

LUIZ FERNANDO DE CAMARGOS

**REGULAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPONENTES A MONTANTE DA VIA  
DE SINALIZAÇÃO DE MORTE CELULAR MEDIADA POR DCD/NRP1**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019

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

T

C172r  
2019 Camargos, Luiz Fernando de, 1990-  
Regulação e identificação de componentes a montante da  
via de sinalização de morte celular mediada por DCD/NRP1 /  
Luiz Fernando de Camargos. – Viçosa, MG, 2019.  
v, 64 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Morte celular. 2. Stress (Fisiologia). 3. Proteínas -  
Síntese. 4. Ligação proteica. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 571.939

LUIZ FERNANDO DE CAMARGOS

**REGULAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPONENTES A MONTANTE DA VIA  
DE SINALIZAÇÃO DE MORTE CELULAR MEDIADA POR DCD/NRP1**

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

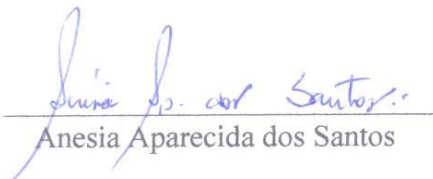
APROVADA: 31 de julho de 2019.



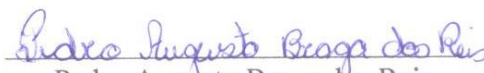
Iara Pinheiro Calil



Jurandir Vieira de Magalhães



Anesia Aparecida dos Santos



Pedro Augusto Braga dos Reis  
(Coorientador)



Elizabeth Pacheco Batista Fontes  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me deixar fazer escolhas e por me ensinar que todas elas têm uma consequência.

À minha família. Aos meus pais, José Erivan e Sirley, que nunca mediram esforços para me darem a oportunidade de estudar. Obrigado por me ensinarem os valores que eu tenho e perdão por não ter aprendido tudo que se dispuseram a me ensinar. Às minhas queridas irmãs Letícia e Larissa que tanto me apoiaram e foram pacientes com minhas ausências em muitas oportunidades.

À minha namorada Larissa por todo o amor durante esse período. Muito mais que namorada foi minha parceira no laboratório. Obrigado por todo o companheirismo e toda a paciência para entender os momentos em que tive de me ausentar para terminar experimentos no laboratório. Te amo muito.

À Profa. Elizabeth Fontes, por ter me aceitado no seu grupo e pesquisa. Obrigado pela confiança e pelas oportunidades. Espero levar comigo sempre seu exemplo de brilhante cientista.

Ao Prof. Pedro Braga muito obrigado por todas as contribuições durante esse período de doutorado.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica Aplicada pela oportunidade de realização do doutoramento.

Ao CNPq e a FAPEMIG pelo suporte financeiro para realização deste projeto.

A todos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas pela paciência, ensinamentos e pela boa convivência que tornaram mais fácil o desenvolvimento desse trabalho. Em especial aos amigos Célio, Otto, Eduardo, Bruno e Marco Aurélio.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para que este trabalho tenha sido realizado.

## ABSTRACT

CAMARGOS, Luiz Fernando de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Regulation and identification of upstream components of the DCD/NRP1-mediated cell death signaling.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-adviser: Pedro Augusto Braga dos Reis.

The plant adaptive stress response is one of the main indicators of growth, development, and productivity. Abiotic signals are prominent because they frequently occur simultaneously in the field, as one kind of stress leads to the other, including alterations in temperature, salinity, drought, and nutritional deprivation. The understanding of how plants alter their metabolic status in response to a unique stress signal has been extensively addressed; however, the understanding of the integration of multiple stress responses is needed. The DCD/NRP-mediated cell death signaling pathway is activated in response to different stimuli. This activation results in the integration of multiple stress signals into a cell death program derived from prolonged stress conditions. Moreover, enhanced accumulation of the molecular chaperone BiP attenuates the expression and activity of the components of this cell death pathway; thus, promoting a better adaptation of plants to adverse conditions. In this investigation, we demonstrated a correlation between the expression of DCD/NRP-mediated cell death components with transducers of the unfolded protein response, G protein signaling, light and abscisic acid accumulation, which implicates DCD/NRP1 as a crucial player in signaling mechanisms. Then, we examined the mechanisms that connect the DCD/NRP1 cell death pathway with its negative modulator, BiP, that are spatially separated in the cell. Analyses of the possible involvement of endoplasmic reticulum (ER) membrane-associated transducers in the cell death pathway activation indicated that the G protein subunit AtAGB1 acts as an upstream component of this pathway. We demonstrated that osmotic- and ER-stress induction of pathway components was prevented in the *agb1-3* mutant. In addition, the *agb1-3* mutant was more tolerant to ER stress, osmotic stress, and drought; phenotype, which was reversed by ectopic expression of AtAGB1 in *agb1-3* and intensified in AtAGB1 overexpressing lines. Furthermore, the expression of AGB1 under stress conditions was negatively modulated by BiP. Collectively, these data indicate that AGB1 may be an upstream component of DCD/NRP-mediated cell death pathway in connection with other G signaling pathways.

## RESUMO

CAMARGOS, Luiz Fernando de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Regulação e identificação de componentes a montante da via de sinalização de morte celular mediada por DCD/NRP1.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientador: Pedro Augusto Braga dos Reis.

A resposta adaptativa de plantas a condições de estresse é um dos principais desafios na agricultura pois afeta parâmetros de crescimento, desenvolvimento e produtividade. Os estresses abióticos ganham destaque pois estão intimamente relacionados com esses parâmetros, e frequentemente ocorrem simultaneamente no campo, como alterações de temperatura, seca e estresse nutricional. A compreensão de como plantas alteram seu metabolismo em resposta a condições adversas únicas vem sendo analisada intensivamente durante anos, porém há a necessidade de entender como elas se comportariam em resposta a múltiplos estresses. A via de sinalização mediada por DCD/NRP1 é ativada em resposta a diferentes estímulos ambientais, resultando na indução de programas de morte celular derivado de estresses prolongados. Além disso, aumento dos níveis do chaperone molecular BiP atenua a expressão e atividade dos componentes dessa via, promovendo assim uma melhor adaptação de plantas a condições adversas. Na presente investigação, foi demonstrado que uma correlação entre a expressão de DCD/NRP1 com transdutores responsivos a sinais de acúmulo de proteínas mal dobradas, proteína G heterotrimérica, luz e ácido abscísico, indicando um papel chave de DCD/NRP em mecanismos sinalizadores. Posteriormente, procurou-se elucidar os mecanismos que conectam a via de morte celular DCD/NRP com seu modulador negativo BiP que se encontram espacialmente separados dentro da célula. Análise do possível envolvimento de transdutores de sinais presentes na membrana do retículo endoplasmático na ativação da via de morte celular demonstrou que a subunidade  $\beta$  da proteína G (AtAGB1) atua como componente a montante da via de sinalização mediada por DCD/NRP1. Foi demonstrado que os genes componentes da via de morte celular mediada por DCD/NRP requerem AGB1 para indução em resposta a estresse osmótico e do retículo endoplasmático. Além disso, o mutante *agb1-3* demonstrou ser mais tolerante a condições adversas de estresse no retículo endoplasmático e por seca, fenótipo revertido em linhagens *agb1-3* transformadas ectopicamente com AtAGB1 e intensificado em linhagens superexpressando AtAGB1. Além disso, a expressão de *AGB1* em condições de estresse também foi modulada pelo chaperone molecular BiP. Coletivamente esses dados indicam que AGB1 atua como integrante a montante de NRP na via de sinalização que integra sinais de múltiplos estresses em programas de morte celular.

## SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS.....	4
<b>Capítulo I – Development and cell death domain-containing asparagine-rich protein (DCD/NRP): an essential protein in plant development and stress responses.....</b>	<b>7</b>
<b>Capítulo II- A subunidade <math>\beta</math> da proteína G atua como transdutor de sinal à montante na via de morte celular induzida por NRPs.....</b>	<b>20</b>
Resumo.....	21
Introdução.....	22
Material e métodos.....	26
Resultados.....	30
Discussão.....	36
Referências.....	41
Figuras.....	46
Informações suplementares.....	55

## INTRODUÇÃO GERAL

Organismos vivos em geral estão em uma constante adaptação a respostas celulares advindas de estímulos internos e externos. As respostas adaptativas a esses estímulos são ativadas pela percepção via sensores e subsequente transmissão da resposta para efetores a jusante (Pandey, 2019). De um modo geral, uma rede de sinais conecta os estímulos internos e externos a respostas adaptativas levando a modificações moleculares que permitiram ajustes fisiológicos, que finalmente levam a condições de susceptibilidade ou tolerância às situações expostas.

Em plantas esses mecanismos possuem uma regulação fina e coordenada. Por se tratarem de organismos sésseis e constantemente expostos a múltiplos estresses ambientais, responsáveis por maior limitação em relação a produtividade, as células vegetais desenvolveram vias de sinalização sofisticadas que respondem de maneira coordenada a esses estímulos (Stone, 2019).

Estresses abióticos merecem destaque por levarem ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio, como de  $H_2O_2$  que tem capacidade de atuar como mensageiro intracelular induzindo a alterações fisiológicas danosas, por exemplo inibição do processo fotossintético. Assim mecanismos celulares antioxidantes são ativados para tentar reverter esses danos, porém com custo na manutenção da homeostase celular (Baxter *et al.* 2014).

Em adição as repostas mediadas por espécies reativas de oxigênio, repostas celulares mediadas por hormônios possuem papel importante na adaptação de plantas a condições ambientais adversas. O hormônio ácido abscísico (ABA) merece destaque ao se analisar respostas a condições ambientais, envolvendo seca e salinidade. Diversos transdutores são responsivos à ABA, desencadeando cascatas sinalizadoras que auxiliam na aclimação às novas condições existentes (Muñoz-Espinoza *et al.* 2015; Danquah *et al.* 2014; Zandalinas *et al.* 2018).

Recentemente, alguns modelos preditivos indicam que o mecanismo essencial para desenvolvimento e aclimação de plantas a novos cenários ambientais ocorre com respostas celulares a combinações de estresses abióticos múltiplos. Dessa maneira, torna-se necessário pesquisar cenários onde combinações de estresses possam ocorrer, e assim, poder antecipar possíveis respostas celulares, fisiológicas e bioquímicas que irão contribuir para adaptações das plantas a essas novas situações de estresses combinados (Zandalinas *et al.* 2018).

Respostas moleculares de plantas a estresses abióticos individuais têm sido

extensivamente estudadas por muitos grupos de pesquisadores, porém não fornecem as bases moleculares para o entendimento da resposta coordenada a essas novas combinações de estresses abióticos. Avanços nessa nova perspectiva estão sendo feitos e têm se chegado a conclusões que a combinação de dois ou mais fatores leva à ativação de efetores moleculares específicos em plantas (Zandalinas *et al.* 2018).

Atualmente, as estratégias de manipulação e reprogramação da expressão de proteínas responsivas a estresses múltiplos têm como objetivo melhorar a tolerância das plantas a condições ambientais adversas. Duas diferentes estratégias vêm sendo utilizadas para isso. Estas incluem a manipulação de genes que codificam fatores de transcrição responsivos a condições de estresses e de genes cujos produtos tenham atividade de proteção ou desintoxicação de subprodutos gerados em condições de estresse (Vinocur e Altman, 2005). A manipulação da expressão de fatores de transcrição, como o gene GmNAC81, e chaperones moleculares, como BiP (“Binding Protein”), demonstrou que estes genes atuam em uma via responsiva a diversas condições de estresse (Valente *et al.*, 2009; Pimenta *et al.*, 2016; Reis *et al.*, 2016). A superexpressão do chaperone molecular BiP, que se localiza no retículo endoplasmático (RE), conferiu maior tolerância à seca em diversas espécie de plantas (Alvim *et al.*, 2001; Valente *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2016). Além disso, por se tratar de um sensor da via de sinalização de resposta a proteínas mal dobradas (UPR (do inglês *unfolded protein response*)), BiP também modula uma via de sinalização de morte celular induzida por múltiplos estresses (Isrigler *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2011; Reis e Fontes, 2012; Mendes *et al.*, 2013, Carvalho *et al.*, 2014a, 2014b). De maneira oposta, a expressão ectópica de um fator de transcrição responsivo a condições de seca, estresses osmótico e no RE, GmNAC81, acelerou o processo natural de senescência (Pimenta *et al.*, 2016).

A supracitada via de morte celular é mediada por proteínas NRPs, que possuem domínios característicos (morte e desenvolvimento e rico em aminoácido asparagina). Estudos anteriores demonstraram que essa via integra respostas a múltiplos fatores (sinais de estresse no RE e osmótico, e mais recentemente a ABA) (Reis *et al.*, 2011; Alves *et al.*, 2011a; 2011b, Reis e Fontes, 2012; Mendes *et al.*, 2013; Reis *et al.*, 2016; Camargos *et al.*, 2018). Dessa maneira, a referida via de sinalização tem emergido como um alvo interessante para engenharia genética de tolerância a estresses múltiplos e também para caracterizar essas novas perspectivas de combinações de fatores ambientais.

Apesar de avanços recentes quanto ao mecanismo de ação da via de morte celular mediada pelas proteínas NRPs, a conexão da mesma com outras vias responsivas a estresses e

também a caracterização de mecanismos a montante que conectam o modulador BiP com as proteínas NRPs e fatores de transcrição da família NAC permanecem obscuros. Dessa forma, os objetivos primordiais desse estudo foram identificar *in silico* conexões entre vias de respostas a sinais de estresses integradas por proteínas NRPs e também identificar novos componentes dessa via integrativa de resposta a estresses abióticos. O primeiro objetivo foi explorado no capítulo I intitulado *Development and cell death domain-containing asparagine-rich protein (DCD/NRP): an essential protein in plant development and stress responses*, como uma revisão atualizada de possíveis funções de NRPs. O segundo objetivo, caracterizar novos membros a montante de NRP que se conectem espacialmente com BiP, assim como também uma expansão do capítulo I, foi abordado no capítulo II intitulado *A subunidade  $\beta$  da proteína G atua como transdutor de sinal à montante na via de morte celular induzida por NRPs*.

## REFERÊNCIAS

- Alves, MS, Reis, PAB, Dadalto, SP, Faria JAQA, Fontes, EPB, Fietto LG. 2011a.** A Novel Transcription Factor, Early Responsive To Dehydration 15, Connects Er Stress With An Osmotic Stress-Induced Cell Death Signal. *The Journal of Biological Chemistry* 286:20020-20030.
- Alves, MS, Fontes, EPB, Fietto LG. 2011b.** EARLY RESPONSIVE to DEHYDRATION 15, a new transcription factor that integrates stress signaling pathways. *Plant Signaling & Behavior*, 6: 1-4.
- Alvim FC, Carolino SMB, Cascardo JCM, Nunes CC, Martinez CA, Otoni WC, Fontes EPB. 2001.** Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiology*, 126:1042-1054.
- Baxter A, Mittler R, Suzuki N. 2014.** ROS as key players in plant stress signaling. *Journal of Experimental Botany* 65(5):1229–1240.
- Camargos LF, Fraga OT, Oliveira CC, Silva JCF, Fontes EPB, Reis PAB. 2018.** Development and cell death domain-containing asparagine-rich protein (DCD/NRP): an essential protein in plant development and stress responses. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 31: 59-70.
- Carvalho HH, Silva PA, Mendes GC, Brustolini, Maiana R. Pimenta MR, Gouveia BC, Ramos HJO, Soares-Ramos JRL, Fontes EPB. 2014a.** The endoplasmic reticulum binding protein BiP displays dual function in modulating cell death events. *Plant Physiology* 164:654-670.
- Carvalho HH, Brustolini OJB, Pimenta MR, Mendes GC, Gouveia BC, Silva JCF, Mota CS, Soares-Ramos JRL, Fontes EPB. 2014b.** The molecular chaperone binding protein BiP prevents leaf dehydration-induced cellular homeostasis disruption. *PLoS One* 9: e86661.
- Costa MDL, Reis PAB, Valente MAS, Irsigler AST, Carvalho CM, Loureiro ME, Aragão FJL, Boston RS, Fietto LG, Fontes EPB. 2008.** A new branch of endoplasmic reticulum stress signaling and the osmotic signal converge on plantspecific asparagine-rich proteins to promote cell death. *Journal of Biological Chemistry* 283(29):20209–20219.
- Danquah A, de Zelicourt A, Colcombet J, Hirt H. 2014.** The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology Advances* 32:40–52.
- Irsigler AST, Costa MDL, Zhang P, Reis PAB, Dewey RE, Boston RS, Fontes EPB. 2007.** Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways. *BMC Genomics* 8(431).

**Mendes GC, Reis PAB, Calil IP, Carvalho HH, Aragão FJL, Fontes EPB. 2013.** GmNAC30 and GmNAC81 integrate the endoplasmic reticulum stress–and osmotic stress–induced cell death responses through a vacuolar processing enzyme.

*Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(48):19627–19632.

**Muñoz-Espinoza VA, López-Climent MF, Casaretto JA, Gómez-Cadenas A. 2015.** Water stress responses of tomato mutants impaired in hormone biosynthesis reveal abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid interactions. *Frontiers in Plant Science* 6:1–14.

**Pandey S. 2019.** Heterotrimeric G-Protein Signaling in Plants: Conserved and Novel Mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 70:213–238.

**Pimenta MR, Silva PA, Mendes GC, Alves JR, Caetano HDN, Machado JPB, Brustolini OJB, Carpinetti PA, Melo BP, Silva JCF, Rosado GL, Ferreira MFS, Dal-Bianco M, Picoli EAT, Aragão FJL, Ramos HJO, Fontes EPB. 2016.** The Stress-Induced Soybean NAC Transcription Factor GmNAC81 Plays a Positive Role in Developmentally Programmed Leaf Senescence. *Plant & Cell Physiology* 57(5): 1098-1114.

**Reis PAB, Rosado GL, Silva LAC, Oliveira LC, Oliveira LB, Costa MDL, Alvim FC, Fontes EPB. 2011.** The Binding Protein BiP Attenuates Stress-Induced Cell Death in Soybean via Modulation of the N-Rich Protein-Mediated Signaling Pathway. *Plant Physiology* 157(4): 1853–1865.

**Reis PAB, Fontes EPB. 2012.** N-rich protein (NRP)-mediated cell death signaling: a new branch of the ER stress response with implications for plant biotechnology. *Plant Signaling & Behavior* 7:628–632.

**Reis PAB, Carpinetti PA, Freitas PPJ, Santos EGD, Camargos LF, Oliveira IHT, Silva JCF, Carvalho HH, Dal-Bianco M, Soares-Ramos JRL, Fontes EPB. 2016.** Functional and regulatory conservation of the soybean ER stress-induced DCD/NRP-mediated cell death signaling in plants. *BMC Plant Biology* 16:156.

**Stone SL. 2018.** Role of the Ubiquitin Proteasome System in Plant Response to Abiotic Stress. *International Review of Cell and Molecular Biology* 343:65-110.

**Valente MAS, Faria JAQA, Soares-Ramos JRL, Reis PAB, Pinheiro GL, Piovesan ND, Morais AT, Menezes CC, Cano MAO, Fietto LG, Loureiro ME, Aragão FJL, Fontes EPB. 2009.** 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.

**Vinocur B, Altman A. 2005.** Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 16:123–132.

**Zandalinas SI, Mittler R, Balfagón D, Arbona V, Gómez-Cadenas A. 2018.** Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum* 162:2–12.

## **CAPÍTULO I**


### **DEVELOPMENT AND CELL DEATH DOMAIN-CONTAINING ASPARAGINE- RICH PROTEIN (DCD/NRP): AN ESSENTIAL PROTEIN IN PLANT DEVELOPMENT AND STRESS RESPONSES**

Artigo Publicado

Luiz Fernando de Camargos, Otto Teixeira Fraga, Célio Cabral Oliveira, Jose Cleydson Ferreira da Silva, Elizabeth P. B. Fontes and Pedro Augusto Braga dos Reis (2018). Development and cell death domain-containing asparagine-rich protein (DCD/NRP): an essential protein in plant development and stress responses. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*. 31:59. <https://doi.org/10.1007/s40626-018-0128-z>

Pages 8 to 19

# Development and cell death domain-containing asparagine-rich protein (DCD/NRP): an essential protein in plant development and stress responses

Luiz Fernando de Camargos · Otto Teixeira Fraga · Celio Cabral Oliveira ·  
Jose Cleydson Ferreira da Silva · Elizabeth Pacheco Batista Fontes ·  
Pedro Augusto Braga Reis 

Received: 20 October 2018 / Accepted: 14 November 2018 / Published online: 1 December 2018  
© Brazilian Society of Plant Physiology 2018

**Abstract** Plants have evolved intriguing mechanisms to cope with environmental changes and developmental signals. These mechanisms are responsible for modulating the global gene expression in the cell and promoting a precise adjustment. The signaling pathways do not operate separately but display a complex network implicating the whole cell. The development and cell death (DCD) domain-containing asparagine-rich protein (NRP) plays a role in different stresses and developmental conditions; thereby, is considered an essential gene for plant adaptation and growth. The molecular functions of DCD/NRPs are not well characterized; however, they have been shown to be differentially expressed upon abiotic, biotic and developmental conditions. The evolution of omics approaches has generated data, which can be used to understand the function of NRPs and how they operate in different pathways. Using microarray and co-expression data, we identified that the expression of DCD/NRPs is strongly related to ER stress, ABA

signaling, and the heterotrimeric G protein signaling. Interestingly, the involved pathways are also associated with plant development. Thus, NRPs may be a key factor in stress and developmental signaling.

**Keywords** NRPs · UPR · G signaling · ABA · Cell death response · Osmotic stress

## 1 Introduction

The plant development and adaptation to environmental conditions are strictly controlled by a balance in the gene expression variation. Sophisticated signaling networks are regulated to maintain this balance. Signaling pathways are part of the cell communication mechanisms in response to any signal or change in the homeostasis. Although the signal may be originated or perceived by a specific part of the cell, the response and modulation of signaling pathways involve the adjustment of the whole cell, and the crosstalk and signaling among different organelles are essential to a better response to the cell change. Signaling pathways are crucial to understanding how plants perceive any environmental change and how they cope with the changing environment for adjustment. These processes fascinate scientists around the world and have instigated a continuous interest for a deeper understanding of the molecular basis of plant signaling.

---

L. F. de Camargos · O. T. Fraga · C. C. Oliveira ·  
J. C. F. da Silva · E. P. B. Fontes · P. A. B. Reis (✉)  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular,  
Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil  
e-mail: pedrorreis@ufv.br

L. F. de Camargos · O. T. Fraga · C. C. Oliveira ·  
J. C. F. da Silva · E. P. B. Fontes · P. A. B. Reis  
National Institute of Science and Technology in Plant-Pest  
Interactions, Bioagro, Universidade Federal de Viçosa,  
Viçosa, MG, Brazil

Omics approaches have provided valuable insights into plant biological processes and have generated great perspectives to plant biology. Genomic, transcriptomic, proteomic, metabolomic and other omics have been used to identify and characterize the molecular function of several genes in an intricate signaling network.

The development and cell death domain-containing asparagine-rich protein (DCD/NRP) gene was first identified by a differential display of induced mRNAs in response to an incompatible interaction in soybean (Ludwig and Tenhaken 2001). The protein sequence consists of a high content of asparagine residue at N-terminus and a conserved DCD (development and cell death) domain at C-terminus. The asparagine-rich domain has not been characterized, but it contains sites for post-translational modifications such as phosphorylation, glycosylation, and myristoylation. The DCD domain is a plant-specific domain composed of approximately 130 amino acid residues, and several of those are conserved in all members (Tenhaken et al. 2005). The DCD/NRP function in the plant cell is not completely understood; however, omics approaches have provided some clues about the role of this proteins in stress and developmental responses. In this review, we discuss the role of DCD/NRP in different signaling pathways, including ABA responses, endoplasmic reticulum (ER) and osmotic stress-originated cell death responses, and G signaling. We also provide a brief discussion of the major signaling pathways derived from ER stress, including the unfolded protein response (UPR) and general plant-specific cell death signaling from ER.

## 2 ER stress and unfolded protein response (UPR)

As a key organelle involved in several cell responses, the endoplasmic reticulum (ER) mediates cellular functions related to synthesis and post-translational modification of secretory proteins, controls the Ca<sup>2+</sup> concentration in the cell and acts as a modulator of signaling pathways (Stachelin 1997). ER is part of the endomembrane system, a well-conserved arrangement of membranes that works in eukaryotic organisms. The ER also has an important quality control system, which is responsible for identifying misfolded proteins to eliminate them from the secretory pathway, preventing their accumulation in the ER (Liu and

Howell 2010). Incorrectly or incompletely folded proteins are usually retained within the ER; however, irreversibly misfolded proteins are targeted to degradation (Vitale and Denecke 1999). When ER cannot restore the homeostasis and hence accumulates unfolded proteins, a specific signaling pathway, designated unfolded protein response (UPR), is triggered to cope with this adverse condition.

