

JULIANA ROCHA VAEZ

TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO MEDIADA PELA PROTEÍNA BIP
DE SOJA EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TABACO

Tese 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
2003

JULIANA ROCHA VAEZ

TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO MEDIADA PELA PROTEÍNA BIP
DE SOJA EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TABACO

Tese 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 EM: 31 de julho de 2003.

Maurílio Alves Moreira
(Conselheiro)

Sônia Madali Boseja Carolino
(Conselheira)

Maria Goreti de Almeida Oliveira

Valéria Monteze Guimarães

Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

Aos meus pais Léo Vaez de Almeida e Edna Marta Rocha Vaez e às minhas irmãs Luciana e Liliana, fontes de amor, compreensão, incentivo... tornando um sonho em realidade.

À Elizabeth Pacheco Batista Fontes, exemplo de profissionalismo.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Bioquímica Agrícola, pela oportunidade de realização do Curso.

Aos meus conselheiros Professor Maurílio Alves Moreira e Doutora Sônia Madali Boseja Carolino, pelo apoio e pelos ensinamentos.

À Professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, pela amizade, atenção e dedicação durante o desenvolvimento desta dissertação.

À Professora Valéria Monteze Guimarães, pela atenção e disposição.

Aos professores do Curso de Bioquímica Agrícola, em especial ao Sebastião Resende, pelos ensinamentos.

Ao Professor Francisco Murilo Zerbini Júnior, pela atenção e presteza.

Ao Zeca, pelo apoio, pela atenção, pela ajuda e pelo carinho.

Ao Júnior e à Tina, pelo amor incondicional.

À minha avó Enilde, pelo carinho e apoio.

A Alessandra e Laudiene, pela amizade e ajuda.

Ao Eduardo, pelas incontáveis gentilezas, pela atenção e pela amizade.

Aos meus colegas de laboratório Alessandro, Carol, Anete, Rejane, Marília, Eliane, Felipe, Anésia, Simone, Mariana, Ana Paula e Dirce, em especial a André, Josiane e Léo, pelo carinho e agradável convívio.

Ao Newton Piovesan, pela ajuda na execução dos trabalhos na casa de vegetação e nas sessões de dúvidas.

A Inês, Karina, Márcio e Rita, pela ajuda.

Aos meus amigos Thiago, Ana Karina, Fabíola, Gustavo e Marcelo, pelo incentivo.

Aos meus colegas de curso, pelo convívio.

Aos funcionários do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), em especial ao Aloísio, pela colaboração.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo financiamento do projeto.

A todos que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

JULIANA ROCHA VAEZ, filha de Léo Vaez de Almeida e Edna Marta Rocha Vaez, nasceu em 27 de janeiro de 1978, em Pirassununga, São Paulo.

Em 2001, graduou-se em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), em Natal.

No segundo semestre de 2001, especializou-se em Bioquímica pela UFRN, em Natal.

Em 2002, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de tese em julho de 2003.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	4
2.1. Sinalização em resposta ao acúmulo de proteínas mal dobradas no retículo endoplasmático – UPR (“unfolded protein response”).	4
2.2. BiP (Binding Protein)	7
2.2.1. Regulação dos genes BiP de plantas durante estresses no RE ..	9
2.2.2. Expressão tecido-específica dos genes <i>BiP</i>	10
2.2.3. Diferentes modelos de expressão da família dos genes <i>BiP</i> de soja	12
2.2.4. Diferentes vias de sinalização dos genes <i>BiP</i> de plantas.....	13
2.2.5. Diferentes estados da proteína BiP de soja durante estresses ...	15
2.2.6. Propriedades protetoras de BiP de plantas contra estresses abióticos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Extração de proteínas	18

	Página
3.2. Quantificação de proteínas	19
3.3. Análise da segregação das plantas transformadas em meio com canamicina.....	19
3.4. Análise molecular das plantas transgênicas	20
3.5. Análise da expressão do transgene	20
3.6. Análise da tolerância a estresse hídrico mediado por BiP.....	21
3.6.1. Indução de estresse hídrico.....	21
3.6.2. Cinética de indução de BiP em resposta ao estresse hídrico	21
3.7. Análise do potencial de BiP como gene de seleção em sistemas de transformação de plantas	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	23
4.1. Obtenção e análise de linhagens transgênicas em homozigose expressando o gene <i>BiP</i> de soja nas orientações senso ou anti- senso	23
4.2. Alto nível constitutivo de acúmulo de BiP na linhagem T3-35S- BiPS7.2.....	27
4.3. Correlação entre os níveis de BiP e tolerância ao estresse hídrico..	32
4.4. Análise do potencial de BiP como gene de seleção em sistemas de transformação de plantas	41
5. CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

RESUMO

VAEZ, Juliana Rocha, M. S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2003, **Tolerância ao estresse hídrico mediada pela proteína BiP de soja em plantas transgênicas de tabaco**. Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Conselheiros: Maurílio Alves Moreira e Sônia Madali Boseja Carolino.

A proteína de ligação (BiP) é um importante componente de resposta ao estresse no retículo endoplasmático (RE). Tem sido demonstrado que níveis elevados de BiP em tabaco transgênico de linhagens senso conferem tolerância à tunicamicina, um inibidor de glicosilação, durante a germinação e tolerância ao déficit hídrico durante o crescimento das plantas. Para avaliar a função protetora de BiP contra estresses abióticos, linhagens homozigotas T3 expressando o gene *BiP* da soja na orientação senso e anti-senso, foram obtidas através de análises de segregação do loco do T-DNA das gerações T2 e T3. Sob déficit hídrico progressivo, níveis de BiP em folhas de linhagens transgênicas com a orientação senso estão correlacionados com a manutenção da turgidez de broto e do conteúdo de água, independentemente do grau de intensidade do estresse. Contudo, o efeito protetor da superexpressão de BiP contra estresse hídrico não é perdido na expressão do cDNA de *BiP* da geração T4 das linhagens homozigotas anti-senso. A suscetibilidade das linhagens anti-senso ao déficit hídrico foi

