

MAXIMILLER DAL-BIANCO LAMAS COSTA

ESTRESSE OSMÓTICO E DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO
INDUZEM MORTE CELULAR PROGRAMADA DE MANEIRA
DEPENDENTE DAS PROTEÍNAS *NRPs*

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

MAXIMILLER DAL-BIANCO LAMAS COSTA

ESTRESSE OSMÓTICO E DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO
INDUZEM MORTE CELULAR PROGRAMADA DE MANEIRA
DEPENDENTE DAS PROTEÍNAS *NRPs*

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

APROVADA: 31 de julho de 2007.

Prof. Luciano Gomes Fietto
(Co-Orientador)

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro
(Co-Orientador)

Prof.^a Juliana Lopes Rangel Fietto

Claudine Márcia Carvalho

Prof.^a Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

Aos meus avós José da Costa e Maria da Conceição Costa

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus, pois se não fosse ele me guiando por toda a minha vida, talvez não estivesse hoje onde estou. Agradeço também aos meus pais e familiares pelo grande apoio durante toda a minha jornada, e principalmente pelo amor e excelente convivência familiar.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização de uma Pós-Graduação gratuita e de excelente qualidade e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À Professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes pela confiança e principalmente pela orientação durante todo o período de desenvolvimento da dissertação.

Ao Departamento de Bioquímica, professores e funcionários pela boa convivência e ensinamentos. Aos meus co-orientadores Marcelo Ehlers Loureiro (DBV) e Luciano Gomes Fietto (DBB) pela discussão e ajuda nos experimentos. Este último tenho um agradecimento especial por ter sido mais que um co-orientador, mas um grande amigo.

Não poderia esquecer de citar minha namorada Giselle pelo apoio e compreensão durante todo este tempo.

Os colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e Laboratório de Proteômica pela excelente convivência e ajuda durante os trabalhos, em especial aos amigos mais próximos nestes últimos meses: Rejane, Carol, João Paulo, Gustavo e Pedro Augusto. Este último, aliás,

foi mais que um amigo, mas um parceiro de trabalho e exemplo de força de vontade na ajuda e condução dos experimentos.

Aos amigos da minha cidade, Marcelo Henrique e Júnior, que mesmo distante sempre estiveram por perto.

Aos amigos de república, com quem convivi por estes seis anos e meio em Viçosa.

Aos amigos da Bioquímica Agrícola, da Bioquímica 2001, e os amigos de Viçosa.

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

A todos os funcionários do BIOAGRO que indiretamente contribuem para o bom funcionamento do setor.

E a todos que não tenha citado, mas que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii	
ABSTRACT.....	xi	
INTRODUÇÃO.....	1	
REVISÃO DE LITERATURA.....	6	
O Retículo Endoplasmático e a proteína BiP.....	6	
A via de resposta a proteínas mal dobradas no retículo endoplasmático (UPR).....	7	
Sinalização da UPR em mamíferos e leveduras.....	8	
A via UPR em plantas.....	10	
Morte Celular Programada em plantas (PCD).....	12	
Estresse no RE e Morte Celular Programada em plantas (PCD).....	14	
Estresse Osmótico.....	14	
Proteínas ricas em asparagina contendo domínio DCD (N-Rich Protein).....	16	
Proteínas contendo domínio NAC.....	18	
CAPÍTULO 1		
UM NOVO RAMO DE SINALIZAÇÃO DO ESTRESSE NO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO INTEGRA COM O SINAL OSMÓTICO ATRAVÉS DE UMA RESPOSTA APOPTÓTICA DEPENDENTE DA PROTEÍNA NRP.....		21
INTRODUÇÃO.....	21	
MATERIAIS E MÉTODOS.....	26	
Células de soja em suspensão e Tratamentos.....	26	
Extração de RNA e síntese de cDNA.....	26	

PCR em tempo real.....	27
Clonagem molecular do cDNA completo do gene <i>N-rich</i>	27
Expressão transiente em protoplastos de soja.....	31
Ensaio de Caspase-3.....	32
Agroinoculação em folhas de tabaco.....	33
Localização celular de <i>NRP-B (N-rich)</i>	33
Técnicas de Biologia Molecular.....	34
Análises de Bioinformática.....	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
Clonagem do cDNA completo de <i>N-rich1</i> , designado <i>NRP-B</i> , e análises de bioinformática.....	35
Regulação dos genes <i>NRP-A</i> e <i>NRP-B</i> por indutores da UPR ocorre via um novo ramo de sinalização de estresses no retículo endoplasmático.....	44
NAM, <i>NRP-B</i> e <i>NRP-A</i> são genes precocemente induzidos por indutores de morte celular e reprimidos por inibidores de senescência.....	48
Expressão transiente de <i>NRich</i> induz morte celular em protoplastos de soja.....	50
O gene <i>NRP-A</i> também é co-regulado pelos estresses osmótico e do retículo e assim como <i>NRP-B</i> induz morte celular em protoplastos de soja.....	54
Expressão transiente dos genes <i>NRP-A</i> e <i>NRP-B</i> em folhas de tabaco induzem senescência.....	58
A proteína <i>NRich</i> está localizada na membrana plasmática.....	60
CONCLUSÕES.....	62
CAPÍTULO 2.	

SUPEREXPRESSÃO DO CHAPERONE MOLECULAR BiP ATENUA	65
PROCESSOS DE MORTE CELULAR.....	
INTRODUÇÃO.....	65
MATERIAIS E MÉTODOS.....	68
Material Vegetal e Tratamentos.....	68
Extração de RNA e síntese de cDNA.....	68
Fragmentação de DNA genômico.....	69
Monitoração de morte celular por Azul de Evans.....	69
Detecção in-vivo de H ₂ O ₂	69
Malondialdeído (MDA).....	70
Agroinoculação em folhas de tabaco.....	70
RESULTADO E DISCUSSÃO.....	72
Expressão ectópica de BiP em plantas transgênicas atenua o processo de morte celular induzida por estresses no RE e osmótico.....	72
Plantas transgênicas submetidas ao tratamento com tunicamicina produzem maior quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	77
BiP não afeta o nível de peroxidação de lipídeos resultante de acúmulo excessivo de ROS.....	79
Superexpressão de BiP atenua os processos de morte celular induzidos pelas proteínas NRP-A e NRP-B em plantas de tabaco.....	81
CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

RESUMO

COSTA, Maximiller Dal-Bianco Lamas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2007. **Estresse osmótico e do retículo endoplasmático induzem morte celular programada de maneira dependente das proteínas NRPs.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-orientadores: Luciano Gomes Fietto, Marcelo Ehlers Loureiro e Luis Orlando de Oliveira

A identificação de vias de sinalização de resposta em células afetadas por diferentes estresses, bem como das interações entre estas vias, constitui um dos interesses majoritários de pesquisas na área de interações das células vegetais com o meio ambiente. Recentemente, uma nova via de integração entre os estresses do retículo e osmótico foi descrita pelo nosso grupo, sendo que dois dos genes que exibiram as mais fortes induções sinérgicas pela combinação dos estresses, N-rich1 e N-rich2, codificam proteínas similares à proteína NRP, aqui designada NRP-A, que está especificamente associada ao evento de morte celular programada. Nesta investigação, foi demonstrado que as ESTs de N-rich1 e N-rich2 correspondiam a um mesmo gene homólogo a NRP-A, sendo denominados NRP-B. Utilizando plantas transgênicas defeituosas na ativação da via de resposta a proteínas mal dobradas no RE (via UPR), foi demonstrado que a ativação dos genes alvos NAM, NRP-A e NRP-B é sinalizada por estresses no RE por meio de uma via distinta da UPR. Assim também, a expressão dos três genes não é alterada pelo hormônio ABA, indicando que a indução destes pelo estresse osmótico é

independente de ABA. Consistente com o envolvimento em morte celular, os três genes são induzidos por indutores de morte celular e reprimidos por inibidores de senescência. Além disso, a expressão transiente de NRP-A e NRP-B promoveu ativação de caspase-3-like em protoplastos de soja e acelerou o processo de senescência em folhas de tabaco, evidenciando a participação dessas proteínas em processos de morte celular. Foi demonstrado que a proteína NRP-B localiza-se possivelmente na membrana plasmática e sua expressão é capaz de promover ativação transcricional de NAM e NRP-A, estando possivelmente ancorada a complexos sistemas de sinalização. Coletivamente estes resultados descrevem um novo ramo de sinalização do estresse no retículo endoplasmático que integra com o sinal osmótico através de uma resposta apoptótica dependente das proteínas NRPs. Como estratégia para tolerância engenheirada a estresses em plantas, foi demonstrado que a superexpressão do chaperone molecular BiP confere resistência a estresses abióticos em plântulas de soja, além de prevenir morte celular. Expressão ectópica de BiP em plantas transgênicas de soja diminuiu as lesões foliares necróticas induzidas por tunicamicina, e manteve o turgor foliar em condições de desidratação induzida por PEG, apresentando, nestas condições, um teor relativo de células mortas inferior às plantas não transformadas. O envolvimento de BiP na prevenção de morte celular foi adicionalmente demonstrado por agroinoculação de NRP-A e NRP-B em folhas de tabaco transformadas com o gene *soyBiPD* nas orientações senso e anti-senso, onde foi observado uma atenuação na senescência na planta senso e o efeito inverso na planta anti-senso. Experimentos

adicionais deverão ser conduzidos para evidenciar os mecanismos pelos quais *BIP* atua em processos de morte celular

ABSTRACT

COSTA, Maximiller Dal-Bianco Lamas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2007. **Osmotic- and ER-stress induce NRPs-dependent programmed cell death.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-Advisers: Luciano Gomes Fietto, Marcelo Ehlers Loureiro and Luis Orlando de Oliveira

The identification of cell signaling pathways in response to different stresses and the interactions among these pathways have become major focus for understanding the molecular bases of plant cell-environment interactions. Recently, a novel integrative pathway between ER- and osmotic-stress has been described by our group. Among the target genes of the integrative pathway, N-rich1 and N-rich2 genes, which exhibit the strongest synergistic induction by the combination of both stresses, are homolog of NRP, here designated NRP-A, that has been shown to be specifically associated with programmed cell death. In this investigation, we demonstrated that the N-rich1 and N-rich2 ESTs correspond to the same NRP-A homolog gene, and hence designated NRP-B. Using transgenic plants defective for the unfolded protein response (UPR) activation, we demonstrated that activation of the integrative target genes, NAM, NRP-A and NRP-B, occurs via an ER-stress signaling pathway distinct from the UPR. Likewise, the expression of the three genes is not altered by ABA treatment, indicating that their osmotic induction is ABA-independent. Consistent with an involvement in cell death programs, all

three genes are up-regulated by cell death inducers and repressed by senescence inhibitors. Furthermore, the transient expression of NRP-A and NRP-B promoted caspase-3-like activation in soybean protoplasts and accelerated senescence in tobacco leaves. These results revealed the involvement of these proteins in cell death programs. We also demonstrated that NRP-B is located to the plasma membrane, most likely associated to signaling systems, and is capable to promote NAM and NRP-A up-regulation when expressed in soybean protoplasts. Collectively, these results describe a novel branch of the ER stress signaling that integrates with the osmotic signal through a NRP-dependent apoptotic response. As a strategy for engineering stress tolerance in plants, we demonstrated that enhanced accumulation of the molecular chaperone BiP confers abiotic stress tolerance in soybean seedlings in addition to preventing cell death. Ectopic expression of BiP in transgenic soybean plants decreased tunicamycin-induced leaf necrosis and kept leaf turgor under PEG-induced dehydration conditions, resulting in dead cell content lower than that in untransformed plants. The BiP involvement in preventing cell death was further demonstrated by transient expression of NRP-A and NRP-B in sense and antisense BiP- overexpressing tobacco leaves. While in sense leaves senescence was clearly delayed, in antisense leaves the NRP-induced senescence was accelerated as compared to wilt-type leaves. Further experiments are necessary to elucidate the mechanisms by which BiP prevents cell death in plants.

INTRODUÇÃO

A soja é uma cultura agrônômica muito relevante para o cenário agrícola nacional, sendo um dos principais produtos agrícolas produzidos pelo Brasil pesando de modo relevante em sua balança comercial. O crescente interesse por essa cultura é devido ao alto teor de proteínas e óleos de suas sementes, sendo uma das melhores fontes protéicas de origem vegetal, deficiente somente em aminoácidos sulfurados como metionina e cisteína

A importância econômica e nutricional da soja a coloca em local privilegiado entre as espécies passíveis de melhoramento, esperando-se produzir novos cultivares com qualidade superior. As estratégias moleculares modernas de melhoramento incluem a alteração racional da expressão de conjuntos de genes que conferem maior produtividade e qualidade, assim como maior tolerância a estresses bióticos e abióticos.

Para alcançar esse objetivo, os melhoristas utilizam complexos sistemas de cruzamentos e retro-cruzamentos quando os genes de interesse localizam-se na mesma espécie. Porém, quando os genes de interesse encontram-se fora do pool gênico primário da espécie, ou deseja-se manipular a expressão de algum gene endógeno da planta, a engenharia genética oferece as ferramentas básicas para identificar, selecionar, isolar e transferir genes específicos escolhidos dentro de um vasto pool gênico, para um amplo espectro de seres vivos (Binsfeld, 2000). Conseqüentemente, a dificuldade concentra-se, no caso do melhoramento clássico, na identificação e transferência de genes de

espécies com o fenótipo desejado para variedades cultivadas, e no caso da engenharia genética, em identificar e caracterizar genes alvos para a transformação de plantas.

Seca e salinidade são considerados um dos principais fatores de restrição à agricultura brasileira, limitando o crescimento da planta, produtividade e distribuição geográfica. Diferentes métodos para aumentar a tolerância a estresses em plantas têm sido desenvolvidos, como a manipulação e a reprogramação da expressão de genes endógenos relacionados com estresse (Mahajan and Tuteja, 2005). Em geral, são utilizados fatores de transcrição e outros genes regulatórios como alvo, uma vez que dessa forma pode-se controlar a expressão de vários genes envolvidos na resposta a um determinado estresse (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998; Kasuga *et al.*, 1999; Hsieh *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2006). Entretanto, também tem sido descrito a mudança da expressão de apenas um gene (Bartels, 2001; Zhu, 2001). Neste caso, alvos efetivos para serem engenheirados incluem genes envolvidos diretamente em proteção celular (Zhu, 2001; Kumar *et al.*, 2004). Esta classe inclui os genes cujos produtos atuam funcionalmente em vias de desintoxicação de produtos gerados em condições de estresses, tais como os genes relacionados com o sistema antioxidativo, ou em vias de reparo de proteínas e estruturas celulares, como genes que codificam chaperones moleculares (Gupta *et al.*, 1993; Badawi *et al.*, 2004, Rodrigues *et al.*, 2006). Os chaperones moleculares são induzidos por uma variedade de estresses fisiológicos, e são definidos como proteínas que facilitam o correto dobramento das proteínas *in vivo*, sendo requeridos para uma

ampla gama de processos, incluindo dobramento, oligomerização, e remoção proteolítica (Pelham, 1989; Hammond & Helenius, 1995).

Qualquer condição de estresse, que quebra a homeostasia do RE e promove o acúmulo de proteínas mal dobradas na organela, ativa uma cascata de sinalização que tem sido bem estudada em leveduras e mamíferos, denominada via de resposta a proteínas mal-dobradas (Unfolded Protein Response – UPR). Entretanto muito pouco se sabe a respeito dos componentes da sinalização do estresse no RE em plantas. Por outro lado, estudos do padrão de expressão gênica em resposta a diversos outros estresses abióticos em diferentes plantas revelaram uma possível comunicação entre a via de resposta a estes estresses devido à expressão em comum de alguns genes (Kreps *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2002; Denekamp & Smeekens, 2003; Houde *et al.*, 2006).

No intuito de investigar a comunicação entre a via UPR e vias responsivas a estresse osmótico, e elucidar o potencial do chaperone molecular BiP em manter o turgor da folha sob déficit hídrico (Bertolotti *et al.*, 2000; Alvim *et al.*, 2001; Valente, 2006) e em regular a UPR em plantas, recentemente foi identificado pelo nosso grupo, genes co-regulados por estes estresses (Irsigler *et al.* 2007). Os resultados sugerem a ativação de uma via inédita de sinalização que parece integrar as duas respostas de defesa da planta, potencializando os mecanismos de defesa a diversas condições de estresses (Figura 1). Dentro desse contexto, torna-se importante determinar se a ativação da via de integração leva à ativação de proteínas de defesa envolvida em respostas a outros estresses abióticos e bióticos. Estes conhecimentos serão

fundamentais para a definição de estratégias moleculares que possam efetivamente conferir às plantas cultivadas vantagens fisiológicas que as permitem superar condições adversas.

O presente trabalho teve como objetivo primordial caracterizar molecular e funcionalmente os genes co-regulados pelo estresse no RE e estresse osmótico, em especial aqueles que codificam proteínas ricas em Asparagina (N-Rich), como alvos moleculares para aquisição de resistência engenheirada em plantas de soja. Além disso, foi proposto avaliar o efeito de BiP, inibidor da ativação da via de sinalização em resposta a proteínas mal dobradas, no controle de morte celular gerada por estresses abióticos.

Osmotic and stress response pathways converge at the the level of gene activation

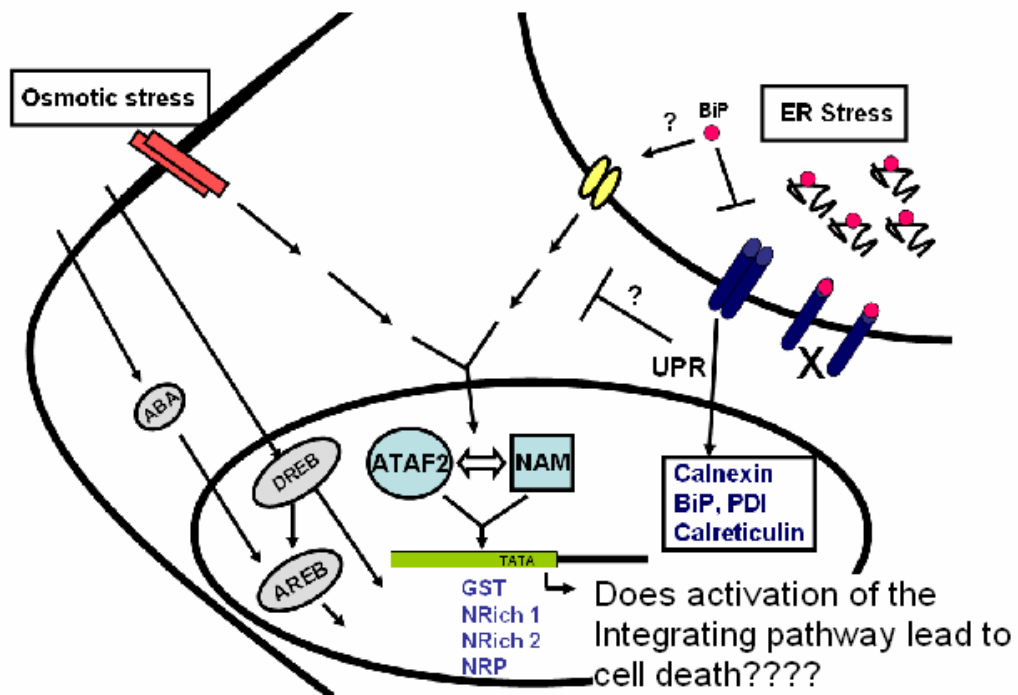


Figura 1 - Integração entre as vias de sinalização induzidas em resposta ao estresse osmótico e ao estresse do retículo endoplasmático (RE). Estresse originado no RE por acúmulo de proteínas mal dobradas ativa uma via de sinalização que integra ao sinal osmótico de uma maneira convergente no nível de ativação dos genes *ATAF2*, *NAM*, *GST*, *NRich1* e *NRich2*. No modelo, é destacado a via UPR, ativada por um receptor transmembrana do RE que é regulado por concentrações de BiP no RE e resulta na ativação dos genes que codificam chaperones moleculares tais como: calreticulina, BiP e calnexina. Em destaque, também, as vias de resposta à seca dependente do hormônio ABA ou mediada por DREB.

REVISÃO DE LITERATURA

O Retículo Endoplasmático e a proteína BiP

O retículo endoplasmático é o primeiro compartimento da via secretora de eucariotos, sendo responsável pela síntese e modificação de proteínas. Imediatamente após a entrada nessa organela, os polipeptídeos nascentes podem sofrer uma série de processamentos pós-traducionais. Estes incluem adição covalente de carboidratos e clivagem por enzimas proteolíticas, enovelamento nas estruturas secundárias e terciárias apropriadas, as quais podem ser estabilizadas por ligações dissulfídicas e, em alguns casos, aquisições de estruturas quaternárias em complexos multiméricos (Yan Jun *et al.*, 2003). O retículo endoplasmático também possui um mecanismo de controle de qualidade que discrimina proteínas corretamente das incorretamente enoveladas. Este mecanismo assegura que somente proteínas corretamente enoveladas e montadas prossigam para seu destino final (Oda *et al.*, 2003; Sitia & Braakman, 2003). Esses processos são auxiliados e monitorados por chaperones do retículo endoplasmático, dentre os quais BiP exerce uma função de destaque.

BiP é uma proteína de 78 kDa, pertencente à família dos chaperones Hsp70, (Haas & Meo, 1988) sendo um dos chaperones mais bem caracterizados do retículo endoplasmático (Denecke, 1996). A proteína BiP possui dois domínios importantes: um amino-terminal que contém um sítio catalítico e um carboxi-terminal de ligação ao substrato

(McKAY, 1993) que interage com seus substratos de maneira dependente de ATP (Knarr *et al.*, 2002). BiP é uma proteína multifuncional, envolvida na regulação de diversos processos celulares associados ao retículo endoplasmático (Pilon & Schekman 1999), tais como: (1) enovelamento de cadeias polipeptídicas nascentes, (2) translocação dessas cadeias polipeptídicas para o lúmen do retículo endoplasmático, (3) sistema ERAD (degradação de proteína associada ao retículo endoplasmático), além de (4) funcionar como um vedante do translocon durante os estágios iniciais de translocação protéica e (5) como sensor da via UPR, que controla a transcrição de genes de respostas ao estresse na organela para garantir a sobrevivência celular (Liu & Kaufman, 2003).