UPR is a regulatory network that modulates the ER-related gene expression. Upon UPR activation ER protein processing-related genes are coordinately up-regulated to increase the ER protein folding and processing capacity, and to improve the ER-associated protein degradation system; thereby, decreasing the accumulation of unfolded proteins (Hollien 2013). In plants, there are at least two arms in this pathway. One of them activates the inositol-requiring transmembrane kinase and endonuclease 1 IRE1 [IRE1a (AT2G17520) and IRE1b (AT5G24360), in Arabidopsis], another arm is transduced by membrane-tethered bZIP transcription factors [bZIP17 (AT2G40950) and bZIP28 (AT3G10800), in Arabidopsis] (Ruberti et al. 2015; Bao and Howell 2017). IRE1 is a type I membrane protein, which consists of a UPR sensor domain at the N-terminus facing the ER lumen and, facing the cytosol, are the kinase and ribonuclease domains at C-terminus (Koizumi et al. 2001). Upon unfolded protein accumulation, the endoribonuclease domain of IRE1 is activated and promotes unconventional cytosolic splicing at bZIP60 mRNA (Deng et al. 2011). The unspliced form of bZIP60 (bZIP60u) mRNA is translated into an ER membrane-associated protein, whereas the splicing generates a soluble form, which lacks the transmembrane domain (bZIP60s) (Deng et al. 2011). Once translated, the spliced form is translocated to the nucleus to activate the expression of UPR-related genes (Deng et al. 2011; Nagashima et al. 2011). The second arm of plant UPR is activated by the post-translational modification of bZIP17 and bZIP28. Upon stress conditions, both proteins are relocated from the ER to the Golgi complex, where they are cleaved by the Golgi resident proteases S1P and S2P (Site-1 Protease and Site-2 Protease). These proteases remove the transmembrane domains of bZIP17/28, releasing the cytosolic exposed regions. Thus, the cleaved proteins can be translocated into the nucleus to promote the regulation of UPR-related genes (Liu et al. 2007; Gao et al. 2008; Sun et al. 2015).

In addition to the bZIP transcriptional factors, there are other plant-specific transcription factors directly involved in ER stress responses, such as ANAC036, ANAC062, ANAC089 and ANAC103 (Sun et al. 2013; Yang et al. 2014a, b; Reis et al. 2016). The plasma membrane-bound ANAC062 is processed and nuclear localized upon ER stress conditions by an unknown mechanism. In the nucleus, the processed ANAC062 regulates UPR responsive genes. Accordingly, in ANAC062 knock-down plants, the expression of downstream UPR responsive genes is impaired (Yang et al. 2014b). Likewise, ANAC103, which is an ER stress-induced nuclear soluble protein, regulates the expression of UPR-related genes (Sun et al. 2013). In response to severe ER stress, programmed cell death (PCD) responses are activated with the participation of the ER stress-induced ANAC036 and ANAC089 transcription factors (Reis et al. 2016; Yang et al. 2014a). An ortholog of ANAC036, GmNAC081, has been first described in soybean and demonstrated to transactivate the expression of hydrolytic enzymes in addition to the vacuolar processing enzyme (VPE), an executioner of PCD (Mendes et al. 2013). ANAC089, an ER membrane-bound, acts as a regulator of PCD-related genes. Upon ER stress, ANAC089 is processed and relocated to the nucleus to induce PCD (Yang et al. 2014a).

Although under ER stress, some ER transducers are well characterized, they also play different roles in other plant signaling pathways, which are not so well understood. They are involved in developmental, hormonal and immune responses (Bao and Howell 2017). Vegetative growth and development require the IRE1 function because, under normal conditions, the double mutant *ire1a ire1b* displays growth defects. The complementation of the double mutant with *IRE1b* has demonstrated that both protein kinase domain and RNase domain are required to rescue the wild-type phenotype under stress conditions (Deng et al. 2013). The ribonuclease activity of IRE1 is implicated in root growth, while the kinase domain is not essential.

On the other hand, an impairment in vegetative growth is not dependent on bZIP60 mRNA, the primary target for the IRE1 splicing activity. The *bizp60* mutant does not show a clear phenotype for the stunted root growth phenotype. Furthermore, the IRE1 function is required for reproductive development.

The double mutant *ire1a ire1b* is male sterile at moderately elevated temperatures (Deng et al. 2016).

The other arm of UPR that is related to bZIP17/28 is also essential for developmental responses. The proteolytically cleaved forms of bZIP17/28 are required for normal root growth. Mutants for S2P display a short root phenotype, which can be reversed by complementation with processed form of either bZIP17 or bZIP28 (Iwata et al. 2017; Kim et al. 2018).

There are other ER regulator genes, which are involved in cytoprotective roles of UPR. The ER-resident molecular chaperone BiP displays cytoprotective properties associated with the perception of ER homeostasis disruption, which affects protein folding and assembly (Hendershot 2004; Malhotra and Kaufman 2007; Srivastava et al. 2013). In addition to functioning as a molecular chaperone, BiP plays a regulatory role in different stress responses in plant cells. For example, the overexpression of BiP has been shown to increase plant tolerance to water deficit by a mechanism associated with modulation of cell death responses (Cascardo et al. 2000; Alvim et al. 2001; Valente et al. 2009; Reis et al. 2016). In fact, the BiP-mediated drought tolerance has been linked to its capacity to modulate the development and cell death domain-containing asparagine-rich protein (DCD/NRP)-mediated cell death response. This cell death pathway is activated by multiple stress signals, including drought, and can be modulated transcriptionally and post-translationally by BiP overexpression (Valente et al. 2009; Reis et al. 2011, 2016; Carvalho et al. 2014a, b).

### 3 NRP proteins and programmed cell death pathway

Genome-wide approaches and expression profiling revealed the existence of a modest overlap of the ER and osmotic stress-induced transcriptomes in soybean seedlings treated with PEG (an inducer of osmotic stress) or tunicamycin and AZC (potent inducers of ER stress). A subset of differentially expressed genes exhibited a strong and synergistic induction under a combined treatment of both ER- and osmotic-stresses. Those are involved in diverse roles, such as plant-specific development and cell death (DCD) domain-containing proteins (GmNRP-A and GmNRP-B) (Irisigler et al. 2007) and NAC domain-containing

proteins (GmNAC081) (Faria et al. 2011), which were later implicated as components of a stress-induced cell death signaling, designated DCD/NRP-mediated cell death signaling pathway (Costa et al. 2008; Faria et al. 2011, Reis et al. 2011).

The DCD/NRP-mediated cell death signaling pathway integrates signals from prolonged ER stress and osmotic stress in a synergistic and convergent programmed cell death response (Irsigler et al. 2007; Costa et al. 2008). The current model of this integrative pathway establishes that, under stress conditions, the GmERD15 protein, a transcriptional factor induced by osmotic and ER stresses, induces the expression of the NRP gene. NRP protein is localized in the cytoplasm and activates a signaling cascade, culminating with the induction of GmNAC081 expression, a programmed cell death effector (Alves et al. 2011; Faria et al. 2011; Reis et al. 2011; Reis and Fontes 2012). In the nucleus of stressed plant cells, GmNAC081 interacts with GmNAC030 to bind to promoters and activate expression of genes that encode hydrolytic enzymes, especially VPE (Vacuolar Processing Enzyme) (Mendes et al. 2013). VPE has a caspase-1 activity and performs a plant-specific cell death program through the collapse of the vacuole (Hara-Nishimura et al. 2005). This signaling pathway integrates the osmotic and endoplasmic reticulum stress signal representing a regulon with a predictable potential to improve tolerance to water deficit (Valente et al. 2009; Reis and Fontes 2012; Reis et al. 2016). Furthermore, the expression of the molecular chaperone BiP in genetically modified (GM) lines modulates the expression and activity of components of this signaling pathway and promotes a better adaptation of transgenic lines to drought conditions (Valente et al. 2009; Reis et al. 2011). Although BiP-mediated drought tolerance event has been associated with its capacity to modulate the NRP-mediated cell death pathway, the mechanism by which BiP, a molecular chaperone resident in the endoplasmic reticulum, controls the expression and activity of pathway components is entirely unknown.

The DCD/NRP-mediated cell death response is conserved in plants (Reis et al. 2016), and the modulation of this pathway could be a target for future biotechnological researches seeking to improve the adaptation of plants in response to climate changes. Arabidopsis orthologous proteins belonging to the NRP pathway [AtNRP1 (At5G42050), AtNRP2

(At3G27090), ANAC036 (At2G17040) and  $\gamma$ VPE (At4G32940)], were able to induce cell death when expressed transiently in *Nicotiana benthamiana* leaves. Besides, Arabidopsis null mutants for AtNRP1 and AtNRP2 are more tolerant to ER stress. Like in soybean, the modulation of the NRP pathway in Arabidopsis is also mediated by the molecular chaperone BiP, which negatively regulates the expression of the cell death-inducing genes.

The DCD/NRP-mediated cell death response is also related to the developmental programmed cell death process. The transcriptome analysis of BiP overexpression in soybean demonstrated the down-regulation of developmental and cell death response-related genes (Carvalho et al. 2014a, b). Likewise, BiP-overexpressing soybean lines display a delay in the developmentally programmed leaf senescence, which was coordinated with a decreased expression of components of the NRP-mediated cell death signaling and reduced activity of VPE. The NRP-mediated cell death signaling positively regulates not only stress-induced but also natural leaf senescence (Carvalho et al. 2014a, b; Pimenta et al. 2016). Accordingly, the components of the DCD/NRP-mediated pathway are induced during leaf senescence, and overexpression of the downstream component GmNAC081 accelerates leaf senescence.

#### 4 AtNRP1 modulates ABA response

The abscisic acid (ABA) is a phytohormone of the isoprenoid group, which is synthesized in the plastidial 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) pathway. ABA plays crucial roles in stress response and plant development. Also known as a stress hormone, ABA functions as a signaling messenger, which accumulates under abiotic stress conditions and promotes various signaling pathways (Wang et al. 2016).

Three classes of proteins are involved in the core ABA signaling pathway: the ABA receptors pyrabactin resistance/pyrabactin resistance-like/regulatory component of ABA receptor (PYR/PYL/RCARs), the negative regulators protein phosphatase 2Cs (PP2Cs) and the positive regulators SNF1-related protein kinase 2 (SnRKs). The ABA receptors are inactivated in the absence of ABA and PP2C inhibits SnRKs by dephosphorylation, which suspends the kinase activation cascade. In the presence of ABA, the

PYR/PYL/RCARs receptor binds to ABA and induces a conformational change that stabilizes the interaction between the receptor and PP2C, forming an inactive receptor/ligand/phosphatase complex. The ABA-induced inactivation of PP2C leads to activation of SnRKs by autophosphorylation, which then phosphorylates the downstream components, such as transcription factors like ABA-insensitive 5 (ABI5) (Kundu and Gantait 2017).

Basic leucine zipper (bZip) transcription factor ABI5 is a key regulator of ABA signaling pathway, and it was initially identified in a screen for mutants exhibiting ABA-resistant germination (Finkelstein and Lynch 2000). ABI5 modulates the seed dormancy and germination processes, some plant vegetative growth and development. The stability and activity of ABI5 can be regulated by post-translational modifications (PTM). SnRKs are responsible for ABA-induced phosphorylation and stabilization of ABI5 (Nakashima et al. 2009). Otherwise, two homologs of Ser/Thr protein phosphatase 6 (PP6), FyPP1 and FyPP3, can dephosphorylate ABI5. Furthermore, FyPP proteins act antagonistically with SnRKs to regulate ABI5 phosphorylation and stability (Dai et al. 2013).

The intracellular trafficking has been demonstrated to play crucial roles in ABA signaling regulation (Yu and Xie 2017). E3 ligase KEG (Keep On Going) interacts and ubiquitinates ABI5 in the absence of ABA, and it also mediates ABI5 degradation by the proteasome at the TGN/EE (trans-Golgi network/early endosome). In response to ABA, KEG is self-ubiquitinated, and ABI5 accumulates in the nucleus due to increased transcription and impairment of proteasome-mediated degradation by KEG (Liu and Stone 2013). Moreover, the PYR1/PYL4 ABA receptors are also reported to be regulated by intracellular trafficking. First, the PYL4 ABA receptor has been demonstrated to be ubiquitinated by RSL1, which triggers endocytosis of this receptor to endosomal compartments (Bueso et al. 2014). Furthermore, FYVE1 was identified as a component of the endosomal sorting complex required for the transport (ESCRT) machinery, which recognizes ubiquitylated PYL4 and mediates the relocation from the plasma membrane to the endosomal/vacuolar degradation pathway (Belda-Palazon et al. 2016).

Recently, NRP-mediated intracellular trafficking has been described as a new ABA signaling regulatory

module (Zhu et al. 2018). AtNRP1 interacts with FyPP3, the PP6 catalytic subunit, in a phosphorylation status-dependent manner, which is controlled by the phosphatase activity of FyPP3. ABA induces the expression of both genes and enhances the co-localization of NRP and FyPP3 to SYP41/61-positive endosomes, leading to vacuolar-dependent degradation. The degradation of FyPP3 stabilizes ABI5 that modulates transcription of ABA-stimulated genes (Zhu et al. 2018). The fine-tune capability for adjusting the levels of regulatory proteins and their subcellular localization by intracellular trafficking emerge as an important signaling regulatory module. The abscisic acid plays a central role in hormone crosstalk events, and NRP proteins are associated with ER stress, osmotic stress, and programmed cell death. Further investigation is necessary to elucidate whether NRP can redirect other proteins to intracellular trafficking connecting different pathways.

## 5 G proteins interactome, NRPs, and abiotic stress responses

Canonical heterotrimeric G proteins are composed of alpha, beta and gamma subunits. The alpha subunit binds to a GTP molecule, promoting the dissociation of the alpha/beta dimer to activate downstream pathways and it also has an intrinsic GTPase activity that acts as a negative regulator of these signaling cascades. In contrast to animals, plants only have a few well-characterized G protein subunits; Arabidopsis has only one alpha (AtGPA1), one beta (AtAGB1) and three gamma variants (AtAGG1, AtAGG2 and AtAGG3), which raises the question of how those proteins control different types of responses, including developmental processes, sugar sensing, biotic and abiotic stress responses, with only a few possible combinations of subunits. Regarding the exchange of hydrolyzed GDP to a new molecule of GTP, GPA1 has a self-activating mechanism, and it is capable of promoting the spontaneous exchange of nucleotides (Urano et al. 2013). With only two controversial G-protein coupled receptors (GPCRs) predicted, the regulation of G signaling is performed by the GTPase-accelerating protein AtRGS1, which interacts with the entire complex (Johnston et al. 2007). Several phosphorylation sites have been recently described on AtRGS1, raising the hypothesis that receptor-like

kinases (RLKs) and WITH-NO-LYSINE kinases (WNKs) are responsible for the initial signal transduction and post-translational modifications (PTMs) are the critical factors for the plasticity and signal variety of the G protein complex (Tunc-Ozdemir et al. 2016, 2017).

The involvement of heterotrimeric G proteins with development and stress responses is somewhat controversial. While *agb1-3* mutants display several growth defects and its seedlings are more sensitive to ABA treatment and induced ER stress, during the vegetative phase, the mutant plants are more resistant to drought and ER stress (Xu et al. 2015; Chen and Brandizzi 2012). *AtAGB1* is predominantly expressed on seedlings, and its expression is much higher compared to the other subunits (Cho et al. 2015). The mutant plants for the negative regulator *AtRGS1* also display consistent phenotypes. *AtRGS1*-overexpressing lines are hypersensitive to ABA and more tolerant to drought; however, the *rgs1* seedlings have higher survival rates under NaCl treatment comparing to wild-type lines (Chen et al. 2006; Colaneri et al. 2014).

Besides the classic alpha subunit, Arabidopsis has three extra-large G proteins (*AtXLG1-3*) with an unclear guanine nucleotide binding activity (Chakravorty et al. 2015). *XLG* proteins have been found to interact with beta/gamma dimers in the plasma membrane, but they are also described as nuclear and cytoplasmic proteins (Maruta et al. 2015; Ding et al. 2008). Inactivation of *XLG* genes (*xlg123*) leads to increased leaf width while *gpa1* mutants display the opposite phenotype, leading to the hypothesis that  $\alpha/\beta\gamma$  trimmers act antagonistically to *XLG*/ $\beta\gamma$  to determine leaf development. Those extra-large proteins are also related to abiotic stress responses, *xlg123* mutant seedlings are more sensitive to salt, cadmium and induced ER stress compared to wild-type seedlings and *gpa1* mutants (Urano et al. 2016).

Interestingly, a recent interactome study has implicated *AtXLG2* and *AtXLG3* as possible interacting partners of *AtNRP1* and *AtNRP2*. The interaction between *AtXLG3* and *AtNRP1* was displayed in the nucleus by BiFC assay. Another interaction partner candidate for *AtXLG3* is *AtERD15* (Early Response to Drought), which is involved in ABA responses, stomatal opening and its homolog from soybean (*GmERD15*) has been shown to bind to the promoter of *NRP/DCD* genes (*GmNRP-B*) to control their

expression and activate the transduction of the *NRP*-mediated stress-induced cell death signaling. However, the inactivation of several genes that encode the subunits of the G protein complex did not affect the expression pattern of *AtNRP1* during development under normal and saline stress conditions (Liang et al. 2017; Aalto et al. 2012; Alves et al. 2011). These data indicate a strong relationship between the G protein complex and *NRP/DCD* proteins regarding development and stress responses. Nevertheless, the non-deciphered molecular mechanism of the involved pathways raises the necessity of further transcriptomic and proteomic studies during different stress conditions and various growth stages.

## 6 NRP gene expression correlation

Transcriptomic analyses are powerful tools to identify the role of a specific gene in response to environmental, development and stress changes. Using the microarray transcriptomic data, we can seek different patterns in the *NRP* gene expression upon various conditions. Besides cell death response originated from ER- or osmotic-stress, the *NRP* gene plays a role in different stress responses (Hoepffinger et al. 2011; Reis et al. 2016). The *AtNRP-1* gene is induced by distinct stress conditions. Upon saline and ozone stress and mechanical perturbation, *AtNRP-1* gene expression is rapidly induced. Additionally, *nrp1* null mutants had higher inhibition of root growth under saline stress compared to wild-type plants (Hoepffinger et al. 2011).

Recently, a study made by Song et al. (2016) showed the transcriptional network of ABA signaling in a dynamic form. The dynamic TF binding site for each transcription factor tested exhibited a higher correlation with differential gene expression than a static TF binding site. Based on their database ([www.ABAtf.net](http://www.ABAtf.net)), we identified the *AtNRP1* gene (*At5g42050*) as differentially expressed and up-regulated by ABA. Moreover, after ABA treatment, the *AtNRP1* promoter region changes the binding sites for some of the ABA-related TF binding sites tested (Table 1). This transcriptional regulation corroborates with *AtNRP1* function in the ABA signaling, as it modulates the function of *FyPP3* and hence promotes the *ABI5*-mediated gene expression regulation (Zhu et al. 2018).

**Table 1** Prediction of the positions of transcription factors binding sites on the AtNRP1 promoter

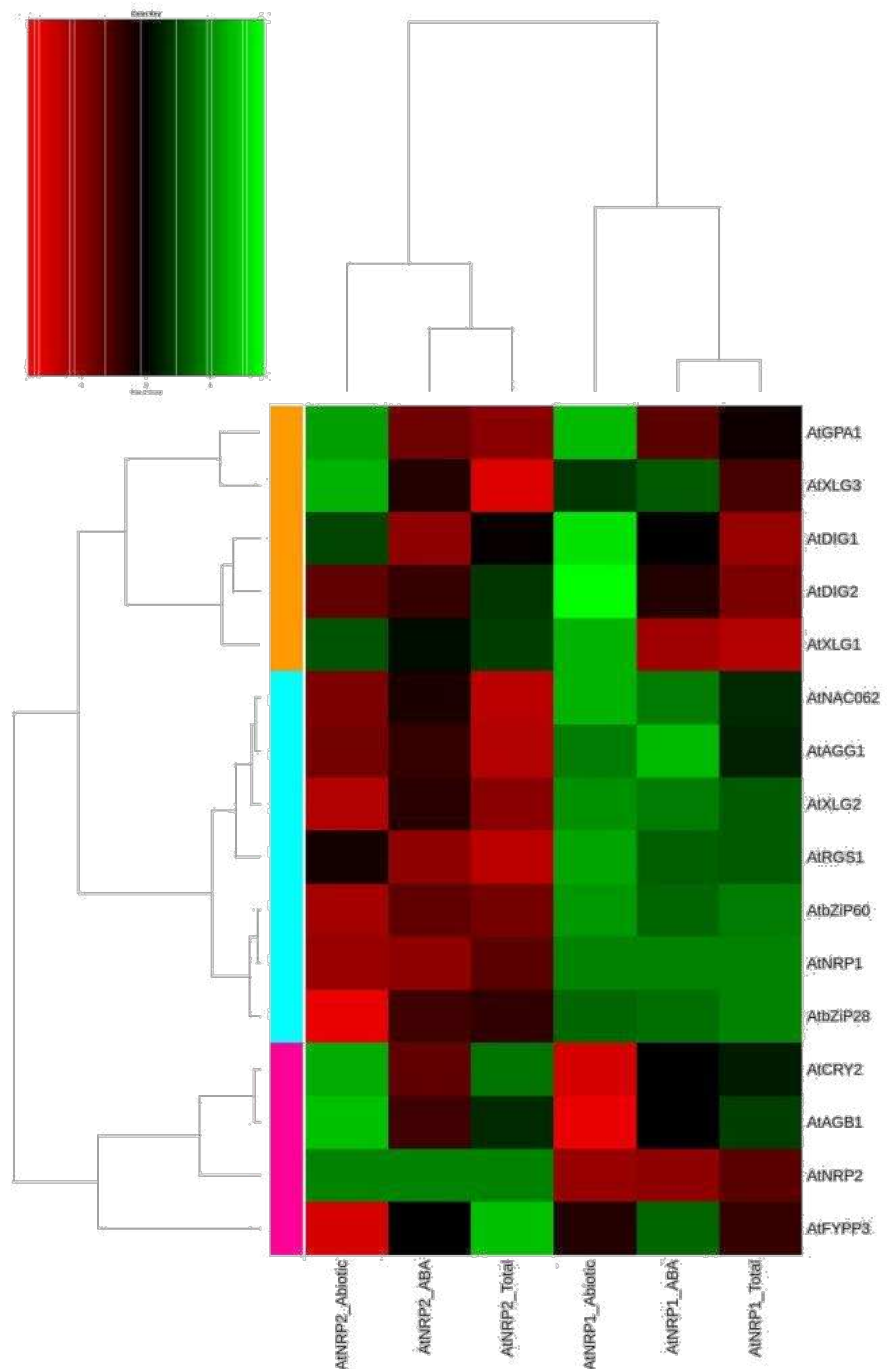
TF	Binding site position (Chr5)	Binding site position (Chr5)	TF	Binding site position (Chr5)	Binding site position (Chr5)
ABF1 mock	16,815,961	16815962	GBF3 mock	16,815,128	16,815,129
ABF1 ABA	16,815,141	16,815,142		16,815,979	16,815,980
ABF3 mock	16,815,009	16,815,010		16,817,679	16,817,680
ABF3 ABA	16,814,965	16,814,966	GBF3 ABA	16,815,121	16,815,122
	16,817,682	16,817,683		16,817,722	16,817,723
At5G04760 mock	16,814,981	16,814,982	NF-YB2 mock	16,815,960	16,815,961
At5G04760 ABA	16,814,965	16,814,966		16,817,714	16,817,715
	16,817,402	16,817,403	NF-YB2 ABA	16,814,966	16,814,967
	16,817,705	16,817,706		16,817,674	16,817,675
ANAC032 mock	16,815,360	16,815,361	NF-YC2 mock	16,815,980	16,815,981
ANAC032 ABA	16,817,675	16,817,676	NF-YC2 ABA	16,815,460	16,815,461
ANAC102 mock	16,815,363	16,815,364		16,817,738	16,817,739
ANAC102 ABA	16,815,366	16,815,367	RD26 mock	16,815,358	16,815,359
	16,817,685	16,817,686	RD26 ABA	16,815,366	16,815,367
GBF2 mock	16,815,128	16,815,129		16,817,400	16,817,401
	16,815,979	16,815,980	ZAT6 mock	16,814,947	16,814,948
	16,817,679	16,817,680	ZAT6 ABA	16,814,953	16,814,954
GBF2 ABA	16,815,122	16,815,123		16,817,466	16,817,467
	16,815,980	16,815,981	ABF4 mock	16,815,159	16,815,160
	16,817,700	16,817,701		16,815,984	16,815,985
HB7 mock	16,815,369	16,815,370	ABF4 ABA	16,815,120	16,815,121
HB7 ABA	16,815,364	16,815,365			
	16,817,526	16,817,527			

The dynamic binding site prediction of some transcription factors upon ABA treatment

Although transcriptomic analyses can indicate how one specific gene responds to different conditions, they cannot predict regulatory patterns in a complex signaling network. Thus, using co-expression analysis, we can describe genes in the same or related signaling pathway. As NRPs are induced by different conditions, we sought in a microarray database [using the online software CressExpress (<http://cressexpress.org/>)] how those genes correlate with identified partners (Zhu et al. 2018; Liang et al. 2017; Zhou et al. 2017) and ABA-, UPR- and G signaling-related transducers (Fig. 1). The co-expression correlation was based in