similar aos controles, plantas não-transformadas. Esse resultado pode indicar que ocorreu seleção natural dos transformantes com baixa expressão do gene anti-senso nas gerações subsequentes. O caráter essencial dos genes *BiP* pode levar a uma pressão seletiva para o silenciamento do gene anti-senso. A função de BiP na tolerância contra estresses do RE foi investigada na geração T3 de plantas transgênicas senso e anti-senso de *N. tabacum*. Aparentemente, a superexpressão constitutiva de BiP não atenuou a letalidade ocasionada pela inibição da glicosilação pela tunicamicina nas concentrações de 0,6 a 1,0 µg/mL. Nessas condições, a tunicamicina inibe a indução de brotos mais eficientemente em plantas superexpressando BiP do que nas selvagens. Análises de *immunoblottings* detectaram aumento no nível de BiP nas concentrações de tunicamicina de 0,8 e 1,0 µg/mL. A indução de BiP foi coordenada com o acúmulo de um produto de degradação de 25-28 kDa, indicando a existência de uma co-regulação entre a via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR) e o sistema de degradação de proteínas associadas ao RE em células de plantas. O aumento no nível de BiP em discos foliares transgênicos senso foi similar ao observado em controles após o tratamento com tunicamicina. Entretanto, o tratamento de discos foliares senso não promoveu acúmulo adicional de BiP nem do produto de degradação de 25-28 kDa. Tais resultados evidenciam que o nível de BiP pode atuar como sensor para ativação de resposta a estresses em plantas. Portanto, elevados níveis de BiP em células de plantas inibem a ativação da via UPR e podem evitar a ativação do sistema ERAD.

ABSTRACT

VAEZ, Juliana Rocha, M. S., Universidade Federal de Viçosa, July 2003.
Hydric stress tolerance mediated by BiP protein in transgenic tobacco plants. Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Committee Members: Maurílio Alves Moreira and Sônia Madali Boseja Carolino.

The binding protein (BiP) is an important component of endoplasmic reticulum stress response of cells. Elevated levels of BiP in sense transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv Havana) lines have been shown to confer tolerance to the glycosylation inhibitor tunicamycin during germination and tolerance to water deficit during plant growth. In order to further examine the protective function of BiP against abiotic stresses, homozygous T3 lines constitutively expressing a soybean *BiP* gene in the sense and antisense orientation were obtained by following the segregation of the T-DNA locus in the T2 and T3 generations. Under progressive drought, the leaf BiP levels in the sense transgenic lines correlated with the maintenance of the shoot turgidity and water content, regardless of stress intensity. Nevertheless, the protective effect of BiP overexpression against water stress was not disrupted by expression of an antisense *BiP* cDNA construct in the T4 generation of homozygous anti-sense lines. In fact, the susceptibility of the antisense lines to water deprivation was similar to the untransformed, control plants. This result may indicate the

occurrence of natural selection for low antisense gene expression in the subsequent generations. The essential character of *BiP* genes may lead to a selective pressure towards antisense gene silencing. The BiP-mediated tolerance against ER stressors was also investigated in the T3 generations of *N. tabacum* sense and antisense transgenic plants. Apparently constitutive overexpression of BiP did not attenuate the lethality caused by inhibition of protein glycosylation at 0,6 to 1,0 µg/mL of tunicamycin. In fact, under this condition, tunicamycin inhibited the induction of shoots more efficiently in BiP overproducers than in wild type plants. Analysis of control disc leaves by immunoblottings detected a significant increase in BiP protein levels at 0,8 and 1,0 µg/mL of tunicamycin. The induction of BiP was coordinate with the accumulation of a 25-28 kDa specific degradation product of the protein, suggesting the existence of co-regulation between the activation of BiP synthesis via UPR (unfolded protein response) and its specific degradation, probably via ERAD (ER-associated protein degradation) in plant cells. The enhanced level of BiP in the sense transgenic disc leaves was similar to that observed in wild type cells after treatment with tunicamycin. Nevertheless, treatment of sense disc leaves with tunicamycin did not promote an additional accumulation of BiP and did not cause accumulation of the 25-28 kDa specific degradation product. Taken together, these results suggest that the BiP levels may act as an ER sensor for activation of plant ER stress response. Therefore, elevated levels of BiP in plant cells inhibit activation of the unfolded protein pathway and, in turn, may prevent activation of the ERAD system upon accumulation of unfolded protein in the ER.

1. INTRODUÇÃO

Os estresses abióticos e bióticos, em plantas, são considerados um dos principais fatores de restrição à agricultura brasileira, contribuindo para a redução da produtividade agrícola. Esforços para melhorar a tolerância a estresses abióticos por meio de melhoramento genético convencional e engenharia genética de plantas têm tido sucesso limitado devido à complexidade genética de respostas a esses estresses. De fato, a capacidade genética de um organismo para adaptação ao estresse envolve um sistema complexo de vias moleculares de sinalização capaz de responder às agressões do meio ambiente de maneira coordenada.

As plantas respondem aos estresses bióticos e abióticos por meio de ajustes morfológicos, fisiológicos e metabólicos, e algumas respostas celulares adaptativas estão claramente interconectadas com outras respostas a estresses ambientais. Em condições naturais, é improvável que a planta seja sujeita a apenas um tipo de estresse. Por exemplo, em condições de estresse hídrico a absorção de nutrientes é afetada, levando a um estresse nutricional. O déficit hídrico celular resulta em estresse osmótico, o qual também pode ser causado por um estresse salino. Conseqüentemente, em condições de estresse hídrico, tanto a deficiência nutricional quanto os estresses osmótico e salino contribuem para debilitar a planta. Nessa vasta gama de efeitos fisiológicos, provavelmente

aquelas proteínas, relacionadas com estresses em geral e que, portanto, permitem respostas celulares adaptativas e coordenadas sob diversas condições de estresses, tenham maior probabilidade de proteger as plantas em condições de campo (ALVIM et al., 2001).