A via de resposta a proteínas mal dobradas no retículo endoplasmático (UPR)

O acúmulo de proteínas mal dobradas é a principal causa de estresse no RE, e pode ser resultado do rápido influxo de polipeptídeos mal-dobrados nascentes, excedendo a capacidade de dobramento, ou quando se tem um impedimento para o correto dobramento das proteínas, como a prevenção de modificações pós-traducionais, o desequilíbrio de cálcio ou o erro na estrutura primária da proteína (Ron & Walter, 2007). Estas perturbações podem afetar e acionar a UPR, que é uma via de transdução de sinal que ativa a transcrição coordenada de um conjunto de genes envolvidos no restabelecimento da homeostasia no RE, tanto

pelo aumento da capacidade de dobramento das proteínas como pelo decréscimo da demanda destes dobramentos.

Para aumentar a capacidade de dobramento, a síntese de chaperones residentes no RE é aumentada (Kozutsumi *et al.*, 1988). Por outro lado, a demanda de dobramento diminui pela (1) diminuição global da síntese de proteínas, (2) diminuição da transcrição de genes codificando proteínas secretórias, (3) degradação de mRNAs específicos (Hollien & Weissman, 2006) e (4) grande liberação de proteínas mal- e não-dobradas através da degradação associada ao RE (ERAD) (Travers *et al.*, 2000).

Sinalização da UPR em mamíferos e leveduras

Três principais proteínas transmembranas, IRE1, ATF6 e PERK são sinalizadores conhecidos da resposta ao estresse no RE e regulam uma larga faixa de genes. IRE1 tem domínios quinase e de endonuclease (Cox *et al.*, 1993; Mori *et al.*, 1993), e quando ativado promove processamento e maturação do mRNA que codifica o fator de transcrição b-ZIP Hac1p de leveduras (Cox & Walter, 1996), homólogo a XBP-1 de mamíferos (Calfon *et al.*, 2002). Este fator de transcrição regula expressão de chaperones moleculares, genes relacionados ao ERAD e uma gama de proteínas secretórias. Em células de mamíferos, o fator de transcrição ATF6, uma proteína transmembrana do RE, sob condição de estresse migra para o aparato de Golgi onde seu domínio de transativação é liberado da membrana por clivagem proteolítica, migrando

então para o núcleo para regular a transcrição de vários genes (Haze *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002). PERK, outra proteína transmembrana, é uma quinase que quando ativada, atenua a tradução de proteínas pela fosforilação do fator de iniciação da tradução 2 (eIF2 α) (Harding *et al.*, 2000; Holci & Sonenberg, 2005).

Acredita-se que o nível e estado dos chaperones moleculares são os principais fatores que possibilitam a sensibilidade do estresse no RE. A capacidade de BiP em Interagir com IRE1 ou PERK (Liu *et al.*, 2002), e a sua propriedade de ligar a proteínas mal dobradas, sugerem um possível mecanismo para BiP desempenhar o papel de sensor do estresse no RE. Segundo este modelo, BiP estaria ligado em condições normais nos domínios luminais de IRE1, PERK e ATF6, mantendo-os desativados. Após acúmulo de proteínas mal-dobradas, BiP seria liberado, permitindo a oligomerização/dimerização e trans-autofosforilação de IRE1 e PERK e assim sua ativação. A liberação de ATF6 permitiria seu transporte para o Golgi onde seria clivado gerando um domínio citossólico de ATF6 que migraria para o núcleo ativando a transcrição de vários genes (Zhang & Kaufman, 2004). Este modelo é suportado pelo fato de que a superexpressão de BiP atenua a ativação de PERK e IRE1, reprimindo assim a UPR, ocorrendo o oposto quando se tem uma repressão de BiP (Bertolotti *et al.*, 2000; Okamura *et al.*, 2000)

Um modelo alternativo para percepção do estresse no RE propõe que a ligação de proteínas mal dobradas a IRE1 e PERK ativaria a UPR de maneira independente de BiP. Esta hipótese tem sido considerada baseada na observação de que IRE1 de leveduras é capaz de se ligar a

uma cadeia polipeptídica, e também, devido ao fato de que a ativação de IRE1 nem sempre depende de BiP. Um terceiro modelo, que é intermediário, postula que a ativação seria devido à liberação de BiP dos receptores transmembranas, bem como à ligação de proteínas mal dobradas aos receptores (Ron & Walter, 2007).

A via UPR em plantas

O Retículo Endoplasmático de plantas é diferente do RE de animais, sendo contínuo ao longo da planta inteira por via das cadeias de plasmodesmas que permitem comunicação célula-a-célula (Ghoshroy, 1997). Certos sinais de tensão, como um ataque por um patógeno, são transmitidos ao longo da planta, ocasionando uma indução sistemática de genes específicos por esta continuidade do RE. Porém, a UPR é restringida às células onde a tensão foi iniciada não induzindo uma resposta sistêmica na planta (Jelitto-Van Dooren 1999).

Análises recentes do transcriptoma de *A. thaliana* induzido por estresse no RE evidenciaram a indução de genes envolvidos em diferentes processos como o dobramento de proteínas, glicosilação/modificação, translocação, degradação de proteínas, tradução, tráfego de vesículas, morte celular programada, quinases, fatores de transcrição, proteínas de estresse e proteínas não classificadas, sendo que muitas são ortólogas a proteínas da UPR de mamíferos e leveduras (Urade, 2007). Além disto, já foi descrito um cis-elemento de 24 pb em soja similar a ERSE e ERSE-II de mamíferos que

flanqueiam a região 5' dos genes induzidos pela UPR (Buzeli *et al*, 2002), e dentre os genes identificados pelo transcriptoma de *A. thaliana*, mais de 65% deles possuem este cis-elemento (Urade, 2007).

Recentemente o fator de transcrição contendo o motivo zíper de leucina induzido pelo estresse no retículo (bZIP) de *Arabidopsis*, chamado AtbZIP60, foi identificado pela sua capacidade de ativar o promotor de *BiP* e Calnexina através de elementos responsivos a estresse no RE (Iwata & Koizumi, 2005). AtbZIP60 está ancorado na membrana sob condições normais, mas é liberado sobre estresse no RE em um mecanismo desconhecido. Acredita-se que o mecanismo de ativação seja similar ao ATF6 de mamíferos e que sua autorregulação seja similar a XBP1 em células de mamíferos. Entretanto, uma vez que o domínio luminal de AtbZIP60 é muito menor que o de ATF6, não se sabe se a função de sensor do estresse no RE é similar ao ATF6 (Urade, 2007).

Em *Arabidopsis* dois ortólogos de Ire1 foram identificados. Atlre1-1 que é expresso apenas em alguns tecidos e estágios de desenvolvimento, enquanto o Atlre1-2 é constitutivo em toda a planta. O domínio C-terminal de Atlre1 é conservado em uma variedade de organismos, enquanto o domínio N-terminal, que em leveduras tem a função de sensor do estresse, apresentam seqüência muito diferente. Entretanto, ainda não foi elucidado como as proteínas Ire1 de plantas funcionam como reguladores da transcrição no estresse do retículo (Urade, 2007), mas é possível que BiP tenha papel importante, já que sua superexpressão em plantas de tabaco resulta em diminuição da ativação da UPR por tunicamicina (Leborgne-Castel *et al.*, 1999).

Morte Celular Programada em plantas (PCD)

PCD é geneticamente definida como um processo associado a características morfológicas e bioquímicas distintas que envolvem vias de sinalização controlando a destruição das células com o mínimo dano às células vizinhas (Steller, 1995; Pallavan-Unsal *et al.* 2005). Este processo é parte integral do ciclo celular de organismos multicelulares (Greenberg, 1996) e pode ser induzido por vários estímulos ambientais ou de desenvolvimento do organismo (Wertz and Hanley, 1996; Vaux and Korsmeyer, 1999), ocorrendo em plantas durante os processos de desenvolvimento, tais como senescência, embriogênese, desenvolvimento do tecido vascular e durante o processo de interação da planta com um patógeno (Pennell & Lamb, 1997; Danon *et al.*, 2000). Processos de PCD em estágios iniciais podem ser revertidos em plantas (O'Brien *et al.*, 1998).

O processo é similar ao de mamíferos, embora não haja um padrão comum bem estabelecido, apesar de resultar nos mesmos fenômenos morfológicos e bioquímicos como quebra do citoplasma, condensação nuclear, aumento da permeabilidade de membrana, influxo de cálcio, exposição das fosfatidilserina, liberação do citocromo C, ativação de proteases específicas e fragmentação do DNA em fragmentos de 50kb e depois em escadas de nucleossomos (Solomon *et al.*, 1999; Jones, 2000; Zuppini *et al.*, 2004). Esses sintomas são expressos diferencialmente,

dependendo do propósito de controle da morte celular que ocorre nas células das plantas (Lam, 2004).

A morte programada é comumente distinguida da morte necrótica, embora essas formas de morte sejam consideradas como dois extremos do mesmo fenômeno, chamado "necroapoptose" (Lemasters, 1999; Pallavan-Unsal et al. 2005). Pelo menos em células animais, o balanço vida ou morte é controlado por um delicado equilíbrio entre fatores anti e pro-apoptóticos. Assim, o principal papel é designado por proteínas da família Bcl-2 (Tsujimoto and Shimuzu, 2000), que ainda não foram descritas ou encontradas em plantas até o momento (Chichkova *et al.*, 2004; Urade, 2007).

A morte celular pode ser dividida em três fases: iniciação, decisão e degradação (Kroemer & Reed, 2000; Xu et al 2005). Durante a primeira fase células acumulam moléculas efetoras, as quais diretamente e seletivamente alteram a permeabilidade da membrana das mitocôndrias. Isto determina a liberação de fatores apoptóticos que disparam a fase de degradação. A última fase implica na ativação de proteases específicas e depois endonucleases as quais são responsáveis pelo típico produto de degradação na PCD. A decisão da célula em morrer por apoptose ou necrose depende das condições em que ela se encontra, sendo que a concentração de ATP e a integridade da mitocôndria são essenciais para isto (Orrenius *et al.*, 2003).

Estresse no RE e Morte Celular Programada em plantas (PCD)

O RE é o principal sítio para a síntese e enovelamento de proteínas, e também serve como local para estocagem de cálcio. Qualquer perturbação em sua homeostasia pode promover o acúmulo de proteínas mal dobradas, induzindo a UPR. O prolongamento da ativação da via UPR pode desencadear processos de morte celular (Rao *et al.*, 2002; Zhang & Kaufman, 2004; Zuppini *et al.*, 2004). Entretanto os eventos da sinalização celular que conectam estresse no RE e morte celular não são bem compreendidos (Xu *et al.* 2005; Urade, 2007). Recentemente foi identificada em plantas, uma proteína G heterotrimérica que está envolvida em eventos de sinalização que induz morte celular associada com a via UPR em *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2007).

Estresse Osmótico em plantas

Em plantas, assim como em outros organismos, a transpiração de H₂O é usada para prevenir aumentos significativos de temperatura, sendo que mais de 90% da água adquirida do solo é consumida por transpiração durante dias muito quentes (Ueda *et al.*, 2004), acarretando na inibição do crescimento da planta sob condições de estresse hídrico (Yeo *et al.*, 1991; Pérez-Alfocea *et al.*, 1993). Esta perda de água excessiva é combatida pela síntese de vários tipos de osmoprotetores, como glicina-betaína e prolina (Gorhan *et al.*, 1985; Delauney and Verma, 1993). Por outro lado, também tem sido demonstrado que a regulação da permeabilidade de

água através de aquaporinas modificam a sensibilidade do estresse hídrico (Aharon *et al.*, 2003).

Vias de transdução de sinal genéricas começam com a percepção do sinal, seguida pela produção de mensageiros secundários que podem modular a concentração intracelular de cálcio, freqüentemente iniciando cascatas de fosforilação que terminam com a ativação de proteínas alvos, diretamente envolvidos no processo, ou fatores de transcrição que controlam genes específicos. Os produtos destes genes participam da produção de moléculas regulatórias, como o hormônio Ácido Abscísico (ABA), Etileno e Ácido Salicílico (AS), que podem iniciar um segundo ciclo de sinalização (Xiong *et al.*, 2002; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2000).

No caso específico do estresse hídrico e osmótico, ocorre uma resposta complexa iniciada com a percepção do estresse, que ativa vias de transdução de sinal que manifestam mudanças celulares, fisiológicas e dos níveis de desenvolvimento. Assim, a resposta depende da severidade e duração do estresse, genótipo da planta, estágio de desenvolvimento e fatores ambientais que acarretam o estresse (Bray, 1993).

DRE/CRT (**D**ehydratation **R**esponsive **E**lement/**C**-repeat) e ABRE (**A**BA **R**esponsive **E**lement) são os principais cis-elementos encontrados nos genes induzidos por estresse osmótico. O primeiro funciona em processos iniciais de resposta enquanto o segundo funciona após o acúmulo de ABA durante a desidratação. Existem vários fatores de transcrição respondentes a ABA, que se posicionam *posterior* à resposta

deste hormônio, estando envolvidos em processos tardios de adaptação ao estresse. (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006).

A transdução de sinal em estresse osmótico e salino é similar, sendo importantes três parâmetros para o retorno a condição de homeostasia ou a adaptabilidade da planta ao estresse: (1) retorno ao equilíbrio iônico e osmótico para tentar manter certa homeostasia sob condição de estresse, (2) controle dos danos e detoxificação acarretada pelo estresse e (3) coordenação da divisão celular (Mahajan & Tuteja, 2005)

Proteínas ricas em asparagina contendo domínio DCD (N-Rich Protein)

Uma das primeiras proteínas com alto conteúdo de Asparagina descrita, a proteína NRP, é induzida durante a reposta hipersensível, e serve como marcador para morte celular programada estando presente na parede celular de células de soja (Ludwig & Tenhaken, 2001). Este gene não responde diretamente ao ácido salicílico, que acelera processos de morte celular em culturas de células de soja (Shirasu *et al.*, 1997; Ludwig & Tenhaken 2000), mas sua transcrição pode ser amplificada na presença dos sinais dessa molécula, que é essencial para a morte celular programada.

O gene codifica uma proteína que consiste de dois domínios: O domínio N-terminal é extremamente rico no aminoácido asparagina (25%) e por isto a proteína foi chamada de N-rich protein (NRP) (Ludwig &

Tenhaken 2001). Na região C-terminal, a proteína codificada pelo gene NRP, apresenta um domínio relacionado com o desenvolvimento e morte celular específico de plantas, denominado DCD (**D**evelopment and **C**ell **D**eath). (Tenhaken *et al*; 2005). O exato papel biológico do gene NRP ainda não está definido, mas acredita-se que ele esteja envolvido em processo de PCD atuando na modificação da parede celular de plantas (Ludwig & Tenhaken 2001). Esta hipótese tem sido sustentada principalmente (1) devido ao fato de estar presente na parede celular, o primeiro local de passagem do patógeno, (2) por apresentar possibilidades de modificações pós-traducionais e (3) devido ao seu conteúdo não usual de aminoácidos (média de Asn nas proteínas depositadas no *Expasy* é 4,44%).

Os genomas de arroz e *Arabidopsis*, que foram primeiramente seqüenciados contêm 11 e 7 membros com o domínio DCD, respectivamente. Pelo menos quatro subgrupos de proteínas podem ser identificados por comparação filogenética do domínio DCD de arroz e *Arabidopsis*. Os quatro subgrupos diferem na arquitetura onde o domínio DCD é localizado na estrutura da proteína. Enquanto no subgrupo I, o domínio DCD é encontrado no C-terminal da proteína, no subgrupo II, ele se localiza na região interna da proteína. O terceiro subgrupo é mais variável, sendo que as proteínas representativas apresentam o domínio DCD na região N-terminal, seguido por um domínio ParB. O quarto subgrupo possui o domínio DCD na região N-terminal, mas contém várias repetições de KELCH na parte C-terminal da proteína (Tenhaken *et al*; 2005).

Proteínas contendo domínio NAC

NAC (NAM, ATAF e CUC) é uma família de genes específica de plantas, sendo que a maioria das proteínas NAC contém um domínio N-terminal altamente conservado, o qual pode formar uma estrutura hélice-volta-hélice que se liga especificamente a uma sequência de DNA (Aida *et al.*, 1997), uma sequência sinal de localização nuclear e um domínio C-terminal variável. As proteínas NAC constituem uma grande família de fatores de transcrição específicos de plantas e está representada em *Arabidopsis* por mais de 100 genes (Riechmann *et al.*, 2000). O papel de proteínas NAC em resposta ao estresse abiótico e biótico tem sido descrito na literatura e várias proteínas NAC têm sido identificadas por causa da sua interação com outras proteínas de importância biológica nestes processos. As Proteínas da família NAC GRAB 1 e GRAB2 (Gemivirus REP A Binding) foram identificadas pela sua habilidade em interagir com a proteína REP A de *Wheat dwarf geminivirus* (Xie *et al.*, 1999). Além disto, foi demonstrado em *Arabidopsis* que a proteína TIP (TCV-interacting protein, uma proteína NAC-like) é essencial para a via de resposta e resistência ao TCV (turnip crinkle virus) (Ren *et al.*, 2000). A função de proteínas da família NAC na resposta ao estresse biótico foi evidenciado pela indução do gene StNAC de *Solanum tuberosum* na infecção por *Phytophthora infestans* (Collinge and Boller, 2001) e pela indução de vários genes NAC de *Brassica napus* por ataque de insetos herbívoros e por infecção por fungos. (Hegedus *et al.*, 2003).

Várias proteínas desta família de transativadores também foram associadas à resposta contra diferentes estresses abióticos. A expressão de diferentes genes NAC de *Brassica napus* foi induzida por choque térmico, frio e por desidratação (Hegedus *et al.*, 2003). Recentemente, foi demonstrado que plantas transgênicas superexpressando 3 diferentes genes NAC de *Arabidopsis* (ANAC019, ANAC055 e ANAC072) mostraram um significativo aumento da tolerância à seca (Tran *et al.*, 2004), além de ligarem à seqüência CATGTG e regular vários genes induzidos por estresse (Tran *et al.*, 2004). Esses estudos indicam o possível papel das proteínas NAC em resposta a estresses.

As proteínas NAC consistem de dois domínios, sendo que o domínio NAC situado na porção N-terminal da proteína pode ser subdividido em cinco subdomínios conservados (A-E), exibindo uma carga livre negativa onde se situa a região de ligação ao DNA. O domínio C-terminal tem a função de transativação e são carregados positivamente (Xie *et al.*, 1999). Subdomínios A, C e D são altamente conservados em proteínas NAC de diferentes espécies, enquanto os subdomínios B e E são mais diversos (Ooka *et al.*, 2003). O domínio não conservado C-terminal, de proteínas NAC, possui atividade de ativação transcricional (Ren *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2000; Duval *et al.*, 2002).

Membros da família de genes NAC de plantas estão envolvidos em muitos processos de desenvolvimento da planta (Olsen *et al.* 2005), incluindo a manutenção do meristema do broto apical (SAM) (Aida *et al.*, 1997; Weir *et al.*, 2004), sinalização através de hormônios (Aida *et al.*, 2002; Che *et al.*, 2002; Greve *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2000), resposta de

infecção por patógeno (Collinge and Boller 2001; Ren *et al.*, 2000; Selth *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 1999), senescência foliar (John *et al.*, 1997), desenvolvimento do embrião (Duval *et al.*, 2002), transporte do mRNA por grandes distâncias através do floema (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999) e resposta a diferentes estresses abióticos (Hegedus *et al.*, 2003; Tran *et al.*, 2004).

CAPÍTULO 1

UM NOVO RAMO DE SINALIZAÇÃO DO ESTRESSE NO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO INTEGRA COM O SINAL OSMÓTICO ATRAVÉS DE UMA RESPOSTA APOPTÓTICA DEPENDENTE DAS PROTEÍNAS NRPs

INTRODUÇÃO

As plantas estão constantemente submetidas a condições adversas do meio ambiente que restringem profundamente o desenvolvimento, crescimento e produtividade. Em respostas a estresses, as células vegetais desenvolveram um conjunto complexo de mecanismos de defesa que operam para aumentar a tolerância contra estas condições restritivas e são críticos para garantir a sobrevivência das plantas em geral. Em condições de campo, é provável que diversas condições de estresses atuem simultaneamente limitando o crescimento e a produtividade. A identificação de vias de sinalização de resposta em células afetadas por diferentes estresses, bem como das interações entre estas vias, constitui um dos interesses majoritários de pesquisas na área de interações das

células vegetais com o meio ambiente. O nosso conhecimento sobre integração de vias de sinalização de respostas a diferentes estresses fisiológicos tem aumentado consideravelmente na última década com as análises de expressão gênica de alcance genômico em plantas submetidas a diversas condições de estresses (Kreps *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2002; Denekamp & Smeekeens, 2003; Houde *et al.*, 2006). Recentemente, por meio de análises de *microarray* em soja, nossa equipe de pesquisadores identificou uma possível via de convergência que integra as respostas ao estresse osmótico e ao estresse causado pelo acúmulo de proteínas mal dobradas no retículo endoplasmático (UPR-unfolded response pathway) (Irsigler *et al.*, 2007).

Em plantas, sabe-se muito pouco a respeito dos componentes de sinalização da UPR. Recentemente foi identificado em *A. thaliana* dois homólogos a Ire1 que são proteínas associadas à membrana do retículo e que estão envolvidas na detecção de proteínas mal dobradas presentes no lúmen desta organela, além de um fator de transcrição chamado de AtbZIP60 que é induzido pelo estresse no retículo e é capaz de induzir a expressão dos genes *CALENEXINA* e *BIP* que são alvos conhecidos da via UPR (Iwata e Koizumi, 2005). Embora alguns componentes tenham sido descritos faltam informações sob o modo de atuação destas proteínas em condições de estresse (Urade, 2007), e os mecanismos moleculares da sinalização da UPR.