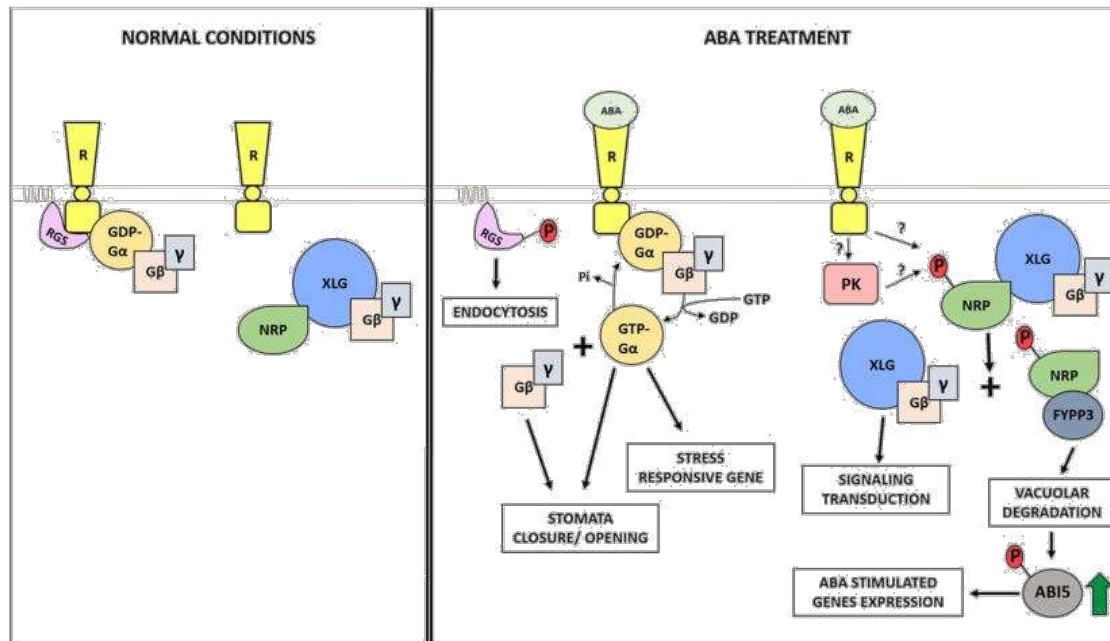
more than 1000 arrays and showed different responses for the NRP genes. AtNRP2 exhibits a positive correlation with G signaling proteins upon abiotic stress conditions while AtNRP1 has a higher correlation upon abiotic and ABA conditions. Besides the G signaling proteins, AtNRP1 also correlates with UPR transducers at all tested conditions and ABA-related genes in abiotic and ABA conditions. NRP function was first characterized in the connective cell death response pathway (Costa et al. 2008) and more recently involved in heterotrimeric G protein, ABA and cryptochrome signaling (Zhu et al. 2018; Liang

**Fig. 1** Expression correlation among NRPs, interacting partners and signaling related genes. Correlation of gene expression indicates a possible co-functionality of genes in the same pathway. The colors indicate the correlation coefficient. The correlation coefficient was calculated using the approximately 2000 arrays from Cressexpress database. The coefficient ranges from the lower correlation (red) to the higher correlation (green). (Color figure online)



et al. 2017; Zhou et al. 2017). Although the implication of NRP in these pathways was based on protein–protein interactions and protein modulation, the microarray and correlation data provide strong evidence for the role of NRP genes in the connection and

modulation of several signaling pathways. Relying on the NRP interactions patterns, we propose a simple model for the connections among ABA signaling, NRP, and G proteins (Fig. 2). Nevertheless, more experiments should be performed to clarify how the



**Fig. 2** Proposed model of NRP signaling pathway at normal condition and upon ABA treatment. AtRGS1 binds to a trimeric complex ( $G\alpha\beta\gamma$ ) in an inactive state by stimulation of the GTP hydrolysis of  $G\alpha$  protein. Another trimeric complex can also exist under normal conditions and is composed by XLG instead of the  $G\alpha$  subunit. In this case, AtRGS1 does not bind to a non-canonical trimeric complex. We are assuming here that NRP is bound to trimeric complex in an inactive state through interaction with XLG. Upon ABA treatment, AtRGS1 is phosphorylated and undergoes endocytosis process. Therefore,

the releasing of the complex from AtRGS1 promotes the activation of signaling cascade by  $G\alpha$  and  $G\beta\gamma$  pathways. The ABA treatment stimulates the NRP phosphorylation at the noncanonical heterotrimeric complex, either by a receptor kinase or a protein kinase. Once phosphorylated, NRP dissociates from the noncanonical trimeric complex and binds to FyPP3. NRP-FyPP3 are addressed to vacuolar degradation. FyPP3 may modulate the ABI5 phosphorylation status, which in turn induces the expression of ABA-regulated genes

NRP gene expression is regulated and how the NRP post-translational modifications can integrate several signaling pathways. Thus, using omics approaches, we can proceed further with the NRP molecular characterization in different signaling pathways.

## 7 Conclusions

Omics approaches have improved the understanding in signaling pathways, and have provided several clues about the molecular function and the relationship among genes in the cell response. Through transcriptomic analyses, we can identify genes related to some specific pathways or genes that have their expression modulated by the cell adjustment. Development and cell death domain-containing asparagine-rich protein (DCD/NRP) is an important protein, which is differentially regulated by stress conditions and

developmental events in the plant cell. Although the molecular function is not clear, NRP integrates the osmotic and ER stresses response in a cell death pathway and modulates the ABA signaling by the interaction with FyPP3. The expression of the *DCD/NRP* gene has displayed an interesting correlation with several signal transducers related to UPR, G signaling, light, and ABA signaling, which implicates NRP as a key protein in the signaling network. Although the gene expression data can provide essential information about *DCD/NRP*, they cannot directly assign a molecular function for this gene. So, the integration of transcriptomic with omics approaches will contribute to the understanding of the role of NRPs in plant development and stress responses.

**Acknowledgements** This work was supported by FUNARBE and the Brazilian Government Agencies CNPq, FAPEMIG, and FINEP. L.F.C. is supported by CNPq, C.C.O. is supported by

CAPES; O.T.F.N is supported by FAPEMIG graduate fellowships.

## References

- Aalto MK, Helenius E, Kariola T, Pennanen V, Heino P, Hörak H et al (2012) ERD15—an attenuator of plant ABA responses and stomatal aperture. *Plant Sci* 182:19–28. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.08.009>
- Alves MS, Reis PA, Dadalto SP, Faria JA, Fontes EP, Fietto LG (2011) A novel transcription factor, ERD15 (early responsive to dehydration 15), connects endoplasmic reticulum stress with an osmotic stress-induced cell death signal. *J Biol Chem* 286:20020–20030. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.233494>
- Alvim FC, Carolino SMB, Cascardo JCM, Nunes CC, Martinez CA, Otoni WC, Fontes EPB (2001) Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiol* 126:1042–1054. <https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1042>
- Bao Y, Howell SH (2017) The unfolded protein response supports plant development and defense as well as responses to abiotic stress. *Front Plant Sci*. 8:344. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00344>
- Belda-Palazon B, Rodríguez L, Fernández MA, Castillo MC, Anderson EA, Gao C, Gonzalez-Guzman M, Peirats-Llobet M, Zhao Q, De Winne N et al (2016) FYVE1/FREE1 interacts with the PYL4 ABA receptor and mediates its delivery to the vacuolar degradation pathway. *Plant Cell* 10:e1004243. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00178>
- Bueso E, Rodríguez L, Lorenzo-Orts L, Gonzalez-Guzman M, Sayas E, Muñoz-Bertomeu J, Rodríguez PL et al (2014) The single-subunit RING-type E3 ubiquitin ligase RSL1 targets PYL4 and PYR1 ABA receptors in plasma membrane to modulate abscisic acid signaling. *Plant J* 80:1057–1071. <https://doi.org/10.1111/tpj.12708>
- Carvalho HH, Brustolini OJB, Pimenta MR, Mendes GC, Gouveia BC, Silva PA, Silva JCF, Mota CS, Soares-Ramos JRL, Fontes EPB (2014a) The molecular chaperone binding protein BiP prevents leaf dehydration-induced cellular homeostasis disruption. *PLoS ONE* 9:e86661. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086661>
- Carvalho HH, Silva PA, Mendes GC, Brustolini OJB, Pimenta MR, Gouveia BC et al (2014b) The endoplasmic reticulum binding protein BiP displays dual function in modulating cell death events. *Plant Physiol* 164:654–670. <https://doi.org/10.1104/pp.113.231928>
- Cascardo JCM, Almeida RS, Buzeli RAA, Carolino SMB, Otoni WC, Fontes EPB (2000) The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses. *J Biol Chem* 275:14494–14500. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.19.14494>
- Chakravorty D, Gookin TE, Milner M, Yu Y, Assmann SM (2015) Extra-large G proteins (XLGs) expand the repertoire of subunits in *Arabidopsis* heterotrimeric G protein signaling. *Plant Physiol*. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00251>
- Chen Y, Brandizzi F (2012) AtIRE1A/AtIRE1B and AGB1 independently control two essential unfolded protein response pathways in *Arabidopsis*. *Plant J* 69:266–277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2011.04788.x>
- Chen Y, Ji F, Xie H, Liang J (2006) Overexpression of the regulator of G-protein signalling protein enhances ABA-mediated inhibition of root elongation and drought tolerance in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 57:2101–2110
- Cho Y, Yu CY, Iwasa T, Kanehara K (2015) Heterotrimeric G protein subunits differentially respond to endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 10:e1061162. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1061162>
- Colaneri AC, Tunc-Ozdemir M, Huang JP, Jones AM (2014) Growth attenuation under saline stress is mediated by the heterotrimeric G protein complex. *BMC Plant Biol* 14:129. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-129>
- Costa MDL, Reis PAB, Valente MAS, Irsigler AST, Carvalho CM, Loureiro ME et al (2008) A new branch of endoplasmic reticulum stress signaling and the osmotic signal converge on plant-specific asparagine-rich proteins to promote cell death. *J Biol Chem* 283:20209–20219. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802654200>
- Dai Q, Xue Q, McCray T, Margavage K, Chen F, Lee H, Nezames D, Guo Q, Terzaghi W, Wan JM et al (2013) The PP6 phosphatase regulates ABI5 phosphorylation and abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25:517–534
- Deng Y, Humbert S, Liu JX, Srivastava R, Rothstein SJ, Howell SH (2011) Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:7247–7252. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102117108>
- Deng Y, Srivastava R, Howell SH (2013) Protein kinase and ribonuclease domains of IRE1 confer stress tolerance, vegetative growth, and reproductive development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:19633–19638. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314749110>
- Deng Y, Srivastava R, Quilichini TD, Dong H, Bao Y, Horner HT, Howell SH (2016) IRE1, a component of the unfolded protein response signaling pathway, protects pollen development in *Arabidopsis* from heat stress. *Plant J* 88:193–204. <https://doi.org/10.1111/tpj.13239>
- Ding L, Pandey S, Assmann SM (2008) *Arabidopsis* extra-large G proteins (XLGs) regulate root morphogenesis. *Plant J* 53:248–263. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2007.03335.x>
- Faria JAQA, Reis PAB, Reis MTB, Rosado GL, Pinheiro GL, Mendes GC, Fontes EPB (2011) The NAC domain-containing protein, GmNAC6, is a downstream component of the ER stress and osmotic stress-induced NRP-mediated cell-death signaling pathway. *BMC Plant Biol* 11:129. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-129>
- Finkelstein R, Lynch J (2000) The *Arabidopsis* abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 12:599–609. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.4.599>
- Gao H, Brandizzi F, Benning C, Larkin RM (2008) A membrane-tethered transcription factor defines a branch of the heat stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl*

- Acad Sci USA. 105:16398–16403. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808463105>
- Hara-Nishimura I, Hatsugai N, Nakaune S, Kuroyanagi M, Nishimura M (2005) Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Curr Opin Plant Biol* 8:404–408. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.016>
- Hendershot LM (2004) The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med* 71:289–297
- Hoepflinger MC, Pieslinger AM, Tenhaken R (2011) Investigations on N-rich protein (NRP) of *Arabidopsis thaliana* under different stress conditions. *Plant Physiol Biochem* 49:293–302. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.01.005>
- Hollien J (2013) Evolution of the unfolded protein response. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1833:2458–2463. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.01.016>
- Irsigler AST, Costa MDB, Zhang P, Reis PAB, Dewey RE, Boston RS, Fontes EPB (2007) Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways. *BMC Genom* 8:431
- Iwata Y, Ashida M, Hasegawa C, Tabara K, Mishiba KI, Koizumi N (2017) Activation of the *Arabidopsis* membrane-bound transcription factor bZIP28 is mediated by site-2 protease, but not site-1 protease. *Plant J* 91:408–415. <https://doi.org/10.1111/tpj.13572>
- Johnston CA, Taylor JP, Gao Y, Kimple AJ, Grigston JC, Chen JG et al (2007) GTPase acceleration as the rate-limiting step in *Arabidopsis* G protein-coupled sugar signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:17317–17322. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704751104>
- Kim JS, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2018) ER-anchored transcription factors bZIP17 and bZIP28 regulate root elongation. *Plant Physiol* 1:01414. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01414>
- Koizumi N, Martínez IM, Kimata Y, Kohno K, Sano H, Chrispeels MJ (2001) Molecular characterization of two *Arabidopsis* Ire1 homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases. *Plant Physiol* 127:949–962. <https://doi.org/10.1104/pp.010636>
- Kundu S, Gantait S (2017) Abscisic acid signal crosstalk during abiotic stress response. *Plant Gene* 11:61–69. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.04.007>
- Liang Y, Gao Y, Jones AM (2017) Extra large G-protein interactome reveals multiple stress response function and partner-dependent XLG subcellular localization. *Front Plant Sci* 8:1015. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01015>
- Liu JX, Howell SH (2010) Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants. *Plant Cell* 22:2930–2942. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.078154>
- Liu X, Stone L (2013) Cytoplasmic degradation of the *Arabidopsis* transcription factor ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 is mediated by the RING-type E3 ligase KEEP on GOING. *J Biol Chem* 288:20267–20279. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.465369>
- Liu JX, Srivastava R, Che P, Howell SH (2007) Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *Plant J* 51:897–909. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2007.03195.x>
- Ludwig AA, Tenhaken R (2001) A new cell wall located N-rich protein is strongly induced during the hypersensitive response in *Glycine max* L. *Eur J Plant Pathol* 107:323–336. <https://doi.org/10.1023/A:1011202225323>
- Malhotra JD, Kaufman RJ (2007) The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol* 18:716–731. <https://doi.org/10.1016/j.semedb.2007.09.003>
- Maruta N, Trusov Y, Brenyah E, Parekh U, Botella JR (2015) Membrane-localized extra-large G-proteins and Gβγ of the heterotrimeric G proteins form functional complexes engaged in plant immunity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 56:114. <https://doi.org/10.1104/pp.114.255703>
- Mendes GC, Reis PAB, Calil IP, Carvalho HH, Aragão FJL, Fontes EPB (2013) GmNAC30 and GmNAC81NAC081 integrate the endoplasmic reticulum stress- and osmotic stress-induced cell death responses through a vacuolar processing enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:19627–19632. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311729110>
- Nagashima Y, Mishiba K, Suzuki E, Shimada Y, Iwata Y, Koizumi N (2011) *Arabidopsis* Ire1 catalyses unconventional splicing of bZIP60 mRNA to produce the active transcription factor. *Sci Rep* 1:29. <https://doi.org/10.1038/srep00029>
- Nakashima K, Fujita Y, Kanamori N, Katagiri T, Umezawa T, Kidokoro S, Maruyama K, Yoshida T et al (2009) Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol* 50:1345–1363. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp083>
- Pimenta MR, Silva PA, Mendes GC, Alves JR, Caetano HDN, Machado JPB, Brustolini OJB, Carpinetti PA, Melo BP, Silva JCF, Rosado GL, Ferreira MFF, Costa MDBL, Picoli EAT, Aragao FJL, Ramos HJO, Fontes EPB (2016) The stress-induced soybean NAC transcription factor GmNAC81 plays a positive role in developmentally programmed leaf senescence. *Plant Cell Physiol* 57:1098–1114. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw059>
- Reis PAB, Fontes EPB (2012) N-rich protein (NRP)-mediated cell death signaling: a new branch of the ER stress response with implications for plant biotechnology. *Plant Signal Behav* 7:628–632. <https://doi.org/10.4161/psb.20111>
- Reis PAA, Rosado GL, Silva LAC, Oliveira LC, Oliveira LB, Costa MDBL, Alyim C, Fontes EPB (2011) The binding protein BiP attenuates stress-induced cell death in soybean via modulation of the N-rich. *Plant Physiol* 157:1853–1865. <https://doi.org/10.1104/pp.111.179697>
- Reis PAB, Carpinetti PA, Freitas PPJ, Santos EGD, Camargos LF, Oliveira IHT, Silva JCF, Carvalho HH, Costa DBM, Soares-Ramos JRL, Fontes EPB (2016) Functional and regulatory conservation of the soybean ER stress-induced DCD/NRP-mediated cell death signaling in plants. *BMC Plant Biol* 16:19
- Ruberti C, Kim SJ, Stefano G, Brandizzi F (2015) Unfolded protein response in plants: one master, many questions. *Curr Opin Plant Biol* 27:59–66. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.016>
- Song L, Huang SSC, Wise A, Castanon R, Nery JR, Chen H, Watanabe M, Thomas J, Bar-Joseph Z, Ecker JR (2016) A transcription factor hierarchy defines an environmental

- stress response network. *Science* 354:p.aag1550. <https://doi.org/10.1126/science.aag1550>
- Srivastava R, Deng Y, Shah S, Rao AG, Howell SH (2013) BINDING PROTEIN is a master regulator of the endoplasmic reticulum stress sensor/transducer bZIP28 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25:1416–1429. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.110684>
- Stachelin LA (1997) The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J* 11:1151–1165. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.1997.11061151.x>
- Sun L, Yang ZT, Song ZT, Wang MJ, Sun L, Lu SJ, Liu JX (2013) The plant-specific transcription factor gene NAC103 is induced by bZIP60 through a new cis-regulatory element to modulate the unfolded protein response in *Arabidopsis*. *Plant J* 76:274–286. <https://doi.org/10.1111/tpj.12287>
- Sun L, Zhang SS, Lu SJ, Liu JX (2015) Site-1 protease cleavage site is important for the ER stress-induced activation of membrane-associated transcription factor bZIP28 in *Arabidopsis*. *Sci China Life Sci* 58:270–275. <https://doi.org/10.1007/s11427-015-4807-6>
- Tenhaken R, Doerks T, Bork P (2005) DCD—a novel plant specific domain in proteins involved in development and programmed cell death. *BMC Bioinform* 6:169. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-169>
- Tunc-Ozdemir M, Urano D, Jaiswal DK, Clouse SD, Jones AM (2016) Direct modulation of a heterotrimeric G protein-coupled signaling by a receptor kinase complex. *J Biol Chem*. <https://doi.org/10.1074/jbc.e116.736702>
- Tunc-Ozdemir M, Li B, Jaiswal DK, Urano D, Jones AM, Torres MP (2017) Predicted functional implications of phosphorylation of regulator of G protein signaling protein in plants. *Front Plant Sci* 8:1456. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01456>
- Urano D, Chen JG, Botella JR, Jones AM (2013) Heterotrimeric G protein signalling in the plant kingdom. *Open Biol* 3:120186. <https://doi.org/10.1098/rsob.120186>
- Urano D, Maruta N, Trusov Y, Stoian R, Wu Q, Liang Y, Jones AM et al (2016) Saltational evolution of the heterotrimeric G protein signaling mechanisms in the plant kingdom. *Sci Signal* 9:ra-93. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf9558>
- Valente MAS, Faria JAQA, Ramos JRLS, Reis PAB, Pinheiro GL, Piovesan ND et al (2009) The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. *J Exp Bot* 60:533–546. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern296>
- Vitale A, Denecke J (1999) The endoplasmic reticulum: gateway of the secretory pathway. *Plant Cell* 11:615–628. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.4.615>
- Wang D, Gao Z, Du P, Xiao W, Tan Q, Chen X, Li L, Gao D (2016) Expression of ABA metabolism-related genes suggests similarities and differences between seed dormancy and bud dormancy of peach (*Prunus persica*). *Front Plant Sci* 6:1248. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01248>
- Xu DB, Chen M, Ma YN, Xu ZS, Li LC, Chen YF, Ma YZ (2015) A G-protein  $\beta$  subunit, AGB1, negatively regulates the ABA response and drought tolerance by down-regulating AtMPK6-related pathway in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 10:e0116385
- Yang ZT, Lu SJ, Wang MJ, Bi DL, Sun L, Zhou SF, Song ZT, Liu JX (2014a) A plasma membrane-tethered transcription factor, NAC062/ANAC062/NTL6, mediates the unfolded protein response in *Arabidopsis*. *Plant J* 79:1033–1043. <https://doi.org/10.1111/tpj.12604>
- Yang Z-T, Wang M-J, Sun L, Lu S-J, Bi D-L, Sun L, Song Z-T, Zhang S-S, Zhou S-F, Liu J-X (2014b) The membrane-associated transcription factor NAC089 controls ER-stress-induced programmed cell death in plants. *PLoS Genet* 10:e1004243. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004243>
- Yu F, Xie Q (2017) Non-26S proteasome endomembrane trafficking pathways in ABA signaling. *Trends Plant Sci* 22:976–985. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.08.009>
- Zhou R, Zhu T, Han L, Liu M, Xu M, Liu Y et al (2017) The asparagine-rich protein NRP interacts with the *Verticillium* effector PevD1 and regulates the subcellular localization of cryptochrome 2. *J Exp Bot* 68:3427–3440. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx192>
- Zhu T, Wu Y, Yang X, Chen W, Gon Q, Liu X (2018) The asparagine-rich protein NRP facilitates the degradation of the PP6-type phosphatase FyPP3 to promote ABA response in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 11:257–268. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.11.006>

## **CAPÍTULO II**

### **A SUBUNIDADE $\beta$ DA PROTEÍNA G ATUA COMO TRANSDUTOR DE SINAL À MONTANTE NA VIA DE MORTE CELULAR INDUZIDA POR NRPs**

## Resumo

A via de morte celular DCD/NRP (“developmental cell death domain-containing N-rich protein) foi inicialmente identificada como um componente de integração de sinalização induzida por estresses do retículo endoplasmático (RE) e osmótico. O acúmulo de DCD/NRP, por sua vez, leva à indução dos fatores de transcrição GmNAC81 e GmNAC30, que interagem entre si para regular o programa de morte celular. Foi demonstrado previamente que o chaperone molecular BiP modula negativamente a ativação do programa de morte celular e promove assim uma melhor adaptação à seca em plantas superexpressando BiP. Nesta investigação, foi utilizado genética reversa e estudos de superexpressão gênica para identificar componentes a montante da resposta de morte celular mediada por DCD/NRP. Inicialmente, foi demonstrado que, o transdutor de sinal associado à membrana do retículo endoplasmático AGB1 é requerido para indução da expressão de componentes da via de sinalização mediada por DCD/NRP1 em *Arabidopsis* em resposta a estresses osmótico e do retículo endoplasmático. Posteriormente, foi demonstrado que o mutante nulo *agb1-3* atenua o processo de morte celular induzido por estresse do retículo endoplasmático quando comparado com linhagem selvagem Col-0, mimetizando o fenótipo exibido pelos alelos nulos de componentes da sinalização de morte celular. Este fenótipo de tolerância à morte celular induzida por estresse do RE foi revertido pela expressão ectópica de *AtAGB1* em linhagens *agb1-3* e a maior susceptibilidade resultante foi intensificada em linhagens Col-0, superexpressando AGB1. Em seguida, foi demonstrado que a superexpressão de BiP reverteu o fenótipo susceptível resultante da superexpressão de *AtAGB1*. Resultados de ensaios de estresse hídrico corroboraram com a interpretação de que AGB1 participa da sinalização de morte celular. Durante o déficit hídrico, tanto o mutante *agb1-3* e plantas BiP-Ox mantiveram o turgor das folhas, enquanto as folhas de plantas do tipo selvagem se tornaram murchas com lesões cloróticas e necróticas. AGB1 codifica a subunidade G $\beta$  que dimeriza com a subunidade G $\gamma$  da proteína G heterotrimérica, ambas sendo reguladas transcricionalmente por BiP em condições de estresse no retículo endoplasmático, resultados que suportam o módulo G $\beta\gamma$  como um componente a montante da resposta de morte celular mediada por NRP.

**Palavras chave:** AGB1, morte celular programada, N-rich proteins, estresse abiótico, BiP

## Introdução

Durante o desenvolvimento, as plantas são constantemente expostas a um grande número de fatores bióticos e abióticos, podendo ocorrer danos aos tecidos em desenvolvimento, comprometendo a sobrevivência do organismo. Estratégias desenvolvidas pelas plantas para resistir às condições ambientais e climáticas são complexas, uma vez que as plantas são sésseis e não podem simplesmente escapar às condições adversas do meio ambiente. A indução de morte celular programada (*Programmed Cell Death-PCD*) é um programa de defesa usado pelas plantas desencadeado não somente por programas de desenvolvimento, mas também em resposta a fatores de estresses bióticos e abióticos (Petrov *et al.*, 2015).

Uma resposta celular induzida por condições de estresse é o fechamento estomático, que atua principalmente evitando perda de água em condições de estresse osmótico. Além disso, esse estímulo também visa manter o bom funcionamento dos mecanismos fotossintéticos (Xiong *et al.*, 2002). Um outro tipo de resposta a estímulos ambientais importante nas plantas é aquela induzida por estresse no retículo endoplasmático (RE), que geralmente é tratado como um estresse secundário que ocorre pela alteração no dobramento de proteínas em razão da perda da homeostase nessa organela (Schroder e Kaufman, 2005; Ron e Walter, 2007). Diante disso, as plantas desenvolveram mecanismos para tentar minimizar estes danos causados por estresses associados ao RE.