Qualquer condição de estresse que provoca diminuição na eficiência do enovelamento protéico e, portanto, aumento temporário na quantidade de proteínas mal dobradas no retículo endoplasmático (RE) ativa uma via de sinalização denominada via de resposta a proteínas mal dobradas, UPR (MARTÍNEZ e CHRISPEELS, 2003). Como resultado primário da ativação dessa via, ocorre a regulação positiva e coordenada de um conjunto de genes, dentre eles o gene da proteína de ligação, BiP (FINK, 1999; GETHING e SAMBROOK, 1992).

A proteína BiP, também chamada de GRP78, é um dos mais bem caracterizados chaperones moleculares do RE que se associa a polipeptídios recém-sintetizados para assistir ao enovelamento correto e oligomerização de proteínas secretórias. BiP também exerce importante papel na translocação de proteínas recém-sintetizadas, através da membrana do RE (LEE, 1992; GALILI et al., 1998).

Uma vez que BiP é induzida pela UPR e participa no enovelamento das proteínas secretórias, acredita-se que exerça um papel protetor contra estresses no RE. De fato, tem sido demonstrado que a superexpressão de BiP em cultura de células de mamíferos (MORRIS et al., 1997) e em protoplastos de fumo (LEBORGNE-CASTEL et al., 1999) previne a regulação positiva de genes induzidos pela via UPR e aumenta a tolerância das células a estresses. Além disso, a transfecção de células de mamíferos com um mRNA de BiP anti-senso suprimiu a indução de BiP sem alterar seus níveis basais. Essas células também apresentam aumento na sensibilidade a ionóforos (LI e LEE, 1991; LI et al., 1992), estresse oxidativo (GORMER et al., 1991) e toxidez mediada pela célula (SUGAWARA et al., 1993). Coletivamente, essas observações indicam que BiP atua diretamente atenuando o estresse no RE e claramente demonstram o papel protetor de BiP em culturas de células.

Na tentativa de avaliar o efeito protetor de BiP em organismos multicelulares intactos, ALVIM et al. (2001) obtiveram plantas transgênicas de tabaco, cujos níveis de BiP foram alterados por meio da tecnologia de repressão anti-senso e pela superexpressão do transgene BiP isolado da soja. O aumento do acúmulo constitutivo de BiP em plantas transgênicas conferiu tolerância a estresse hídrico e atenuou o efeito citotóxico de agentes que provocam estresses no retículo endoplasmático (como tunicamicina) durante a germinação da semente. O efeito protetor resultante da superexpressão de BiP foi anulado por meio de repressão anti-senso. Entretanto, o mecanismo pelo qual o aumento no acúmulo de BiP resulta no incremento da tolerância a estresse hídrico ainda não foi elucidado.

A capacidade da superexpressão de BiP em conferir tolerância ao antibiótico tunicamicina durante a germinação de sementes transgênicas senso a possibilidade da utilização do gene *BiP* como agente de seleção em sistemas de transformação de plantas. Isso eliminaria a necessidade da introdução de genes bacterianos de resistência a antibióticos no genoma de plantas como genes marcadores. Assim, neste trabalho a hipótese de *BiP* ser utilizado como agente de seleção foi avaliada. Para tal determinação, fez-se necessária a obtenção de plantas transgênicas homozigotas, por meio de análise de segregação do transgene *nptII* e genotipagem da geração T3. O fenótipo tolerância a estresse hídrico também foi avaliado nas plantas transgênicas homozigotas (geração T4).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sinalização em resposta ao acúmulo de proteínas mal dobradas no retículo endoplasmático – UPR (“unfolded protein response”)

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela composta por uma membrana contínua onde ocorrem a síntese, o enovelamento e a maturação de proteínas secretórias, bem como translocação de proteínas através da membrana do RE, integração de proteínas transmembranas, síntese de fosfolipídios e esteróis e estocagem de íons cálcio que serão liberados para o citosol e exercerão controle em diversos processos nela ocorridos (VOELTZ et al., 2002). Perturbações, por exemplo agentes estressores que alterem a homeostase dos processos ocorridos no RE, podem resultar em acúmulo de proteínas mal dobradas que levarão a célula à disfunção e morte (KAUFMAN, 2002).

Estresses no RE podem ativar a via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR), que é uma via de transdução de sinal que permite a comunicação entre o RE e o núcleo, ativando a expressão de diversos genes-alvos, envolvidos na manutenção da homeostase celular, por meio dos processos de translocação, glicosilação, degradação e transporte protéico (KIMATA et al., 2003). Em condições de estresse, o sistema de degradação de proteínas associadas ao RE (sistema ERAD) é saturado com as proteínas mal dobradas; a via UPR é, então,

requerida para o transporte do excesso de proteínas para o vacúolo para reciclagem, evitando o desequilíbrio das atividades celulares (SPEAR e NG, 2003; CABRAL et al., 2002). A via UPR induz à transcrição de um conjunto de genes envolvidos no processamento de proteínas secretórias que ocorre no retículo endoplasmático, além de atenuar a síntese global de proteínas e ativar, coordenadamente, o sistema ERAD (HAMPTON, 2002; MARTÍNEZ e CHRISPEELS, 2003). Essas respostas diversificadas são adaptativas para a tentativa de sobrevivência celular. Se o enovelamento protéico mediado por chaperones induzidos pela UPR não permitir a aquisição da estrutura correta para que a proteína exerça a sua atividade, ela será, então, encaminhada para degradação. Os três maiores transdutores de sinais da via UPR, descritos em células de mamíferos, são as proteínas PERK, IRE1 e ATF6 (TIRASOPHON et al., 1998; HARDING et al., 1999; SHI et al., 1998; KAUFMAN, 1999).

PERK é uma cinase transmembrana que fosforila a subunidade α do fator de iniciação 2 (eIF2) em resposta ao estresse no RE (HARDING et al., 1999). A fosforilação de eIF2 reduz a formação do complexo de iniciação, o que diminui o reconhecimento do códon de iniciação AUG e leva à atenuação da tradução. Em contraste, a eficiência de tradução de alguns tipos de mRNA que apresentam baixo requerimento de eIF2 para a formação do complexo de iniciação, como é o caso do mRNA que codifica o fator de transcrição ATF4, é aumentada (HARDING et al., 2000). Esse controle da tradução apresenta-se como um eficiente mecanismo para reduzir o número de proteínas mal dobradas no RE. Quando a transcrição de GADD34 (gene, cujo produto danifica o DNA e impede o crescimento celular) é induzida através da UPR, o seu produto protéico recruta a proteína fosfatase I (PPI) para defosforilar eIF2, revertendo a atenuação da tradução (NOVOA et al., 2001).