Apesar do potencial da via UPR em acomodar respostas adaptativas para sobrevivência, esta via de sinalização tem sido pouco explorada em plantas como estratégias para melhorar tolerância a

estresses. Evidência sob a possível comunicação entre a via UPR e vias de resposta a estresse osmótico foram anteriormente fornecidas pela demonstração da indução em soja de uma isoforma do chaperone molecular BiP, residente no RE, por tunicamicina (um ativador potente da via UPR) e por estresse hídrico (Cascardo et al., 2000). Embora esta indução coordenada de BiP pareça ocorrer por meio de vias de sinalização distintas, tem sido observado que superexpressão de BiP em tabaco confere às plantas transgênicas maior tolerância à seca (Alvim et al., 2001). Mais recentemente, a análise, em escala genômica, do transcriptoma diferencialmente regulado por estresses osmótico e do retículo endoplasmático identificou 10 genes co-regulados com expressão aumentada e 75 co-regulados com expressão diminuída, sendo que destes últimos, aproximadamente 70% deles estão envolvidos com o processo fotossintético (Irsigler et al. 2007). A indução coordenada dos genes co-induzidos pelos estresses osmótico e do retículo ocorreu com cinética similar. Além disto, sete dos genes co-induzidos (*NAM*, *ATAF2*, *N-rich1*, *N-rich2*, *UBA*, *GST* e *GST2*) tiveram um aumento sinérgico na expressão quando as plantas foram submetidas a uma combinação de AZC e PEG, sendo considerados alvos desta nova via de integração entre os estresses do retículo e osmótico (Irsigler et al., 2007). Entre eles, os dois genes *N-rich1* e *N-rich2* exibiram as mais fortes induções sinérgicas pela combinação dos estresses.

As ESTs que representam os genes *N-rich1* e *N-rich2* codificam proteínas com domínios N-terminal (*N-rich1*) e C-terminal (*N-rich2*) similares à proteína NRP (N-Rich Protein), que é induzida durante a

resposta de hipersensibilidade (HR) em soja infectada com bactérias incompatíveis (Ludwig & Tenhaken, 2001), e contém em sua região C-terminal um domínio relacionado com processos de morte celular e desenvolvimento (DCD – Development and Cell Death). A indução de *NRP* está especificamente associada ao evento de PCD (morte celular programada) induzido por patógenos incompatíveis e, provavelmente, *NRP* participa em uma via de sinalização que leva a resposta hipersensitiva.

A morte celular programada (PCD) é um processo com características morfológicas e bioquímicas distintas e envolvem vias de sinalização que controlam a destruição das células com o mínimo dano as células vizinhas (Steller, 1995; Pallavan-Unsal *et al.* 2005). Assim como em outros organismos, em plantas a PCD ocorre durante diferentes processos de desenvolvimento, tais como senescência, embriogênese, desenvolvimento do tecido vascular e processos de interação da planta com patógenos (Pennell & Lamb, 1997; Danon *et al.*, 2000; Lam *et al.*, 2001). Em mamíferos existem duas vias que controlam a PCD. Uma é independente da mitocôndria e envolve a participação de receptores específicos e a outra é dependente da mitocôndria, que libera vários fatores apoptóticos no espaço intermembranas que controlam a atividade de proteínas da família Bcl-2. Nos dois casos, o resultado final é a ativação de caspases efetoras da morte celular. Em plantas, muitas características morfológicas e bioquímicas de PCD têm sido caracterizadas apesar de membros da família das Bcl-2 ainda não terem

sido descritos (Danon *et al.*, 2000; Balk & Leaver, 2001; Lam *et al.*, 2001; Hoerberichts & Woltering, 2003; Urade, 2007).

Baseado nas funções putativas dos genes *N-rich*, o objetivo principal dessa investigação foi avaliar se a via integrativa pudesse transduzir um sinal de morte celular programada gerado por estresses prolongados do retículo e/ou osmótico. Para isso, os genes *N-rich*, alvos da via integrativa, foram clonados, e o seu envolvimento na indução de morte celular programada foi diretamente avaliado em células de soja em suspensão e em folhas de tabaco.

MATERIAIS E MÉTODOS

Células de soja em suspensão e Tratamentos

Cultura de células de soja em suspensão anteriormente preparadas (Cascardo *et al*, 2001) foram cultivadas em meio MS Soja (Finer & Nagasawa, 1988) mantendo-se o procedimento de subcultivos sucessivos semanais. Os tratamentos foram realizados em culturas de células cinco dias após repicagem.

As células foram tratadas com Polietilenoglicol 10% (p/v) (PEG; MW 8000), Tunicamicina (Sigma) 10 µg/mL, Ciclohexamida (Sigma) 0,5 µg/mL, BAP (6-benzilaminopurina), Zeatina 10 µM ou ABA 100. µM, pelo período de tempo indicado nas respectivas figuras. Após os tratamentos, as células foram filtradas sob vácuo e lavadas com uma solução isotônica de NaCl 0,25 M e, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para análises subseqüentes.

Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen), tratado com 3 unidade de DNase livre de RNase (Promega) para eliminação do DNA contaminante e purificado com colunas RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Após a extração e purificação, o RNA foi quantificado (DU 650 BECKMAN Spectrophotometers) e sua identidade avaliada em gel de agarose desnaturante 1,5 %. A síntese de cDNA foi realizada utilizando 2

μg de RNA total, oligo dT e a Transcriptase Reversa MMLV (Invitrogen) segundo recomendações do fabricante.

PCR em tempo real (qRT-PCR)

Todo o procedimento de PCR em tempo Real, incluindo testes, validações e experimentos foram conduzidos seguindo manuais da *Applied Biosystems*. As reações de PCR em tempo real foram conduzidas utilizando o aparelho 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), oligonucleotídeos específicos (Tabela 1), cDNAs dos tratamentos e o SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Para a quantificação da expressão gênica, foi utilizado o método comparativo de Ct: $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ e $2^{-\Delta\text{Ct}}$. Como controle endógeno para normalização dos dados do qRT-PCR, foi utilizado RNA da helicase de soja, que apresentou baixa variação nos valores de expressão entre os tratamentos.

Clonagem molecular do cDNA completo do gene *NRP-B*

A seqüência 3' do gene *N-rich 1* foi obtida por RACE (**R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds) usando o Gene Racer Kit (Invitrogen). Para isso, inicialmente foi preparado um cDNA de plantas, a partir de RNA extraído de folhas de soja, tratadas com PEG por 10h, utilizando transcriptase reversa (Invitrogen) e oligo dT especial fornecido pelo GeneRacer Kit (Invitrogen), que insere uma seqüência conhecida no final do gene. O gene *N-rich1* foi designado *NRP-B*.

Tabela 1 – Lista dos Oligonucleotídeos específicos para qRT-PCR

Primer	Seqüência (5' – 3')	Gene alvo
NAMFW	ACGGAGACTTCAGATTCGGTGC	NAM
NAMRV	CATCGTTATTCCACTTGGGGTCGC	
NRP-BFW	TACAGGCATCCAATTTGGCGAACC	NRP-B
NRP-BRV	TGACTTGAAAGAGTTGATCTCACCCC	
NRP-AFW	GGCACAAAGACTGGTGCTGAGA	NRP-A
NRP-ARV	CTCTGTATCGTGGAGGCAGACC	
HELICFW	TAACCCTAGCCCCTTCGCCT	HELIC
HELICRV	GCCTTGTCGTCTTCCTCCTCG	
CALNFW	TGATGGGGAGGAGAAGAAAAGGC	CALN
CALNRV	CACTTGGGTTTGGGATCTTGGCTC	
BIPDFW	ATCTGGAGGAGCCCTAGGCGGTGG	BIPD
BIPDRV	CTTGAAGAAGCTTCGTCGTAAACTAAG	
LTPFW	CCCATGGCACATGCAGCTAT	LTP
LTPRV	GGCGGCATTGAGGCTCTTC	
SMPFW	GCCGAAGTGAAGAAAAGACGAACC	SMP
SMPRV	CTTGGGCTGTTTGTGGGTCTTC	

Os primers foram desenhados utilizando o programa Primer Express 3.0 (*Applied Biosystems*)

A partir do cDNA, foi realizada uma amplificação utilizando um oligonucleotídeo que ancora nesta seqüência alvo e o oligonucleotídeo *Forward* de *N-rich 1 (NRP-B)* utilizado no PCR em tempo real (Tabela 2). O fragmento obtido foi clonado segundo informações fornecida pelo TOPO TA CLONING (Invitrogen), originando o clone pUFV826, que foi seqüenciado, obtendo a extremidade 3' do gene. Para realização das construções, foram utilizadas as técnicas padrões de clonagem, conforme descrito por Sambrook et al., (1989).

Para a expressão transiente em protoplastos, os genes *NRP-B* e *NRP*, aqui designado *NRP-A* (Ludwig & Tenhaken, 2001, gi:57898928), foram amplificados utilizando oligonucleotídeos que inserem sítios para *BglIII* e *EcoRI* (Tabela 2), e clonados nos sítios correspondente no vetor pMON921, originando os clones pUFV967 e pUFV849, respectivamente.

Para a expressão transiente em folhas de tabaco, os genes *NRP-B* e *NRP-A* foram amplificados e clonados utilizando oligonucleotídeos que amplificam o cDNA completo (Tabela 2), sendo seus respectivos fragmentos clonados segundo informações fornecidas por pCR8/GW/TOPO TA CLONING (Invitrogen), originando os vetores de entrada pUFV908 e pUFV874. A partir deles por LR clonase (Invitrogen), o fragmento de cada gene foi recombinado para o vetor 35S-cassB-YFP-NOS terminator:pCAMBIA1300 (gentilmente cedido por Steve Slocombe da Universidade de Lerds – Inglaterra) originando os clones pUFV937 e pUFV938, que contém os cDNAs de *NRP-B* e *NRP-A* sob o controle do promotor 35S, respectivamente.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos específicos para clonagem em diferentes vetores.

Primer	Seqüência (5' – 3')	Vetor de destino
FwNRich1	TACAGGCATCCAATTTGGCGAACC	pCR4
Oligo dT Primer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T) ₂₄	
FwNRP-CI	GA <u>AGATCT</u> ATG GACAACAACAATGACTTTTG	pMON921
RvNRP-CI	CGGAATTC CT ATGCTGGAATGGCTTTGAAA	
FwNRich1-CI	GA <u>AGATCT</u> ATG GAGAATAATAATCAGTCGTT	pMON921
RvNRich1-CI	CGGAATTC TT ATGCCGGCAAAGCCTTAAAAG	
FwGt NRich1	ATG GAGAATAATAATCAGTCGTT	pCR8/GW/TO
RvGt NRich1	TT ATGCCGGCAAAGCCTTAAAAG	PO
FwGtNRP	ATG GACAACAACAATGACTTTTG	pCR8/GW/TO
RvGtNRP	CT ATGCTGGAATGGCTTTGAAA	PO
FwGmNRP	AAAAAGCAGGCTTCACAAT ATG GACAACAACAATGA	pDONR201
RvGmNRP	AGAAAGCTGGCTCTT CT ATGCTGGAATGGCTTG	
GtNRichFw	AAAAAGCAGGCTTCACAAT ATG GAGAATAATAATCA	pDONR201
RvNRichGt	AGAAAGCTGGCTCT GCCGGCAAAGCCT	

* Nucleotídeos em negrito correspondem à *star/stop códon*. Nucleotídeos grifados representam sítios para enzimas de restrição. Nucleotídeos tachados representam attB parcial.

O cDNA de *NRP-B* foi amplificado com oligonucleotídeos que introduziram extensões adaptadoras apropriadas, necessárias para a recombinação gênica, mediada pela enzima BP Clonase no vetor pDONR201, originando o clone pUFV921. Por LR Clonase (Invitrogen), o fragmento em pUFV921 foi transferido para o vetor pK7WG2, originando o clone pUFV940 que contém o cDNA de *NRP-B* sob o controle do promotor 35S.

Para localização subcelular de *NRP-B*, o cDNA foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos específicos (Tabela 2) para clonagem por recombinação no vetor de entrada pDONR201, exceto que a sequência do oligonucleotídeo reverso não continha o códon de parada. O fragmento amplificado foi clonado no vetor pDONR201, originando o clone pUFV977 e transferido para o vetor pK7FWG2. O clone resultante pUFV1002 contém o cDNA de *NRP-B* fusionado a GFP e sob o controle do promotor 35S.

Expressão transiente em protoplastos de soja

Protoplastos foram preparados em ambiente estéril a partir de células de soja essencialmente como descrito previamente (Fontes *et al.*, 1994). Cinco dias após a repicagem, as células foram lavadas duas vezes com manitol 0,6 M, centrifugadas a 500 rpm por 2 minutos, ressuspendidas em igual volume de solução enzimática [celulase 0,5% (p/v), macerozima R-10 0,5% (p/v), pectoliase Y23 0,1% (p/v) em tampão de lavagem (manitol 0,6M; MES 20 mM; pH 5,5] e incubadas por 3 horas

sob agitação de 40 rpm. A digestão foi acompanhada a cada 30 minutos por microscopia. Em seguida, os protoplastos foram filtrados em peneira de 65 μm e coletados por centrifugação a 500 rpm por 2 minutos, sendo lavados 2 vezes com tampão de lavagem. Os protoplastos foram então novamente coletados por centrifugação por 2 minutos a 500 rpm, ressuspensos em 2 mL de tampão de lavagem e transferidos para um outro tubo contendo tampão gradiente [sacarose 20% (p/v); manitol 0,6M; MES 20 mM; pH 5,5]. O material foi centrifugado por 5 minutos a 500 rpm, sendo coletada a banda na interface, que corresponde aos protoplastos viáveis. Estes foram lavados 2 vezes com tampão de eletroporação (25mM HEPES-KOH pH 7,2, 10 mM KCl, 15 mM MgCl_2 e 0,6M de manitol) e ressuspensos em 2 mL do mesmo tampão. Os protoplastos foram contados em microscópio usando uma câmara de Neubauer. Os ensaios de expressão foram conduzidos por meio de eletroporação a 25 μF de capacitância e 250 volts (Gene Pulser – BIORAD) de 10 μg de DNA (cassete de expressão) e 40 μg de ssDNA, para 2×10^5 – 5×10^6 protoplastos em um volume final de 0.8 mL. O material foi mantido no gelo por 15 minutos e plaqueado em 7-9 mL de MS Soja + 0,6 M de manitol pH 5,5. Para a expressão transiente o material foi incubado por 36 horas.

Ensaio de Caspase-3

Para a dosagem da atividade de caspase-3, após expressão transiente, foi utilizado o ApoAlert® Caspase-3 Colorimetric Assay Kit (Clontech) seguindo recomendações do fabricante. O substrato da enzima

foi o DEVD-pNA e o inibidor irreversível da atividade de caspase-3 utilizado foi o tetrapeptídeo sintético DEVD-fmk, ambos fornecidos pelo fabricante.

Agroinoculação em folhas de tabaco

Agrobactéria transformadas com os vetores de interesse foram crescidas por 16 horas, e centrifugadas por 5 min a 8000 RPM. O sobrenadante foi removido e as células foram lavadas em 1 mL meio de infiltração (10 mM MgCl₂, 10 mM MES pH 5,6 e 10 µM de acetoseringona). Estas foram centrifugadas por 5 min a 8000 rpm, e ressuspendidas em 1 mL do mesmo tampão, sendo diluídas em meio de infiltração para OD de 0,2-0,4. Utilizando seringas estéreis sem agulha, folhas jovens de tabaco foram infiltradas por uma gentil pressão através do estômato na epiderme inferior.

Localização celular de *NRP-B (N-rich)*

Folhas de tabaco foram inoculadas com agrobactérias transformadas com a construção pUFV1002, pK7FWG2-N-rich. Três dias após a inoculação, as folhas transformadas foram observadas no microscópio LSM 510 META invertido (ZEISS) para obtenção das imagens. Foi utilizada a objetiva de imersão de óleo de 40x1,4 e o laser de argônio. O GFP foi excitado a 488 nm, e sua emissão foi coletada a 505-530 nm na facilidade de uma trilha. A fenda do microscópio foi fixada,

fornecendo uma faixa óptica de 1,5 a 2,0 μm . As imagens foram processadas com auxílio do software “LSM Image Browser 4” (ZEISS) e posteriormente editadas no programa Adobe Photoshop.

Técnicas de Biologia Molecular:

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

Análises de Bioinformática

Análises de homologia foram realizadas utilizando o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990). As seqüências de proteínas foram analisadas utilizando ferramentas como o programa MEGA (Kumar *et al.*, 2001), ferramentas contidas no Expasy (www.expasy.ch/tools), CBS (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) e SDSC Biology Workbench (<http://workbench.sdsc.edu>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Clonagem do cDNA completo de *N-rich1*, designado *NRP-B*, e análises de bioinformática

Análises de comparação, utilizando o programa Blast, do EST de *N-rich1* mostraram que a seqüência estava incompleta, faltando a região 3' do gene, que foi obtida através da técnica de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). A análise da seqüência obtida demonstrou que ela continha os ESTs *N-rich1* e *N-rich2* (Figura 2), indicando que representavam o mesmo gene, designado *NRP-B* (N-rich protein-B). A proteína deduzida tem um peso molecular estimado de 37092.28 Da e pI 7.05 (Figura 3) e compartilha com a proteína NRP de soja, aqui designada NRP-A, alta similaridade de seqüência na região carboxi, que contém o domínio DCD, além de um conteúdo do aminoácido asparagina acima do normal na região amino-terminal, mais divergente (Figura 4). A região interna de NRP-B delimitada pelos resíduos 102 a 164 não possui similaridade com qualquer outra proteína do Banco de Dados, e, portanto, o significado funcional e estrutural dessa região permanece para ser determinado (Figuras 2 e 3).

Além da presença do domínio rico em asparagina e do DCD (Figura 4), foram evidenciados, por meio de bioinformática, putativos sítios de fosforilação, glicosilação e miristorilação na seqüência de NRP-B, como possíveis substratos de enzimas conhecidas. A proteína deduzida NRP-B também compartilha com NRP-A (Ludwig & Tenhaken, 2001) um

>NRP-B

TTTTATATACCAACTAGTGATTTCTTATCAAATTTTCTCATTCCAACCTGAACCTGCTCTGAATCCAATT
CTTCTTCTTCTTGTCTCTGTTTAAGGCAATACAACATTTACTACTCATACTCAAAGTAGCTTAGTGTTTTGT
TTAGCATATCATGGAGATAATAATCAGTCGTTTTGGCAATTCAGTGACCAGCTGAGGTTACAGGCATCCAAT
TTGGCGAACCTTTCTCTAAACGATTCGATTTGGAGCAACAATTACATCTCCAAGAGGCGTGATGAAAGGATTA
ATTTTGACATCAAAGTGGGGGTGAGATCAACTCTTTCAAGTCAAAGGATCCAGCTTGTGATTACAACGATAA
CGTGAATGGATCTCTTCTTGCATGCCTTACAACAACAACAACAACAACATTATTTTGGGTTTTGGTGGGA
GTTGGTCTCAATGGAGGCTTCAACAAGGGAATTTACTCCAAGCCTGCCTTTGCCAATCTCAACAACAATATTA
ATCTCAATATCAATCCTAAGGGACACAAGGGCAAGGTTGAAGATGAGCTTTTTACCCATCCAATCTTCCA
GAAAAACAACAACCTCAACAAAAACATGGGGACAACAACAACAATGATAACAATAAGGATCCAAGGCTGCT
GGCGACAAGAGATTCAAAACGCTGCCACCATCAGAGTCTTCTTAGGGATGAAACCATTGGAGGCTATATCT
TTGTTTGAACAATGATACCATGGCTGAGAATCTCAAGAGACAACCTTTCGGTCTGCCTCCACGATACAGAGA
TTCTGTTCGGGCCATTACTCCGGGGTGGCCCTTTTCTTTACAACCTATTCCAACCTCCAACCTCCATGGAATC
TTTGGGCTGCAAGTTTGGAGGGTCAAATATTGATCCATCAGCTTGGGAGGATAAGAAGTGCCTGGTGAAT
CTCGTTTCCCGCTCAGGTACGAGTGATAACTAGGAAAACCTTGTGAACCACTGGAGGAGGATTCTTCAGGCC
AATCTTCAACCTATGATGGTCCCAAGTTCGGTCTTGAGCTGAATGTGCCCGAGGCGTGTCTCTGCTGGAT
ATTTTTCAGAAACAAGACCTTCAGTGACACTTTTAAGGCTTTGCCGGCAATAAAGGAGATAAATAGCAAAA
TAATACAACAAGAAGAACATCACTCACAGAGGCAATAGATAATTAGAGGTTTGGGTTGGTTGAAAGTTATTA
AGTATGGACTTAAGAAGAGAGTCCGAAAGACAAAACAAATGAATATAACGGAGGACGCTTGGATATTCAACA
ACCTATATATTTATTACTAGTACTTTTGTATAGAGGATGGTCTATTATACTCATATTATTAAGAGAGAATAGA
ATAAGGATGAACTATTTTGCATATGGGTTCTTGTACAAAACTACAAATTTGGCGACAAATGGAAGCCTATAT
GTTGTAGCTTGTGTTGTGTTTTCAGAAAGGAACTCAAATATAGTGGAGAAGTGTGAAACCATGGTGGTCCATTC
AGTGTATTTCATACATTATATACGTGTGCTTTAAACNTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAANGAAA

Figura 2 – Sequência de nucleotídeos de NRP-B obtida pelo RACE. A região sublinhada evidencia uma região que não tem similaridade com nenhuma proteína no banco de dados. Em vermelho é mostrada a região de similaridade entre NRP-B e NRP-A. A região entre as duas marcações azul é a região da EST de NRich 1 enquanto a região entre as duas marcações verde representa a localização de NRich 2.

>NRP-B

MENNNQSFQWQFSDQLRLQASNLANLSLND SIWSNNYISKRRDERINFDIKVGGEINSFKSKDPACD
YNDNVNGSLLAMPYNNNNNNNIIILGFGGVGLNGGFNKGIYSKPAFANLNNNINLNINPKGHKGKVE
DEL FHP SKSSKNNNLNKKHGDNNNDMNKDSKAAGDKRFKTLPPSESLPRDETIGGYIFVCNNDT
MAENLKRQLFGLPPRYRDSVRAITPGLPLFLYNYSTHQLHGIFEAA SFGGSNIDPSAWEDKKCPGE
SRFPAQVRVITRKTCEPLEEDSFRPILHHDGPKFRLELVPEALSLLDIFAEQDTFSDTFKALPA

Figura 3 – Sequência de aminoácidos de NRP-B. As asparaginas estão em vermelho, enquanto o domínio DCD é marcado em cinza. A região sublinhada evidencia uma região que não tem similaridade com nenhuma proteína no banco de dados.

