21: 359-364, 1996.
- XIONG, L., LEE, H., ISHITANI, M., ZHU, J. K. Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in Arabidopsis. **Journal of Biological Chemistry**. 277, 8586–8596, 2002.
- XIONG, L., ZHU, J. K., Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. **Physiologia Plantarum**. 112: 152–166, 2001.
- XU, C., BAILLY-MAITRE, B., REED, J.C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. **Journal of Clinical Investigation**. 115: 2656-2664, 2005.
- YOSHIDA, H., MATSUI, T., HOSOKAWA, N., KAUFMAN, R.J., NAGATA, K., MORI, K. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response **Developmental Cell**. 4: 265–271, 2003.
- YOSHIDA, H., MATSUI, T., YAMAMOTO, A., OKADA, T., MORI, K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. **Cell**. 107: 881–891, 2001.
- YOSHIDA, H., OKADA, T., HAZE, K., YANAGI, H., YURA, T., NEGISHI, M. Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors

6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. **Molecular Cell Biology**.21: 1239–48, 2001.

ZAREMBINSKI, T.I., HUNG, L-W., MUELLER-DIECKMANN, H-J., KIM, K-K., YOKOTA, H., KIM, R., KIM, S-H. Structure-based assignment of the biochemical function of a hypothetical protein: a test case of structural genomics. **Proceedings of the National Academy of the Sciences**. 95: 15189–15193, 1998.

ZHANG, K. KAUFMAN, R.J. Signaling the Unfolded Protein Response from the Endoplasmic Reticulum. **The Journal of Biologic Chemistry**. 279: 25935-25938, 2004.

ZEGZOUTI, H., JONES, B., FRASSE, P., MARTY, C., MAITRE, B., LATCHE, A., PECH, J-C., BOUZAYEN, M. Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display. **Plant Journal**. 18: 589–600, 1999.

ZHU, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants, **Annual Review of Plant Biology**. 53: 247–273, 2002.

ZUPPINI, A., NAVAZIO, L., MARIANI, P. Endoplasmatic Reticulum stress-induced programmed cell death in soybean cells. **Journal of Cell Science** 117: 2591-2598, 2004.