ATF6 é um fator de ativação transcricional transmembrana que apresenta um motivo zíper de leucina básico (HAZE et al., 1999). Dois homólogos de ATF6 (ATF6 α e ATF6 β) são produzidos no RE como glicoproteínas transmembranas do tipo II, que estão sujeitas à proteólise pelas proteases S1P e S2P quando houver algum tipo de estresse no RE. Seguindo a proteólise, a região

N-terminal citosólica é liberada da membrana e translocada para o núcleo (YOSHIDA et al., 2001). No núcleo, juntamente com o fator transcricional NF-Y, liga-se ao cis elemento de resposta ao estresse no RE, ERSE-I (CCAAT-N₉-CCACG) ou ERSE-II (ATTGG-N-CCACG), induzindo a transcrição dos genes ligados a UPR (KOKAME et al., 2001; OKADA et al., 2002).

IRE1 é uma glicoproteína transmembrana com atividades cinase e RNase que, em condições de estresse no RE, dimerizam e se autofosforilam. Em leveduras, a forma fosforilada de IRE1 é a espécie biologicamente ativa que promove o processamento alternativo do mRNA de HAC1, tornando-o um fator de transcrição ativo que vai se ligar ao motivo UPRE (CAGCGTG) e induzir a transcrição de genes associados à via UPR (RUEGSEGGER et al., 2001; MARTÍNEZ e CHRISPEELS, 2003). Em mamíferos, há dois homólogos, um constitutivamente expresso em todas as células e tecidos, IRE1 α , e outro expresso em células epiteliais do intestino, IRE1 β (IWAWAKI et al., 2001). Quando dimerizados, autofosforilam-se e ativam a sua atividade RNase, promovendo o processamento alternativo do mRNA de XBP1, tornando-o ativo e permitindo que ele se ligue ao cis elemento UPRE (TGACGTGG/A) e induza a transcrição de genes ligados à UPR (TIRASOPHON et al., 2000).

No que diz respeito às células de plantas, dois homólogos de *Ire1p* (*AtIrel-1* e *AtLrel-1*) foram identificados em *Arabidopsis* e um em arroz (*Oslrel*) (KOIZUMI et al., 2001; OKUSHIMA et al., 2002). A organização estrutural desses supostos receptores transmembrana do RE possuem quatro domínios característicos da proteína Ire1 de mamíferos e leveduras: (1) domínio sensor luminal na região N-terminal, (2) domínio transmembrana, (3) domínio cinase e (4) domínio ribonuclease na região C-terminal. Além disso, a proteína Ire1-1 de *Arabidopsis* funciona como uma proteína cinase e o domínio sensor de AtIre1-1 e AtIre1-2, quando ligados ao domínio C-terminal de Ire1 de levedura, funciona complementarmente ao mutante *DIre1p* de levedura (KOIZUMI et al., 2001). Entretanto, homólogos de *ATF6* ou *Hac1/XBP* não foram encontrados no genoma de *Arabidopsis*, e componentes *downstream* não foram identificados.

Recentemente, experimentos de hibridização utilizando o método *microarray* revelaram que diversos genes da UPR em *Arabidopsis* estão ligados a processos ocorridos no RE, incluindo a via secretória. Essas análises genômicas indicaram que, assim como em células de mamíferos, as células de plantas estão envolvidas em pelo menos três diferentes mecanismos, que são mediados pela UPR: (1) regulação positiva dos genes que codificam chaperones e proteínas de vesícula de transporte; (2) regulação positiva das proteínas ligadas ao sistema ERAD (sistema de degradação de proteínas associadas ao retículo endoplasmático), que tem seu funcionamento dependente da concentração de BiP (KABANI et al., 2003); e (3) atenuação dos genes que codificam proteínas secretórias (MARTÍNEZ e CHRISPEELS, 2003).

2.2. BiP (Binding Protein)

A proteína BiP foi independentemente identificada pela sua capacidade de interagir com a cadeia pesada de imunoglobulina e pela sua indução por deficiência de glicose no meio, sendo, assim, também denominada Grp78 (glucose regulated protein 78 kDa) (HASS e WABL, 1983; LEE, 1992; MUNRO e PELHAM, 1996). Atualmente, a proteína BiP tem sido descrita como o chaperone molecular mais bem caracterizado do RE.

Como chaperone molecular residente no lúmen do RE, BiP assiste à montagem e dobramento de proteínas secretórias, ligando-se transitoriamente a proteínas recém-sintetizadas, de forma a inibir interações inter e intramoleculares, que poderiam provocar dobramentos defeituosos ou reações de agregação (GETHING e SAMBROOK, 1992; MUNRO e PELHAM, 1996). Ela se associa a outras proteínas, através de seqüência de aminoácidos, expostas na superfície de proteínas desnaturadas. Entretanto, não é parte integrante das estruturas protéicas, as quais auxiliam o enovelamento. BiP, como os demais chaperones moleculares, previne a formação de estruturas incorretas que podem expor, de maneira transiente, regiões carregadas eletricamente ou hidrofóbicas, normalmente envolvidas nas interações com outras proteínas. Já foi demonstrado,

in vitro, que BiP possui alta afinidade por heptapeptídios que contêm uma região constituída por aminoácidos altamente hidrofóbicos (HARTL, 1996). Esses oligopeptídios geralmente ficam expostos na superfície de intermediários de dobramento e montagem, bem como em proteínas mal dobradas. Contudo, o reconhecimento por BiP de intermediários da via de dobramento de proteínas *in vivo* mostra-se extremamente influenciado pela taxa e estabilidade do enovelamento da cadeia de polipeptídios (HELLMAN et al., 1999). Recentemente, foi demonstrada a existência de um complexo multiprotéico no RE formado por BiP, GRP94, CaBP1, PDI (proteína dissulfeto isomerase), ERdj3 (ER-localized Dna J homologue), cochaperone Hsp40, ciclofilina B, GRP170, ERp72, GRP170 e UDP-glicosiltransferase, que se liga a proteínas recém-sintetizadas (MEUNIER et al., 2002).