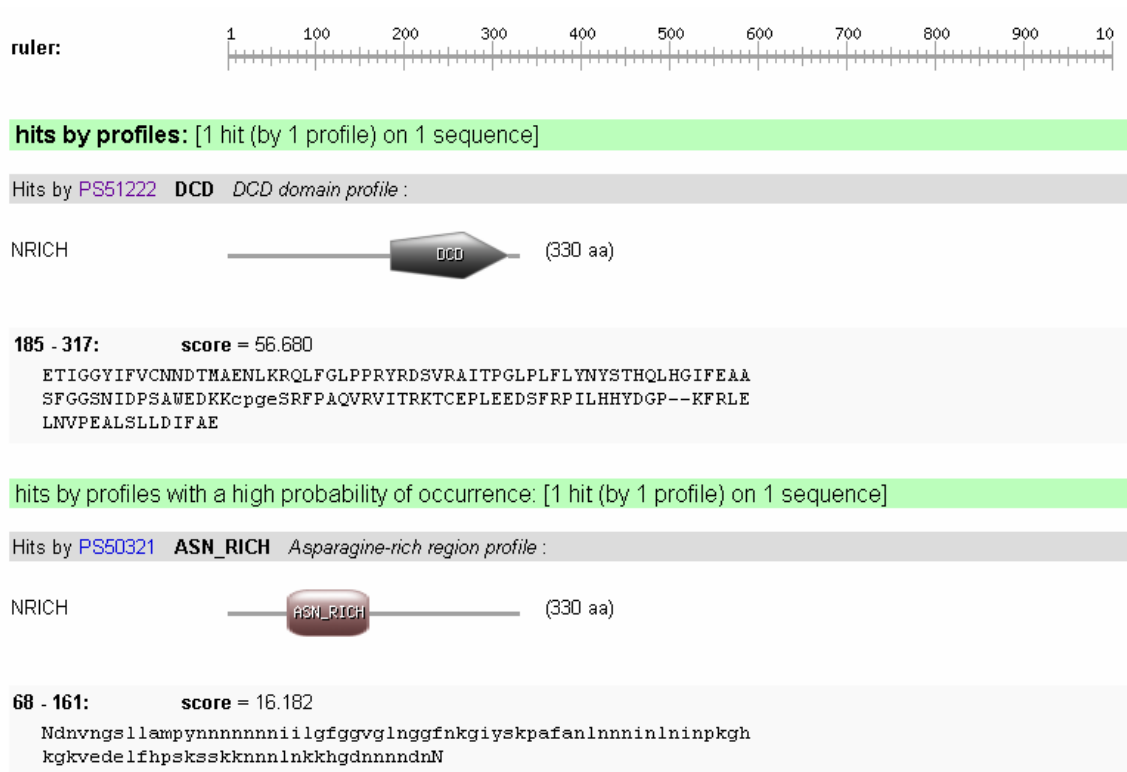


Figura 4 – **Domínios encontrados em NRP-B.** Os domínios em destaque foram identificados por meio de análise da seqüência de aminoácidos realizada com o PROSITE retirando os filtros de baixa complexidade.

perfil similar de hidropatia (Figura 5) e, assim como NRP-A, não forma hélices transmembrana e nem tem homologia com proteínas de membrana de *Arabidopsis thaliana* (Figura 6). Por meio de fracionamento celular, a proteína NRP-A foi localizada na parede celular (Ludwig & Tenhaken, 2001) e devido à similaridade estrutural entre as duas proteínas, é possível que NRP-B também esteja localizada na parede celular. Entretanto, análises da localização celular pelo PREDOTAR indicam que a seqüência não contém sinal de exportação na região amino-terminal para o aparelho secretor. Ressalta-se que apesar de não ter sido descrito ainda nenhuma proteína da família de Bcl-2 em plantas, uma descrita em humanos, e muito diferente de NRP-B, possui na região amino uma seqüência de cinco Asparaginas que acredita-se ter um papel importante (Chen *et al.*, 1999).

Análise comparativa de seqüência com proteínas de outras espécies de plantas evidenciou a presença do domínio DCD altamente conservado entre os homólogos na região C-terminal, e alta divergência na região amino-terminal (Figura 7). As espécies que possuem o domínio DCD no C-terminal foram previamente classificadas como representativos do subgrupo I dessa família de proteínas (Tenhaken *et al.*, 2005). O agrupamento hierárquico baseado na conservação de seqüência de aminoácidos evidenciou a separação desses representativos do subgrupo I em dois ramos caracterizados pelo tipo de seqüência conservada presente no amino-terminal, seqüência verde e amarela destacada na Figura 7 (Figura 8). As proteínas NRP-A e NRP-B de soja foram agrupadas sob o mesmo sub-ramo e em proximidade com uma proteína

de função desconhecida de *A. thaliana* (At5g42050). Análise por meio das ferramentas disponíveis no TAIR (banco de dados de *A. thaliana*) demonstrou que o locus At5g42050 é muito induzido por ciclohexamida, estresse osmótico, salino e em folhas em senescência (Tenhaken *et al.*, 2005), sendo, portanto um interessante alvo de estudo futuro.

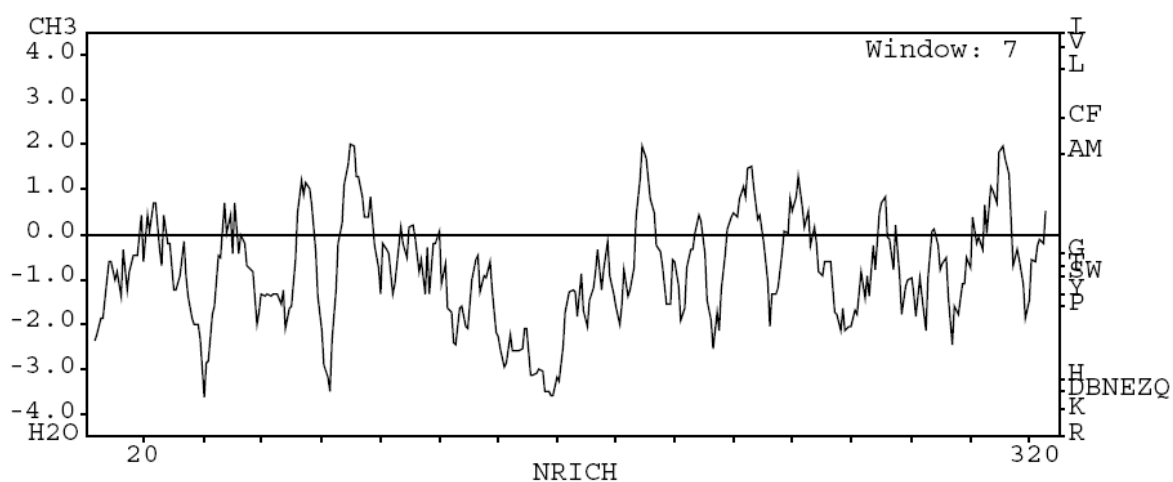


Figura 5 – **Padrão de Hidropatia de NRP-B.** Análise da seqüência de aminoácidos realizada com o programa GREASE evidenciou a presença de dois domínios distintos com polaridades diferentes.

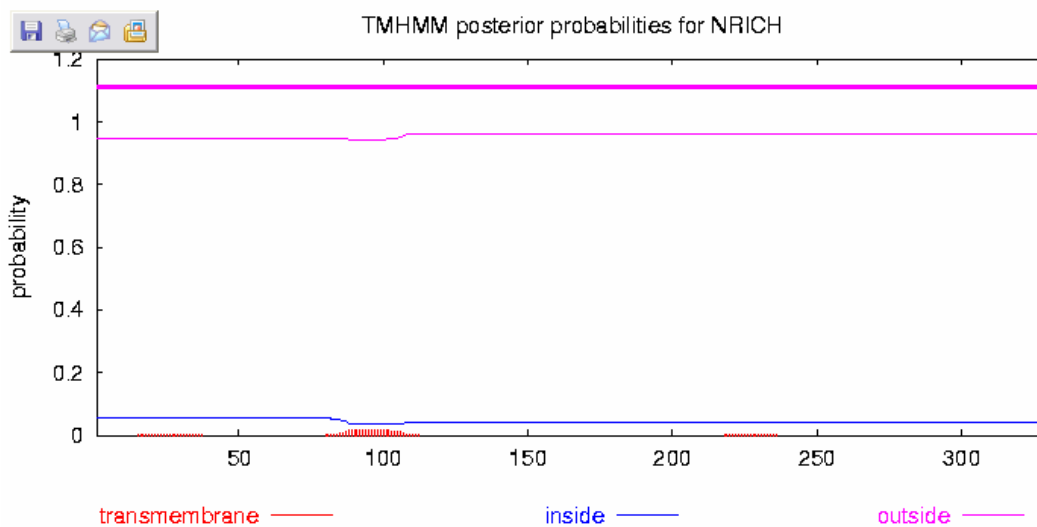


Figura 6 – **Formação de Hélices Transmembranas por NRP-B.** Análise da seqüência de aminoácidos realizada com o programa TMHMM mostra que o gene não forma hélice transmembrana, provavelmente não sendo localizado na membrana plasmática.

GDA2 *P. sativum*
Citrus_
gda-1_A. thaliana
A. _thaliana 2
S. tuberosum
O. sativa 5
O. sativa 4
V. vinifera
O. sativa 3
O. sativa 2
O. sativa 1
GDA2_0. sativa
NRP_G._max
NRICH_Glycine_max
A. _thaliana 3

```

-----
MDNMH---SFWQLGDELRGQSRFSEDQSWLRAASRLAEQTRFKGERMNN
---MD---SFWQLGDELRGQTRASEDHKWSTVATKLAEQTRMKGERMNN
---MD---SFWQLGDELRGQTRASEDHKWSTVATKLAEQTRMKGERMNN
MENMQ---SYWQFGDELRGQSKASEDHKWSTAALKLSEQMKYKGERMNN
---MD---NLWHLGDEFRGQSKVVEDRQWSLMTSKLAEINKSKAERTNE
---MD---NLWHLGDEFRGQSKVVEDRQWSLMTSKLAEINKSKAERTNE
-----MAHQLIMGATAASQYQTRWIPATRVAHNGQTQWPDDDH
MEGYD---REFYQFSDQLRLQTASFSGLSLGD-SIWS SPS-----DRRN
MEGYD---REFYQFSDQLRLQTASFSGLSLGD-SIWS SPS-----DRRN
MEGYD---REFYQFSDQLRLQTASFSGLSLGD-SIWS SPS-----DRRN
MEGYD---REFYQFSDQLRLQTASFSGLSLGD-SIWS SPS-----DRRN
MDNNN---D-FWKFSDDLRLLESG-LANLNLNDYSIWSNSYSSKRPDQRN
MENN---QSFWQFSDQLRLQASNLANLNLND-SIWSNNYISKRRDERIN
MEYNNNNQSQFWQFSDQLRVQTPNLANLNLND-SIWS TNSVFK---ERRN

```

GDA2 *P. sativum*
gi Citrus_
gda-1_A. thaliana
A. _thaliana 2
S. tuberosum
O. sativa 5
O. sativa 4
V. vinifera
O. sativa 3
O. sativa 2
O. sativa 1
GDA2_0. sativa
NRP_G._max
NRICH_Glycine_max
A. _thaliana 3

```

-----
LDLSKG--MTEIRPRDKIMYHEDNNF-ESFNFNMMNLDNKVVEN----
LDLSKG--YTEFRPSEKFSFQENN-----LNFNMLNLDGKFGES----
LDLSKG--YTEFRPSEKFSFQENN-----LNFNMLNLDGKFGES----
LDLSKS--SAEIRPRGNHMFQEDNKW-ES--LNFNMLNLESKMTEN----
LDYARMNTIPDVQKQWVKVSYHQDES--KMDHLNLGLMNLDLKMNDIRMND
LDYARMNTIPDVQKQWVKVSYHQDES--KMDHLNLGLMNLDLKMNDIRMND
HRLTRP-----IDEPMRNWDTKLQHY----
-EPAFDGEYHHFSSPSPAKNAIANINGVAGNLDGPGGLIGSGKLAFGATKA
-EPAFDGEYHHFSSPSPAKNAIANINGVAGNLDGPGGLIGSGKLAFGATKA
-EPAFDGEYHHFSSPSPAKNAIANINGVAGNLDGPGGLIGSGKLAFGATKA
-EPAFDGEYHHFSSPSPAKNAIA-----TKA
FDVK-GSDFNNNNSSKAFDDDFNDGWKITNSNGPLFSMPHNNNNNTLEV
FDIKVGGEINSPK--SKDPACDYND----NVNGSLLAMPYNNNNNNNI I
LDIAATTDKNNNQIDYYQKKTSDN----INSNWNWSSGSSNNDMG----

```

GDA2 *P. sativum*
Citrus_
gda-1_A. thaliana
A. _thaliana 2
S. tuberosum
O. sativa 5
O. sativa 4
V. vinifera
O. sativa 3
O. sativa 2
O. sativa 1
GDA2_0. sativa
NRP_G._max
NRICH_Glycine_max
A. _thaliana 3

```

MN-----KNSLRNGVYNNMNAVYQKSNANFVG
VT-----KSSLRNGIYNNMNAVYQKNSGHNMG
IMG-----KTSMQSNVYNNMNTVVFQKNDFKSGG
IMG-----KTSMQSNVYNNMNTVVFQKNDFKSGG
MS-----KNRIMDSIYNANPVYLPNPNFNSLG
AAM-----KNPFRGMAYNMNQLYPKGGNGNVN
AAM-----KNPFRGMAYNMNQLYPKGGNGNVN
-----FHLHQ
DRYNSVNL PVDNNNNNKSYGGAAKINNNNVNAF GFNKMGGYNNSSNGGGN
DRYNSVNL PVDNNNNNKSYGGAAKINNNNVNAF GFNKMGGYNNSSNGGGN
DRYNSVNL PVDNNNNNKSYGGAAKINNNNVNAF GFNKMGGYNNSSNGGGN
DRYNSVNL PVDNNNNNKSYGGAAKINNNNVNAF GFNKMGGYNNSSNGGGN
GGFNKGGGIYSNTNTTISYHPNLLNNAF GGFNKG IYSNTTSSPYLNNN
LGFGGVG-----LN----GGFNKGIYS-----KPAFAN-
LGFPGVGSKSTVDLNPIDKFNSPFNDTWKFNSVNVVNGYSPSSAVNGD-

```

GDA2 *P. sativum*
Citrus_
gda-1_A. thaliana
A. _thaliana 2
S. tuberosum
O. sativa 5
O. sativa 4
V. vinifera
O. sativa 3
O. sativa 2
O. sativa 1
GDA2_0. sativa
NRP_G._max
NRICH_Glycine_max
A. _thaliana 3

```

----NMNSNKY----SGNVQLNKDPH-----SNNN
----NLMVNKY----GGNNLSVKEAE-----NNNN
----NMKVNY----NGNIVANKEMS-----NNKH
----NMKVNY----NGNVVANKEMS-----NNKH
----NSLSKF----NASNYT-KEPS-----KNNN
SFKMNVGVNKYLHSPNGKDVNGKNSG-----ANSN
SFKMNVGVNKYLHSPNGKDVNGKNSG-----ANSN
-----
YGGNGGDVKS YFNKSVGRPASNNNNNNSNGGGGYGKKGDDGAGGKKKHA
YGGNGGDVKS YFNKSVGRPASNNNNNNSNGGGGYGKKGDDGAGGKKKHA
YGGNGGDVKS YFNKSVGRPASNNNNNNSNGGGGYGKKGDDGAGGKKKHA
YGGNGGDVKS YFNKSVGRPASNNNNNNSNGGGGYGKKGDDGAGGKKKHA
HHHLDDNNLNRNMLKGYKTYFKGEDQFHTPKSAKKNTTNNNNKKGHD
---LNNINLN- INPKGHKGVED-ELFHPKSSKK---NNNLNKKHGD
---FNKGVYTS-MKKYGYNVNLKNNNKNKGI DEHDQIQKGGKKNRKNQON

```

GDA2 *P. sativum*
Citrus_
gda-1_A. thaliana
A. _thaliana 2
S. tuberosum
O. sativa 5
O. sativa 4
V. vinifera
O. sativa 3

```

NNNNENNTNAT---DKRFKTLPAEETLPRNEVLGGYIFVCNNDTMQEDLK
NNNNNND SNANSALDKRFKTLPAEETLPRNEVLGGYIFVCNNDTMQEDLK
NNNCNDNGNMLAVDKRFKTLPAEETLPRNEVLGGYIFVCNNDTMQEDMK
NNCNDNGNMLAVDKRFKTLPAEETLPRNEVLGGYIFVCNNDTMQEDMK
NNVESTNGNNS--VDKRFKTLPAEETLPRNEVLGGYIFVCNNDTMQEDLK
GSNSGNNSSNSAVDKRFKTLPTS EMLPRNEVLGGYIFVCNNDTMQEDLK
GSNSGNNSSNSAVDKRFKTLPTS EMLPRNEVLGGYIFVCNNDTMQEDLK
-----DRWYRTLPPSEMLPRNEALGGYIFVCNNDTMQEDLR
KNS---DSGAQASDKRFKTLPAEALPRDEALGGYIFVCNNDTMEENLK

```

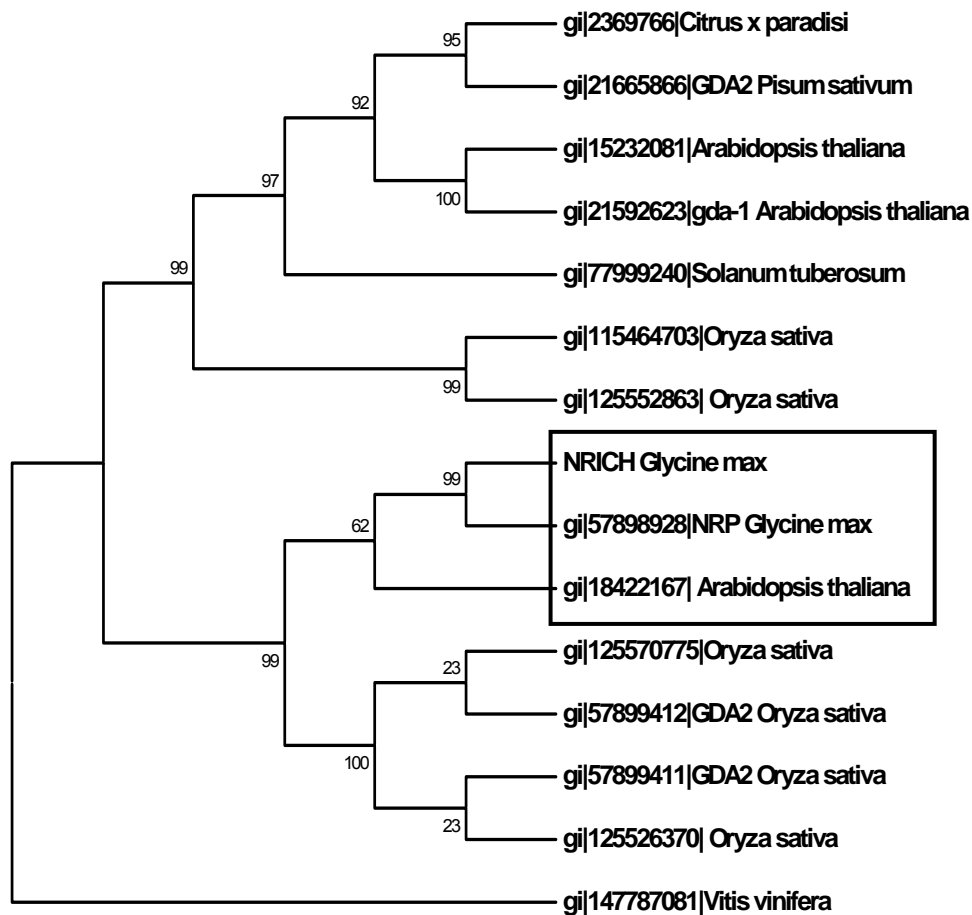



Figura 8 – **Agrupamento hierárquico entre NRP-B e seqüências homólogas.** Para a construção do agrupamento hierárquico por UPGMA o alinhamento anteriormente mostrado foi utilizado para a construção da árvore pelo programa MEGA3. Os números representam valores de bootstrap. NRICH Glycine max corresponde a NRP-B e NRP Glycine max a NRP-A.

Regulação dos genes *NRP-A* e *NRP-B* por indutores da UPR ocorre via um novo ramo de sinalização de estresses no retículo endoplasmático

O gene *NRP-B* foi previamente identificado pela sua co-regulação por indutores da via UPR (tunicamina e AZC) e por estresse osmótico (Irsigler et al., 2007). Com a finalidade de avaliar se a regulação do gene *NRP-B* é sinalizada por componentes da via UPR, a indução do gene *NRP-B* por tunicamicina foi avaliada sob condições que impedem a ativação da via UPR. Além de *NRP-B*, foram incluídos no ensaio os genes *NRP-A* pela homologia com *NRP-B* (Figura 7), e o gene *NAM*, também co-regulado por estresses osmótico e do RE (Irsigler et al., 2007). Tanto em células de mamíferos quanto em células de plantas, tem sido demonstrado que expressão ectópica de BiP inibe a ativação da via UPR em condições que promovem o acúmulo de proteínas anormais no RE (Leborgne-Castel et al., 1999; Bertolotti et al., 2000; Okamura et al., 2000). Plantas jovens de soja superexpressando o gene *soyBiPD* foram tratadas com tunicamicina e a ativação da via UPR avaliada por Real Time RT-PCR utilizando os marcadores específicos *BiPD* e *calnexina* (Figura 9). Expressão ectópica de *BiP* em soja atenua a ativação da via UPR, conforme demonstrado pela diminuição da indução dos genes *BiPD* e *calnexina*, em condições que promovem estresse no retículo (compare WT e Transgênica, T, tratadas com tunicamicina). Em contraste, inibição da via UPR por superexpressão de *BiP* não inibe a indução dos genes *NRP-B*, *NRP-A* e *NAM* que, em condições normais, parece serem ligeiramente induzidos por BiP (Figura 10).