O processo de PCD em organismos multicelulares já está bem caracterizado de acordo com cada tecido ou órgão, similarmente aos indutores específicos desses processos (Fath *et al.*, 2000; Young e Gallie 2000; Lombardi *et al.*, 2010). Em plantas, mais especificamente, durante o crescimento e desenvolvimento, PCD é ativada em vários estágios de vida, como ocorre no desenvolvimento de células do endosperma e senescência foliar. Além disso, várias cascatas de sinalização induzidas por estresses culminam na execução de programas de PCD identificados em plantas (Pinto *et al.*, 2012). Entre eles, a via de sinalização mediada por proteínas DCD/NRPs (*developmental cell death/asparagine-rich proteins*), que sinaliza morte celular em resposta a múltiplos estresses, tem sido caracterizada como uma relevante resposta adaptativa de plantas a estresses e a eventos de desenvolvimento, como senescência natural de folhas (Reis e Fontes, 2012; Pimenta *et al.*, 2016).

A via de sinalização intermediada pelas proteínas DCD/NRPs integra um sinal de morte celular gerado pelo estresse prolongado do RE e estresse osmótico em uma resposta sinérgica e convergente (Irsigler *et al.*, 2007, Costa *et al.*, 2008). O modelo atual dessa via integrativa

estabelece que a sinalização por condições de estresse induz a expressão do fator de transcrição *GmERD15*. Esse transfator, induzido por estresses osmótico e do RE, se liga ao promotor de NRP para aumentar sua expressão, cuja proteína codificada localiza-se no citoplasma e membrana plasmática e ativa uma cascata de sinalização, culminando com a indução da expressão do fator transcricional GmNAC81 (Alves *et al.*, 2011, Faria *et al.*, 2011, Reis *et al.*, 2011, 2012). Também foi identificado que GmNAC81 interage com GmNAC30 no núcleo de células vegetais estressadas, e induz a expressão de genes que codificam enzimas hidrolíticas, principalmente VPE (*vacuolar processing enzyme*) (Mendes *et al.*, 2013). VPE possui atividade de caspase-1 e executa um programa de morte celular, específico de plantas, por meio do colapso do vacúolo (Hatsugai *et al.*, 2015). Esta via de sinalização que integra o sinal osmótico e de estresse do RE representa um *regulon* (unidade de regulação) com potencial para melhorar tolerância a déficit hídrico (Reis e Fontes, 2012). Consistente com esta observação, plantas geneticamente modificadas superexpressando o chaperone molecular BiP promovem maior adaptação a condições de seca via modulação negativa da expressão e atividade dos componentes dessa via de sinalização (Valente *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2011). Embora, este evento de tolerância à seca mediada por BiP tenha sido considerado de relevância para aquisição de tolerância à seca em variedades de soja, o mecanismo pelo qual BiP, um chaperone molecular residente no RE, controla a via de morte celular intermediada por NRPs é totalmente desconhecido. Recentemente, foi demonstrado que a via de morte celular programada mediada por proteínas DCD/NRPs é conservada em plantas e opera com mecanismos regulatórios similares, uma vez que BiP, em *Arabidopsis* e tabaco, também regula negativamente a referida via de sinalização e promove melhor adaptação às condições de seca (Alvim *et al.*, 2001, Reis *et al.*, 2016).

Similarmente a mamíferos, foi demonstrado que BiP em plantas regula a via de resposta a proteínas mal dobradas (*unfolded protein response*-UPR) que se trata de uma via de sinalização citoprotetora que permite a comunicação do RE com o núcleo em condições de estresses que promovem o acúmulo de proteínas mal dobradas no RE (Chakrabarti *et al.*, 2011). Em condições normais, a proteína BiP associa-se aos transdutores de sinais da via de UPR, associados à membrana do RE, mantendo-os no seu estado inativo (Chakrabarti *et al.*, 2011; Liu e Howell, 2016). Porém, quando esse estresse secundário é ativado, BiP é deslocada para atuar como chaperone molecular no controle do acúmulo de proteínas mal dobradas, permitindo que estes transdutores de sinais sejam ativados. Em plantas, foi demonstrado que BiP associa-se com o transdutor de sinal bZIP28, sob condições normais, e acredita-se que ela possa se associar

também a bZIP17 e IRE1, conforme já descrito em mamíferos (Wan e Jiang, 2016; Liu e Howell, 2016). No caso de bZIP28, foi demonstrado que a dissociação de BiP em resposta ao acúmulo de proteínas mal dobradas no RE leva ao deslocamento de bZIP28 para as membranas do Golgi, onde é proteoliticamente clivado pelas enzimas SP1 e SP2, ocorrendo a liberação do domínio C-terminal bZIP e sua subsequente translocação para o núcleo (Srivastava *et al.*, 2013; 2014). Ire1 também é ativado por estresses no RE, por meio de oligomerização que leva à ativação do domínio de cinase por fosforilação e subsequente ativação da sua atividade de endonuclease (Liu e Howell, 2016). O substrato da atividade endonuclease de Ire1 é o mRNA (“*unspliced* bZIP60”) de bZIP60, um outro transfator ancorado à membrana do RE (Deng *et al.*, 2011). Ire1 ativada promove um splicing não convencional do mRNA de bZIP60 gerando um mRNA processado (“*spliced* bZIP60”) o qual perde o fragmento que codifica o segmento transmembrana da proteína bZIP60. Como consequência, o mRNA processado de bZIP60 é traduzido em uma proteína solúvel que é translocada para o núcleo. Ambos bZIP28 e bZIP60 coordenam, no núcleo, positivamente a indução da expressão de proteínas que atuam no retículo endoplasmático (Calnexinas, BiP, Calreticulina) com o objetivo de proteger as células contra estresses no RE, como componentes da via citoproteora UPR (Howell, 2013).

Enquanto a via UPR atua como sinal de pro-sobrevivência celular, estresses prolongados do RE promovem a ativação de vias de sinalização de morte celular. Pelo menos duas vias de morte celular derivadas do estresse do RE e específica de células vegetais têm sido caracterizadas. A primeira refere-se à via de morte celular mediada pelas proteínas DCD/NRPs e induzida por estresses múltiplos que é executada pela indução da expressão de VPE por meio da regulação por dois transfatores da família NAC, GmNAC81 e GmNAC30 em soja (Mendes *et al.*, 2013). Uma segunda via de morte celular, ativada especificamente por estresses do RE, é iniciada pela liberação do fator de transcrição NAC089 da membrana do retículo endoplasmático para o núcleo por um mecanismo ainda desconhecido (Yang *et al.*, 2014). No núcleo, NAC089 leva à ativação do processo de morte celular por meio de aumento da expressão de *caspase like 3/7* promovendo fragmentação do DNA (Yang *et al.*, 2014). Apesar de não tão bem caracterizada como os membros da família NAC, a subunidade  $\beta$  da Proteína G (G $\beta$ ) em *Arabidopsis* parece exercer função importante na via de PCD induzida por estresse do RE (Wang, *et al.* 2007; Chen e Brandizzi, 2012).

Foi demonstrado que plântulas de *Arabidopsis* mutantes para a subunidade  $\beta$  (*agb1-2*) da proteína G são mais tolerantes ao estresse induzido por tunicamicina que resulta em morte celular do que linhagens selvagens Col-0 e mutantes para subunidade  $\alpha$  da Proteína G (G $\alpha$ )

(Wang *et al.*, 2007). A proteína  $G\beta$  parece estar associada à membrana do RE e ativação de UPR leva à degradação de  $G\beta$  ao contrário de  $G\alpha$ . Dessa maneira, parece que eventos de sinalização mediados por  $G\beta$ , estabilizado pela subunidade  $\gamma$  da Proteína G ( $G\gamma$ ) e independente de  $G\alpha$ , intermedeiam a via de morte celular ativada em resposta ao acúmulo de proteínas mal dobradas. Posteriormente, em controvérsia, foi demonstrado que plântulas de *Arabidopsis agb1-3* são mais sensíveis ao estresse no RE (Chen e Brandizzi, 2012). De acordo com estes últimos resultados, em plantas mutantes para AtAGB1, a ativação da via de UPR é superior e a via de morte celular é intensificada, comparado a plantas selvagens (Chen e Brandizzi, 2012).

A interação de AGB1 com o ramo UPR IRE1/bZIP60 já foi demonstrado anteriormente durante a germinação de sementes (Chen e Brandizzi, 2012). Consequentemente, torna-se relevante avaliar a função negativa e/ou positiva de AtAGB1 no controle de morte celular induzida por estresses. Nesta investigação, a possível função de AtAGB1 em morte celular induzida por diferentes estresses foi avaliada, utilizando tanto mutantes nulos para AtAGB1 quanto plantas transgênicas superexpressando AtAGB1. O fenótipo resultante da manipulação dos níveis de AtAGB1 foi analisado em resposta a diversos estresses.

Os resultados dessa investigação demonstraram inicialmente que a indução por estresses dos componentes da via de sinalização mediada por NRPs depende da função de AtAGB1. Foi também demonstrado que plantas superexpressando AtAGB1 são mais sensíveis ao estresse hídrico, bem como ao estresse do retículo endoplasmático. Além disso observamos que esse fenótipo foi revertido como consequência da superexpressão de BiP, que atua como modulador da via de morte celular induzida por proteínas NRPs.

## Material e métodos

### *Construções plasmidiais*

Todas as construções recombinantes foram geradas a partir do sistema de clonagem GATEWAY (Invitrogen, Carlsbad). Os oligonucleotídeos iniciadores estão listados na Tabela S1. A ORF (*Open Reading Frame*) de AGB1 (AT4G34460), foi amplificada a partir do cDNA de folhas de *Arabidopsis thaliana* ecótipo Columbia (Col-0) e inserido nos vetores de entrada pDONR207. O clone resultante foi designado AtAGB1-Ns-pDONR207 (pUFV3192). Em seguida, a sequência de DNA inserida foi transferida por recombinação do vetor de entrada para vetor de expressão em plantas pEARLEY 104 sob controle do promotor 2x35S de CaMV fusionado a YFP. A construção resultante (AtAGB1-Ns-pEARLEY104; pUFV3312) foi utilizada para ensaio de localização subcelular e para transformações estáveis de plantas.

### *Material vegetal*

*Arabidopsis thaliana*, ecótipo Columbia (Col-0), foi usada como selvagem. Sementes mutantes nulas por inserção de T-DNA *agb1-3* (SALK\_061896), *bzip28* (SALK\_132285C), *bzip60* (SALK\_050204), *ire1a* (CS855024), *nrp1* (SALK\_041306), *nrp2* (CS449852), *vpey* (CS67916), *vpe 4°* (CS67918) foram obtidas do Arabidopsis Biological Resource Center (Fig. S1). As linhagens transgênicas superexpressando soyBiPD (Glyma.05G219400.1.p) e AtBiP2 (At5G42020) designadas BiPD-Ox e BiP2-Ox foram previamente descritas (Reis *et al.*, 2016). Plantas de *Arabidopsis* Col-0 foram transformadas com soyBiPD utilizando o clone pUFVBiPS (Alvim *et al.*, 2001). A construção consiste no cDNA de soyBiPD que contém a sequência HDEL nativa no C-terminal, sob controle do promotor 35S e sequência terminadora de poliadenilação 3' nos no vetor binário de transformação de plantas pBI121. Foi escolhida a linhagem BiPD-Ox (T07) para transformação com AtAGB1 pois foi o transformante que apresentou maior expressão da proteína BiP. Para a obtenção de plantas transformadas com AtBiP2 foi utilizado o clone pUFV (pUFV1243) que consiste na construção 2x35S:BiP2-GFP-HDEL no vetor binário de expressão em plantas pK7WG2 (Fig. S3).

### *Condições de crescimento de plantas e obtenção de linhagens transgênicas expressando ectopicamente AGB1.*

Sementes de *Arabidopsis* foram esterilizadas, plaqueadas em meio Murashige-Skoog (MS) (Sigma-Aldrich, Saint Louis) e incubadas a baixa temperatura (4°C) por 72 horas na ausência de luz e, em seguida, expostas a luz branca. Plântulas foram crescidas em placas contendo meio MS por duas semanas em estufa a 22°C e fotoperíodo curto (12 horas de luz/12

horas de escuro). Plantas transgênicas foram obtidas por transformação via *Agrobacterium tumefaciens* através do método de mergulha do pendão floral (Zhang *et al.*, 2006). Para isso, *A. tumefaciens*, cepa GV3101, foi transformada com a construção de DNA (AtAGB1-Ns-pEARLEY104; pUFV3312) por eletroporação e as colônias transformadas foram confirmadas por PCR utilizando os oligonucleotídeos AGB1-FWD e AGB1-NS-RVS (Tabela S1). Para transformação de plantas utilizaram-se as linhagens Col-0, *agb1-3* e BiPD-Ox (T07). Plantas transformadas com construções de DNA específicas foram selecionadas em meio MS suplementado com Glufosinato de amônio (Sigma-Aldrich, Saint Louis) a 10 mg.L<sup>-1</sup>. Transformantes selecionados foram confirmados por PCR utilizando os oligonucleotídeos 35S\_MC36-Fwd e AGB1-NS-RVS (Tabela S1), transferidos para solo, cultivados em estufa a 22°C e fotoperíodo curto (12 horas de luz/12 horas de escuro). Para análise de segregação as sementes foram germinadas em meio MS contendo Glufosinato de amônio a 10 mg.L<sup>-1</sup>. Linhagens homozigotas para o locus T-DNA flanqueando a construção (AtAGB1-Ns-pEARLEY104; pUFV3312), na geração T1, foram selecionadas analisando a frequência de sementes T2 resistentes Glufosinato de amônio (Sigma-Aldrich) a 10 mg.L<sup>-1</sup> após auto fecundação. Pelo menos, três transformantes independentes de cada genótipo transformado foram selecionados para análise da expressão do transgene por qRT-PCR e imunodeteção. A nomenclatura das linhagens transgênicas selecionadas são definidas na Tabela S2.

#### *Localização subcelular*

A localização subcelular de AtAGB1 foi examinada nas células da epiderme de folhas de *Nicotiana benthamiana* expressando transientemente AGB1 fusionado no C-terminal de YFP. Folhas de *N. benthamiana* com 3 a 4 semanas foram agro-infiltradas com *A. tumefaciens* cepa GV3101 carregando a construção AtAGB1-Ns-pEARLEY104 (pUFV3312) com densidade ótica (D.O.) de 0,3. Fluorescência foi visualizada nas células epidermais após três dias de infiltração em microscopia confocal usando o microscópio Zeiss inverted 510 META laser scanning (Zeiss, Jena) equipado com laser de argônio e hélio. YFP foi excitado pelo laser argônio/hélio no comprimento de onda de 488 nm, e o pico de emissão foi observado na região entre 500-530 nm delimitada por filtro de barreira. Imagens foram capturadas e processadas com o software LSM Image Browser 4 (Carl-Zeiss).

### *Ensaio de estresse em plântulas*

Para os ensaios de indução de estresse osmótico e do RE, inicialmente plântulas de *Arabidopsis* foram germinadas em meio MS por duas semanas. Em seguida plântulas foram transferidas para placas de 12 poços contendo meio MS (¼ força) líquido, e deixadas aclimatando por 24 h. Os tratamentos foram iniciados pela substituição do meio por uma solução de polietilenoglicol 10% (p/v) (PEG: MW 8000) (Sigma-Aldrich, Saint Louis) em meio MS (¼ força) líquido, para indução de estresse osmótico, e pela adição de uma solução de Tunicamicina (TUN) (Sigma-Aldrich, Saint Louis) 2,5 µg/mL, para indução de estresse do RE, em meio MS (¼ força) líquido. Para cada tratamento foram utilizadas 3 ou 5 repetições, sendo cada uma composta por 10 plântulas. Para os controles, utilizou-se apenas meio MS (¼ força) líquido acrescido de DMSO (Sigma-Aldrich, Saint Louis) (para o tratamento com tunicamicina) ou meio MS (¼ força) líquido puro (para o tratamento com PEG). Os tempos de tratamento estão descritos nas figuras. Após os tempos de tratamento as plântulas foram retiradas da solução, o excesso de meio foi removido com papel e elas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Todo o material biológico foi armazenado a -80 °C após o ensaio.

### *Ensaio de morte celular pelo método de coloração com azul de Evans*

Plântulas de *Arabidopsis* foram germinadas em meio MS por duas semanas. Em seguida plântulas foram transferidas para placas de 12 poços contendo meio MS (¼ força) líquido contendo TUN 10 µg/mL por 24 e/ou 48 horas. DMSO (solvente utilizado para solubilizar TUN) foi utilizado como controle negativo. Após a indução, as plântulas foram coradas com azul Evans a 2% (p/v) durante 5 min e depois foram lavadas extensivamente com água.

### *Determinação de conteúdo de clorofila total e peroxidação lipídica*

O conteúdo de clorofila total foi determinado por leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 663 e 646 nm após extração utilizando DMSO saturado com CaCO<sub>3</sub> de acordo com a metodologia proposta por Wellburn (1994). A quantificação de peroxidação lipídica em plântulas foi estimada através do teor de malondialdeído (MDA), um produto da decomposição de oxidação de ácidos graxos poliinsaturados. O conteúdo de MDA foi determinado pela reação do ácido tiobarbitúrico de acordo com descrito por Hodges e colaboradores (1993).

### *Tolerância à seca*

Para ensaios de tolerância à seca, plântulas após duas semanas crescidas em placa foram transferidas para solo. Plantas foram crescidas em estufa (22°C e fotoperíodo curto (12 horas de luz/12 horas de escuro)). Após duas semanas de adaptação, foi cessada a irrigação por duas semanas. Durante esse período foi avaliado o teor relativo de água e decorrido o tempo de seca as plantas foram irrigadas para observar recuperação após dois dias, estabelecendo assim a taxa de sobrevivência.

O teor relativo de água (TRA) foi estabelecido utilizando quatro discos foliares de 1 cm<sup>2</sup> cada, retirados de folhas mais novas completamente expandidas. Esses discos foram pesados para quantificação da massa fresca (MF), em seguida imersos em água deionizada por 24 horas. Após esse período, pesou-se novamente os discos para determinação da massa túrgida (MT). Os mesmos foram submetidos à secagem em estufa com circulação forçada de ar, a 70°C, durante 48 h. Em seguida foram pesados para obtenção da massa seca (MS). Três repetições foram utilizadas para essa avaliação. A determinação do TRA foi calculada seguindo a seguinte fórmula proposta por Barrs e Weatherley (1962). (Equação 1)

$$TRA (\%) = \frac{(MF-MS)}{(MT-MS)} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo:

TRA = Teor relativo de água (%)

MF = Massa fresca (g)

MT = Massa túrgida (g)

MS = Massa seca (g)

### *Ensaio de imunodeteção*

Proteína total foi extraída de *Arabidopsis* transformadas e selvagens de acordo com descrito por Cascardo e colaboradores (2000) utilizando tampão de extração descrito em Peng e colaboradores (2018). As proteínas foram separadas por corrida eletroforética em gel de SDS-PAGE 10% (p/v) e em seguida transferidas por eletroblotting para membrana de nitrocelulose. A imunomarcagem foi realizada com anticorpos anti-GFP (Miltenyi Biotec, 130-091-833) e anti-BiP e detectada com Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante.

### *Extração de RNA, síntese de cDNA*

Oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram confeccionados utilizando o software Primer Express 3.0 (Life Technologies). RNA total de plântulas de *Arabidopsis* foi extraído utilizando TRIzol (Thermo Fisher Scientific) e quantificados com NanoDrop spectrophotometer. Foi realizado o tratamento de 4 µg do RNA total com RNase-free DNase I Amplification Grade (Thermo Fisher Scientific). Em seguida foi obtido o cDNA a usando 1U da enzima M-MLV (Thermo Fisher Scientific) e 0,5 µM dos oligonucleotídeos oligo (dT).

### *RT-PCR convencional e quantitativo*

A confirmação dos nocautes *agb1-3*, *nrp1* e *nrp2* foi realizada por RT-PCR, utilizando os primers RT\_AGB1-FWD e RT\_AGB1-RVS, AtNRP1-FWD e AtNRP1-RVS, AtNRP2-FWD e AtNRP2-RVS (Tabela S1) em um termociclador C1000 thermal cycler (Bio-Rad). RNA total foi extraído de Col-0, *agb1-3*, *nrp1* e *nrp2* e utilizado para síntese de cDNA. As reações de PCR continham 20 ng de cDNA, 0,1 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada um dos oligonucleotídeos correspondentes, 1x de tampão para a Taq DNA polimerase (10 mM Tris HCl pH= 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) 1 µL de Taq DNA polimerase em um volume final de 25 µL. As condições de reação foram: 3 min a 94° C, seguidos de 30 ciclos (30 seg a 94° C, 30 seg a 55° C e 1 min e 30 seg a 72° C), seguindo 10 min a 72° C. A reação de amplificação foi conduzida em um equipamento C1000 thermal cycler (Bio-Rad) e os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídeo 0,1 mg.L<sup>-1</sup>.

RT-PCR quantitativa foi realizada utilizando SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies), em uma reação com volume de 10 µL contendo 20 ng cDNA e 0,6 µM de cada um dos oligonucleotídeos correspondentes no equipamento ABI7500 real-time PCR system (Life Technologies). As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos a 94°C por 15 seg e 60°C por 1 min, seguido da etapa de dissociação. A expressão do gene foi normalizada com relação a expressão dos genes endógenos AtActin 2 (At3g18780) (Liu e Howell, 2010) e AtUBQ5 (At3g62250) (Moreno *et al.* 2012) e quantificada utilizando os métodos  $2^{-\Delta Ct}$  para quantificação absoluta e  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para quantificação relativa. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção de transcritos por RT-PCR quantitativo estão listados na tabela S1.

## Resultados

### *Identificação de transdutor de sinal do retículo endoplasmático que conecta a ativação da via de morte celular DCD/NRP à resposta ao estresse*

Recentemente foi demonstrado que a via de morte celular mediada por DCD/NRPs em condições de estresse, descrita em soja, também opera em *Arabidopsis* com mecanismos regulatórios similares, sendo modulada por BiP (Reis *et al.*, 2016). Isto possibilitou o uso de genética reversa para identificação de componentes a montante da via de morte celular que pudessem ser diretamente modulados por BiP.

Assim sendo, foram selecionados mutantes nulos de receptores de sinalização presentes na membrana do retículo endoplasmático (Fig. S1) e o efeito da inativação desses genes sobre a indução dos genes *NRP1*, *NRP2* e *ANAC036*, componentes da via de morte celular mediada por DCD/NRP e regulada por BiP foi avaliado. Na linhagem selvagem, Col-0, o tratamento com o indutor de estresse osmótico PEG promoveu a indução dos genes da via de morte celular, *NRP1*, *NRP2* e *ANAC036*, porém com diferentes cinéticas e amplitude de indução (Fig. 1). Tratamento com PEG resultou no aumento de transcritos de *NRP1* 2h após tratamento, atingindo um pico 8 h após tratamento. Em contraste, *NRP2* e *ANAC036* exibiram cinética de indução tardia atingindo o máximo de indução 12 h após o tratamento. Estes resultados são consistentes com a ordem de atuação dos componentes na via de sinalização de morte celular, em que *NRP1* age a montante, induzindo a expressão de *NRP2* e *ANAC036* (Reis *et al.*, 2016). Enquanto que no mutante *ire1a*, somente os genes *NRP2* e *ANAC036* foram induzidos por estresse osmótico em uma amplitude superior às respectivas induções em Col-0 (Fig. 1a), no nocaute *bzip28*, a indução por estresse osmótico foi limitada ao gene *NRP1*, mas com cinética tardia (4h após tratamento, Fig. 1b). Estes resultados sugerem que a indução tardia do gene *NRP1* independe de *bZIP28* e que a expressão dos genes *NRP2* e *ANAC036* é regulada negativamente por *Ire1a*, em condições de estresse induzido por PEG.

A indução precoce de *NRP1* parece ser coordenada por *Ire1a* e *bZIP28* e, conseqüentemente pela via UPR, enquanto que a indução tardia de *NRP1* não depende de *bZIP28*. Estes resultados também indicam haver uma desconexão da indução de *NRP1* do módulo *NRP2/ANAC036* pelos transdutores da via UPR, o que sugere uma via alternativa de controle da via de morte celular mediada por DCD/NRP1, possivelmente também ativada/dependente de modificações pós-traducionais do componente a montante *NRP1*. Isto poderia explicar o motivo pelo qual a indução de *NRP1* por estresse osmótico ocorre no nocaute *bzip28* mas não leva à indução do módulo *NRP2/ANAC036*. Indução do módulo *NRP2/ANAC036*

no nocaute *ire1a* independente de NRP1 invoca um controle alternativo da via de morte celular na indução dos componentes a jusante. Embora os componentes da via de morte celular sejam induzidos por estresse osmótico via os transdutores da via UPR, somente com a supressão total de indução dos genes nos duplos mutantes *ire1a/ire1b*, *bzip28/ire1a* ou *bzip28/bzip60* poder-se-á inferir que o controle da expressão desses genes específicos se ocorre pela via UPR, induzida pelo estresse osmótico.

Inativação de AGB1 em *agb1-3* suprimiu a indução mediada por PEG de todos os genes analisados da via de morte celular mediada por DCD/NRP1 (Fig. 1c). Essa característica já havia sido observada em plantas superexpressando o chaperone molecular BiP, que atua como modulador negativo da via de morte celular DCD/NRP, em plantas submetidas a condições de estresse abiótico (Valente *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2016). Os resultados da presente investigação indicam que AtAGB1 atua como um regulador positivo da via de morte celular a montante a NRP1, contrário a ação de BiP. Em contraste, no mutante *bzip60*, *NRP1* e *ANAC36* foram induzidos por estresse osmótico em uma amplitude muito superior à indução observada em Col-0, sugerindo que bZIP60 atua como regulador negativo desses genes em condições de estresse osmótico. (Fig. 1d). Modulação inversa do módulo de sinalização Ire1/bZIP60 e AGB1 em respostas a sinais de estresse no RE tem sido previamente demonstrado (Chen e Brandizzi, 2012).