Evidências conclusivas têm demonstrado que BiP é uma proteína multifuncional. Ela fecha os poros do complexo translocon da membrana do RE voltados para o lúmen (HAMMAN et al., 1998), inclusive durante a integração de proteínas na membrana do RE (HAIGH e JOHNSON, 2002); participa na translocação de proteínas secretórias através da membrana do RE (YOUNG et al., 2001); é requerida para translocação pós-traducional (MATLACK et al., 1999); e é necessária para a translocação co-traducional em leveduras (YOUNG et al., 2001) e, possivelmente, em mamíferos (NICCHITTA e BLOBEL, 1993). Além disso, tem sido demonstrado que, em mamíferos, BiP exerce uma função dinâmica no controle de uma série de processos celulares básicos associados ao RE, incluindo regulação de sua própria expressão por meio da via UPR, regulação da velocidade de tradução de proteínas secretórias, da taxa de processamento do RE e endereçamento de proteínas para a via de degradação (HAMMOND e HELENIUS, 1995; MORRIS et al., 1997; LAITUSIS et al., 1999; LIU et al., 2002; MA et al., 2002). Como parte integral do sistema de controle de qualidade do RE, BiP retém proteínas incorretamente dobradas dentro do RE (HAMMOND e HELENIUS, 1995).

BiP, em condições normais, é sintetizada em baixos níveis, sendo a sua expressão induzida por agentes externos que levam ao acúmulo de proteínas mal

dobradas no RE, por meio da cascata de sinalização em resposta a proteínas mal dobradas, UPR (GETHING e SAMBROOK, 1992). Essa via é caracterizada pela regulação transcricional coordenada de BiP e outros chaperones do RE, os quais estão envolvidos no dobramento de proteínas (KALINSKI et al., 1995).

2.2.1. Regulação dos genes BiP de plantas durante estresses no RE

Como membro da família de proteínas reguladas por estresse, HSP70, a expressão dos genes *BiP/GRP-78* tem sido analisada em condições de estresses que promovem a regulação positiva do mRNA BiP (LEE, 2001). O evento de sinalização mais bem caracterizado que induz BiP é o acúmulo de proteínas mal dobradas no RE causadas por agentes de estresses do RE como tunicamicina, que inibe N-glicosilação de proteínas recém-sintetizadas, ou a expressão de mutantes defectivos de dobramento (LEE, 1992). Essa indução ocorre através da via UPR que regula, positivamente, a transcrição de um grupo de proteínas residentes no RE, incluindo BiP.

Em plantas, assim como em animais e leveduras, a expressão de BiP é regulada de acordo com o requerimento celular da atividade chaperone. Dessa forma, tanto o aumento da atividade secretora quanto o acúmulo de proteínas mal dobradas resultam num aumento da síntese de BiP em plantas (BOSTON et al., 1996; DENECKE, 1996). No mutante *floury-2* do milho, a síntese de uma forma variante de uma proteína de reserva do tipo zeínas, que contém uma sequência sinal não-clivável, está associada com um aumento no acúmulo de BiP (BOSTON et al., 1991; FONTES et al., 1991; COLEMAN et al., 1995; GILLINKI et al., 1997). A expressão de um mutante defectivo da faseolina, uma proteína de reserva do feijão, também induz a síntese de BiP em protoplastos de folha de tabaco (PEDRAZZINNI et al., 1994). Além disso, a tunicamicina, um potente ativador da via UPR, induz eficientemente os níveis de expressão de BiP tanto em nível de mRNA quanto da proteína, em diversas espécies de plantas (FONTES et al., 1991; D'AMICO et al., 1992; KOIZUMI, 1996). Recentemente, foi demonstrado que promotores de BiP de soja fusionados ao gene *reporter*

GUS (β -glucuronidase) são ativados por tunicamicina em plantas transgênicas de tabaco (BUZELI et al., 2002). Além disso, tem sido demonstrado que, como em células de mamíferos, a superexpressão de *BiP* em protoplastos de folhas de tabaco atenua os estresses no RE causados por tunicamicina e previne a ativação da via UPR (LEBORGNE-CASTEL, 1999). Coletivamente, esses resultados levaram à conclusão de que, similarmente à *BiP* de mamíferos e leveduras, a *BiP* de plantas é regulada pela via UPR.

2.2.2. Expressão tecido-específica dos genes *BiP*

Tem sido demonstrado que *BiP* de plantas exibe uma expressão tecido-específica, sendo também regulada por eventos de desenvolvimento (BOSTON et al., 1996; PEDRAZZINI e VITALE, 1996; GALILI et al., 1998). Transcritos de *BiP* de tabaco acumulam-se predominantemente em folhas e órgãos que contenham tecidos secretores e tecidos em desenvolvimento (DENECKE et al., 1991). Em soja, os membros da família do gene *BiP* estão sob regulação órgão-específica (CASCARDO et al., 2001), e a expressão dos genes *BiP* é determinada por eventos de desenvolvimento que estão associados à alta atividade secretória (KALINSKI et al., 1995; FONTES et al., 1996). Em estudos recentes, foi demonstrado que promotores de *BiP* de soja direcionaram altos níveis de expressão do gene *reportes GUS* em tecidos com alta atividade secretória, como tricoma de folha e tecidos vasculares (BUZELI et al., 2002). Ensaios histoquímicos de plantas transgênicas com o gene *GUS* também exibiram intensa coloração em tecidos com alta taxa de divisão celular, como meristemas apicais de raízes e brotos e regiões procambiais, além de regiões com alta atividade secretória, como células meristemáticas que se encontram associadas à biogênese da parede celular (BUZELI et al., 2002). Da mesma forma, em milho, arroz e endospermas de trigo (BOSTON et al., 1991; FONTES et al., 1991; MUENCH et al., 1997; DUPONT et al., 1998) e cotilédones de abóbora (HATANO et al., 1997), a síntese de *BiP* é coordenada com o início da síntese de proteínas de

reserva, demonstrando que a síntese de BiP nesses cultivares também é induzida por eventos de desenvolvimento associados à alta atividade secretória.