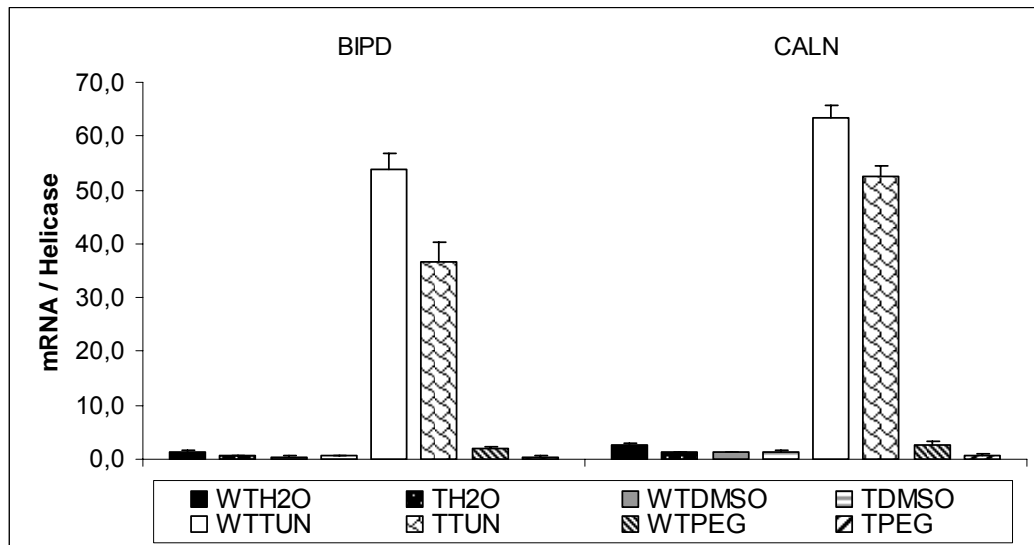


Figura 9 - **Ativação dos genes controle.** Após tratamento das plântulas de soja, foi verificada por PCR em tempo real a expressão dos genes controles. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a Helicase. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 7 réplicas biológicas devidamente validadas individualmente (+DP, n = 2 réplicas manuais). BIPD corresponde a chaperona molecular endógena BIP, isoforma D. CALN corresponde à Calnexina.

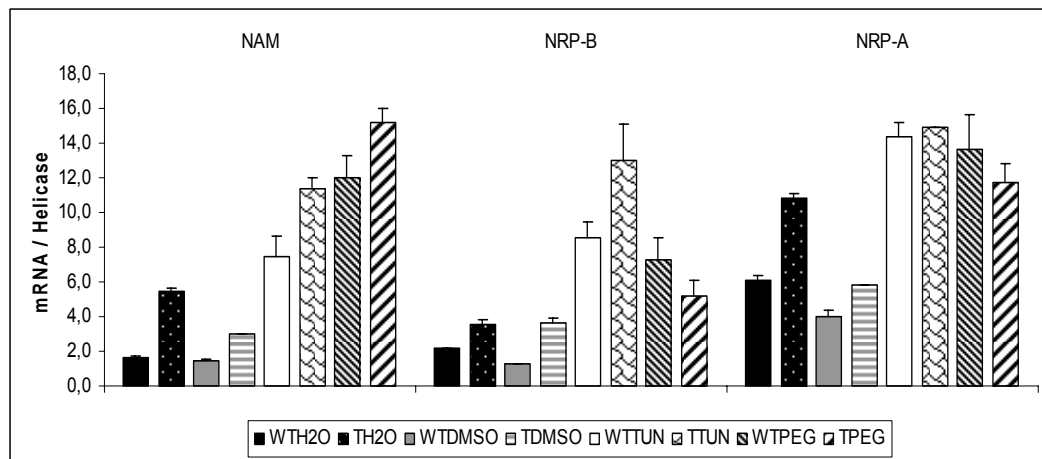


Figura 10 - **Ativação dos genes NAM, NRP-A e NRP-B.** Após tratamento das plântulas de soja, foi verificada por PCR em tempo real a expressão dos genes. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a Helicase. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 7 réplicas biológicas devidamente validadas individualmente (+DP, n = 2 réplicas manuais).

Estes resultados indicam que a indução dos genes *NRP-B*, *NRP-A* e *NAM* por tunicamicina ocorre por uma via de sinalização distinta da UPR.

Uma vez que os genes *NRP-A*, *NRP-B* e *NAM* são induzidos por estresse osmótico, foi de interesse avaliar se esta regulação era dependente de vias de sinalização mediadas pelo ácido abscísico (ABA). Entretanto, tratamento de células de soja em suspensão com ABA não promoveu aumento significativo no acúmulo dos transcritos *NRP-A*, *NRP-B* e *NAM* (Figura 11). A efetividade do tratamento pode ser comprovada pela indução significativa do gene marcador *SMP* (da família *Lea*), que é induzido por PEG ou desidratação através de uma via de sinalização dependente de ABA (Chandler & Robertson, 1994). Estes resultados indicam que a regulação dos genes *NRP-A*, *NRP-B* e *NAM* por estresse osmótico é possivelmente independente do hormônio ABA.

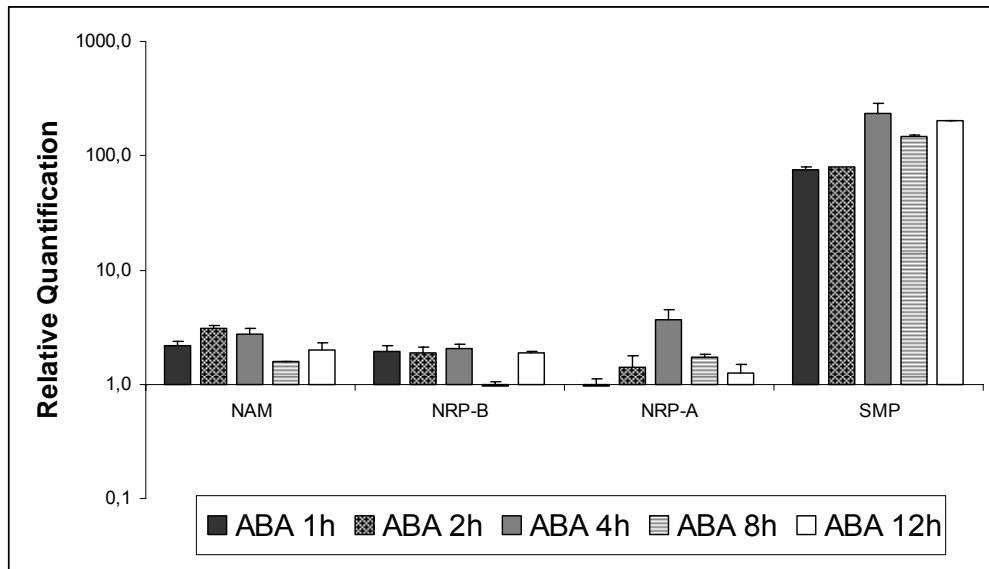


Figura 11 – **Regulação por estresse osmótico ocorre em uma via independente de ABA.** Foi medida a expressão dos genes por PCR em tempo real em células de soja em suspensão tratadas com ABA no tempo indicado na figura. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a Helicase, e normalizando com o tratamento controle. O gráfico está em escala logarítmica, sendo que os valores representam quantas vezes cada gene no tratamento é mais expresso do que no controle (não representado). Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 2 réplicas biológicas (n = 2 réplicas manuais).

NAM, NRP-B e NRP-A são genes precocemente induzidos por indutores de morte celular e reprimidos por inibidores de senescência.

A presença de um domínio DCD em NRP-A e NRP-B, e a rápida indução de NRP-A durante HR levantaram a possibilidade de que ativação da via integrativa pudesse transduzir um sinal de morte celular gerado por estresses prolongados. Para avaliar se os referidos genes componentes da via de integração estão envolvidos em processos de morte celular, inicialmente, foi determinada a variação da expressão gênica por PCR em tempo real em condições de estresse causado por tratamento com ciclohexamida, indutor de morte celular em células de soja em suspensão (Wertz & Hanley, 1996), e com os hormônios antagonistas BAP e Zeatina, que são citocininas inibidoras de senescência (Figura 12).

Tratamento com ciclohexamida resultou em um aumento significativo nos níveis de transcritos de *NRP-A*, *NRP-B* e *NAM* (Figura 12). Em contraste, os hormônios BAP e Zeatina reprimiram fortemente a expressão dos genes *NRP-A*, *NAM* e ligeiramente a expressão de *NRP-B*. Além disto, a cinética de indução dos três genes em células de soja tratadas com PEG, tunicamicina e ciclohexamida demonstrou que os três genes são rapidamente induzidos, 30 min após os tratamentos (Figura 13). Como genes precoces, é possível que estejam agindo anteriormente às proteínas efetoras na sinalização destes fenômenos.

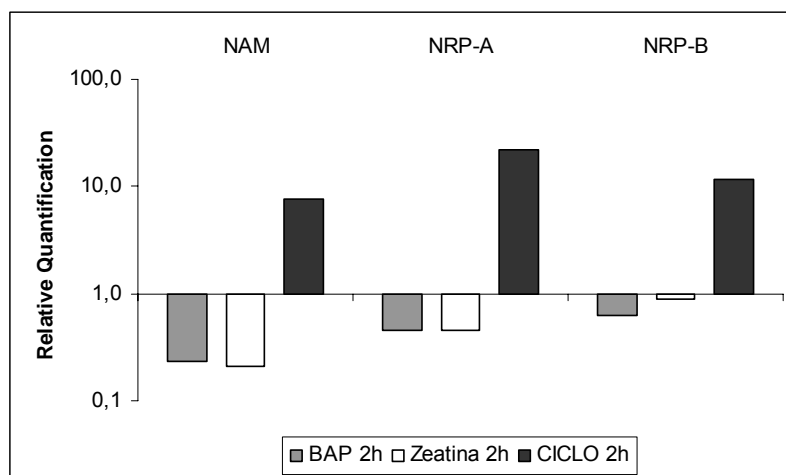


Figura 12 – **Indutores de morte celular e inibidores de senescência ativam e reprimem os genes da via integrativa, respectivamente.** Foi medida a expressão dos genes por PCR em tempo real em células de soja em suspensão tratadas com BAP, Zeatina e Ciclohexamida por 2 horas. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a Helicase, e normalizando com o tratamento controle. O gráfico está em escala logarítmica, sendo que os valores representam quantas vezes cada gene no tratamento é mais expresso do que no controle (não representado). Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 1 réplicas biológica (n = 1 réplica manual).

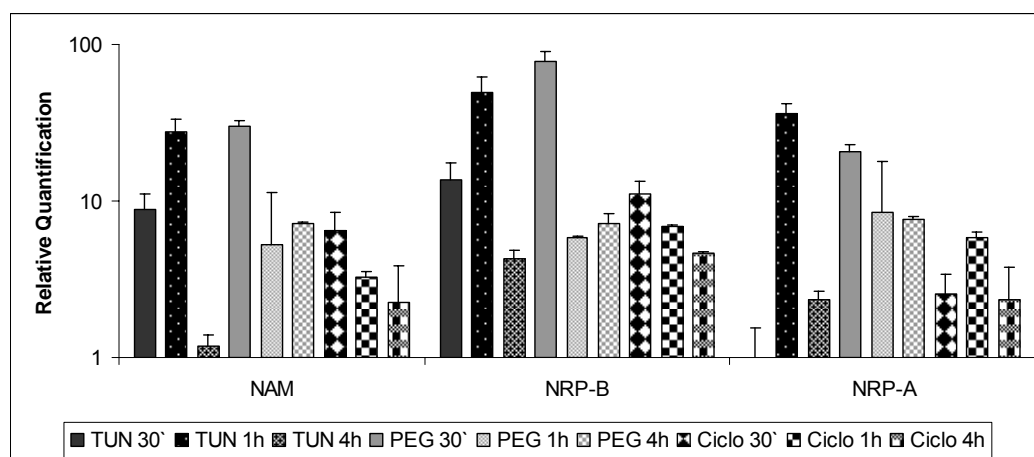


Figura 13 – **Cinética de indução dos genes indicados.** Cinética de indução medida por PCR em tempo real em células de soja em suspensão tratadas com Tunicamicina, PEG e Ciclohexamida. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a Helicase, e normalizando com o tratamento controle. O gráfico está em escala logarítmica, sendo que os valores representam quantas vezes cada gene no tratamento é mais expresso do que no controle (não representado). Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 2 réplicas biológicas (+SD, n = 2 réplicas biológicas).

Expressão transiente de NRich induz morte celular em protoplastos de soja

Com a finalidade de acessar diretamente o envolvimento de *NRP-B* em morte celular, o cDNA de *NRP-B* foi transferido para um cassete de expressão de plantas, sob o controle do promotor 35S, e transientemente expresso em protoplastos de soja (Figura 14). A fim de avaliar o efeito da expressão do gene *NRP-B* sobre morte celular foi monitorado a atividade de caspase, que é um marcador bioquímico de morte celular. Expressão transiente de *NRP-B* em protoplastos de soja induziu a atividade de caspase-3-like (Figure 15). Extratos de células de soja superexpressando *NRP-B* (Figura 14) apresentaram um aumento de duas vezes na atividade de caspase-3 comparada com as células-controle, transformadas com o vetor pMON921 (Figura 15). Além disso, a inclusão de um inibidor específico de caspase-3 inibiu a ativação da enzima. Caspase-3 tem sido caracterizada como uma protease *downstream* na fase efetora dos processos de PCD em mamíferos (Morishima *et al.*, 2002) e evidências recentes demonstram seu possível envolvimento em PCD em plantas (Zuppini *et al.*, 2004).

Além disto, foi examinado o efeito de expressão de *NRP-B* na ativação/repressão dos genes da via integrativa (Figura 16). Os genes controles especificamente induzidos por tunicamicina (calnexina) ou por PEG (LTP) não foram afetados por expressão de *NRP-B*. Similarmente, a expressão do gene *NRP-B* em protoplastos não altera a expressão do GST da via integrativa, com cinética de indução tardia (Irsigler *et al.*,

2007). Em contraste, expressão de *NRP-B* aumenta o acúmulo dos transcritos de *NRP-A* e *NAM* na ordem de duas a três vezes. Estes resultados sugerem que *NRP-A* e *NAM* possam ser alvos de ativação do gene *NRP-B* na via de integração, embora a cinética de indução similar dos três genes não suporta totalmente esta hipótese.

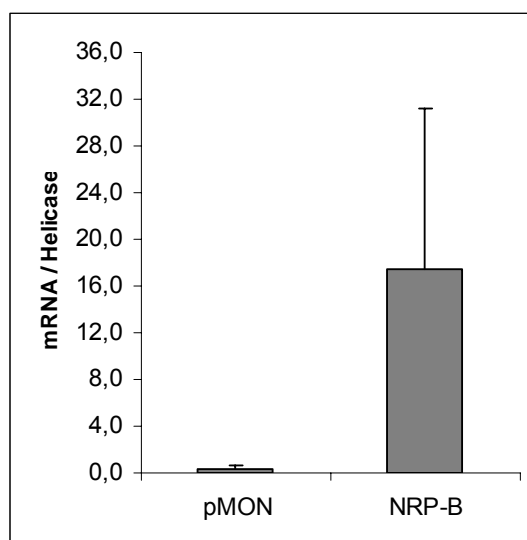


Figura 14 – **Superexpressão de NRP-B em protoplastos.** Após expressão transiente, foi verificada por PCR em tempo real a expressão de NRP-B em protoplastos transformados com o vetor vazio (pMON) e o cassete de expressão NRP-B (pMON-NRP-B).contendo o gene NRP-B. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a Helicase (+DP, n = 5 réplicas biológicas).

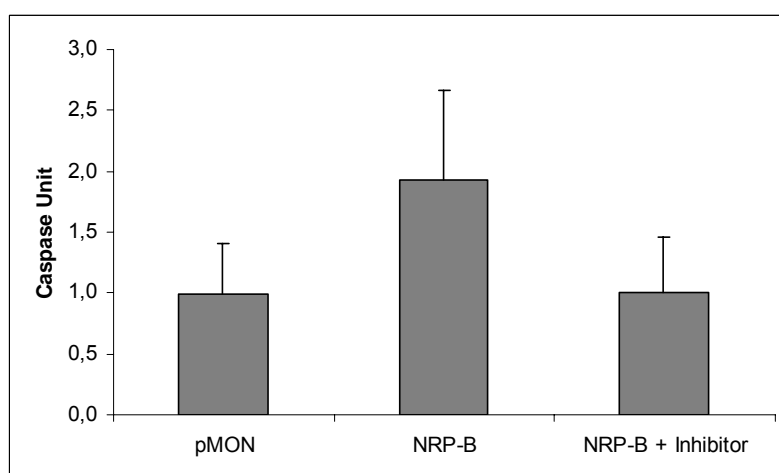


Figura 15 – **Atividade de Caspase-3.** A atividade da caspase-3 foi determinada em extratos de protoplastos transformados com o vetor vazio pMON921 (pMON) e o cassete de expressão, pMON-NRP-B, na ausência (NRP-B) e presença do inibidor específico de caspase-3 (NRP-B + inibitor). (+DP, n = 4 réplicas biológicas)

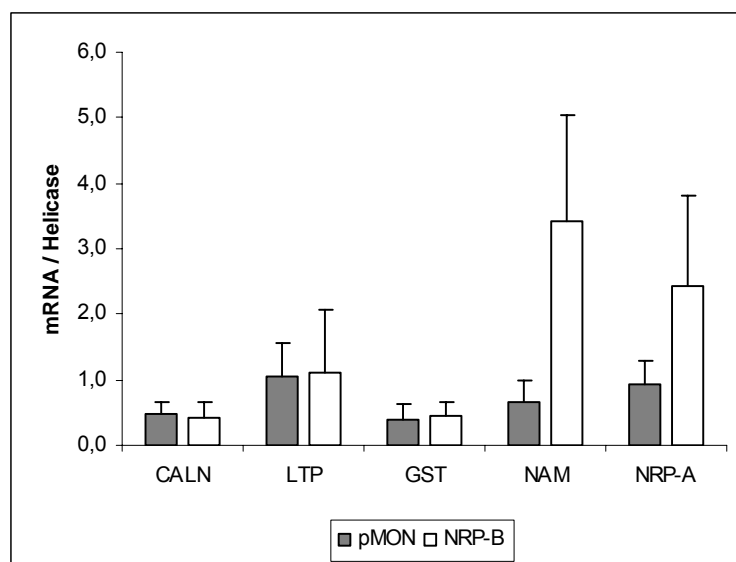


Figura 16 – **Ativação dos genes pela superexpressão de NRP-B.** A expressão de Calnexina, LTP, GST, NAM e NRP em protoplastos transformados com o vetor vazio (pMON921) ou com o cassette de expressão NRP-B (pMON- NRP-B) foi determinada por RT-PCR em tempo real. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a Helicase (+DP, n = 5 réplicas biológicas)

O gene *NRP-A* também é co-regulado pelos estresses osmótico e do retículo e assim como *NRP-B* induz morte celular em protoplastos de soja

Baseado na conservação de domínios estruturais e devido ao fato de a expressão de *NRP-A* ser dependente de *NRP-B*, é possível que ambos estejam em uma mesma via de transdução de sinais. Para avaliar esta possibilidade, foi examinado o efeito da combinação dos tratamentos de PEG e AZC sobre a expressão de *NRP-A*, conforme descrito por Irsigler *et al* (2007). Os resultados claramente evidenciaram a potencialização da ativação de expressão de *NRP-A* quando submetido simultaneamente aos dois estresses, indicando a possível participação deste gene na via de integração (Figura 17).

Resultados de expressão gênica indicam que *NRP-A* está envolvido em morte celular (Ludwig & Tenhaken, 2001). Ensaios de expressão transiente em protoplastos também foram conduzidos com o gene *NRP-A* para avaliar qual a sua participação em fenômenos de morte celular. Inicialmente, foi verificada a eficiência da expressão transiente do gene *NRP* exógeno em protoplastos (Figura 18), Expressão de *NRP-A* em protoplastos induziu a atividade de caspase-3 similarmente ao efeito do gene *NRP-B* (Figura 19), evidenciando que *NRP-A*, assim como *NRP-B*, participa ativamente em processos de morte celular. Do mesmo modo, também foi avaliado o efeito da superexpressão de *NRP* nos genes controles e da via integrativa (Figura 20). Os resultados demonstram que expressão de *NRP-A* causa inibição de *NAM* na ordem de três vezes, mas não altera a expressão de *NRP-B*.

Uma vez que *NRP-B* induz a expressão de *NRP-A* (Figura 16), é possível que *NRP-B* esteja *anteriormente* a *NRP-A* em uma mesma via de transdução que sinaliza morte celular programada e que é ativada como resultado de estresses prolongados no retículo endoplasmático e osmótico. Por outro lado, a expressão do gene *NAM*, é reprimida por *NRP-A* e induzida por *NRP-B*. Provavelmente a repressão de *NAM* por *NRP-A* esteja associada a um controle da ativação da via de sinalização por *retroinibição* direto ou indireto.