A fim de caracterizar a função de AtAGB1 como possível componente dessa via de morte celular, a expressão relativa de AGB1 foi monitorada sob condições que ativam este programa específico de morte celular. Controles específicos da efetividade do tratamento com PEG (estresse osmótico) e de estresse induzido do RE (tratamento com tunicamicina) foram incluídos no ensaio (Fig. 2a e 2b). Foi demonstrado que *AGB1* também é induzido por estresse osmótico e do RE (Fig. 2c e 2d). Plantas superexpressando BiP foram incluídas no ensaio, porque já foi demonstrado que superexpressão de BiP modula negativamente a expressão dos componentes da via de morte celular em resposta a estresse osmótico e do RE. Similarmente aos componentes da via de morte celular, a superexpressão de BiP reduz a indução de *AGB1* em resposta a estresse osmótico e do RE, indicando que AGB1 pode estar atuando neste programa de morte celular induzido por estresses abióticos.

Ensaio complementares demonstraram que a inativação do gene AGB1, no mutante *agb1-3*, promoveu atenuação acentuada da indução da expressão dos componentes da via de morte celular mediada por DCD/NRP1 em resposta ao tratamento com PEG e TUN (Fig. S2a e S2b). O nível de transcritos de *NRP1*, *NRP2*, *ANAC36* e *VPE* foram consideravelmente reduzidos no mutante *agb1-3*, sob condições de estresse osmótico e no RE, mimetizando o

efeito da superexpressão de BiP. Coletivamente, estes resultados indicam que AGB1 age a montante na via de morte celular que integra sinais de estresse osmótico e do RE.

*AtAGB1 participa de transdução de sinal que leva à morte celular, porém não diretamente.*

Para confirmar a função de AtAGB1 como possível transdutor de sinal de morte celular derivado do retículo endoplasmático e propagado pela via de morte celular mediada por DCD/NRP, analisou-se o potencial de AtAGB1 como desencadeador de processo de morte celular. A linhagem mutante *agb1-3* foi transformada com o transgene 35S:YFP-AtAGB1, sendo obtidas três linhagens independentemente transformadas (*agb1-3/AtAGB1*). As linhagens complementadas diferiram no nível de transcritos de AtAGB1 detectados, bem como no nível de proteína expressa (Fig. S3a,b). Foram também obtidas três linhagens transgênicas independentes superexpressando a proteína YFP-AtAGB1 sob controle do promotor 2x35S. Embora em todas as três linhagens superexpressando *AGB1*, o acúmulo de transcritos de *AGB1* tenha sido superior àquele de Col-0, apenas nas linhagens AtAGB1-2 e AtAGB1-6 foram verificados níveis significantes de proteína expressa (Fig. S3a,b). A fim de confirmar se a *ORF* de *AGB1* fusionada ao C-terminal de YFP estava sendo corretamente direcionada para a membrana plasmática, análises de microscopia confocal foram realizadas com expressão transiente de 35S:YFP-AGB1 em *N. benthamiana* (Fig. S3c). Os resultados confirmam que a fluorescência se concentrou na membrana plasmática e também exibiu padrões típicos do RE.

Obtidas as linhagens transgênicas, primeiramente foram analisadas se alterações nos níveis de *AtAGB1* resultariam em ativação direta da via de morte celular mediada por DCD/NRP em condições normais. Inativação do gene *AGB1* no mutante *agb1-3* não causa alteração nos níveis de transcritos dos genes *AtNRP1*, *AtNRP2* e *AtANAC036*, comparado com Col-0. Similarmente, o aumento da expressão de *AGB1* nas linhagens complementadas e superexpressando *AGB1* não causou aumentos significativos da expressão de transcritos de *AtNRP1* e *AtNRP2* que caracterizaria AtAGB1 como indutor direto da via de morte celular, mesmo em condições normais de crescimento das plantas (Fig. 3). Com relação a ANAC036, um aumento do nível de expressão pode ser observado em algumas plantas superexpressando e complementadas. Estes resultados são consistentes com o modelo de atuação do dímero G $\beta$  $\gamma$ , que é ativado em resposta a sinais ambientais, estresse biótico ou abiótico (Trusov *et al.*, 2007; Chakravorty *et al.*, 2011; Maruta *et al.*, 2015). Esta hipótese é reforçada com a observação de que o aumento da expressão de *AtAGB1* não promove o aumento coordenado da expressão de nenhuma das subunidades G $\gamma$ s parceiras, *AtGG1*, *AtGG2*, *AtGG3* (Fig. S4). Dessa forma, AtAGB1 não parece atuar de maneira direta como indutor de morte celular na via DCD/NRP1,

mas esta parece depender de ativação do dímero G $\beta\gamma$  por sinais de estresses osmótico e do RE.

A via de morte celular mediada por DCD/NRP foi identificada e caracterizado por conectar programas de morte celular ativados por estresses do retículo endoplasmático, osmótico e por seca (Valente *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2016). Genética reversa tem sido utilizada para identificar componentes da via de sinalização mediada por DCD/NRP1 que integra sinais de morte celular derivados desses estresses múltiplos. Tem sido demonstrado que linhagens mutantes por perda de função das proteínas AtNRP1 e AtNRP2 (*nrp1* e *nrp2*, respectivamente) são mais tolerantes à morte celular induzida por tunicamicina do que Col-0 (Reis *et al.*, 2016). Assim sendo, o fenótipo de linhagens mutantes *agb1-3* submetidas a condições de estresse no retículo endoplasmático foi examinado e comparado àquele exibido por linhagens alelos nulos dos componentes da via de sinalização de morte celular mediada por NRP1.

A intensidade de coloração com o indicador de morte celular, Azul de Evans, foi inferior em *agb1-3* quando comparado com o padrão de coloração em Col-0 mas similar àquele desenvolvido em *nrp1*, *nrp2*, *vpe*, mutante quadruplo de *vpe* e BIP-Ox, indicando que a perda da função de AGB1 promove tolerância à morte celular induzida por tunicamicina, “fenocopiando” os demais componentes da via de morte celular e superexpressão de BiP (Fig. 4a e S6). O fenótipo de tolerância à morte celular, exibido pelos componentes da via de sinalização de morte celular foi confirmado pelo nível superior de clorofila nestes mutantes comparados com Col-0 (Fig. 4b). Este fenótipo de tolerância à morte celular em *agb1-3* foi devido à disrupção do gene AGB1 porque o fenótipo foi revertido em ensaios de complementação (Fig. 5a e 5b).

Indução de morte celular mediada por tunicamicina também foi avaliada em plantas superexpressando AtAGB1 e em nocautes ectopicamente expressando AtAGB1. A superexpressão de AtAGB1 em plantas superexpressoras e complementadas promoveu maior indução de morte celular em relação à Col-0 e à *agb1-3* sob tratamento com tunicamicina, aumento este evidenciado pela maior intensidade da coloração com o corante Azul de Evans e perda significativa de clorofila total em relação à linhagem selvagem (Fig. 5). Consistente com o papel de AGB1 como transdutor de sinais de morte celular, a intensidade do fenótipo de morte celular correlacionou perfeitamente com os níveis de expressão do transgene YFP-AGB1. Nas linhagens *agb1-3/AGB1-3* e AtAGB1-3 que exibiram fenótipos de morte celular induzida por tunicamicina similares a Col-0, os níveis de transcritos do transgene foram muito inferiores às outras linhagens transgênicas e ligeiramente superiores à Col-0 (Fig. S3a,b). Coletivamente, estes resultados indicam que AGB1 transduz um sinal de morte celular possivelmente

propagado pelos componentes da via de morte celular mediada por DCD/NRP1.

*Linhagens superexpressando AtAGB1 são mais sensíveis ao estresse hídrico, fenótipo revertido pela superexpressão de BiP*

AtAGB1 demonstrou atuar em condições de estresse de maneira semelhante a outros componentes da via de sinalização mediada por DCD/NRP1. Esta via de sinalização também está ligada a mecanismo de tolerância à seca, sendo este demonstrado em plantas em geral (Pimenta *et al.*, 2016; Reis *et al.*, 2016). Como ensaio complementar, analisou-se a resposta de plantas com níveis de AtAGB1 alterados em condições de seca.

A partir de estresse induzido pela suspensão imediata da disponibilidade de água, foi verificado que após um período de quinze dias plantas *agb1-3* demonstraram ser mais tolerantes ao déficit hídrico, em relação a Col-0 (Fig. 6a,b). De maneira oposta, plantas transgênicas complementadas (*agb1-3/AtAGB1*) e superexpressando AtAGB1 (AtAGB1-Ox) demonstraram ser mais sensíveis a condição estabelecida de déficit hídrico, podendo o mesmo ser observado pela menor retenção do conteúdo de água nas folhas com o decorrer do período de estresse.

Corroborando com os dados relativos ao conteúdo de água na folha no decorrer do período de estresse, após quinze dias as plantas foram re-hidratadas para analisar a taxa de sobrevivência. Foi observado que a linhagem *agb1-3* obteve uma taxa de sobrevivência bem superior as demais linhagens, sendo as menores taxas observadas em plantas que estavam superexpressando a proteína AtAGB1 (AtAGB1-2 e AtAGB1-6) (Fig. 6c).

Com a finalidade de examinar a possível influência de BiP, modulador negativo da via, nesses eventos geneticamente modificados, foram obtidas linhagens de plantas transgênicas duplamente transformada para superexpressão de *BiP* e de *AtAGB1* (Fig. S3). Foram obtidas três linhagens transgênicas expressando a construção transgênica 2x35S:AtAGB1 e 35S:soyBiPD, sendo os níveis detectados por qRT-PCR e por imunodeteção (BiPD-Ox/AtAGB1).

De maneira semelhante ao observado em plantas transgênicas superexpressando AtAGB1 em *background* Col-0, a expressão de *AtNRP1* e *AtNRP2* não foi alterada, mas houve um aumento da expressão de ANAC036 em plântulas BiPD-Ox/AtAGB1, em condições normais (Fig. S5). Quando essas linhagens foram submetidas à estresse do retículo endoplasmático, os parâmetros bioquímicos que indicaram morte celular de plantas AtAGB1 não se repetiram quando as mesmas estavam transformadas em *background* BiPD-Ox (Fig. S6). Foi possível observar que em plantas superexpressando BiP houve uma menor coloração com

Azul de Evans, além de também ser revertido a taxa de perda de clorofila total em plantas AtAGB1 sob as mesmas condições (Fig. 5 e S6).

Em seguida, verificou-se se as características observadas em ensaios de indução de estresse do retículo endoplasmático se repetiriam em condições de estresse hídrico. Linhagens AtAGB1-Ox demonstraram ser mais sensíveis ao déficit hídrico sendo esse fenótipo revertido quando superexpressada em *background* BiPD (Fig. 7). Plantas BiP-Ox demonstraram ser mais tolerantes ao estresse hídrico, dados similares aos demonstrados por Reis e colaboradores (2016). Foi possível observar que plantas BiPD-Ox/AtAGB1 se comportaram de maneira semelhante, revertendo o fenótipo de maior sensibilidade à seca induzido pela superexpressão de AtAGB1 (Fig. 6). As linhagens BiPD-Ox/AtAGB1 retiveram um maior conteúdo de água na folha em condições de estresse (Fig. 7b) e também demonstraram uma maior taxa de sobrevivência após a re-hidratação (Fig. 7c).

Uma possível explicação para a regulação AtAGB1 na via DCD/NRP refere-se ao perfil de indução de outros componentes do dímero G $\beta\gamma$ . Conforme demonstrado, superexpressão de AtAGB1 nas linhagens AtAGB1-OX não altera significativamente a expressão das subunidades gama (Fig. S4). Porém há uma clara indução dessas proteínas quando submetidas a condições de estresse do RE na linhagem Col-0 (Fig. 8). Fenômeno que não se repete em mutantes nulos *agb1-3* e BiPD-Ox. Pelo contrário, nessas últimas linhagens as proteínas AGG2 (em linhagem *agb1-3*) e AGG3 tiveram sua expressão reprimida. Já AGG1 e AGG2 (em linhagem BiPD-Ox) não tiveram aumentos significativos de sua expressão induzida por tunicamicina. Esses resultados se assemelham muito ao perfil de expressão de *AGB1* induzidos por PEG e tunicamicina, onde houve uma evidente atenuação da expressão de *AGB1* em plantas BiPD-Ox. Coletivamente, estes resultados indicam que o dímero G $\beta\gamma$  está envolvido com a via de sinalização modulada pelo chaperone molecular BiP que, similarmente ao mutante *agb1-3*, exerce um controle transcricional em G $\gamma$  em condições de estresse.

## Discussão

O complexo da proteína G heterotrimérica é composto por três subunidades, G $\alpha$ , G $\beta$  e G $\gamma$ , sendo que G $\alpha$ , G $\beta$  são representadas por apenas uma cópia no genoma de Arabidopsis, enquanto que G $\gamma$  possui três cópias gênicas (Urano *et al.*, 2016). A ativação do complexo é dependente da troca GDP-GTP na subunidade G $\alpha$ , dissociando o complexo em dois módulos G $\alpha$ -GTP e G $\beta\gamma$ , ativando efetores e desencadeando sinais a jusante (Pandey, 2019).

A subunidade G $\beta$  de Arabidopsis, AtAGB1, está associada à membrana do retículo

endoplasmático e pode estar envolvida com sinais de morte celular desencadeado por estresse nessa organela (Wang *et al.*, 2007). Além disso, tem sido demonstrado que a proteína G heterotrimérica está envolvida em respostas a outros sinais bióticos e abióticos, incluindo luz, salinidade, seca, patógenos, entre outros (Liang *et al.*, 2018; Maruta *et al.*, 2015; Pandey, 2017).

Nesta investigação, foram fornecidas diversas linhas de evidências indicando que AtAGB1 pode atuar como um componente a montante da via de sinalização mediada por DCD/NRP, que induz morte celular em condições de estresses. Inicialmente foi demonstrado que a indução por estresse osmótico dos componentes da via de sinalização de morte celular, *NRP1*, *NRP2*, *ANAC36* e *VPE*, requer a função de AGB1. Além disso, foi demonstrado que *AGB1* é induzido por estresse osmótico e do RE e que a perda de função de AGB1 aumenta a tolerância à morte celular induzida por estresse do RE, similarmente aos fenótipos exibidos pelos mutantes alelos nulos dos componentes da via de sinalização de morte celular. Reintrodução de AGB1 em *agb1-3* reverteu o fenótipo de tolerância aumentada à morte celular e superexpressão de AGB1 promoveu maior sensibilidade à morte celular induzida por estresses. Finalmente, foi demonstrado que, enquanto a inativação de AGB1 promove tolerância à seca, superexpressão de AGB1 promove maior susceptibilidade ao déficit hídrico, fenótipo este revertido pela superexpressão de BiP, que foi demonstrado regular a expressão de AGB1 e das subunidades gama da proteína G heterotrimérica, parceiras de sinalização de AGB1 (Fig. 2 e Fig. 8) e dos componentes da via de sinalização de morte celular induzida por DCD/NRP1 (Reis *et al.*, 2016).

A via de sinalização de morte celular mediada por proteínas NRPs pode ser derivada de estresses do RE, sendo exclusiva de plantas, diferentemente de outras vias de resposta a proteínas mal dobradas. Essa via de sinalização atua na comunicação de respostas a estímulos ambientais através de componentes compartilhados, podendo ser ativada em resposta a sinais de estresse osmótico, por seca e diretamente do retículo endoplasmático. A integração desses sinais irá terminar com a indução de morte celular programada, sendo esta uma resposta adaptativa a estímulos ambientais (Valente *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2011; Reis e Fontes, 2012; Mendes *et al.*, 2013; Pimenta *et al.*, 2016; Reis *et al.*, 2016).

*A via de morte celular mediada por DCD/NRP1 depende parcialmente dos transdutores de sinal da UPR em condições de estresse osmótico*

O mecanismo clássico de ativação da via de morte celular mediada por DCD/NRP coloca essa via como responsiva a múltiplos sinais de estresses abióticos (Isrigler *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2011; Reis e Fontes, 2012; Mendes *et al.*, 2013, Carvalho *et al.*,

2014a, 2014b). Como parte das consequências da progressão de sinal desses estresses, ocorre uma alteração na homeostase do RE resultante de mecanismos adaptativos da via de UPR, bem como mecanismos de ativação de cascata de morte celular. Foi possível observar que esta via de morte celular, principalmente o componente NRP1, é dependente de mecanismos de sinalização advindos de transdutores presentes na membrana do RE, AGB1 e IRE1a.

De maneira interessante, em plantas *ire1a* ocorreu uma indução da expressão do componente ANAC036 com a progressão do estresse no RE. Isso demonstra um indício de comunicação dessa via de morte celular com outras vias responsivas a estresse osmótico, que aparentemente independem de IRE1a e NRP1. Isto devido ao fato do fator de transcrição NAC089 também ser responsivo a estresse do retículo e assim como ANAC036 ativa processo de morte celular programada (Yang et al., 2014; Reis *et al.*, 2016). NAC089 aparentemente pode ser ativado por mais de um dos transdutores presentes na membrana do retículo, da mesma maneira que nossos dados indicam indução da expressão de ANAC036 de maneira independente de IRE1a e do componente a montante NRP1. Dessa forma, um mecanismo adicional que conecte a atuação desses fatores de transcrição em resposta a estresse no RE não pode ser descartado.

Já em plantas *bzip28* nós verificamos indução do NRP1 (componente a montante da via de morte celular DCD/NRP) e ausência da indução de componentes a jusante (módulo NRP2/ANAC036) em condições de estresse osmótico, contrariando o mecanismo clássico descrito anteriormente por Reis e colaboradores (2016). Aparentemente a simples indução da expressão de NRP1 não é suficiente para progressão do sinal no módulo DCD/NRP. A proteína NRP1 já demonstrou ser alvo de modificações pós-traducionais como fosforilação em resposta a ABA. Sendo seu estado de fosforilação fundamental para mecanismos a jusante de resposta a ABA (Zhu *et al.*, 2018). Dessa maneira, modificações pós-traducionais, e não apenas o aumento da expressão gênica, podem ser necessárias para progressão do sinal para o módulo NRP2/ANAC036 que culminaria no processo de morte celular, em condições de estresse osmótico e do RE.

#### *AtAGB1 atua como um regulador positivo da via de morte celular mediada por NRP*

Neste trabalho foi caracterizado uma nova função para a subunidade G $\beta$  da proteína G heterotrimérica de Arabidopsis, atuando como possível componente da via integrativa responsiva à estresse osmótico e do retículo endoplasmático DCD/NRP. Nossa hipótese era que AtAGB1 iria atuar como um transdutor de sinal vindo do retículo endoplasmático, culminando com a resposta adaptativa dos outros integrantes da via. Primeiramente foram

identificados possíveis transdutores de sinais presentes na membrana do retículo endoplasmático que poderiam atuar como integrante dessa via. Linhagens mutantes nulos de transdutores de sinais foram submetidas a condições de estresse osmótico e a via DCD/NRP demonstrou ser dependente de AtAGB1 para o desencadeamento do sinal de estresse. Em seguida foi observado que plântulas *agb1-3* se comportaram de maneira bem semelhante à plântulas BiP-Ox quando expostas a condições de estresse. Em ambas as situações houve um retardamento/inibição da expressão de genes componentes dessa via. Dessa maneira AtAGB1 foi identificado por atuar em resposta à estresse osmótico e do retículo endoplasmático de maneira semelhante ao chaperone molecular BiP (Valente *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2015; Reis *et al.*, 2016).

#### *Atuação de AtAGB1 como integrante a montante da via é dependente de condições de estresse*

Tem sido demonstrado que a subunidade beta de proteína G heterotrimérica está envolvida em respostas celulares diversas, como germinação, desenvolvimento, resposta a fitormônios, resposta ao estresse e regulação de abertura estomatal (Pandey e Assmann, 2004; Joo *et al.*, 2005; Llorente *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008, 2015, 2017; Tsugama *et al.*, 2013; Ge *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015).

As subunidades da proteína G também parecem desempenhar papéis importantes como moduladoras do processo de morte celular. Tem sido demonstrado que plântulas de *Arabidopsis* mutantes para a proteína G $\beta$  (*agb1-2*) demonstraram maior tolerância ao estresse induzido por tunicamicina, quando comparadas com linhagens selvagens e com mutantes nulos da subunidade G $\alpha$  (Wang *et al.*, 2007). G $\beta$  parece estar associada a membrana do retículo endoplasmático e a ativação de via de resposta a proteínas mal dobradas leva à degradação de G $\beta$  ao contrário de G $\alpha$ . Dessa maneira, parece que há eventos de sinalização mediados por G $\beta$ , estabilizado por G $\gamma$ , independente da atuação de G $\alpha$ , atuando na via de morte celular ativada por estresse no retículo endoplasmático.

Como a via mediada por DCD/NRP integra um sinal derivado de estresses do retículo endoplasmático, foi examinado se a simples superexpressão de AGB1 seria suficiente para desencadear a expressão de componentes dessa via de morte celular. Em condições normais, a superexpressão de AtAGB1 por si só não leva ao processo de morte celular, o que contrasta com os dados dos outros componentes da via (Reis *et al.*, 2016) e não induz a expressão dos genes *NRP1*, *NRP2* e *ANAC036*. Estes resultados indicam que provavelmente AGB1 precisa ser ativada por sinais de estresses reconhecidos pelo módulo de sinalização G $\beta\gamma$ , propriedade

inerente de transdutores de sinais.

Em seguida, foi demonstrado que mutantes nulos *agb1-3* mimetizam os fenótipos de tolerância a estresses de mutantes nulos de integrantes da via de sinalização de morte celular e de plântulas superexpressando BiP, modulador negativo desse programa de morte celular. Em cenário posterior, plantas superexpressando AtAGB1 foram submetidas a condições de estresse e demonstraram ser mais sensíveis, atuando dessa maneira como um intensificador do sinal derivado do retículo endoplasmático.

*Superexpressão de AtAGB1 leva a fenótipo mais sensível a seca, cenário que é revertido quando AtAGB1 está superexpressa em background BiP*

A função de G $\beta$  frente a tolerância/sensibilidade à seca foi anteriormente analisada por Xu e colaboradores (2015). De acordo com os autores, plantas mutantes para a subunidade G $\beta$  (*agb1-2*) foram mais tolerantes à seca que plantas selvagens. A proteína AtAGB1 interagiu com a proteína cinase AtMPK6 que tem capacidade de fosforilar AtVIP1, que é um fator de transcrição responsivo à ácido abscísico (ABA). Assim propuseram que AtAGB1 está envolvida na via de tolerância à seca e responsiva à ABA regulando negativamente a cascata de sinalização mediada por AtMPK6.

Em arroz, a tolerância ao estresse por seca e na sinalização a partir de exposição à ABA são repostas mediadas pelas subunidades G $\beta$  e G $\gamma$  de plantas (Zhang *et al.*, 2015). Mutantes para G $\gamma$  levaram a aumento da tolerância à seca em arroz enquanto mutantes para G $\beta$  reduziram a tolerância à seca. Já em experimentos com indução com ABA, transcritos de G $\gamma$  decresceram com aumento de indução, ao contrário de G $\beta$  que aumentaram. Dessa forma G $\beta$  pode ser visto como um regulador positivo para ABA e adaptação à seca, ao contrário de G $\gamma$  que seria negativo, modulado por G $\beta$  (Zhang *et al.*, 2015).

Nossos dados demonstraram que mutantes *agb1-3* são mais tolerantes a condições de seca do que a linhagem Col-0, fenótipo que poder ser associado a um atraso do desencadeamento de morte celular programada mediado pela via DCD/NRP. Situação semelhante foi observada quando linhagens superexpressando G $\beta$  foram mais sensíveis a condições de seca, do que Col-0.

O chaperone BiP atuou de maneira correlata na modulação da resposta ao estresse em plantas mediado por G $\beta$  e por DCD/NRP. Sabe-se que BiP atua como modulador da via de sinalização mediada por DCD/NRP; assim, foram obtidas plantas superexpressando AtAGB1

em background BiPD-Ox para analisar se este também iria modular a resposta mediada por G $\beta$ . Como AtAGB1 atua como transdutor de sinal à montante de DCD/NRP não foi surpresa a observação de que superexpressão de BiP simultaneamente à superexpressão de AtAGB1 em plântulas BiPD-Ox/AtAGB1 reverteram o fenótipo de sensibilidade ao estresse de plântulas superexpressando AtAGB1 no background Col-0. Situação observada tanto em cenário de estresse induzido do retículo endoplasmático quando no estresse por seca.

Em resumo, AtAGB1 foi identificado como um transdutor de morte celular mediada por DCD/NRP, a ausência de AtAGB1 nas células promove maior tolerância ao estresse hídrico e do retículo endoplasmático e menor expressão de genes de morte celular mediada por NRP/DCD, sendo este novo componente também controlado por superexpressão de BiP.