Promotores de *BiP* de plantas compartilham características estruturais conservadas com os promotores de *BiP* de mamíferos, contendo múltiplas cópias da sequência consenso CCAAT *box-like* flanqueadas com sequências ricas em CG. Estas são requeridas para alto nível de expressão basal e constituem unidades repetidas do elemento de resposta a estresse do RE (LEE, 2001). A análise de deleção do promotor usando sequências 5' flanqueadas do gene *BiP* de soja (*gsBiP6*) fusionado com o gene repórter da *GUS* permitiu a identificação de dois domínios funcionais cis-regulatórios, que são importantes para a ativação da expressão de *BiP* em condições normais de desenvolvimento da planta (BUZELI et al., 2002). O primeiro, designado domínio regulatório cis atuante 1, CRD1 (-358 to -211, de *gsBiP6*), corresponde a uma sequência *enhancer like* rica em AT que ativa a expressão mínima do promotor de BiP em todos os órgãos analisados. O segundo domínio, designado domínio ativador, CRD2 (-211 to -80), entretanto é requerido para atividade promotora de BiP em tecido meristemático e células do floema. Aparentemente, a sequência CDR2 também possui elementos negativos cis-atuantes, porque a remoção dessa região inibiu a repressão do promotor *gsBiP6* em filetes parenquemáticos do xilema (BUZELI et al., 2002).

A região CRD2 também é responsável pela ativação dos promotores de *BiP* de plantas em resposta a estresses no RE, uma vez que a sua remoção suprime a indução do gene repórter por tunicamicina (BUZELI et al., 2002). A região CRD2 contém sequências do tipo ERSE-I e ERSE-II, bem como vários elementos potencialmente cis-regulatórios encontrados em promotores de plantas, como sequências relacionadas a G-box e elementos de resposta à auxina (INGRAM e BARTELS, 1996; GUILFOYLE et al., 1998). A presença de supostos elementos cis-atuantes no domínio CRD2 dos promotores de *BiP* de plantas reforça o argumento de que eles possam agir como sítios múltiplos de ligação de transfatores que funcionam através de diferentes combinações, para conferir uma diversidade de padrões de desenvolvimento tecido-específicos e regulados por estresses.

2.2.3. Diferentes modelos de expressão da família dos genes *BiP* de soja

O genoma de diversas espécies de plantas como milho, tabaco, *Arabidopsis* e soja é representado por múltiplas cópias do gene *BiP* (DENECKE et al., 1991; KALINSKI et al., 1995; WROBEL et al., 1997; SUNG et al., 2001). A presença de múltiplas cópias do gene *BiP* nas diferentes espécies de plantas levanta a possibilidade de que esses genes exibam diferenças na regulação, função ou especificidade de substrato. Contudo, em milho, dois genes *BiP* isolados de uma biblioteca de cDNA de semente demonstraram padrão de expressão similar (WROBEL et al., 1997). Similarmente, foi observado que os três genes *BiP* de tabaco ou os dois genes *BiP* (*BiP-1* e *BiP-2*) de *Arabidopsis* são coordenadamente regulados (DENECKE et al., 1991; SUNG et al., 2001). Entretanto, as análises de expressão gênica realizadas não cobriram inteiramente a complexidade da família *BiP* de milho, tabaco ou *Arabidopsis thaliana*, o que levanta a possibilidade da existência de genes de *BiP* ainda não-caracterizados nessas espécies que exibem regulação diferenciada.

Em soja, tem sido demonstrado que a família de genes *BiP* exibe regulação órgão-específica (CASCARDO et al., 2001). De fato, os perfis de géis de eletroforese bidimensionais obtidos de formas de *BiP* de diferentes órgãos de soja mostraram-se muito distintos. Além disso, experimentos de RT-PCR utilizando *primers* gene-específico estabeleceram que três dos quatro genes de *BiP* de soja isolados (*soyBiPA*, *soyBiPB*, *soyBiPC* e *soyBiPD*) são diferentemente expressos em diferentes órgãos (KALINSKI et al., 1995; FIGUEIREDO et al., 1997; CASCARDO et al., 2001). Enquanto todos os quatro transcritos de *BiP* são detectados em folhas por RT-PCR, diferentes subconjuntos são detectados em outros órgãos. O *soyBiPD* é expresso em todos os órgãos, enquanto a expressão de *soyBiPB* é restrita às folhas. Os transcritos de *soyBiPA* são detectados em folhas, raízes e sementes, e o RNA de *soyBiPC* está confinado às folhas, sementes e vagens. A expressão diferencial da família de genes *BiP* de soja indica que a *BiP* de planta evoluiu por mecanismos regulatórios independentes, possivelmente para maximizar a expressão de *BiP* de acordo com

os requerimentos celulares ou em condições de estresse específicas, as quais são percebidas de forma diferenciada pelos diversos órgãos vegetais. Alternativamente, esses resultados podem estar correlacionados com funções ou especificidade de substrato dos membros da família *BiP* de soja (CASCARDO et al., 2001).