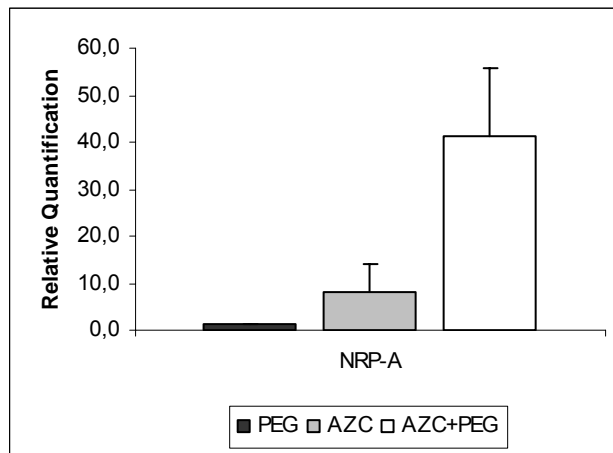


Figura 17 – **Indução sinérgica de NRP-A em resposta a uma combinação de tratamentos com PEG e AZC.** Plantas de soja foram tratadas por 6 horas somente com AZC e depois adicionado PEG, deixando por 10 horas (Irsigler *et al.*, 2007). O resultado é representado em variação de expressão em relação ao controle H₂O usando o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (+DP, n = 3 réplicas biológicas)

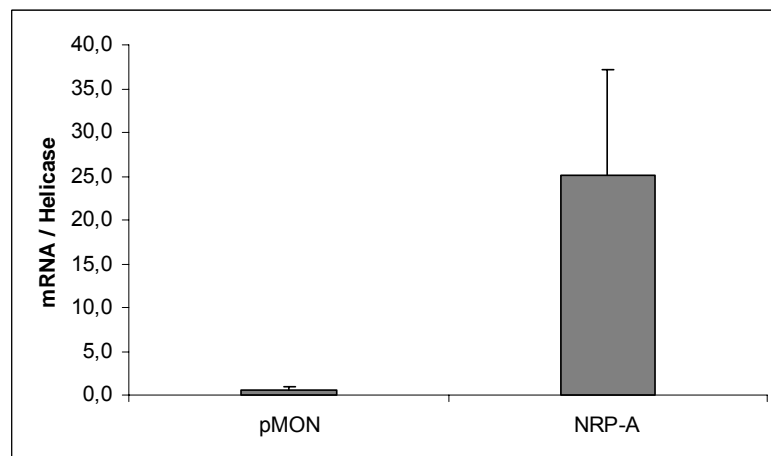


Figura 18 – **Expressão transitente de NRP-A em protoplastos.** Foi verificada por PCR em tempo real a expressão de NRP em protoplastos transformados com o vetor vazio (pMON) e com o cassete de expressão NRP-A (pMON-NRP-A). O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a Helicase (+DP, n = 6 réplicas biológicas)

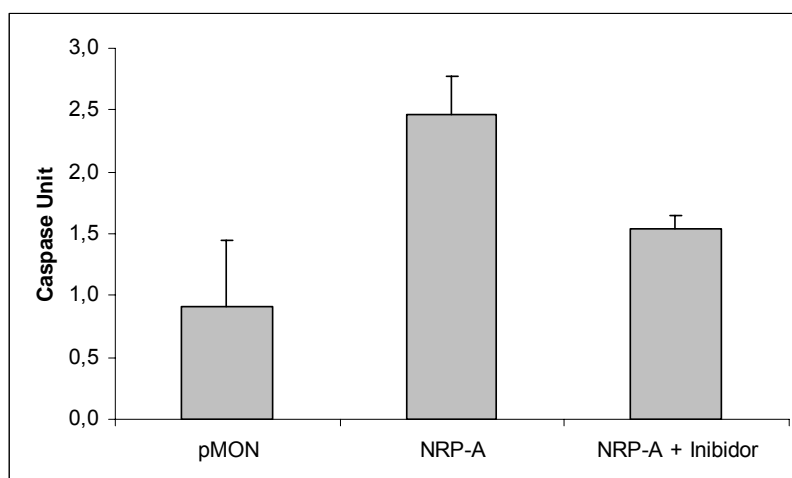


Figura 19 – **Atividade de Caspase-3**. A atividade de caspase-3 foi determinada pelo ApoAlert® Caspase-3 Colorimetric Assay Kit em extratos de protoplastos transformados com o vetor pMON921 (pMON) e com o cassete de expressão pMON-NRP-A (*NRP-A*) na ausência (*NRP-A*) e presença (*NRP-A* + Inibidor) de inibidor de caspase-3. (+DP, n = 5 réplicas biológicas)

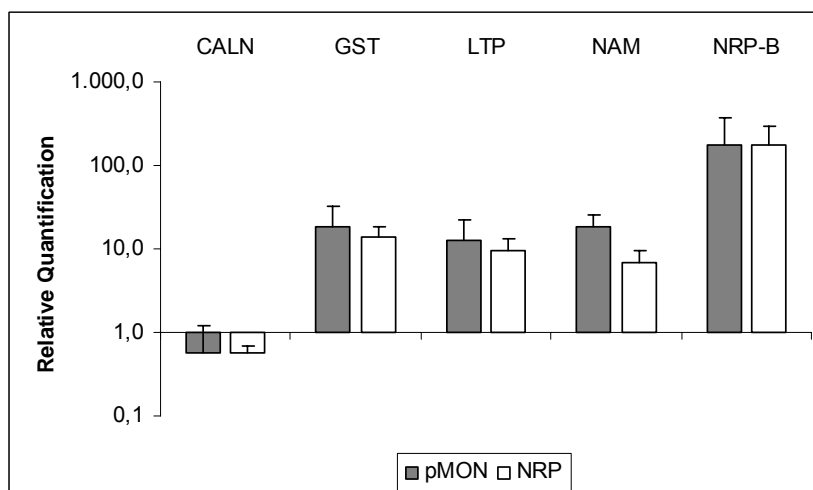


Figura 20 – Efeito da **expressão de NRP-A sobre os genes indicados**. A expressão de Calnexina, LTP, GST, NAM e NRP-B foi determinada por RT-PCR em tempo real em protoplastos transformados com o vetor vazio (pMON) ou com o cassete de expressão pMON921-NRP-A (*NRP-A*). O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno mRNAs de Helicase (+DP, n = 6 réplicas biológicas)

Expressão transiente dos genes *NRP-A* e *NRP-B* em folhas de tabaco induzem senescência.

Com a finalidade de explorar *in planta* o fenômeno de morte celular induzido por *NRP-A* e *NRP-B*, os respectivos cDNAs foram transferidos para vetores binários de transformação de plantas mediada por Agrobactéria, e a expressão transiente dos genes foi induzida por agroinoculação em folhas de tabaco (Figura 21). Após duas semanas a 20 °C, as seções foliares agroinfiltradas com as construções YFP-NRP-B (seção 1), YFP-NRP-A (seção 2) e pk7WG2-NRP-B (seção 3) apresentaram o fenótipo de clorose característico de senescência foliar que é associada à diminuição do teor de clorofila e, conseqüente, amarelecimento das folhas. O desenvolvimento de clorose nas seções infiltradas foi um resultado direto da expressão das proteínas e não devido à presença de agrobactéria, uma vez que na seção infiltrada com um cassete de expressão não relacionado (seção 4) não ocorreu amarelecimento. Estes resultados substanciam os argumentos de que ambas as proteínas estão funcionalmente envolvidas em processos de morte celular, uma vez que a expressão dos genes correspondentes de alguma forma acelerou processos de senescência na planta de tabaco.

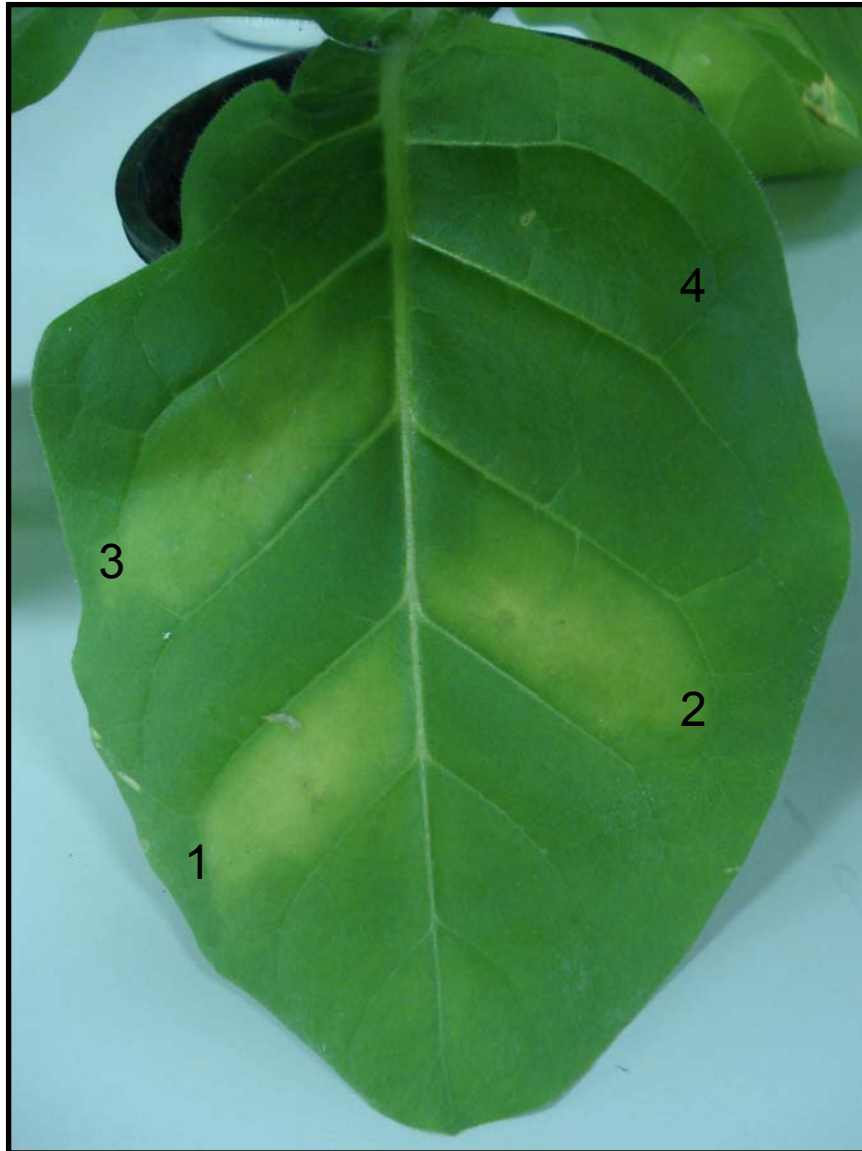


Figura 21 – **Agroinoculação em folhas de tabaco.** Plantas de tabaco foram inoculadas com agrobactérias transformadas com: 1- YFP-NRP-B, 2- YFP-NRP-A, 3. pk7WG2-NRP-A e 4. Controle (pk7FWG2-NAP)

A proteína NRich está localizada na membrana plasmática

Ensaio de fracionamento celular indicam que a proteína NRP está na parede celular (Ludwig & Tenhaken, 2001). Com a finalidade de determinar a localização subcelular de NRP-B, o gene foi transientemente expresso como uma proteína quimérica fusionada a GFP e sua localização celular determinada por microscopia confocal em folhas de tabaco (Figura 22). Intensa fluorescência foi observada ao longo da superfície celular. A fim de avaliar a localização precisa da proteína na membrana plasmática ou parede celular, foi realizada uma plasmólise com KCl 0,8 M para o descolamento da membrana plasmática (Figura 23). Apesar de ter um sinal não específico na parede celular, aparentemente fica evidenciado por estas análises que a proteína NRP-B está localizada na membrana plasmática, provavelmente ancorada com complexos sistemas de sinalização, responsáveis pelo desencadeamento dos processos de PCD.

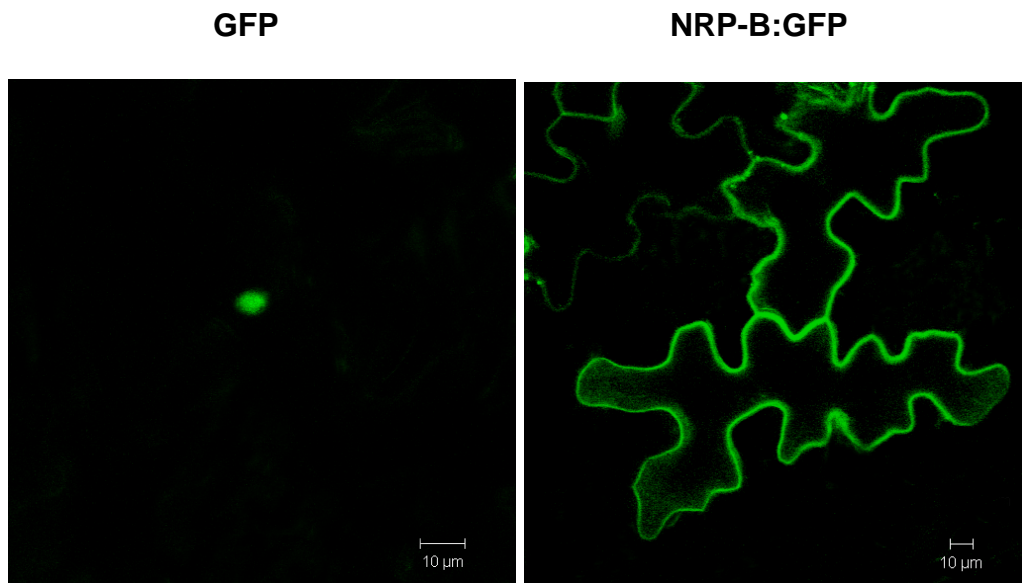


Figura 22 – **Localização subcelular de NRP-B.** 72 horas após a agroinoculação de folhas de tabaco com pK7FWG2 e pK7FWG2-NRP-B, a expressão da proteína NRP-B foi monitorada através da fluorescência emitida pela proteína GFP (green fluorescence protein) por meio de microscopia confocal. As fotos foram editadas no Adobe Photoshop para retirada de regiões como cloroplasto e borrões sem contanto alterar o resultado.

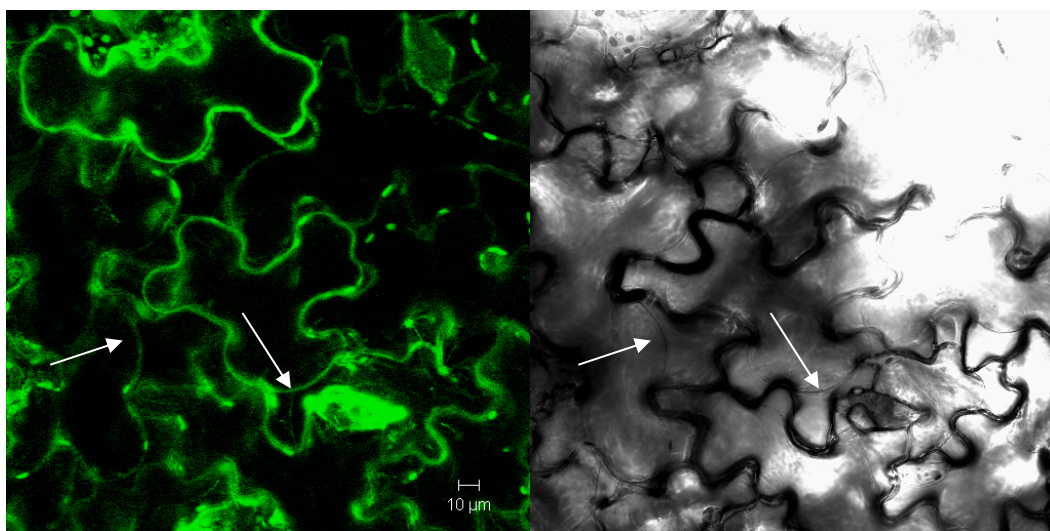


Figura 23 – **Localização subcelular de NRP-B após plasmólise.** Após 3 dias de expressão transiente em folhas de tabaco transformadas com pK7FWG2-NRP-B, foi realizada uma plasmólise com KCl 0,8 M, e a expressão da proteína NRP-B foi monitorada através da fluorescência emitida pela proteína GFP (green fluorescence protein) por meio de microscopia confocal.. Setas brancas mostram a membrana plasmática.

CONCLUSÕES

Os resultados da presente investigação forneceram evidências conclusivas de que as proteínas NRP-A e NRP-B participam funcionalmente em um processo de morte celular em células vegetais. Inicialmente, foi observada que ambas as proteínas possuem um domínio DCD, caracterizado como domínio funcionalmente ativo em eventos desenvolvimento ou morte celular (Tenhaken *et al.*; 2005). Os genes correspondentes são rapidamente induzidos por estresses osmótico e do retículo endoplasmático que induzem o processo de morte celular em plantas com características apoptóticas (Zuppini *et al.*, 2004, Mahajan & Tuteja, 2005, Pallavan-Unsal *et al.* 2005). Além disso, foi demonstrado que *NRP-A* e *NRP-B* são induzidos por cicloheximida, um indutor clássico de morte celular, e reprimidos pelos inibidores de senescência, zeatina e BAP. Evidências diretas da função de NRP-A e NRP-B em morte celular foram fornecidas em ensaios de expressão transiente em protoplastos de soja e folhas de tabaco. Expressão de ambos os genes em células de soja em suspensão induziu a atividade de caspase-3-like. Assim também, expressão dos genes *NRP-A* e *NRP-B* em folhas de tabaco acelerou o processo de senescência como evidenciado pelo aparecimento de clorose acentuada.

Previamente foi observado que as respostas a estresses osmótico e do RE convergem em uma via integrativa. Nesta investigação, foi identificado que a ativação dos genes alvos *NAM*, *NRP-A* e *NRP-B* é sinalizada por estresses no RE por meio de uma via distinta da via UPR. Indução de estresses no RE em plantas superexpressando BiP e, portanto, defeituosas para ativação da via UPR, induzem a expressão dos genes da via integrativa

com a mesma intensidade do controle. Por outro lado, foi demonstrado que a indução da via integrativa por um sinal osmótico é independente do hormônio ABA, já que a expressão dos genes alvos não é afetada por tratamento com este hormônio.

Coletivamente, os resultados dessa investigação e os resultados anteriores da nossa equipe suportam o modelo proposto de integração das respostas a estresses osmótico e no RE que convergem na transdução de sinais de morte celular dependente das proteínas NRPs (Figura 24). Neste modelo, estresses prolongados no retículo endoplasmático ativam uma via de sinalização independente da via UPR que integra o sinal osmótico por meio de uma via independente do hormônio ABA, resultando na ativação dos genes *NAM*, *NRP-A* e *NRP-B*. Provavelmente, o gene *NRP-B* atua anteriormente aos genes *NAM* e *NRP-A*, uma vez que expressão ectópica de *NRP-B* ativa a expressão desses genes. Ativação dessa via integrativa resulta na transdução de um sinal de morte celular que é dependente das proteínas *NRP-A* e/ou *NRP-B*, sendo a sinalização conectada ao retículo endoplasmático, mas não específica de estresses nessa organela. Esta argumentação é substanciada pelo fato de que a via converge com a resposta ao estresse osmótico e a ativação dos genes alvos afeta atividade de caspase-3-like envolvida na resposta apoptótica iniciada na mitocôndria. Além disso, a localização celular de *NRP-B* na membrana plasmática é consistente com sua participação em eventos de sinalização de morte celular mais generalizados.

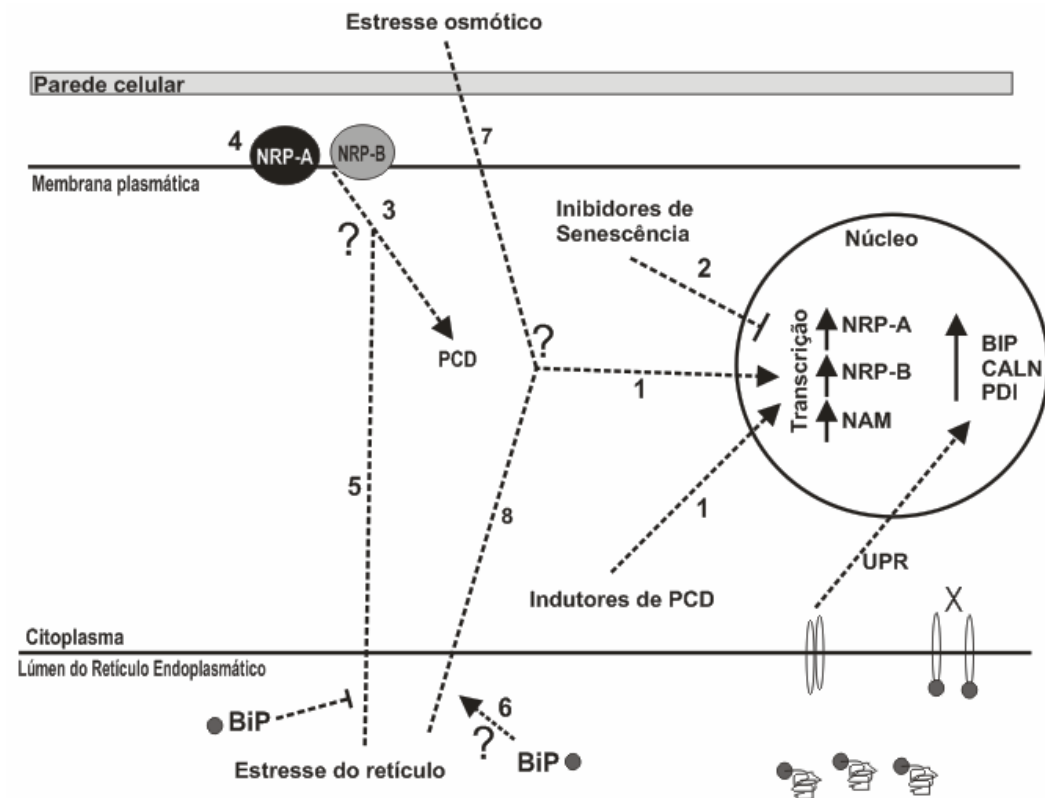


Figura 24 - Modelo de transdução de sinais proposto – Sinalização proposta segundo evidências que 1) Indutores de PCD, estresse osmótico e do RE induzem a transcrição de NAM, NRP-A e NRP-B. 2) Inibidores de senescência inibem a transcrição de NAM, NRP-A e NRP-B. 3) NRP-A e NRP-B induzem morte celular. 4) NRP-B está na membrana plasmática e 5) Superexpressão de BiP atenua processos de morte celular. 6) Superexpressão de BiP aumenta ligeiramente a expressão de NAM, NRP-A e NRP-B. 7) Via de estresse osmótico independente de ABA que conecta com 8) Via de estresse no retículo independente da UPR.

CAPÍTULO 2

SUPEREXPRESSÃO DO CHAPERONE MOLECULAR BiP

ATENUA PROCESSOS DE MORTE CELULAR

INTRODUÇÃO

Diferentes estratégias para aumentar a tolerância a estresses em plantas têm sido desenvolvidas, como a manipulação e a reprogramação da expressão de genes endógenos relacionados com estresse (Mahajan & Tuteja, 2005). Em muitos casos, são utilizados genes cujas proteínas atuam funcionalmente em vias de desintoxicação de produtos gerados em condições de estresses (Rodrigues *et al.*, 2005) ou genes relacionados com vias de reparo de proteínas e estruturas celulares, como chaperones moleculares (Gupta *et al.*, 1993; Badawi *et al.*, 2004), que são induzidos por uma variedade de estresses fisiológicos (Pelham, 1989; Hammond & Helenius, 1995).

O retículo endoplasmático (RE) é o principal sítio para a síntese e enovelamento de proteínas e, conseqüentemente, a capacidade de processamento de proteínas na organela depende de um sistema de

chaperones moleculares atuando diretamente na via produtiva de dobramento de proteínas secretórias (Pilon & Schekman 1999). Qualquer perturbação em sua homeostase pode promover o acúmulo de proteínas mal dobradas, induzindo uma via de sinalização, denominada UPR, cuja ativação acredita-se ser dependente do chaperone molecular BiP (Ron & Walter, 2007). Uma vez que as proteínas induzidas pela UPR estão envolvidas no dobramento das proteínas secretórias, acredita-se que elas tenham uma função protetora dentro do RE evitando a agregação incorreta de proteínas. De fato, a superexpressão de *BiP* em culturas de células de mamíferos (Morris *et al.*, 1997) e protoplastos de fumo (Leborgne-Castel *et al.*, 1999) previne a ativação da via UPR e aumenta a tolerância das células a estresses, sugerindo que BiP atua diretamente atenuando o estresse no RE. O nível de investigação sobre o papel protetor de BiP contra o estresse no RE tem sido estendido para organismos multicelulares intactos, por meio de repressão antisense e hiperexpressão de genes *BiP* em plantas transgênicas (Alvim *et al.*, 2001). Estes estudos demonstraram que níveis elevados de BiP em plantas transgênicas conferiram tolerância a tunicamicina durante germinação e a estresse hídrico durante crescimento da planta. Sob condições de estresse hídrico, os níveis de BiP nas folhas correlacionaram com a manutenção de turgor e do conteúdo relativo de água. O efeito protetor resultante da hiperexpressão de BiP foi anulado por meio de repressão antisense. Este resultados são consistentes com um mecanismo de tolerância a estresse hídrico mediado por BiP.