### Referências bibliográficas

- Alves MS, Reis PAB, Dadalto SP, Faria JAQA, Fontes EPB, Fietto LG. 2011.** A Novel Transcription Factor, ERD15 (Early Responsive to Dehydration 15), Connects Endoplasmic Reticulum Stress with an Osmotic Stress-Induced Cell Death Signal. *The Journal of Biological Chemistry* 286(22):20020–20030.
- Alvim FC, Carolino SMB, Cascardo JCM, Nunes CC, Martinez CA, Otoni WC, Fontes EPB. 2001.** Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiology*, 126:1042-1054.
- Barrs HD, Weatherley PE. 1962.** A Re-Examination of the Relative Turgidity Technique for Estimating Water Deficits in Leaves. *Australian Journal of Biological Sciences*, 15(3):413–428.
- Cascardo JCM, Almeida RS, Buzeli RAA, Carolino SMB, Otoni WC, Fontes EPB. 2000.** The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses. *Journal of Biological Chemistry* 275:14494–500.
- Chakrabarti A, Chen AW, Varner JD. 2011.** A Review of the Mammalian Unfolded Protein Response. *Biotechnology and Bioengineering* 108(12): 2777-2793.
- Chen Y, Brandizzi F. 2012.** AtIRE1A/AtIRE1B and AGB1 independently control two essential unfolded protein response pathways in Arabidopsis. *The Plant Journal* 69(2):266–277.
- Costa MDL, Reis PAB, Valente MAS, Irsigler AST, Carvalho CM, Loureiro ME, Aragão FJL, Boston RS, Fietto LG, Fontes EPB. 2008.** A new branch of endoplasmic reticulum stress

signaling and the osmotic signal converge on plant-specific asparagine-rich proteins to promote cell death. *Journal of Biological Chemistry* 283(29):20209–20219.

**Deng Y, Humbert S, Liu JX, Srivastava R, Rothstein SJ, Howell SH. 2011.** Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:7247–7252.

**Faria JAQA, Reis PAB, Reis MTB, Rosado GL, Pinheiro GL, Mendes GC, Fontes EPB. 2011.** The NAC domain-containing protein, GmNAC6, is a downstream component of the ER stress-and osmotic stress-induced NRP-mediated cell-death signaling pathway. *BMC Plant Biology* 11(129).

**Fath A, Bethke P, Lonsdale J, Meza-Romero R, Jones R. 2000.** Programmed cell death in cereal aleurone. *Plant Molecular Biology* 44(3):255–266.

**Ge XM, Cai H, Lei X, Zhou X, Yue M, He J. 2015.** Heterotrimeric G protein mediates ethylene-induced stomatal closure via hydrogen peroxide synthesis in Arabidopsis. *The Plant Journal* 82(1):138–150.

**Hatsugai N, Yamada K, Goto-Yamada S, Hara-Nishimura I. 2015.** Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. *Frontiers in Plant Science* 6(234).

**Hodges DM, Delong JM, Forney CF, Prange RK. 1993.** Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207:604–611.

**Howell SH. 2013.** Endoplasmic Reticulum Stress Responses in Plants. *Annual Review of Plant Biology* 64:477–499.

**Irsigler AST, Costa MDL, Zhang P, Reis PAB, Dewey RE, Boston RS, Fontes EPB. 2007.** Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways. *BMC Genomics* 8(431).

**Joo JH, Wang SY, Chen JG, Jones AM, Fedoroff NV. 2005.** Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in the Arabidopsis oxidative stress response to ozone. *The Plant Cell* 17(3):957–970.

**Liang X, Ma M, Zhou Z, Wang J, Yang X, Rao S, Bi G, Li L, Zhang X, Chai J, Chen S, Zhou J. 2018.** Ligand-triggered de-repression of *Arabidopsis* heterotrimeric G proteins coupled to immune receptor kinases. *Cell Research* 28:529–543.

**Liu JX, Howell SH. 2010.** Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants. *Plant Cell* 22:1–13.

**Liu JX, Howell SH. 2016.** Managing the protein folding demands in the endoplasmic reticulum

of plants. *New Phytologist* 211(2):418-428.

**Llorente F, Alonso-Blanco C, Sanchez-Rodriguez C, Jorda L, Molina A. 2005.** ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from Arabidopsis are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *The Plant Journal* 43(2):165–180.

**Lombardi L, Ceccarelli N, Picciarelli P, Sorce C, Lorenzi R. 2010.** Nitric oxide and hydrogen peroxide involvement during programmed cell death of *Secchium edule* nucellus. *Physiologia Plantarum* 140(1):89–102.

**Maruta N, Trusov Y, Brenya E, Parekh U, Botella JR. 2015.** Membrane-localized extra-large G proteins and G $\beta\gamma$  of the heterotrimeric G proteins form functional complexes engaged in plant immunity in Arabidopsis. *Plant Physiology* 167:1004–1016.

**Mendes GC, Reis PAB, Calil IP, Carvalho HH, Aragão FJL, Fontes EPB. 2013.** GmNAC30 and GmNAC81 integrate the endoplasmic reticulum stress–and osmotic stress–induced cell death responses through a vacuolar processing enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(48):19627–19632.

**Mishra G, Zhang W, Deng F, Zhao J, Wang X. 2006.** A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*. *Science* 312(5771):264–266.

**Moreno AA, Mukhtar MS, Blanco F, Boatwright JL, Moreno I, Jordan MR, Chen Y, Brandizzi F, Dong X, Orellana A, Pajerowska-Mukhtar KM. 2012.** IRE1/bZIP60–mediated unfolded protein response plays distinct roles in plant immunity and abiotic stress responses. *PLoS ONE* 7(2) e31944.

**Pandey S, Assmann SM. 2004.** The Arabidopsis putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein  $\alpha$  subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *The Plant Cell* 16(6):1616–1632.

**Pandey S, Chen JG, Jones AM, Assmann SM. 2006.** G-protein complex mutants are hypersensitive to abscisic acid regulation of germination and postgermination development. *Plant Physiology* 141(1):243–256.

**Pandey S. 2017.** Heterotrimeric G-protein regulatory circuits in plants: conserved and novel mechanisms. *Plant Signaling & Behavior* 12(6):e1325983.

**Pandey S. 2019.** Heterotrimeric G-Protein Signaling in Plants: Conserved and Novel Mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 70:213–238.

**Peng Y, Chen L, Li S, Zhang Y, Xu R, Liu Z, Liu W, Kong J, Huang X, Wang Y, Cheng B, Zheng L, Li Y. 2018.** BRI1 and BAK1 interact with G proteins and regulate sugar-responsive growth and development in *Arabidopsis*. *Nature Communications* 9: 1522.

**Petrov V, Hille J, Mueller-Roeber B, Gechev TS. 2015.** ROS-mediated abiotic stress-induced

programmed cell death in plants. *Frontiers in Plant Science* 6:69.

**Pimenta MR, Silva PA, Mendes GC, Alves JR, Caetano HDN, Machado JPB, Brustolini OJB, Carpinetti PA, Melo BP, Silva JCF, Rosado GL, Ferreira MFS, Dal-Bianco M, Picoli EAT, Aragão FJL, Ramos HJO, Fontes EPB. 2016.** The Stress-Induced Soybean NAC Transcription Factor GmNAC81 Plays a Positive Role in Developmentally Programmed Leaf Senescence. *Plant & Cell Physiology* 57(5): 1098-1114.

**Pinto MC, Locato V, Gara L. 2012.** Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant, Cell & Environment* 35(2):234–244.

**Reis PAB, Rosado GL, Silva LAC, Oliveira LC, Oliveira LB, Costa MDL, Alvim FC, Fontes EPB. 2011.** The Binding Protein BiP Attenuates Stress-Induced Cell Death in Soybean via Modulation of the N-Rich Protein-Mediated Signaling Pathway. *Plant Physiology* 157(4): 1853–1865.

**Reis PAB, Fontes EPB. 2012.** N-rich protein (NRP)-mediated cell death signaling: a new branch of the ER stress response with implications for plant biotechnology. *Plant Signaling & Behavior* 7:628–632.

**Reis PAB, Carpinetti PA, Freitas PPJ, Santos EGD, Camargos LF, Oliveira IHT, Silva JCF, Carvalho HH, Dal-Bianco M, Soares-Ramos JRL, Fontes EPB. 2016.** Functional and regulatory conservation of the soybean ER stress-induced DCD/NRP-mediated cell death signaling in plants. *BMC Plant Biology* 16:156.

**Ron D, Walter P. 2007.** Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8:519-529.

**Silva PA, Silva JCF, Caetano HDN, Machado JPB, Mendes GC, Reis PAB, Brustolini OJB, Dal-Bianco M, Fontes EPB. 2015.** Comprehensive analysis of the endoplasmic reticulum stress response in the soybean genome: conserved and plant-specific features. *BMC Genomics* 16:783.

**Schroder M, Kaufman RJ. 2005.** ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research* 569:29-63.

**Srivastava R, Deng Y, Shah S, Rao AG, Howell SH. 2013.** BINDING PROTEIN Is a Master Regulator of the Endoplasmic Reticulum Stress Sensor/Transducer bZIP28 in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 25(4):1416-1429.

**Srivastava R, Deng Y, Howell SH. 2014.** Stress sensing in plants by an ER stress sensor/transducer, bZIP28. *Frontiers in Plant Science* 5:59.

**Trusov Y, Rookes JE, Tilbrook K, Chakravorty D, Mason MG, Anderson D, Chen J, Jones AM, Botella JR. 2007.** Heterotrimeric G Protein  $\gamma$  Subunits Provide Functional

Selectivity in G $\beta\gamma$  Dimer Signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell* 19:1235-1250.

**Tsugama D, Liu S, Takano T. 2013.** A bZIP protein, VIP1, interacts with Arabidopsis heterotrimeric G protein  $\beta$  subunit, AGB1. *Plant Physiology. Biochemistry* 71:240–246.

**Urano D, Miura K, Wu Q, Iwasaki Y, Jackson D, Jones AM. 2016.** Plant Morphology of Heterotrimeric G Protein Mutants. *Plant & Cell Physiology* 57(3):437-445.

**Valente MAS, Faria JAQA, Soares-Ramos JRL, Reis PAB, Pinheiro GL, Piovesan ND, Morais AT, Menezes CC, Cano MAO, Fietto LG, Loureiro ME, Aragão FJL, Fontes EPB. 2009.** 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.

**Wan S, Jiang L. 2016.** Endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolded protein response (UPR) in plants. *Protoplasma* 253(3):753-764.

**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(10): 3817-3822.

**Wellburn AR. 1994.** 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.

**Xiong L, Lee H, Ishitani M, Zhu JK. 2002.** Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the *LOS6/ABA1* locus in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 277: 8588-8596.

**Xu D, Chen M, Ma Y, Xu Z, Li L, Chen Y. 2015.** A G-Protein  $\beta$  subunit, AGB1, negatively regulates the ABA response and drought tolerance by down-regulating AtMPK6-related pathway in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 10(1):e0116385.

**Yang Z-T, Wang M-J, Sun L, Lu S-J, Bi D-L, Sun L, Song Z-T, Zhang S-S, Zhou S-F, Liu J-X. 2014.** The membrane-associated transcription factor NAC089 controls ER-stress-induced programmed cell death in plants. *PLoS genetics* 10(3): e1004243.

**Young TE, Gallie DR. 2000.** Programmed cell death during endosperm development. *Plant Molecular Biology* 44(3):283–301.

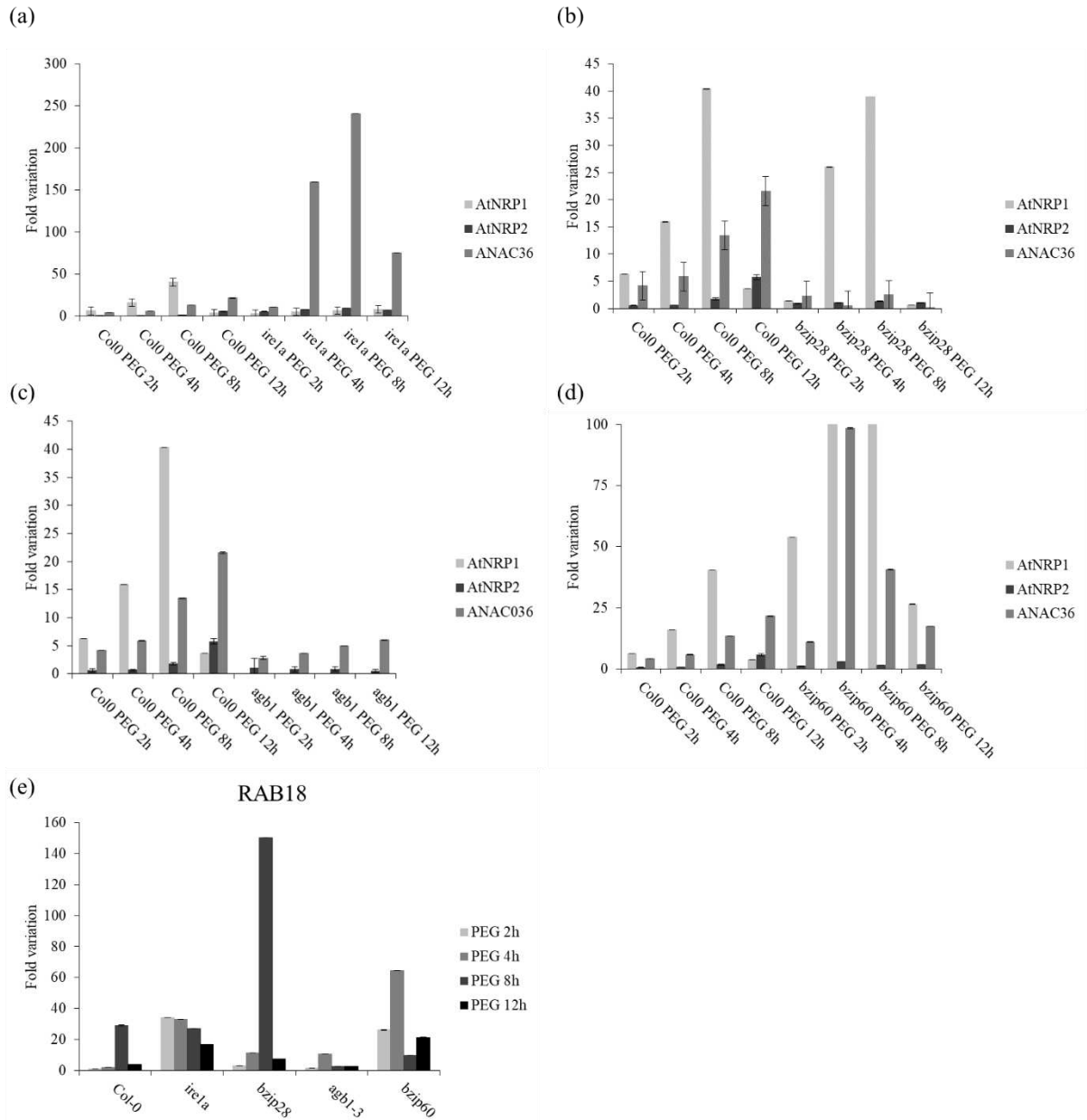
**Zhang D, Zhou Y, Yin J, Yan X, Lin S, Xu W, Baluska F, Wang Y, Xia Y, Liang G, Liang J. 2015.** Rice G-protein subunits *qPE9-1* and *RGB1* play distinct roles in abscisic acid responses and drought adaptation. *Journal of Experimental Botany* 66(20):6371-6384.

**Zhang L, Hu G, Cheng Y, Huang J. 2008.** Heterotrimeric G protein  $\alpha$  and  $\beta$  subunits antagonistically modulate stomatal density in *Arabidopsis thaliana*. *Developmental Biology* 324(1):68–75.

**Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH. 2006.** Agrobacterium- mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral-dip method. *Nature Protocols* 1: 641–646.

**Zhu T, Wu Y, Yang X, Chen W, Gon Q, Liu X. 2018.** The asparagine-rich protein NRP facilitates the degradation of the PP6-type phosphatase FyPP3 to promote ABA response in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 11:257–268.

## Figuras



**Figura 1. A ativação da via DCD/NRP1 por estresses é dependente de AtAGB1 e regulada negativamente por AtbZIP60.**

(a) AtIRE1A não interfere na indução do módulo NRP2/ANAC36. Níveis de transcritos de DCD/NRP (AtNRP1, AtNRP2 e AtANAC036) foram quantificados por qRT-PCR em plântulas Col-0 e *ire1A* utilizando PEG 10% (p/v) como indutor de estresse osmótico expostas por 2h, 4h, 8h e 12h. Expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta Ct}$ , e AtUBQ5 foi utilizado como controle endógeno. Barras de erros representam intervalo de confiança de 95% baseado em cinco replicatas biológicas.

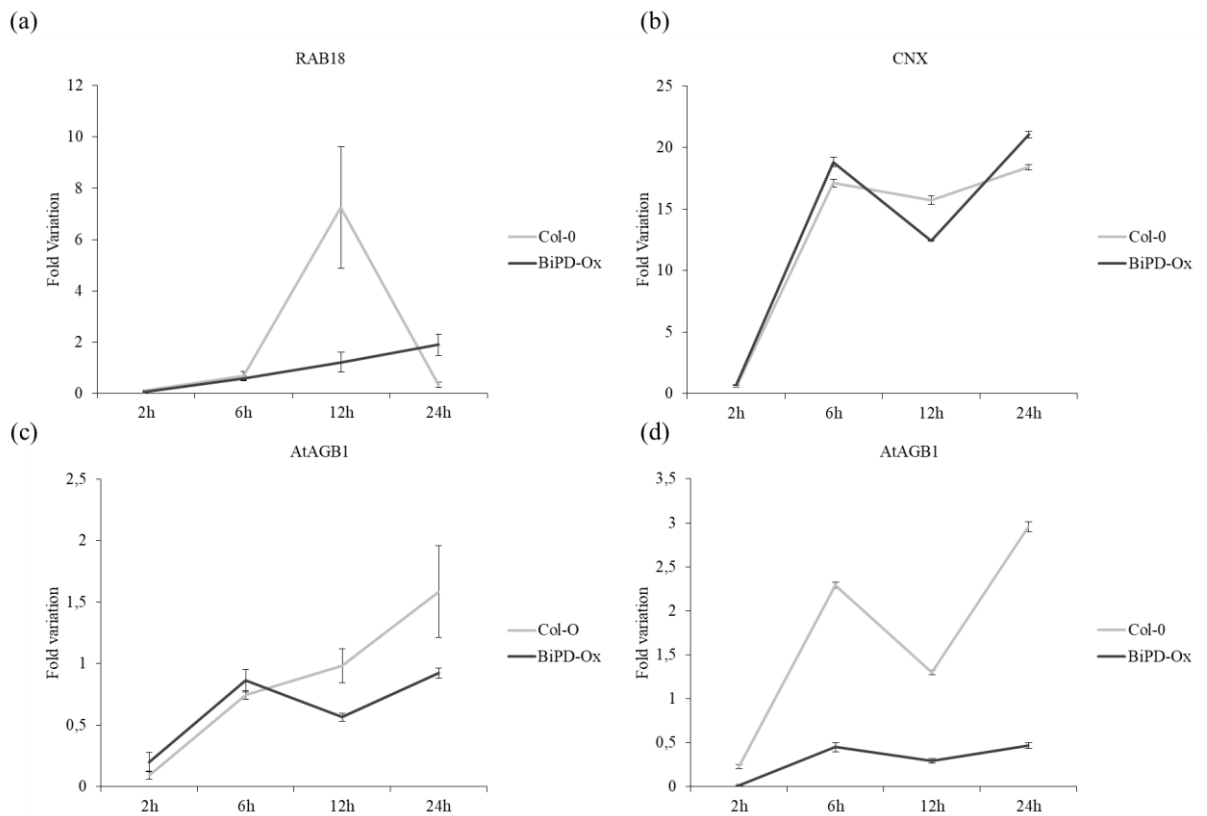
(b) AtbZIP28 não interfere na indução de AtNRP1 em condições de estresse osmótico. Níveis

de transcritos de DCD/NRP1 (AtNRP1, AtNRP2 e AtANAC036) foram quantificados por qRT-PCR em plântulas Col-0 e *bZIP28* utilizando PEG 10% (p/v) como indutor de estresse osmótico expostas por 2h, 4h, 8h e 12h. Expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta Ct}$ , e AtUBQ5 foi utilizado como controle endógeno. Barras de erros representam intervalo de confiança de 95% baseado em cinco replicatas biológicas.

(c) A ausência de AtAGB1 previne a indução da via de morte celular mediada por DCD/NRP1 sob condições de estresse osmótico. Níveis de transcritos de DCD/NRP (AtNRP1, AtNRP2 e AtANAC036) foram quantificados por qRT-PCR em plântulas Col-0 e *agb1-3* utilizando PEG 10% (p/v) como indutor de estresse osmótico expostas por 2h, 4h, 8h e 12h. Expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta Ct}$ , e AtUBQ5 foi utilizado como controle endógeno. Barras de erros representam intervalo de confiança de 95% baseado em cinco replicatas biológicas.

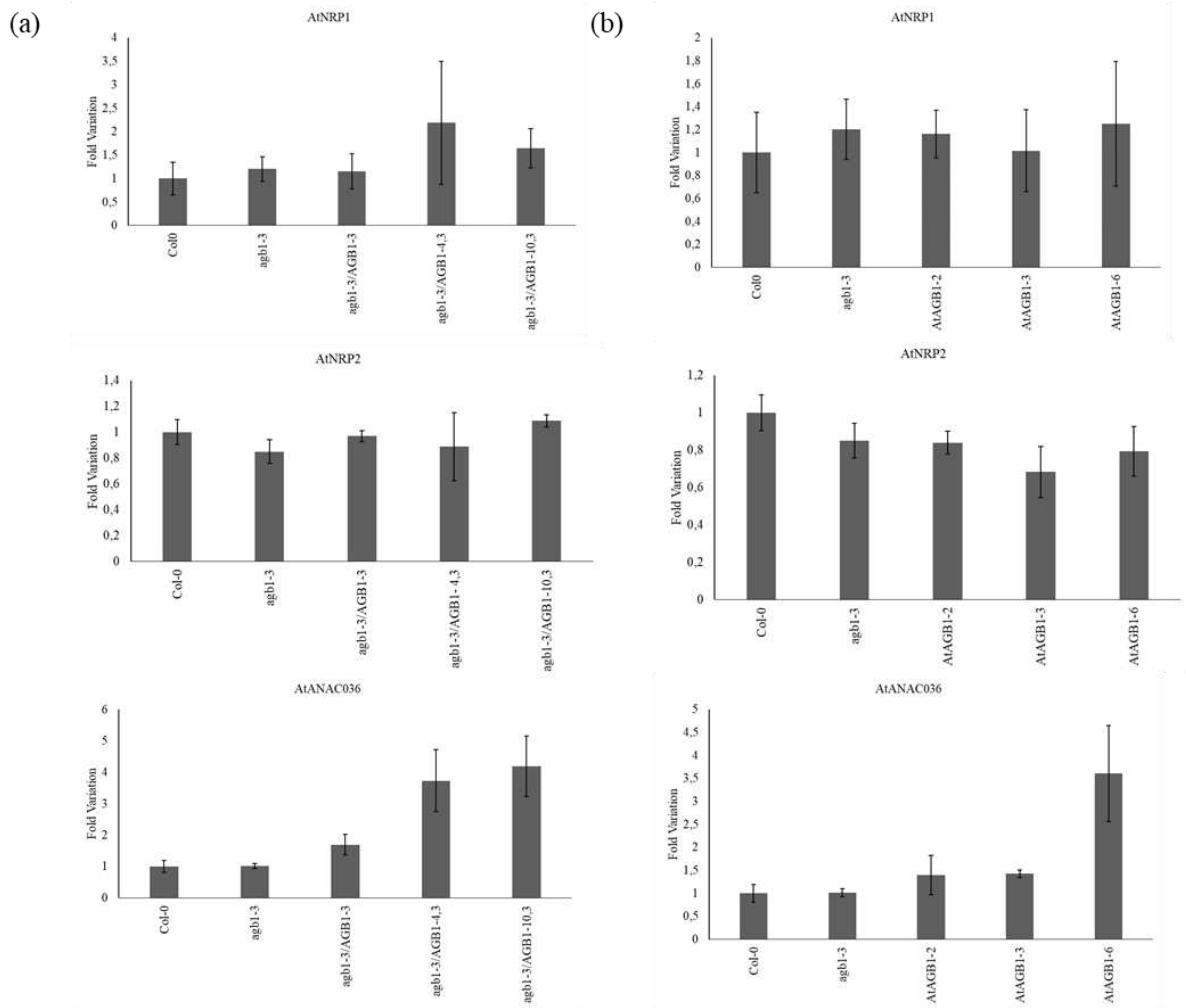
(d) AtbZIP60 regula negativamente a indução dos genes componentes da via de morte celular mediada por DCD/NRP1 em condições de estresse osmótico. Níveis de transcritos de DCD/NRP (AtNRP1, AtNRP2 e AtANAC036) foram quantificados por qRT-PCR em plântulas Col-0 e *bZIP60* utilizando PEG 10% (p/v) como indutor de estresse osmótico expostas por 2h, 4h, 8h e 12h. Expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta Ct}$ , e AtUBQ5 foi utilizado como controle endógeno. Barras de erros representam intervalo de confiança de 95% baseado em cinco replicatas biológicas.

(e) Níveis de transcritos de RAB18, marcador de estresse osmótico, em plântulas submetidas a tratamento com PEG 10% (p/v) expostas por 2h, 4h, 8h e 12h. O RNA total foi isolado de plântulas de *Arabidopsis* 15 dias após a germinação. Expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta Ct}$ , e AtUBQ5 foi utilizado como controle endógeno. Barras de erros representam intervalo de confiança de 95% baseado em cinco replicatas biológicas.