2.2.4. Diferentes vias de sinalização dos genes *BiP* de plantas

BiP de plantas responde a uma variedade de condições de estresses bióticos e abióticos, como estresse hídrico, infestação por fungos, ataque de insetos, estresse nutricional, aclimação a frio e elicitores de resposta planta – patógeno (ANDERSON et al., 1994; KALINSKI et al., 1995; FONTES et al., 1996; FIGUEIREDO et al., 1997; FONTES et al., 1999; PICOLI et al., 2001). Entretanto, em algumas espécies de plantas, determinadas condições de estresse e eventos nutricionais alteram o mRNA de *BiP* e o nível de proteínas em diferentes extensões, indicando que mecanismos pós-transcricionais também estejam envolvidos na regulação da síntese de *BiP* em plantas (ANDERSON et al., 1994; KALINSKI et al., 1995). Alternativa ou adicionalmente, essas discrepâncias entre o nível de mRNA de *BiP* e proteína podem refletir em expressão e regulação diferenciais das famílias de genes *BiP*, uma vez que o genoma de várias espécies vegetais é representado por múltiplos genes *BiP* (DENECKE et al., 1991; KALINSKI et al., 1995; WROBEL et al., 1997). Condizente com a primeira hipótese, a superexpressão constitutiva de genes *BiP* de tabaco em plantas transgênicas levaram a um significativo, mas não proporcional, aumento de mRNA de *BiP* e proteína (LEBORGNE-CASTEL et al., 1999; Fontes E. P. B. – comunicação pessoal). No entanto, a observação de que os membros da família de genes *BiP* de soja não são coordenadamente regulados direciona-se em favor da última hipótese (CASCARDO et al., 2000; 2001). Entretanto, ambas as alternativas sustentam a hipótese de que múltiplos e complexos mecanismos regulatórios estão envolvidos no controle da expressão de genes *BiP* de plantas.

Várias evidências indicam que a estimulação da expressão de *BiP* por estresse hídrico ou ataque de patógenos ocorre através de vias de sinalização distintas da UPR. Primeiramente, embora todas as formas de *BiP* de soja sejam positivamente reguladas por tunicamicina, somente um subconjunto das isoformas de *BiP* de soja é induzido por estresse osmótico em culturas celulares (CASCARDO et al., 2000). Da mesma forma, enquanto os níveis de mRNA de todos os quatro genes *soyBiP* são controlados por tunicamicina, somente o RNA de *soyBiPA* é positivamente regulado por estresse osmótico.

A ausência de indução dos subconjuntos *soyBiPC*, *soyBiPB* e *soyBiPD* em células tratadas com polietilenoglicol (PEG) evidencia que a via UPR e a via reguladora responsável pela resposta ao estresse hídrico são independentemente controladas. Segundo, a rápida indução de *BiP* por PEG apresenta uma cinética de indução mais lenta daquela observada com tunicamicina (CASCARDO et al., 2000). Similarmente, em folhas de tabaco a cinética de indução de *BiP* por tratamento com enzimas que degradam a parede celular (CDEs), à semelhança da observada no ataque de bactérias patogênicas, ocorre de forma rápida e distinta da UPR (JELITTO-VAN DOOREN et al., 1999).

A diferença na cinética de indução de *BiP* indica que diferentes componentes da via UPR estão envolvidos com a via de sinalização que regula a expressão de *BiP* no estresse osmótico e na resposta às CDEs.

Finalmente, o tratamento de suspensões celulares de soja com PEG e tunicamicina promoveu um efeito de sinergismo no nível de indução de *BiP* (CASCARDO et al., 2000). Similarmente, em protoplastos de tabaco a indução de *BiP* em resposta às CDEs e à UPR é aditiva (JELITTO-VAN DOOREN et al., 1999). Todos esses resultados suportam a suposição de que a regulação da expressão de *BiP* por estresses fisiológicos funciona por meio de vias distintas de transdução de sinais.

2.2.5. Diferentes estados da proteína BiP de soja durante estresses

Em células vegetais, existe um equilíbrio entre as formas fosforilada e não-fosforilada de BiP, e esse equilíbrio pode ser deslocado para qualquer direção em resposta a diferentes estímulos (CASCARDO et al., 2000). Em contraste com o tratamento com tunicamicina que promove defosforilação de BiP, a indução de *BiP* por estresse hídrico estimula a fosforilação de *BiP* em culturas de células e de folhas de soja submetidas a estresse (CASCARDO et al., 2000), porém ambos os tratamentos causam a conversão da forma oligomérica de BiP para a forma monomérica (CAROLINO e FONTES, 2001). Em células de mamíferos, a modificação de BiP por fosforilação é associada com a sua oligomerização (FREIDEN et al., 1992). Conseqüentemente, a modificação da proteína de BiP em plantas em resposta ao estresse hídrico difere do padrão normal de modificações pós-traducionais de outras BiPs eucarióticas. Uma provável explicação para essa diferença é a de que a fosforilação de BiP de soja induzida por estresse osmótico controla uma função regulatória distinta, e, desde que não seja restrita à forma oligomérica de BiP, deve ocorrer em diferentes sítios. Entretanto, é necessário determinar os sítios de fosforilação de BiP constitutiva e induzida por PEG para validar essa interpretação.

Em células animais, BiP induzida por tunicamicina ou ligada a proteínas nascentes não é modificada, e acredita-se que a forma não-fosforilada seja aquela biologicamente ativa na via de dobramento (CARLSSON e LAZARIDES, 1983; HENDERSHOT et al., 1988; FREIDEN et al., 1992). Apesar dos seus estados fosforilados, as isoformas de BiP de soja obtidas a partir de folhas submetidas a estresse hídrico exibem atividade de ligação a proteínas e associam-se com um polipeptídio de 28 kDa induzido por estresse (CASCARDO et al., 2000). Evidências indicam que a associação entre BiP e o peptídio de 28 kDa induzido por estresse hídrico não é um artefato *in vitro* e pode ser biologicamente relevante. Primeiro, o peptídio de 28 kDa foi localizado em membranas microssomais compostas primariamente de vesículas derivadas do RE, Golgi e tonoplasto. Como uma proteína secretória, acredita-se que o peptídio de 28 kDa

localiza-se transientemente com BiP, durante sua entrada no RE. Segundo, o complexo formado entre BiP e o peptídeo de 28 kDa foi sensível a ATP, uma propriedade das interações mediadas por chaperones. Dessa forma, a fosforilação de BiP por estresse osmótico não pode ser atribuída simplesmente à inativação das isoformas de BiP. Estas observações indicam que a regulação funcional de BiP de plantas pode diferir de outros BiPs eucarióticos.