Tem sido demonstrado que ativação prolongada da via UPR pode desencadear processos de morte celular (Rao *et al.*, 2002; Zhang & Kaufman, 2004; Zuppini *et al.*, 2004). A superexpressão de BiP em mamíferos atenua a ativação da UPR (Bertolotti *et al.*, 2000; Okamura *et al.*, 2000), e protege a célula contra apoptose mediada por estresses no retículo endoplasmático, ocorrendo o oposto quando se tem uma repressão de BiP (Zhang & Kaufman, 2004). Entretanto os eventos da sinalização celular que conectam estresse no RE e morte celular não são muito bem compreendidos (Urade, 2007). Em plantas, tem sido demonstrado que tratamentos que causam distúrbios na homeostasia do RE induzem um programa de morte celular (Zuppini *et al.*, 2004). Similarmente, os resultados do capítulo anterior demonstraram que o retículo endoplasmático participa em programas de morte celular através da percepção e transmissão de sinais apoptóticos gerados por estresses prolongados na organela. Neste capítulo, foi avaliado o efeito protetor de BiP contra sinais de morte celular. Para isso, estresses prolongados do retículo endoplasmático e sinais de morte celular foram induzidos em plantas transgênicas de soja e de tabaco superexpressando o gene soyBIPD.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Vegetal e Tratamentos

Foram utilizadas plantas de soja do cultivar Conquista transformadas com o gene BiPD (*soyBiPD*) na orientação senso e plantas controle. As plantas foram inicialmente germinadas em terra na casa de vegetação e após uma semana (ou estágio VC) foram retiradas do solo, procedendo-se a lavagem da raiz e colocadas em solução contendo Polietilenoglicol 10% (p/v) (PEG; MW 8000), Tunicamicina (Sigma) 10µg/mL, e os respectivos controles H₂O e DMSO (Sigma).

O material vegetal foi coletado após os tratamentos e imediatamente congelado em nitrogênio líquido sendo armazenado em freezer a -80 °C até o processamento das amostras, salvo casos em que o protocolo exigia análise imediata.

Para os ensaios de agroinoculação de genes indutores de morte celular, foram utilizadas plantas transgênicas de tabaco expressando o gene *soyBiPD* nas orientações senso e antisense. A obtenção e caracterização molecular dessas plantas foram previamente descritas (Alvim *et al.*, 2001).

Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen), tratado com três unidade de DNase livre de RNase (Promega) para

eliminação de DNA contaminante e purificado com colunas RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Após a extração e purificação, o RNA foi quantificado (DU 650 BECKMAN Spectrophotometers) e analisado em gel de agarose desnaturante 1,5 %. A síntese de cDNA foi realizada utilizando 2 µg de RNA total, oligo dT e Transcriptase Reversa MMLV (Invitrogen), segundo especificações do fabricante.

Fragmentação de DNA genômico

Após tratamento e extração do DNA de acordo com Della-Porta (1983), o DNA genômico foi corrido em gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo e visualizado e fotografado sob luz UV (Eagle Eye II).

Monitoração de morte celular por Azul de Evans

Após tratamentos, foram extraídos quatro discos foliares de cada planta e realizado ensaio de exclusão do corante vital segundo Backer & Mock (1994)

Detecção in-vivo de H₂O₂

O teor de H₂O₂ foi monitorado nas folhas de plantas tratadas com PEG e tunicamicina usando o 3,3-diaminobenzidina DAB (Sigma) segundo Orozco-Cardenas & Ryan (1999) com modificações. As plântulas foram colocadas em solução contendo 1 mg/mL de DAB, pH 3,8 por 8

horas sob luz. Em seguida, as plântulas foram submetidas aos estresses analisados sendo transferidas para solução de tunicamicina, DMSO, PEG ou H₂O por 48 horas. Após este período, foram descoradas com etanol 96% fervente por 15 minutos, e transferidas para uma nova solução de etanol 96 % por 24 horas. A remoção gradual do etanol por um gradiente decrescente permitiu reidratação das plântulas para realização das fotografias.

Malondialdeído (MDA)

A peroxidação dos lipídeos foi dosada pela determinação do conteúdo de malondialdeído, que é o principal composto formado pelo processo. Para tal, quatro discos foliares de 1,4 cm de diâmetro foram macerados em 2 mL de Ácido Tricloroacético 0,1 % (p/v) e centrifugados a 10000g por 15 minutos a 4 °C. 500 µL do sobrenadante foram incubados por 20 minutos a 90 °C junto com 1,5 mL da solução de Ácido Tiobarbitúrico (TBA 0,5 % em TCA 20 %) e a reação foi parada em banho de gelo. Após centrifugação a 13000 RPM por 4 minutos, o sobrenadante foi lido a absorvância a 532 nm em espectrofotômetro (DU 650 BECKMAN Spectrophotometers).

Agroinoculação em folhas de tabaco

Agrobactéria transformadas com os vetores de interesse foram crescidas por 16 horas, e centrifugadas por 5 min a 8000 RPM. O

sobrenadante foi removido e as células foram lavadas em 1 mL meio de infiltração (10 mM MgCl₂, 10 mM MES pH 5,6 e 10 μM de acetoseringona). Estas foram centrifugadas por 5 min a 8000 rpm, e ressuspensas em 1 mL do mesmo tampão, sendo diluídas em meio de infiltração para OD de 0,4. Utilizando seringas estéreis sem agulha, folhas jovens de tabaco foram infiltradas por uma gentil pressão através do estômato na epiderme inferior.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Expressão ectópica de BiP em plantas transgênicas atenua o processo de morte celular induzida por estresses no RE e osmótico.

As plantas transgênicas de soja expressando ectopicamente o gene *soyBiPD* foram anteriormente obtidas e selecionadas por *immoblottings* (dado não mostrado). Plântulas transgênicas (35S-BiP-9, T) e controles (WT) foram submetidas aos tratamentos com PEG por 48 horas (Figura 1) e TUN por 36 horas (Figura 2). Consistente com o fenótipo de tolerância à seca mediado por BiP em tabaco transgênicos (Alvim *et al.*, 2001), as plântulas de soja transgênicas (T) mantiveram o turgor foliar em condições de desidratação promovido pelo tratamento com PEG (Figura 01, compare T PEG com WT PEG). Precedentes na literatura demonstram que a superexpressão de chaperonas moleculares tem efeito protetor contra estresses osmótico e hídrico (Alvim *et al.*, 2001; Cho & Hong 2005).

O efeito protetor de BiP contra estresses típicos do retículo endoplasmático também foi avaliado por meio de tratamento das plântulas de soja com tunicamicina (Figura 2). Enquanto que tratamento com tunicamicina causou lesões foliares necróticas nas folhas cotiledonares de plântulas controle, a expressão ectópica de BiP em plantas transgênicas preveniu o aparecimento de necrose foliar. Similarmente, tunicamicina induziu o aparecimento de clorose nas folhas controle, mas não nas



Figura 1 – **Tratamento com PEG induz perda de turgor foliar.** Plântulas de soja Transgênicas (T), linhagem 35S-BiP-C9, e controles (WT) foram tratadas com 1% PEG por 48 horas em meio de Hoagland.

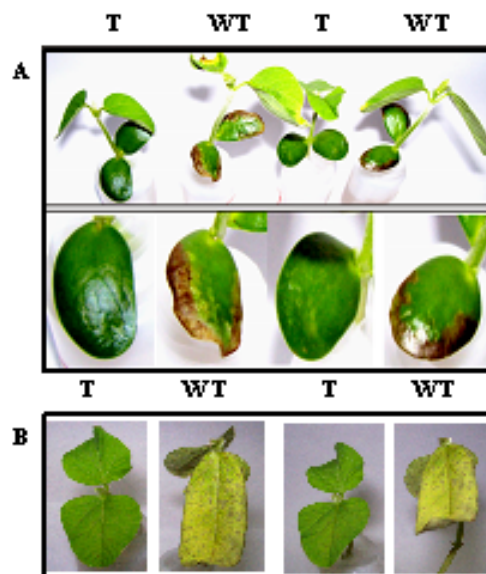


Figure 2 – **Lesões foliares induzidas por tunicamicina.** Plântulas de soja controle (WT) e transgênica (T), linhagem 35S-BiP-C9, foram tratadas com 10 $\mu\text{g/mL}$ de tunicamicina por 36h (A) e então transferidas para meio de Hoagland sem tunicamicina por 24 horas (B)

folhas das plantas transgênicas. Estes fenótipos, necrose e murchamento foliar, parecem estar associados com o processo de morte celular.

A porcentagem de células mortas, induzidas pelas condições de estresse, foi avaliada pelo método de exclusão do corante vital Azul de Evans, que permite monitorar a integridade da membrana nas plantas sob estresse (Figuras 3 e 4). A retenção do corante em células mortas medida espectrofotometricamente é uma estimativa do teor de células mortas. Esta quantificação demonstrou que tratamento com tunicamicina induz morte celular a partir de 24 horas, enquanto que tratamento com PEG promove o máximo de perda de viabilidade celular já nas primeiras 24 horas de tratamento. Entretanto, as plântulas transgênicas tratadas com tunicamicina apresentaram um percentual de células em morte muito inferior do que as plantas controle ao longo do experimento (Figura 3). Tratamento com PEG promoveu um efeito similar (Figura 4), ficando evidente a diferença relativa de células mortas entre as plantas transgênicas e controle após 24 horas de tratamento. O aparente efeito reversível na porcentagem de células mortas após 48 horas de tratamento contínuo por PEG reflete a severidade do tratamento ao invés de recuperação do estresse. Assim, é provável que o período de 48 horas sob desidratação promova lesões intensas na membrana plasmática, tornando-a estruturalmente incapaz de reter o corante em seu interior durante os processos de lavagens no experimento, comprometendo o valor absorvância lido.

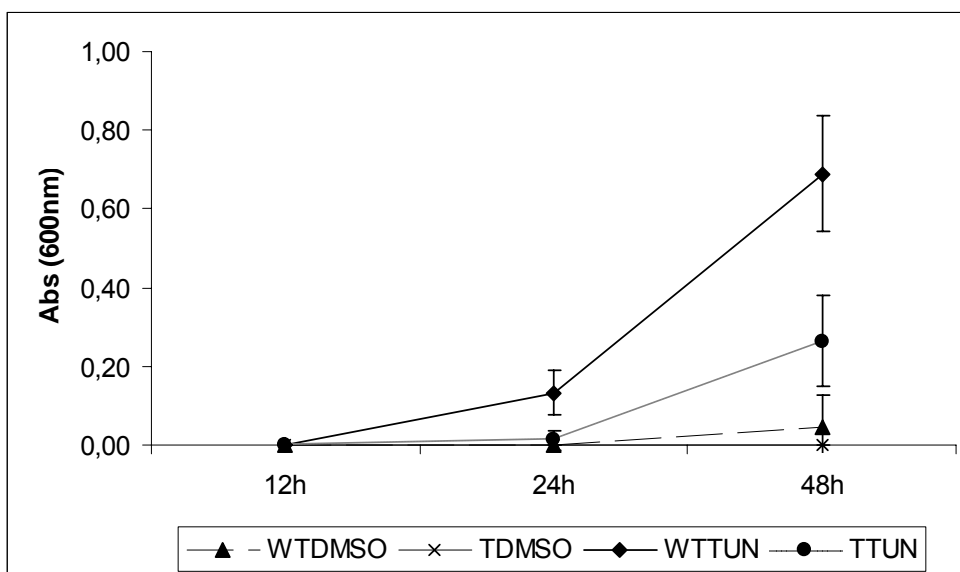


Figura 3 – **Efeito da Tunicamicina na morte celular em plantas superexpressando BiP.** Plântulas de soja controle (WT) e transgênicas (T) tratadas com tunicamicina durante 12h, 24 h e 48 h foram utilizadas para ensaio segundo Backer & Mock (1994). (SD+; n= 5 réplicas biológicas). Como controle do tratamento, as plantas também foram tratadas com DMSO.

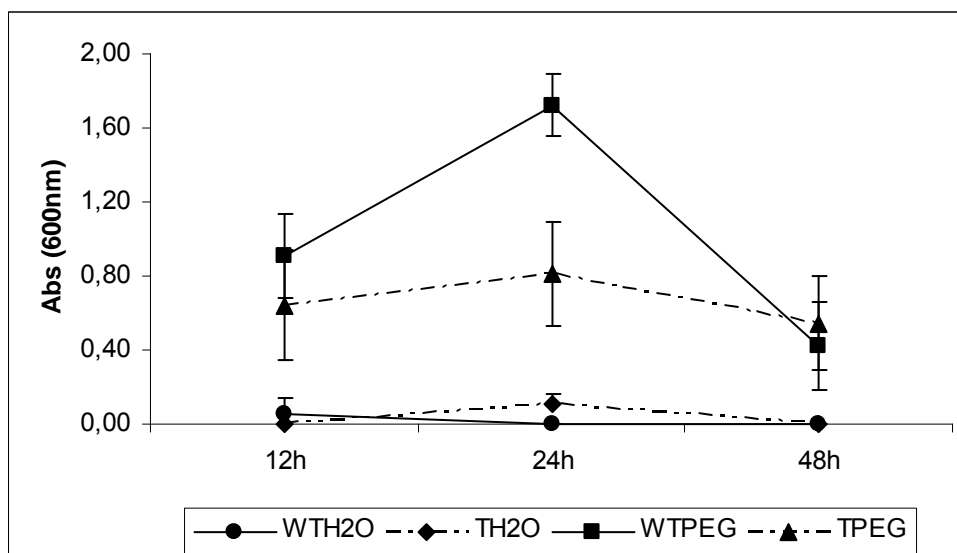


Figura 4 – **Efeito da desidratação celular.** Plântulas de soja controle (WT) e transgênicas (T) tratadas com PEG 1% durante 12h, 24 h e 48 h foram utilizadas para ensaio segundo Backer & Mock (1994). (SD+; n= 5 réplicas biológicas)

A fim de caracterizar o fenômeno de morte celular induzida por PEG e tunicamicina, foi avaliada a fragmentação de DNA como característica de morte celular programada e um dos marcadores finais do processo de PCD (Figura 5). O resultado confirma a hipótese de que a superexpressão de BiP atenua a indução de vias de morte celular, já que a degradação do DNA genômico nas plantas expressando BiP foi muito inferior do que nas plantas controle. Entretanto, a ausência de fragmentações definidas do DNA (aproximadamente em intervalos de 50 pb) não permite excluir a possibilidade de que a morte celular induzida nas condições experimentais seja devido à necrose celular.

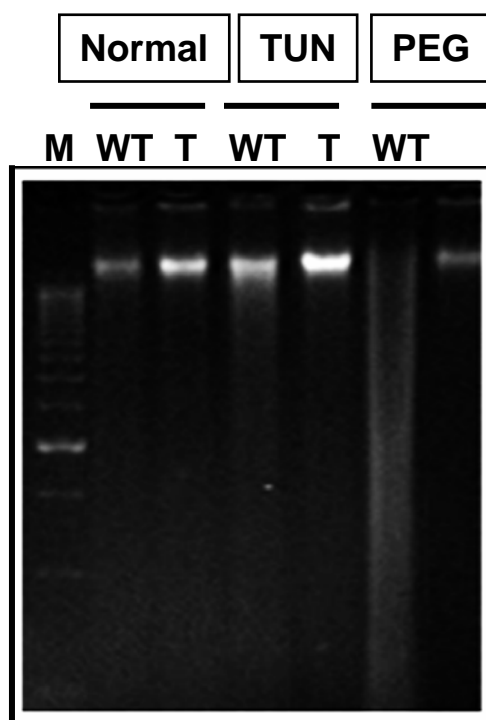


Figura 5 – **Fragmentação de DNA genômico**. O DNA genômico foi extraído de folhas de plantas controles (WT) e transgênicas (T) tratadas com tunicamicina e PEG. M= 1kb, 1= Control WT, 2=Control T, 3= WT TUN, 4= T TUN, 5= WT PEG and 6= T PEG

Plantas transgênicas submetidas ao tratamento com tunicamicina produzem maior quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Várias condições de estresse promovem o aumento na produção de ROS em plantas. Estas moléculas são sinalizadoras de processos de morte celular, mas quando presentes em altas concentrações podem atuar desencadeando desordem na homeostasia da planta por provocar estresse oxidativo (Hu *et al.*, 2006). A produção de H₂O₂ foi monitorada com o corante DAB (Figura 6)

Em condições normais, a proporção de H₂O₂ em plantas transgênicas e controle é equivalente. Similarmente, plantas transgênicas ou controle tratadas com PEG produziram H₂O₂ em proporções similares (dados não mostrados). Entretanto, a quantidade de H₂O₂ produzida pela planta senso sob tratamento com tunicamicina foi muito maior do que as plantas controle. Estes resultados aparentemente contradizem a maior tolerância das plantas senso a morte celular induzida por tunicamicina, uma vez que H₂O₂ parece agir como molécula sinalizadora em diversas vias de PCD em plantas (Breusegem & Dat, 2006; Hu *et al.*, 2006)

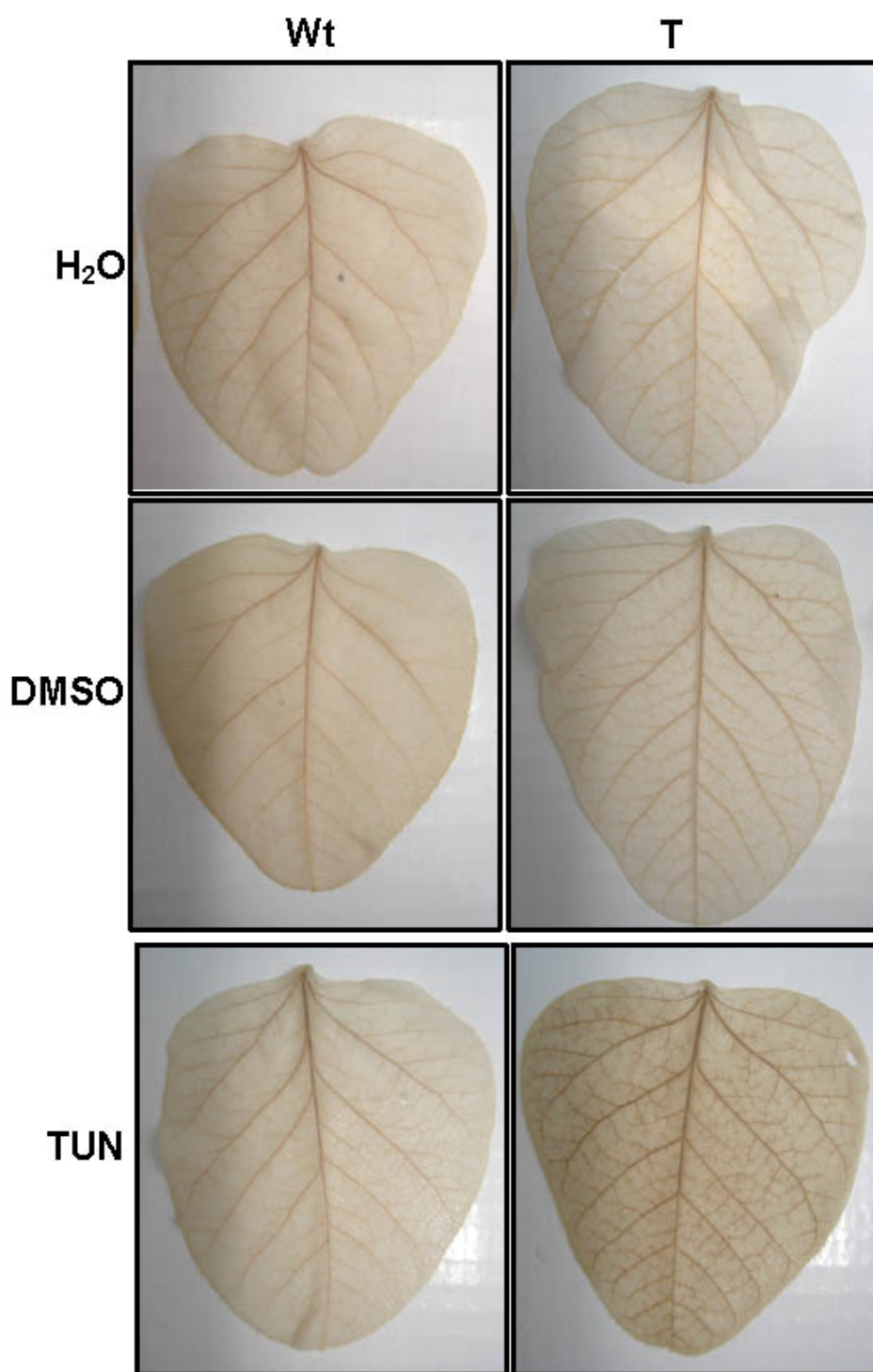


Figura 6 – **Determinação de espécies reativas de oxigênio.** Plântulas de soja transgênicas (T) e controles (WT) foram submetidas aos tratamentos com tunicamicina e DMSO e tratadas com DAB segundo Orozco-Cardenas & Ryan (1999).