**Figura 2 AtAGB1 é induzido sob condições de estresse osmótico e do retículo endoplasmático.**

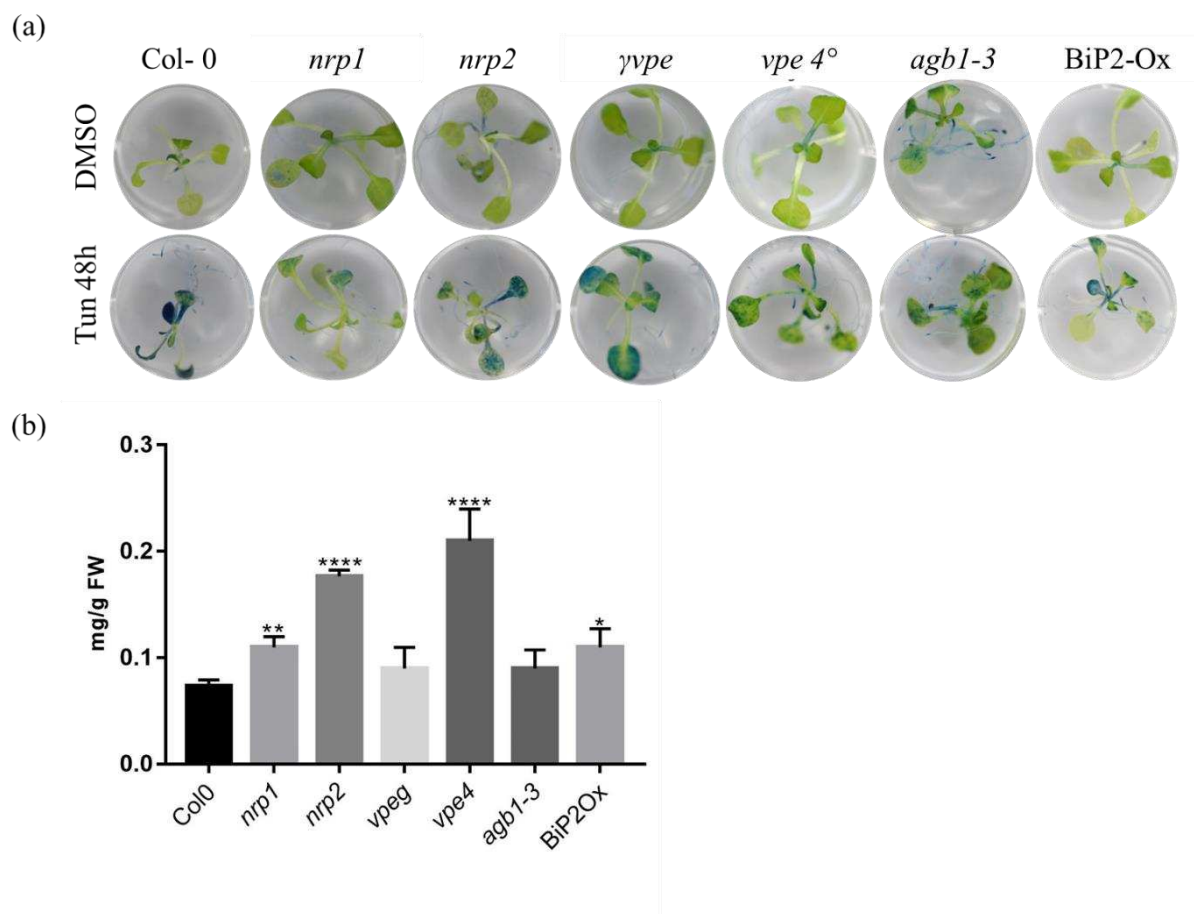
RNA total extraído de plântulas após quinze dias de germinação submetidas à estresse com PEG (10% p/v) (a) e (c) e tunicamicina (2,5 µg/mL) (b) e (d) por 2 h, 6 h, 12 h e 24 h. H<sub>2</sub>O foi usada como controle negativo para estresse por PEG e DMSO usado como controle negativo de estresse com tunicamicina. Expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , e AtUBQ5 foi utilizado como controle endógeno. Barras de erros representam intervalo de confiança de 95% baseado em três replicatas biológicas.



**Figura 3. AtAGB1 não induz os genes da via de morte celular mediada por DCD/NRP1 em condições normais.**

(a) Níveis de transcritos dos componentes da via de morte celular mediada por DCD/NRP1 foram quantificados por qRT-PCR em linhagens Col-0, *agb1-3* e linhagens complementadas com gene AtAGB1 (*agb1-3/AGB1*). A expressão relativa dos genes foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  e AtActina foi utilizada como controle endógeno. Barras de erros representam intervalo de confiança de 95% baseado em três replicatas biológicas.

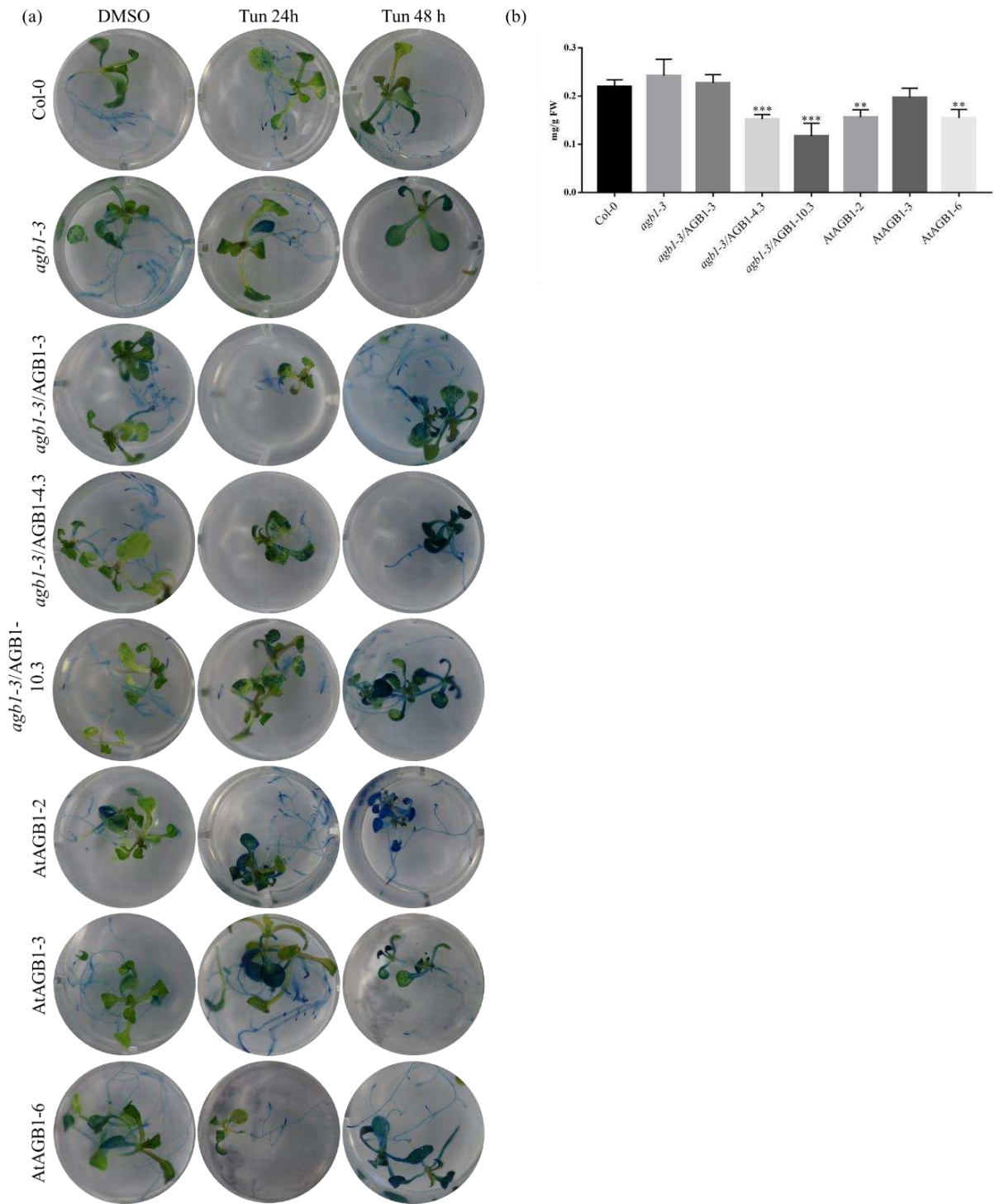
(b) Expressão relativa dos genes componentes da via de morte celular DCD/NRP1 foram quantificados por qRT-PCR em linhagens Col-0, *agb1-3* e plantas transgênicas superexpressando o gene AtAGB1 (AtAGB1). Expressão relativa dos genes foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , e AtActina foi utilizada como controle endógeno. Barras de erros representam intervalo de confiança de 95% baseado em três replicatas biológicas.



**Figura 4. AtAGB1 está envolvida no processo de morte celular mediado por DCD/NRP1 induzida por estresse do retículo endoplasmático**

(a) Diminuição de morte celular no mutante *agb1-3*. Plântulas de Arabidopsis Col-0, mutantes nulos de proteínas envolvidas na via DCD/NRP (*nrp1*, *nrp2*, *vpeg*, *vpe4*), mutante nulo da proteína AtAGB1, *agb1-3*, e planta transgênica superexpressando a proteína BiP (BiP2-Ox) foram tratadas com DMSO ou tunicamicina (10 µg/mL) por 48 horas e, em seguida, coradas com Azul de Evans 2% p/v.

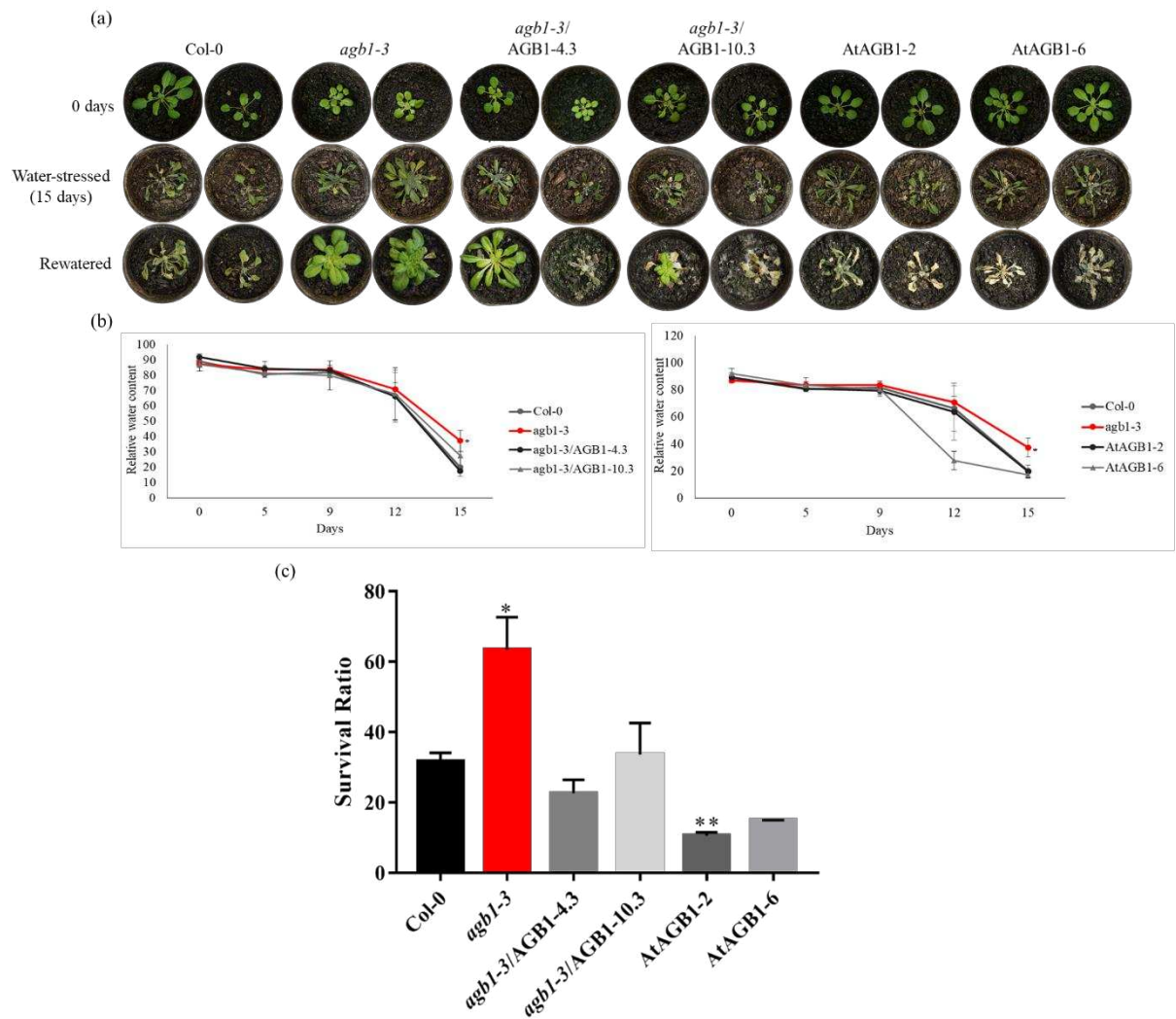
(b) Conteúdo de clorofila total de plântulas de Arabidopsis sob condições de estresse no retículo endoplasmático. A quantificação de clorofila total das linhagens foi realizada após a exposição à tunicamicina (10 µg/mL) por 48 horas. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste t ( $p < 0,05$ ) baseado em três replicatas biológicas.



**Figura 5. Expressão de AtAGB1 induz aumento do processo de morte celular em plântulas submetidas a estresse do retículo endoplasmático.**

(a) Superexpressão de AGB1 aumenta morte celular induzida por tunicamicina. Plântulas transgênicas de *Arabidopsis*, conforme indicado na figura, foram tratadas tunicamicina (10 µg/mL) por 24 e 48 horas ou DMSO por 48 horas e, em seguida, coradas com Azul de Evans 2% p/v.

(b) Conteúdo de clorofila total de plântulas transgênicas de *Arabidopsis* sob condições de estresse no retículo endoplasmático. A quantificação de clorofila total das linhagens foi realizada após exposição à tunicamicina (10 µg/mL) por 48 horas. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste t ( $p < 0,05$ ) baseado em três replicatas biológicas.



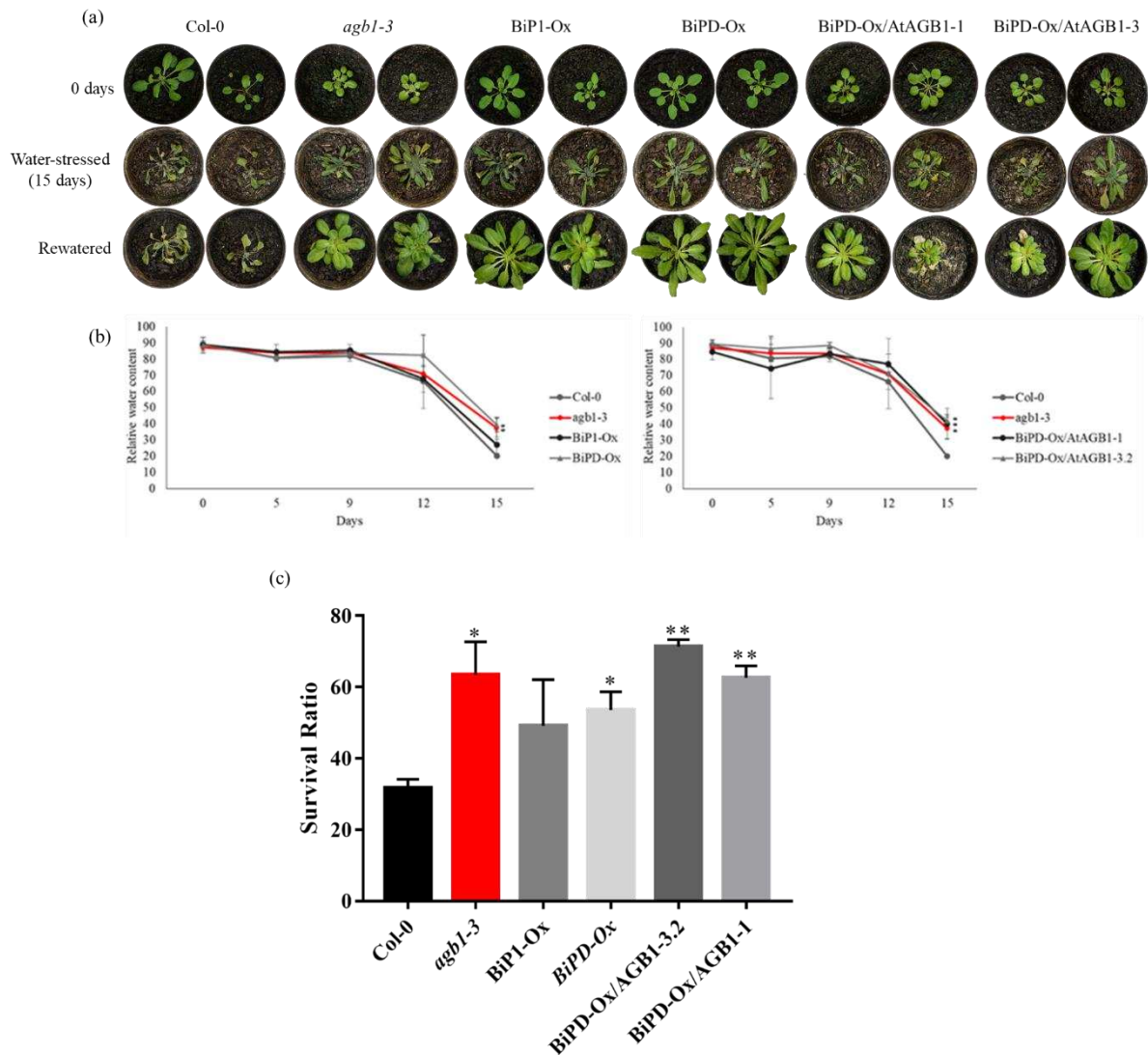
**Figura 6. Sensibilidade ao estresse hídrico em linhagens superexpressando AtAGB1**

(a) Linhagens transgênicas sob condições de estresse hídrico. *Arabidopsis* Col-0, *agb1-3*, transgênicas independentemente transformadas superexpressando-AtAGB1 (35S:YFP-AGB1) e linhagens transgênicas independentemente complementadas (*agb1-3/35S:YFP-AGB1*) foram crescidas em solo e posteriormente induzido estresse hídrico com a interrupção da irrigação durante 15 dias. Passado o período de estresse, foram re-hidratadas e fotografadas após 2 dias.

(b) Teor relativo de água de folhas das linhagens submetidas ao estresse hídrico de 15 dias.

Barras de erros representam intervalo de confiança de 95% baseado em replicatas biológicas (n=3) de dois experimentos diferentes. Asterisco (\*) indica diferença estatística significativa pelo teste t ( $p < 0,05$ ). Resultados representam dados de três experimentos independentes.

(c) Taxa de sobrevivência das linhagens expostas ao estresse hídrico. Resultados representam dados de dois experimentos independentes. (\*) e (\*\*) indicam diferença estatística significativa pelo teste t ( $p < 0,05$ ) e ( $p < 0,01$ ), respectivamente.



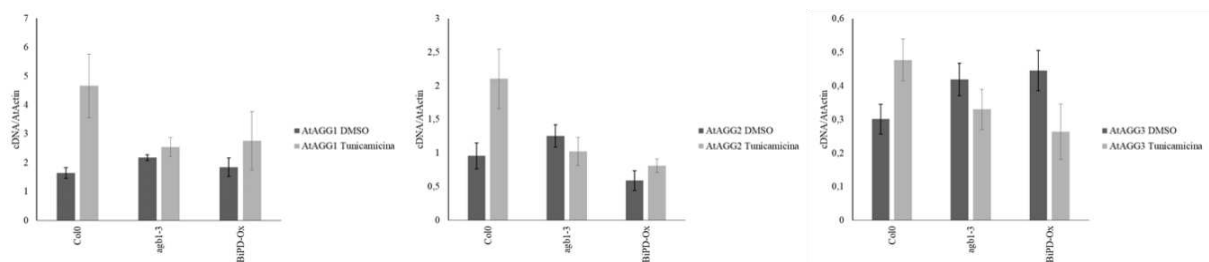
**Figura 7. A superexpressão de BiP previne o efeito negativo de AtAGB1 em condições de deficit hídrico**

(a) Linhagens transgênicas sob condições de estresse hídrico. Plantas transgênicas de Arabidopsis Col-0, superexpressando BiP (BiP1-Ox e BiPD-Ox) e superexpressando BiP e AtAGB1 (BiPD/AtAGB1) foram crescidas em solo e posteriormente induzido estresse hídrico com a interrupção da irrigação durante 15 dias. Passado o período de estresse, foram re-

hidratadas e fotografadas após 2 dias.

(b) Teor relativo de água de folhas das linhagens submetidas ao estresse hídrico de 15 dias. Barras de erros representam intervalo de confiança de 95% baseado em replicatas biológicas (n=3) de dois experimentos diferentes. Asterisco (\*) indica diferença estatística significativa pelo teste t ( $p < 0,05$ ). Resultados representam dados de três experimentos independentes.

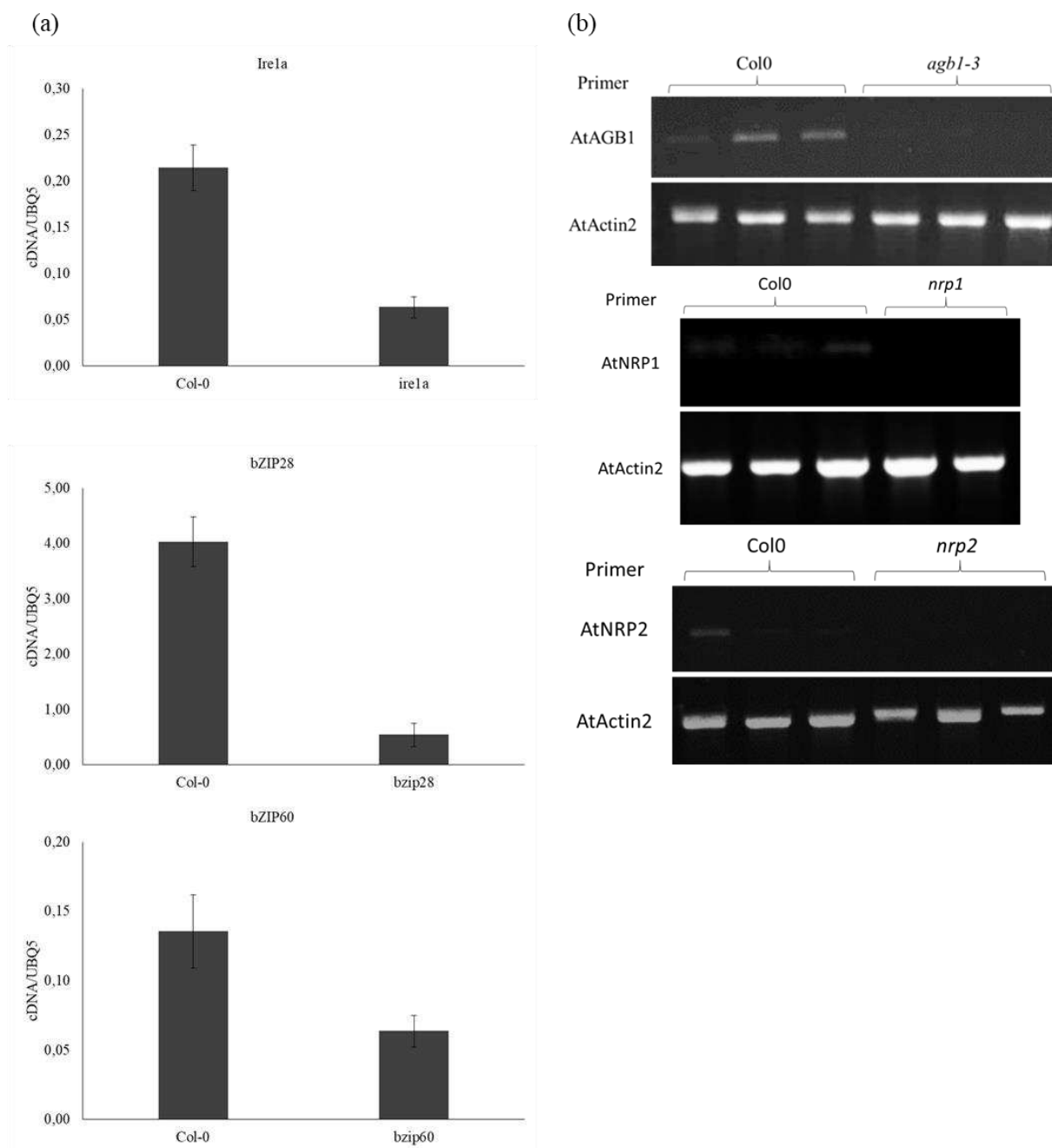
(c) Taxa de sobrevivência das linhagens expostas ao estresse hídrico. (\*) e (\*\*) indicam diferença estatística significativa pelo teste t ( $p < 0,05$ ) e ( $p < 0,01$ ), respectivamente. Resultados representam dados de dois experimentos independentes.



**Figura 8** Expressão de  $G\gamma$  por estresse no retículo é atenuado em linhagens *agb1-3* e *BiPD-Ox*.

Níveis de transcritos dos genes componentes da  $G\gamma$  (*AtAGG1*, *AtAGG2* e *AtAGG3*) em plântulas *Col-0*, *agb1-3* e *BiPD-Ox* submetidas a tratamento com tunicamicina  $2,5\mu\text{M}$  por 8 horas. O RNA total foi isolado de plântulas de *Arabidopsis* 15 dias após a germinação. Expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ , e *AtActin* foi utilizado como controle endógeno. Barras de erros representam intervalo de confiança de 95% baseado em três replicatas biológicas.