BiP não afeta o nível de peroxidação de lipídeos resultante de acúmulo excessivo de ROS

Uma vez que estresse típico do RE causa um acúmulo excessivo de ROS em plantas transgênicas superexpressando BiP, foi dosado a peroxidação dos lipídeos, como resultado direto da ação de ROS. Os ensaios foram realizados utilizando plantas estressadas por 24 horas e os níveis de peroxidação de lipídeos foram avaliados com base no acúmulo do aldeído MDA (Figura 7). Tratamento com PEG por 24 horas acarretou em um aumento dos níveis de aldeídos reativos derivados da peroxidação de lipídeos, não havendo diferença significativa nos níveis de MDA entre as plantas transgênicas e controle. Consistente com estes resultados, a coloração com DAB de folhas estressadas osmoticamente foi significativamente superior às folhas não tratadas, não havendo diferença entre as plantas transgênicas e controle (dados não mostrados). Estes resultados indicam que BiP não atenua diretamente a peroxidação de lipídeos causada por acúmulo de ROS em resposta ao estresse osmótico. Em contraste, tratamento com tunicamicina não promoveu estresse oxidativo tão acentuado, e não causou um aumento significativo nos níveis de MDA. De fato, a coloração de folhas de soja estressadas por tunicamicina com DAB não demonstrou alterações nos níveis de ROS causadas por estresse no RE em plantas controle (Figura 6). Embora o tratamento com tunicamicina tenha promovido um aumento nos níveis de ROS em folhas transgênicas, este aumento não foi suficientemente alto

para causar peroxidação de lipídeos, conforme julgado pelos níveis de MDA (Figura 7).

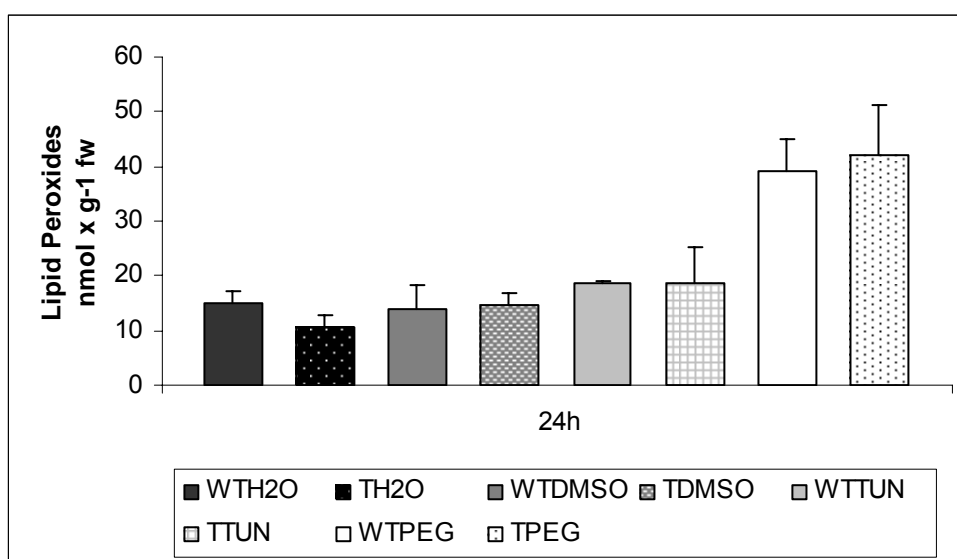


Figura 7 – **Peroxidação de lipídeos expressão como conteúdo de MDA.** Plântulas de soja foram submetidas aos tratamentos por tunicamicina e PEG por 24 horas e as folhas foram utilizadas para dosagem de MDA. (SD+; n= 5 réplicas biológicas).

Superexpressão de BiP atenua os processos de morte celular induzidos pelas proteínas NRP-A e NRP-B em plantas de tabaco.

No capítulo anterior, foi demonstrado que as proteínas NRP-A e NRP-B induzem o processo de morte celular com características de PCD de mamíferos. Além disso, expressão dessas proteínas em folhas de tabaco acelerou o processo de senescência com o desenvolvimento de clorose. Para avaliar o efeito de BiP em PCD induzida por NRPs, folhas de tabaco expressando o gene *soyBiPD* nas orientações senso e anti-senso e plantas controle foram agroinfiltradas com cassetes de expressão para os genes *NRP-A* e *NRP-B* (Figura 8). A expressão de ambas as proteínas provocou o amarelecimento acelerado das folhas infiltradas nas folhas controle (WT). Entretanto, nas folhas transgênicas senso (S), expressão de *NRP-A* e *NRP-B* não alterou o teor de clorofila, conforme julgado pela manutenção da cor verde durante o período do experimento. Em contraste, nas folhas anti-senso, o desenvolvimento de clorose como resultado da expressão de *NRP-A* e *NRP-B* foi acentuado e o processo de senescência acelerado em comparação com plantas controle. Estes resultados substanciam o argumento de que BiP atua prevenindo o processo de morte celular em células vegetais. Experimentos adicionais serão necessários para elucidar o mecanismo pelo qual BiP alivia morte celular.

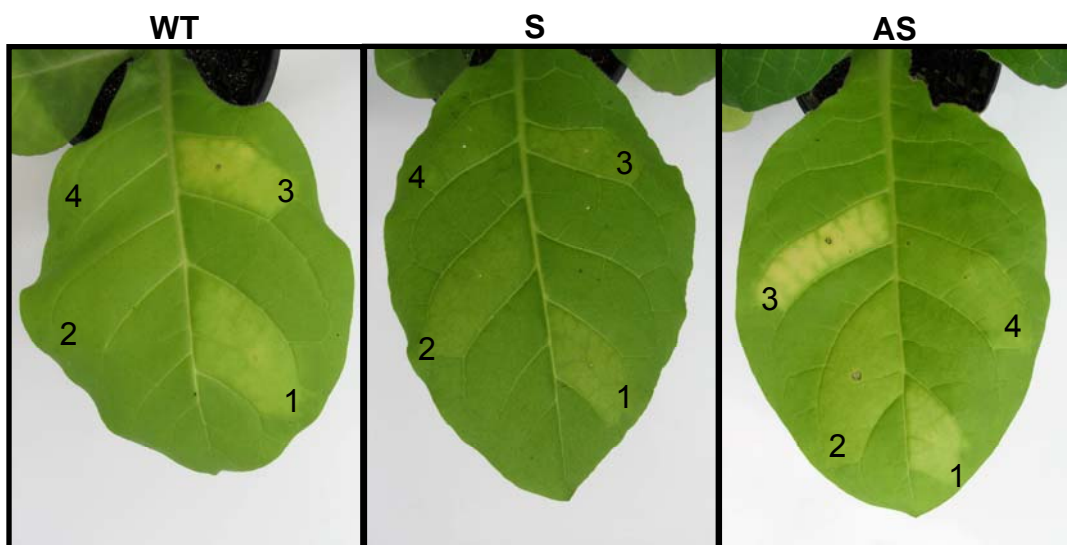


Figura 8 - **Agroinoculação em folhas de tabaco.** Plantas de tabaco controle (Wt) e superexpressando soyBIPD na orientação senso (S) e antisenso (AS) foram infiltradas com agrobactérias transformadas com 1- NRP-A (YFP-NRP), 2- Unrelated protein (pK7FWG2 – NAP), 3- NRP-B (YFP-NRP-B) e NRP-A (pK7WG2-NRP-A). As fotografias foram tiradas cinco dias após a inoculação.

CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que a superexpressão do chaperone molecular BiP confere resistência a estresses abióticos em plântulas de soja, além de prevenir morte celular. Expressão ectópica de BiP em plantas transgênicas diminuiu as lesões foliares necróticas induzidas por tunicamicina, e manteve o turgor foliar em condições de desidratação induzida por PEG, enquanto que as folhas controle murcharam completamente sob as mesmas condições de desidratação. O teor relativo de células mortas foi inferior em plantas transgênicas submetidas aos estresses osmótico e do RE. Assim também superexpressão de BiP protegeu o DNA genômico de degradação induzida pelos estresses abióticos. O envolvimento de BiP na prevenção de morte celular foi adicionalmente demonstrado por meio dos fenótipos desenvolvidos pela expressão dos genes *NRP-A* e *NRP-B*, indutores de morte celular, em folhas de tabaco transformadas com o gene *soyBiPD* nas orientações senso e anti-senso. Expressão aumentada de BiP em plantas transgênicas senso inibiu clorose induzida por *NRP-A* e *NRP-B*, enquanto que inibição de BiP endógeno pela construção anti-senso acelerou o processo de senescência. Embora experimentos adicionais serão necessários para elucidar o mecanismo pelo qual BiP regula morte celular, os resultados permitiram excluir as possibilidades que BiP esteja atuando diretamente na regulação do estado redox sinalizador de morte celular e em peroxidação de lipídeos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aharon R, Shahak Y, Winer S, Bendov R, Kapulnik Y, Galili G.** (2003). Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *The Plant Cell* 15, 439–447.
- Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M.** (1997) Genes involved in organ separation in Arabidopsis, An analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* 9:841–857.
- 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
- Badawi G, Yamauchi Y, Kawano N, Tanaka K, Tanaka K** (2004) Enhanced tolerance to water deficit and high salt stress by overexpressing superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 45: S230-S230
- Bartels D** (2001) Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance? *Trends in Plant Science* 6: 284-286
- Bertolotti A, Zhang YH, Hendershot LM, Harding HP, Ron D** (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology* 2: 326-332
- Binsfeld, P.C** (2000) Análise diagnóstica de um produto transgênico. *Biotecnologia* v 34.
- Bray E** (1993) Molecular response to water deficit. *Plant Physiology* 103:1035-1040
- Breusegem FV, Dat JF** (2006) Reactive Oxygen Species in Plant Cell Death. *Plant Physiology* 141:384–390
- Buzeli RAA, Cascardo JCM, Rodrigues LAZ, Andrade MO, Almeida RS, Loureiro ME, Otoni WC, Fontes EPB** (2002) Tissue-specific regulation of BiP genes: a cis-acting regulatory domain is required for BiP promoter activity in plant meristems. *Plant Mol Biol* 50, 757–771.

- Calton M, Zeng HQ, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D** (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415: 92-96
- Casolo V, Petrusa E, Krajnakova J, Macri F and Vianello A** (2005) Involvement of the mitochondrial K1 ATP channel in H₂O₂- or NO-induced programmed death of soybean suspension cell cultures. *Journal of Experimental Botany* 56:997-1006
- Chandler PM, Robertson M** (1994) Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45: 113-141
- Che P, Gingerich DJ, Sonia L, Howell SH.** (2002) Global and hormone-induced gene expression changes during shoot development in Arabidopsis. *Plant Cell* 14:2771–2785.
- Chen X, Shen J, Prywes R** (2002) The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *Journal Of Biological Chemistry* 277: 13045-13052
- Chen G, Cizeau J, Velde CV, Park JH, Bozek G, Bolton J, Shi L, Dubik D, Greenber A** (1999) Nix and Nip3 Form a Subfamily of Pro-apoptotic Mitochondrial Proteins. *The Journal of Biology Chemistry.* 277:1-10
- Chichkova NV, Kim SH, Titova ES Kalkum M, Morozov VS, Rubtsov YP, Kalinina NO, Taliansky ME and Vartapetian AB** (2004) A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. *The Plant Cell* 16: 157-171.
- Collinge M, Boller T.** (2001) Differential induction of two potato genes, Stprx2 and StNAC, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Mol Biol* 46:521–9.
- Cox JS, Walter P** (1996) A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* 87: 391-404
- Danon A, Delorme V, Mailhac N, Gallois P,** (2000) Plant programmed cell death: A common way to die. 38:647-655
- Delauney AJ, Verma DP.** (1985). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal* 4, 215–223.

- Denecke, J.** (1996) Soluble endoplasmatic reticulum resident proteins and their function in protein syntesis and transpot. *Plant Physiol. Biochem.*, v.34, p.197-205.
- Denekamp M, Smeekens SC** (2003) Integration of wounding and osmotic stress signals determines the expression of the AtMYB102 transcription factor gene. *Plant Physiology* 132: 1415-1423
- Duval M, Hsieh T, Kim S, Thomas T** (2002) Molecular characterization of AtNAM: a member of the Arabidopsis NAC domain superfamily. *Plant Molecular Biology* 50: 237-248
- Greenberg JT,** (1996) Programmed cell death: A way of life for plants, *PNAS* 93:12094-12097
- Ghoshroy S, Lartey R, Sheng JS, Citovsky V** (1997) Transport of proteins and nucleic acids through plasmodesmata. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48, 25–48.
- Gorham J, Jones RGW, McDonnell E.** (1985). Some mechanisms of salt tolerance in crop plants. *Plant and Soil* 89, 15–40.
- Greve K, La Cour T, Jensen MK, Poulsen FM, Skriver K.** (2003) Interactions between plant RING-H2 and plant-specific NAC (NAM/ATAF1/2/CUC2) proteins: RING-H2 molecular specificity and cellular localization. *Biochem J* 371:97–108.
- Gupta A, Heinen J, Holaday A, Burke J, Allen R** (1993) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide-dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 1629-1633
- Haas, I.G.; Meo, T.** (1988) cDNA cloning of the immunoglobulin heavy chain binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, . v.85, p. 2250-2254.
- Hammond C, Helenius A.** (1995) Quality control in the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7, 523-529.
- Harding HP, Zhang YH, Bertolotti A, Zeng HQ, Ron D** (2000) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Molecular Cell* 5: 897-904
- Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K** (1999) Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by

proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Molecular Biology Of The Cell* 10: 3787-3799

Hegedus D, Yu M, Baldwin D, Gruber M, Sharpe A, Parkin I, et al., (2003) Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. *Plant Mol Biol*;53:383–397.

Hsieh T, Lee J, Charng Y, Chan M (2002) Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiology* 130: 618-626

Hollien J, Weissman JS (2006) Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* 313: 104-107

Houde M, Belcaid M, Ouellet F, Danyluk J, Monroy AF, Dryanova A, Gulick P, Bergeron A, Laroche A, Links MG, MacCarthy L, Crosby WL and Sarhan F, (2006) Wheat EST resources for functional genomics of abiotic stress. *BMC Genomic*, 7:149.

Hu CAA, Delauney AJ, Verma DPS (1992) A Bifunctional Enzyme (Delta-1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase) Catalyzes The 1st 2 Steps In Proline Biosynthesis In Plants. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 89: 9354-9358

Hu X , Zhang A , Zhang J, Jiang M (2006) Abscisic Acid is a Key Inducer of Hydrogen Peroxide Production in Leaves of Maize Plants Exposed to Water Stress *Plant Cell Physiol.* 47: 1484–1495

Irsigler AST, Costa MDL, Zhang P, Braga PA, Dewey RE, Boston RS, Fontes EPB (2007) Transcriptional profiling reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways. *BMC Genomics* (enviado para publicação).

Iwata Y, Koizumi N (2005) An *Arabidopsis* transcription factor, AtbZIP60, regulates the endoplasmic reticulum stress response in a manner unique to plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 5280–5285.

Jaglo-Ottosen K, Gilmour S, Zarka D, Schabenberger O, Thomashow M (1998) *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280: 104-106

Jelitto-Van Dooren EPWM, Vidal S & Denecke J (1999) Anticipating endoplasmic reticulum stress: a novel early response before pathogenesis-related gene induction. *Plant Cell* 11, 1935–1943.

- John I, Hackett R, Cooper W, Drake R, Farrell A, Grierson D** (1997) Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs. *Plant Molecular Biology* 33: 641-651
- Jones, A.** (2000). Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends Plant Sci.* 5, 225-230.
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology* 17: 287-291
- Knarr, G.; Gething, M.J.; Modrow, S.; Buchner, J.** (2002) BiP-binding sequences in antibodies. *J. Biol. Chem.*, v.270, p. 27589-27594
- Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J** (1988) The Presence Of Malfolded Proteins In The Endoplasmic-Reticulum Signals The Induction Of Glucose-Regulated Proteins. *Nature* 332: 462-464
- Kreps JA, Wu YJ, Chang HS, Zhu T, Wang X, Harper JF** (2002) Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology* 130: 2129-2141
- Leborgne-Castel N, Jelitto-Van Dooren E, Crofts AJ, Denecke J** (1999) Overexpression of BiP in tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell* 11: 459-469
- Lemasters JL.** (1999). Mechanisms of hepatic toxicity. V. Necroptosis and mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *American Journal of Physiology* 276, G1–6.
- Liu CY, Wong HN, Schauerte JA, Kaufman RJ** (2002) The protein kinase/endoribonuclease IRE1 alpha that signals the unfolded protein response has a luminal N-terminal ligand-independent dimerization domain. *Journal Of Biological Chemistry* 277: 18346-18356
- Liu, S.Y.; Kaufman, (2003)R.J.** The unfolded protein response. *Cell science*, v. 116, p. 1861-1862.
- Ludwig A, Tenhaken R** (2000) Defence gene expression in soybean is linked to the status of the cell death program. *Plant Molecular Biology* 44: 209–218
- Ludwig AA, Tenhaken R,** (2001). A new cell wall located N-rich protein is strongly induced during the hypersensitive response in *Glycine max* L. *European Journal of Plant Pathology.* 107:323-336.

- Mahajan S and Tuteja N** (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*. 444: 139-158
- McKay, D.B.** (1993) Structure and mechanism of 70-kDA heat-shock-related proteins. *Adv Prot. Chem.*, v. 44, p. 67-80.
- Morishina N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y,** (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 277: 34287-94.
- O'Brien IEW, Baguley BC, Murray BG, Morris BAM and Ferguson IB** (1998). Early stages of the apoptotic pathway in plants are reversible. *The Plant Journal*. 13 (6), 803-814.
- Oda Y, Hosokawa N, Wada I,** (2003) Nagata K. Edem as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science*, v.299, p.1394-1397.
- Okamura K, Kimata Y, Higashio H, Tsuru A, Kohno K** (2000) Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 279: 445-450
- Olsen AN, Ernst HA, Lo Leggio L, Skriver K** (2005) NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends In Plant Science* 10: 79-87
- Ooka H, Satoh K, Doi K, Nagata T, Otomo Y,** et al. (2003) Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res* 10: 239–247.
- Orrenius S, Zhivotovsky B and Nicotera P** (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature* 4:
- Palavan-Unsal N, Buyuktuncer E and Tufekci MA** (2005) Programmed cell death in plants. *Journal of Cell and Molecular Biology* 4: 9-23
- Pelham HRB.** (1989) Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 5, 1-23.
- Pennell RI and Lamb C** (1997) Programmed cell death in plants. *Plant Cell*, 9, 1157-1168.

- Pérez-Alfocea F, Estan˜ MT, Caro M, Guerrier G.** 1993. Osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* under NaCl and polyethylene glycol 6000 iso-osmotic stresses. *Physiologia Plantarum* 25, 493–498.
- Pilon M.; Shechekman R.** (1999) Protein translocation: how Hsp 70 pulss it off. *Cell*, V.7, p. 679-682.
- Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, Rio G, Bredesen DE and Ellerby HM** (2002) Coupling Endoplasmatic reticulum stress to the cell death program. *Journal of Biology Chemistry* 244:21826-21842.
- Ren T, Qu F, Morris TJ. HRT** (2000) Gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *Plant Cell* 12:1917–25.
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK, Yu G.** (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*. 15;290(5499):2105-10
- Rodrigues SM, Andrade MO, Gomes APS, DaMatta FM, Baracat-Pereira MC, Fontes EPB** (2006) Arabidopsis and tobacco plants ectopically expressing the soybean antiquitin-like ALDH7 gene display enhanced tolerance to drought, salinity, and oxidative stress. *Journal Of Experimental Botany* 57: 1909-1918
- Ron D and Walter P** (2007) Signal integration in the endoplasmatic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews (Molecular cell biology)*
- Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cazares B, Lucas WJ.** (1999) Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: Implications for supracellular regulation in plants. *Development* 126:4405-4419.
- Selth LA, Dogra SC, Rasheed MS, Healy H, Randles JW, Rezaiana MA.** (2005) A NAC domain protein interacts with tomato leaf curl virus replication accessory protein and enhances viral replication. *Plant Cell* 17:311–325.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.** (2000). Molecular response to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 217±223.

- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.** (2006). Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:781–803
- Shirasu K, Nakajima H, Krishnamachari-Rajasekhar VK, Dixon RA and Lamb C** (1997) Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* 9: 261–270
- Sitia R, Braakman I (2003)** Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* 426
- Solomon M, Belengui B, Delledonne M, Menachem E and Levine A** (1999) The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants
- Tenhaken R, Doerks T, Bork. P,** (2005) DCD – a novel plant specific domain in proteins involved in development and programmed cell death. *BMC Bioinformatics.* 6:169
- Tran LP, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, et al.,** (2004) Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell* 16:2481–2497.
- Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P** (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101: 249-258
- Tsujimoto Y, Shimizu S** (2000) Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Letters* 466, 6–10.
- Ueda A, Kathiresan A, Mayumi I, Narita Y, Nakamura T, Shi W, Tetsuko T and Bennett J** (2004) Osmotic stress in Barley regulates expression of a different set of genes than salt stress does. *Journal of Experimental Botany* 55:2213-2218.
- Urade R** (2007) Cellular response to unfolded proteins in the endoplasmic reticulum of plants. *FEBS Journal*
- Vaux DL.** (1993) Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 786–789.

- Xu C, Bailly-Maitre B and Reed JC** (2005) Endoplasmatic reticulum stress: cell life and death decisions. *The journal of clinical investigation* 115: 2656-2664
- Wang S, Narendra S and Fedoroff N** (2007) Heterotrimeric G protein signaling in the Arabidopsis unfolded protein response. *PNAS* 104:3817-3822
- Weir I, Lu J, Cook H, Causier B, Schwarz-Sommer Z, Davies B.** (2004) CUPULIFORMIS establishes lateral organ boundaries in *Antirrhinum*. *Development* 131:915–922.
- Wertz IE and Hanley MR** (1996) Diverse molecular provocation of programmed cell death. *Trend Biochem. Sci.* 21,359-364
- Yanjun, M; Hendershot, L. M,** (2003) ER chaperone functions during normal and estresse conditions. *Journal of Chem. Neuroanatomy*, p. 1-13.
- Xie Q, Sanz-Burgos AP, Guo H, Garcia JA, Gutierrez C.** (1999). GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant Mol Biol.* Mar; 39 4:647-56.
- Xie Q, Frugis G, Colgan D, Chua NH** (2000) Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal posterior of TIR1 to promote lateral root development. *Genes & Development* 14: 3024-3036
- Xiong L and Zhu JK** (2002) Molecular and Genetic aspects of plant response to osmotic stress. *Plant Cell Environ.* 25:131-139.
- Yeo AR, Lee KS, Izard P, Boursier PJ, Flowers TJ.** 1991. Shortand long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* 25, 881–889.
- Zhang K, Kaufman RJ** (2004) Signaling the Unfolded Protein Response from the Endoplasmatic Reticulum. *The Journal of Biology Chemistry* v279, n°25 25935-25938
- Zhu J** (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 66-71
- Zuppini A, Navazio L and Mariani P** (2004) Endoplasmatic Reticulum stress-induced programmed cell death in soybean cells. *Journal of Cell Science* 117: 2591-2598.