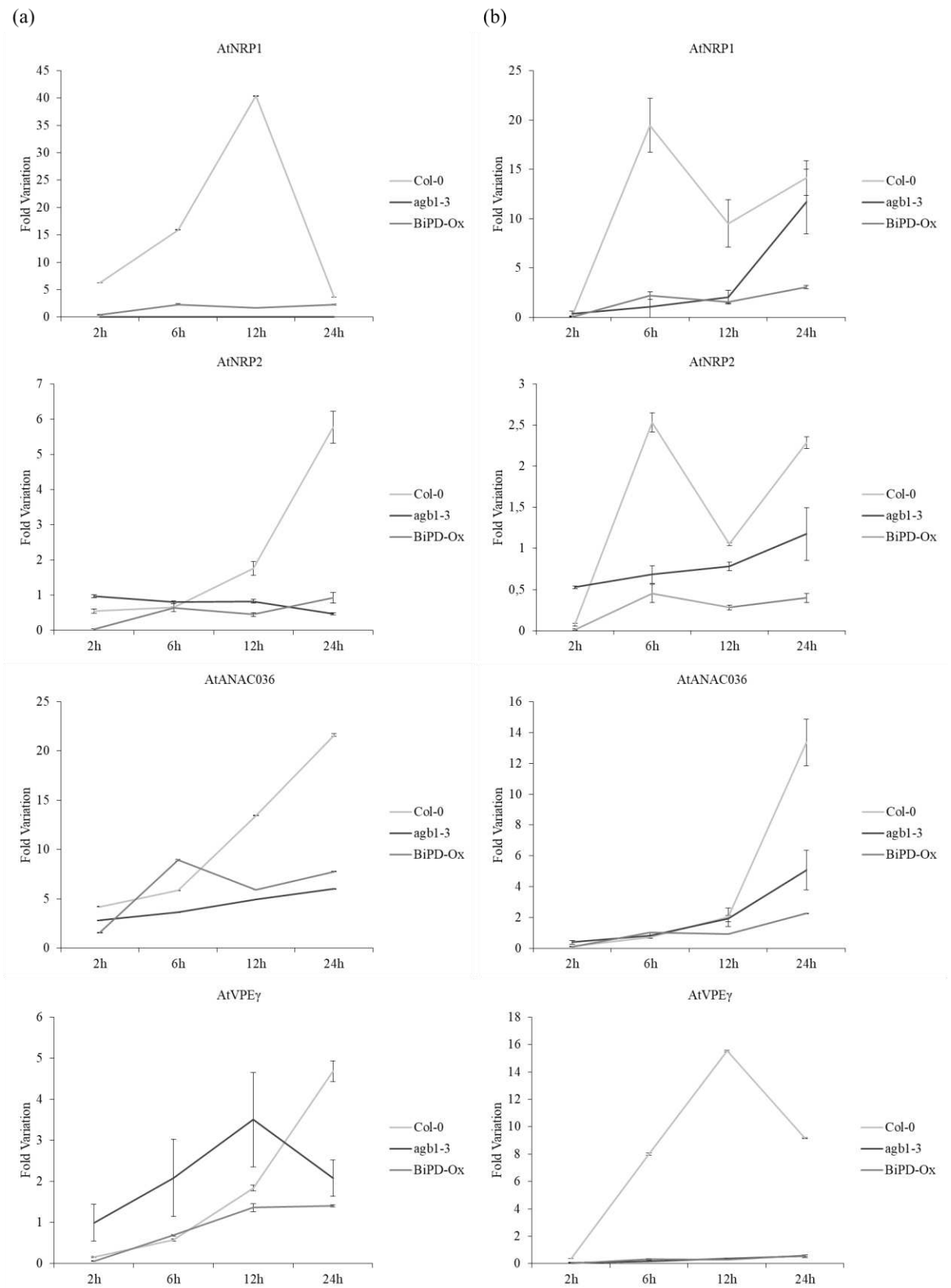
## Informações suplementares



**Fig. S1 Acúmulo de transcritos nos mutantes nulos por inserção de T-DNA.**

(a) Acúmulo de transcritos de *AtIre1A*, *AtIre1B*, *AtbZIP17*, *AtbZIP28* e *AtbZIP60* em linhagens mutantes nulas determinados por qRT-PCR. Expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta C_t}$ , e *AtUBQ5* foi utilizado como controle endógeno. Barras de erros representam intervalo de confiança de 95% baseado em três replicatas biológicas.

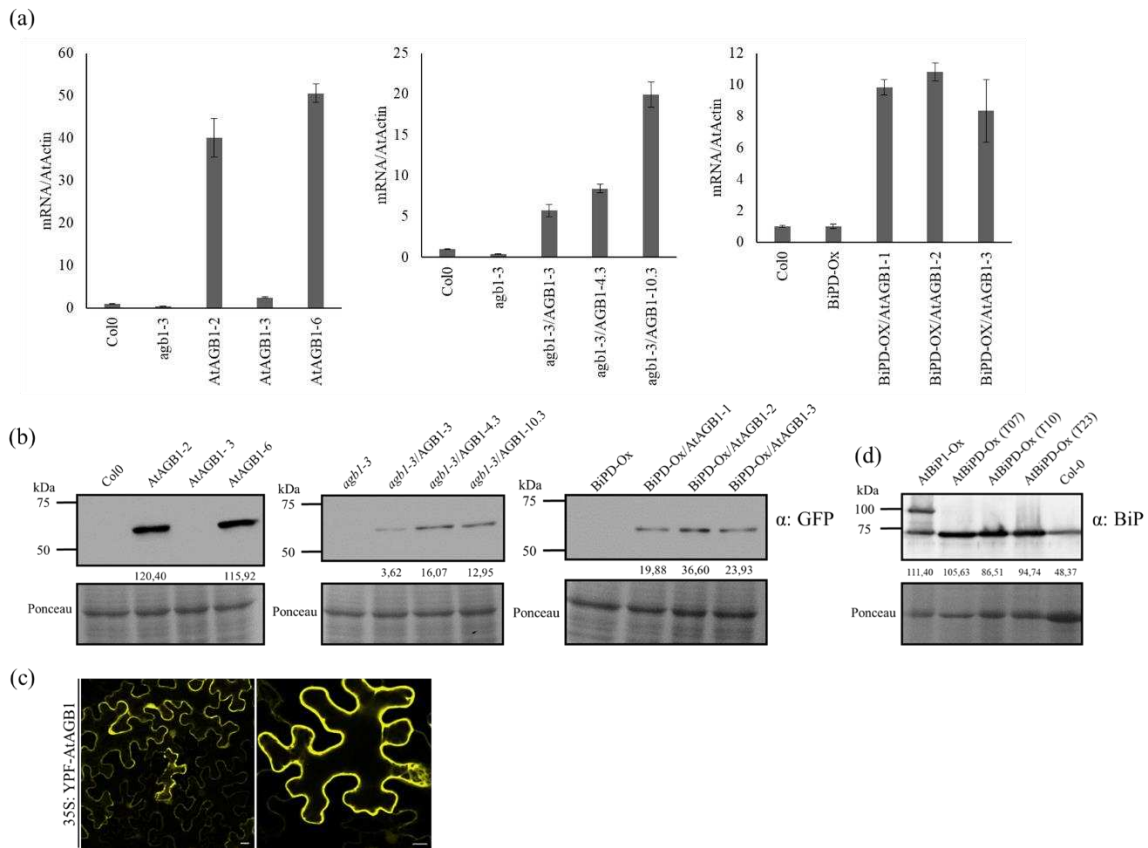
(b) RT-PCR utilizando o RNA isolado de plântulas de *Arabidopsis Col-0*, *agb1-3*, *nrp1* e *nrp2*. *AtActin2* foi utilizado como controle endógeno.



**Fig. S2. A via de sinalização mediada por DCD/NRP1 requer AtAGB1 para ser induzida em condições de estresse osmótico e no retículo endoplasmático.**

Padrão de expressão dos genes da via de sinalização mediada por DCD/NRP1 é semelhante em

linhagens *agb1-3* e BiPD-Ox sob condições de estresse. Níveis de transcritos de DCD/NRP (AtNRP1, AtNRP2, AtANAC036 e AtVPE $\gamma$ ) foram quantificados por qRT-PCR em plântulas Col-0, BiPD-Ox e *agb1-3* utilizando PEG 10% (p/v) como indutor de estresse osmótico (a) e Tunicamicina (2,5 $\mu$ g/mL) como indutor de estresse no retículo endoplasmático (b) expostas por 2h, 6h, 12h e 24h. Expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , e AtUBQ5 foi utilizado como controle endógeno. Barras de erros representam intervalo de confiança de 95% baseado em cinco replicatas biológicas.

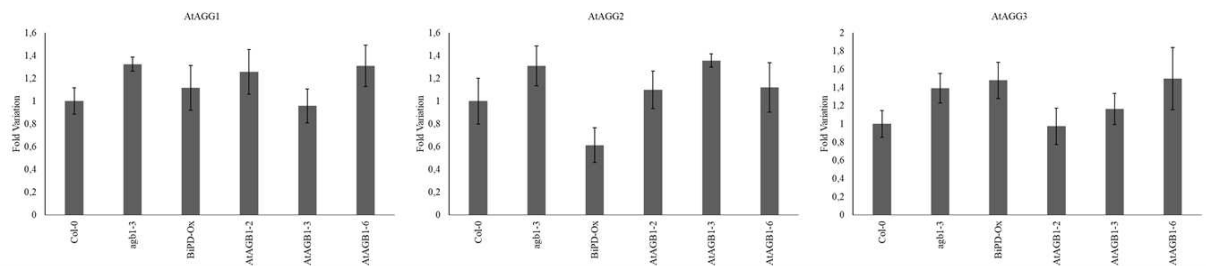


**Fig. S3** Nível de expressão de transcritos e de proteína em linhagens transgênicas transformadas com 35S:YFP-AtAGB1

(a) Acúmulo de transcritos de AtAGB1 em linhagens transgênicas. Níveis de transcritos de AtAGB1 em linhagens transgênicas independentemente transformadas superexpressando-AtAGB1 (35S:YFP-AGB1), linhagens transgênicas independentemente complementadas (*agb1-3*/35S:YFP-AGB1), linhagens transgênicas independentemente transformadas em *background* BiPD-Ox (BiPD-OX/35S:YFP-AGB1), Col-0, *agb1-3* e BiPD-Ox foram determinados por qRT-PCR. Expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta C_t}$ , e AtActina foi utilizada como controle endógeno. Barras de erros representam intervalo de confiança de 95% baseado em três replicatas biológicas.

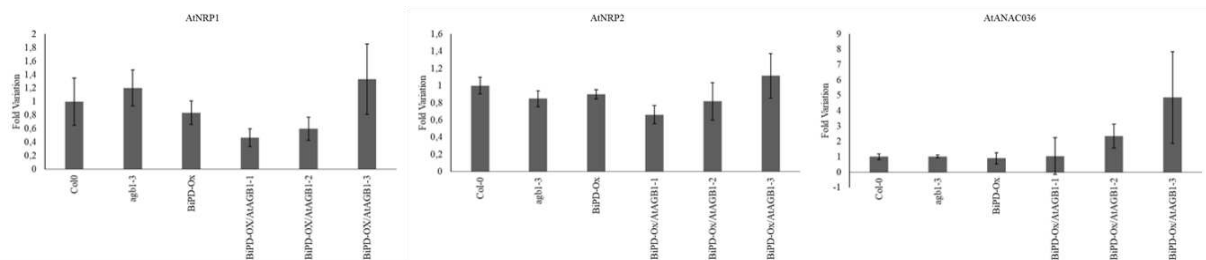
(b) Acúmulo de proteína YPF-AGB1 em linhagens transgênicas. Extrato de proteínas totais de linhagens transgênicas superexpressando-AtAGB1 (35S:YFP-AGB1), linhagens complementadas (*agb1-3/35S:YFP-AGB1*), linhagens transformadas em *background* BiPD-Ox (BiPD-OX/35S:YFP-AGB1), Col-0, *agb1-3* e BiPD-Ox foram separadas por SDS-PAGE e imunodetectadas utilizando o anticorpo anti-GFP.

(c) Localização subcelular de AtAGB1. Folhas de *N. benthamiana* foram infiltradas com *A. tumefaciens* carregando a construção de DNA expressando YFP-AtAGB1 sob controle do promotor 2x35S. Imagens de microscopia confocal de três experimentos independentes tiradas após 72 horas de infiltração. Foram examinadas aproximadamente 200 células.



**Fig. S4 A superexpressão de AtAGB1 não induz a expressão de Gy**

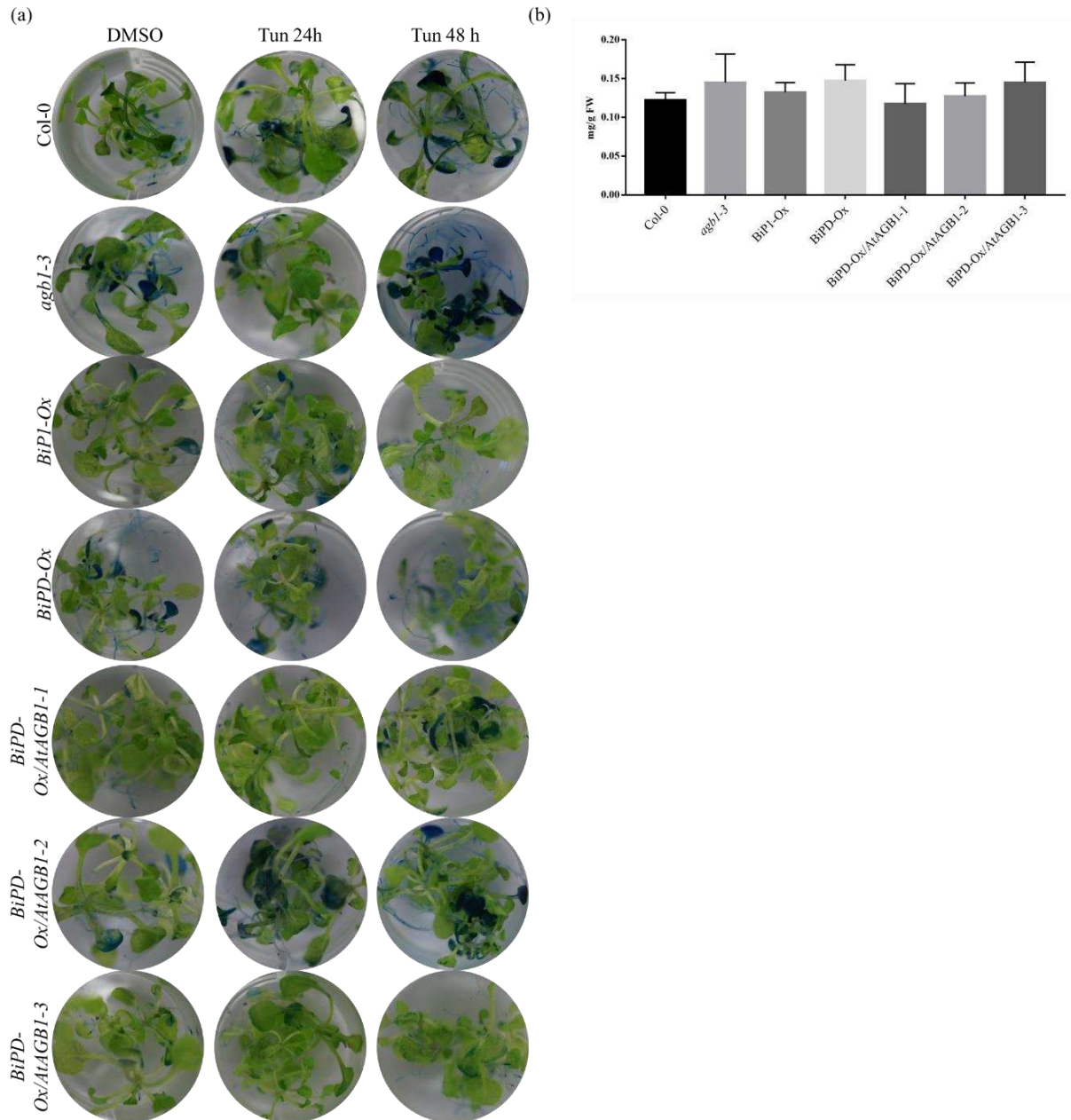
Níveis de transcritos dos genes components da Gy (AtAGG1, AtAGG2 e AtAGG3) em plântulas Col-0, *agb1-3*, AtAGB1-Ox e BiPD-Ox. O RNA total foi isolado de plântulas de Arabidopsis 15 dias após a germinação. Expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , e AtActin foi utilizado como controle endógeno. Barras de erros representam intervalo de confiança de 95% baseado em três replicatas biológicas.



**Fig. S5 Perfil de expressão de DCD/NRP em plantas BiPD-Ox/AtAGB1-Ox.**

Níveis de transcritos dos genes components da via DCD/NRP em plântulas superexpressando BiP transformadas com AtAGB1. O RNA total foi isolado de plântulas de Arabidopsis 15 dias após a germinação. Expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , e AtActin foi utilizado como controle endógeno. Barras de erros representam intervalo de confiança de 95% baseado

em três replicatas biológicas.



**Fig. S6 Superexpressão de BiP reverte o fenótipo de sensibilidade de plântulas transgênicas superexpressando AtAGB1 em condições de estresse no retículo endoplasmático**

(a) Coloração de Azul de Evans de plântulas transgênicas de Arabidopsis tratadas com DMSO ou tunicamicina (10  $\mu$ g/mL). Linhagens foram tratadas com tunicamicina por 24 e 48 horas ou DMSO por 48 horas e em seguida coradas com Azul de Evans 2% p/v.

(b) Conteúdo de clorofila total de plântulas transgênicas de Arabidopsis sob condições de estresse no retículo endoplasmático. A quantificação de clorofila total das linhagens foi

realizada após exposição à tunicamicina (10 µg/mL) por 48 horas. Barras de erros representam intervalo de confiança de 95% baseado em três replicatas biológicas.

**Tabela S1. Lista de oligonucleotídeos iniciadores usados para clonagem, diagnose, RT-PCR e qPCR**

Primer	Gene	Sequência 5'-3'
attB1_2942-Fwd	Gateway AttB1 site sequence	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCT
attB2_2943-Rvs	Gateway AttB1 site sequence	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGT
AGB1-FWD	<i>Arabidopsis thaliana</i> AGB1	AAAAAGCAGGCTTCACAATGTCTGT CTCCGAG
AGB1-NS-RVS	<i>Arabidopsis thaliana</i> AGB1	AGAAAGCTGGGTCAATCACTCTCCT GTGTCCTC
pDONR201/207_3397-Fwd	pDONR207	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATC
RT_AGB1-FWD	<i>Arabidopsis thaliana</i> AGB1	AGGATGCCACCTTATCACCAGTT
RT_AGB1-RVS	<i>Arabidopsis thaliana</i> AGB1	TGTGTCCTCCAAACGCCCATATCT
qRT_AGB1-FWD	<i>Arabidopsis thaliana</i> AGB1	ATTTGGGACTGGATCAGACG
qRT_AGB1-RVS	<i>Arabidopsis thaliana</i> AGB1	GACAGGTCCGTTCTCACCAT
qRT_UBQ5-FWD	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ubiquitin 5	TTGAAGACGGCCGTACCCTC
qRT_UBQ5-RVS	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ubiquitin 5	CGCTGAACCTTTCAAGATCCATCG
35S_MC36-Fwd	35S promoter	TCCTTCGCAAGACCCTTCCTC
qRT_ANAC036-FWD	<i>Arabidopsis thaliana</i> ANAC036	TCCTCTTTCGTCTTCCGAGA
qRT_ANAC036-RVS	<i>Arabidopsis thaliana</i> ANAC036	TGCATTTGGATCTTGTTTGC
qRT_gVPE-FWD	<i>Arabidopsis thaliana</i> VPE gamma	GAAGCGGTCCTGATGATGTT
qRT_gVPE-RVS	<i>Arabidopsis thaliana</i> VPE gamma	AGCCCACCTAGTACCGGAGT
qRT_RAB18-FWD	<i>Arabidopsis thaliana</i> RAB18	CGATCCAGCAGCAGTATGAC
qRT_RAB18-RVS	<i>Arabidopsis thaliana</i> RAB18	TTCGAAGCTTAACGGCCACC
qRT_CNX1-FWD	<i>Arabidopsis thaliana</i> Calnexin 1	ATGAGACAACGGCAACTATTTTCC
qRT_CNX1-RVS	<i>Arabidopsis thaliana</i> Calnexin 1	CCATAATCCTCATGTCCTTCACT
qRT_bZIP60-FWD	<i>Arabidopsis thaliana</i> bZIP60	CGATGATGCTGTGGCTAAAA

qRT_bZIP60-RVS	<i>Arabidopsis thaliana</i> bZIP60	TCTCAAGCATTCTCTTTTCGAGAT
qRT_bZIP28-FWD	<i>Arabidopsis thaliana</i> bZIP28	CAGTCGCTACGAACAACGAA
qRT_bZIP28-RVS	<i>Arabidopsis thaliana</i> bZIP28	AGCTGAGCACTTTTCACGGTT
qRT_IRE1A-FWD	<i>Arabidopsis thaliana</i> IRE1A	GCTTCAGACCTCATATCCGC
qRT_IRE1A-RVS	<i>Arabidopsis thaliana</i> IRE1A	AGCATCACGAAGGAAAGACAG
qRT_NRP2-FWD	<i>Arabidopsis thaliana</i> NRP2	TGCTACTGCTTGGGAAGACA
qRT_NRP2-RVS	<i>Arabidopsis thaliana</i> NRP2	TCCAAGGCTTTGCAGATTTT
qRT_NRP1-FWD	<i>Arabidopsis thaliana</i> NRP1	CAAACGCCAGCTTTTTCGGATTG
qRT_NRP1-RVS	<i>Arabidopsis thaliana</i> NRP1	TGAGCACGCTCTTCTTGCTTTCA
qRT_ACTIN-FWD	<i>Arabidopsis thaliana</i> Actin	ATGTCGTGAGCCATCCTGTC
qRT_ACTIN-RVS	<i>Arabidopsis thaliana</i> Actin	ACACCGGATTCGTGCGGCAT
RT-ACTIN-FWD (28152-cp_682)	<i>Arabidopsis thaliana</i> Actin	ATGGCTGAGGCTGATGATATTCAACC
RT-ACTIN-FWD (28154-cp_683)	<i>Arabidopsis thaliana</i> Actin	CCGTACAGATCCTTCCTGATATCCACA
qRT_AGG1-FWD	<i>Arabidopsis thaliana</i> AGG1	GTTGAACAGGAAGTCGCTT
qRT_AGG1-RVS	<i>Arabidopsis thaliana</i> AGG1	TCTCGATGACAGATAGCAG
qRT_AGG2-FWD	<i>Arabidopsis thaliana</i> AGG2	CAAGAAGCTCGATTCTTAGA
qRT_AGG2-RVS	<i>Arabidopsis thaliana</i> AGG2	GTTTGCTGTCAACACTGTC
qRT_AGG3-FWD	<i>Arabidopsis thaliana</i> AGG3	TGTTTCGTGCCATCTGAGGAA
qRT_AGG3-RVS	<i>Arabidopsis thaliana</i> AGG3	GACCCGTCACAGCATTTGG
AtNRP1-FWD	<i>Arabidopsis thaliana</i> NRP1	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGAGTATA ATAAC
AtNRP1-RVS	<i>Arabidopsis thaliana</i> NRP1	AGAAAGCTGGGTCTTTCAAGGGTTTTGG TCAGC
AtNRP2-FWD	<i>Arabidopsis thaliana</i> NRP2	AAAAAGCAGGCTTCACAAGCTTCTGGC AATTA
AtNRP2-RVS	<i>Arabidopsis thaliana</i> NRP2	AGAAAGCTGGGTCTTCCAATATATGTTA ACTATTGG

**Tabela S2. Proporção de segregação do transgene dos eventos geneticamente modificados obtidos com construções específicas.**

Linhasgens	Plântulas resistentes	Razão	X <sup>2</sup>
AtAGB1-2**	88 <sup>+</sup> /4 <sup>-</sup>	1:1	0,17
AtAGB1-3**	68 <sup>+</sup> /4 <sup>-</sup>	1:1	0,22
AtAGB1-6**	27 <sup>+</sup> /2 <sup>-</sup>	1:1	0,14
<i>agb1-3</i> /AtAGB1-3**	68 <sup>+</sup> /4 <sup>-</sup>	1:1	0,22
<i>agb1-3</i> /AtAGB1-4.3**	80 <sup>+</sup> /5 <sup>-</sup>	1:1	0,29
<i>agb1-3</i> /AtAGB1-10.3*	64 <sup>+</sup> /16 <sup>-</sup>	3:1	0,20
BiPD-Ox/AtAGB1-1*	20 <sup>+</sup> /28 <sup>-</sup>	2:1	0,33
BiPD-Ox/AtAGB1-2*	73 <sup>+</sup> /17 <sup>-</sup>	3:1	0,34
BiPD-Ox/AtAGB1-3.2**	80 <sup>+</sup> /8 <sup>-</sup>	1:1	0,73
BiP1-Ox**	37 <sup>+</sup> /3 <sup>-</sup>	1:1	0,23
BiPD-Ox***	28 <sup>+</sup> /1 <sup>-</sup>	1:1	0,03
BiPD-Ox (T10)***	40 <sup>+</sup> /3 <sup>-</sup>	1:1	0,21
BiPD-Ox (T23)***	8 <sup>+</sup> /3 <sup>-</sup>	3:1	0,01

\* F2; \*\* F4; \*\*\* F7