2.2.6. Propriedades protetoras de BiP de plantas contra estresses abióticos

Uma vez demonstrado que as proteínas induzidas pela UPR agem como chaperones, acredita-se que elas funcionem como um mecanismo protetor do RE contra o dobramento e agregação errôneas de proteínas. De fato, a superexpressão de BiP em culturas de células de mamíferos (MORRIS et al., 1997) e protoplastos de tabaco (LEBORGNE-CASTEL et al., 1999) previne a ativação da via UPR e aumenta a tolerância das células a estresses, indicando que BiP alivia estresses sobre o RE. Além disso, a transfecção de células cultivadas de mamíferos com construções de mRNA anti-senso de BiP suprimiu a indução de BiP sem alterar os níveis basais de BiP. Essas células também apresentaram aumento na sensibilidade a ionóforos (LI e LEE, 1991; LI et al., 1992), estresse oxidativo (GOMER et al., 1991) e toxicidade mediada por células (SUGAWARA et al., 1993).

O papel protetor de BiP de plantas contra estresses abióticos também foi examinado em nível da planta como um todo (ALVIM et al., 2001). O efeito da superexpressão de BiP em uma resposta típica de estresse do RE tem sido investigado usando um ensaio de germinação na presença de tunicamicina, um potente ativador da via UPR. Nesse ensaio, sementes são germinadas em presença de tunicamicina e, em seguida, transferidas para um meio isento do antibiótico. O fenótipo tolerância à tunicamicina é interpretado como a capacidade da semente em recuperar-se e germinar. Sementes transgênicas de tabaco expressando o gene *BiP* de soja recuperaram-se depois da remoção de tunicamicina, enquanto aquelas sem o gene não germinam e eventualmente

morrem (ALVIM et al., 2001). Como em células de mamíferos, tem sido demonstrado que a proteção mediada por BiP contra estressores de RE em plantas é devida à restauração da capacidade de síntese de proteínas em condições de estresse (MORRIS et al., 1997; LAITUSIS et al., 1999; LEBORGNE-CASTEL et al., 1999; ALVIM et al., 2001).

Além de aliviar o estresse do RE, tem sido demonstrado que a superexpressão de BiP de plantas também aumenta a tolerância de plantas ao déficit hídrico (FIGUEIREDO et al., 1997; CASCARDO et al., 2000; ALVIM et al., 2001). Embora o mecanismo de tolerância ao estresse hídrico mediado por BiP ainda esteja para ser elucidado, o estímulo das defesas antioxidantes por estresse hídrico não foi observado em folhas secas de plantas de tabaco transgênicas *senso*, evidenciando que a superexpressão de *BiP* em plantas pode evitar estresse oxidativo endógeno (ALVIM et al., 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

3.1. Extração de proteínas

As plantas de *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana utilizadas correspondiam à quarta geração (T4) daquelas transformadas obtidas por ALVIM (2001). Os extratos de proteína total foram conseguidos empregando-se a técnica de extração de GÖRG et al. (1988) adaptada. Plântulas da análise da segregação do transgene *nptII*, discos foliares provenientes dos experimentos de avaliação do transgene *BiP* como agente de seleção para transformação de plantas e folhas completamente desenvolvidas oriundas dos experimentos de tolerância a estresse hídrico e estresse a frio constituem o material vegetal utilizado.

O material vegetal foi macerado em almofariz na presença de nitrogênio líquido, e ao macerado foi adicionada uma solução de ácido tricloro-acético (TCA) 10% (p/v) em acetona contendo 0,07% de β -mercaptoetanol. A mistura resultante foi transferida para microtubos e incubada por 1 h a -20°C , para precipitação das proteínas totais. Após a centrifugação a 20.000 g por 15

minutos, o precipitado foi lavado três a quatro vezes com solução de acetona contendo 0,07% de β -mercaptoetanol. Em seguida, o precipitado foi secado sob vácuo e ressuspensão com e auxílio de ultra-sonicação, em tampão de lise ([Tris-HCl 50 mM pH 7,5, SDS 1% (p/v), EDTA 25 mM]). Os restos celulares foram removidos por meio de centrifugação a 20.000 *g* por 20 minutos e o extrato protéico obtido, armazenado a 4 °C.

3.2. Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas totais dos extratos obtidos de plântulas, discos foliares e folhas completamente desenvolvidas de plantas transgênicas de tabaco foi determinada pelo método de BRADFORD (1976). A integridade dos extratos protéicos foi avaliada por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970).

3.3. Análise da segregação das plantas transformadas em meio com canamicina

As sementes de *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana empregadas eram da quarta geração (T4) das plantas transformadas obtidas por ALVIM (2001). Foram desinfestadas e colocadas para germinar em placas de Petri contendo meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) sólido com canamicina 150 mg.L⁻¹.

As linhagens BiPS7.2, BiPS5.1, BiPS1.1, BiPAS3.2, BiPAS9.1 e BiPAS6.1 foram as utilizadas nas análises. Na nomenclatura adotada para definir as linhagens transgênicas, S refere-se às plantas transformadas com a construção senso e AS, às transformadas com a construção anti-senso. O primeiro número refere-se a eventos de transformação independentes e o que se segue, a plantas individuais.

A razão da segregação das linhagens foi determinada pela expressão do gene *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina. A segregação do loco T-DNA foi obtida pela frequência de plântulas resistentes ao antibiótico após a autofecundação. A razão da segregação encontrada foi confirmada pelo

teste χ^2 com 50% de significância, como descrito por DEROL e GARDNER (1988).

3.4. Análise molecular das plantas transgênicas

A presença dos transgenes *nptII* e *BiP* foi analisada por PCR de amostras de folhas de plantas transgênicas crescidas em casa de vegetação. PCR foi conduzido com 20 ng de DNA genômico, usando-se 1,5 μ M de oligonucleotídios específicos para o gene *nptII* ou gene *soyBiPD* (Gene Bank, número de acesso AF031241) e 1 U de Taq polimerase em um volume final de 25 μ l. Os oligonucleotídios específicos para BiP de soja foram 5'atctggaggagccctaggcggtgg3' (coordenadas 1966 a 1990) e 5'cttgaagaagcttcgtcgtaaactaag3' (posições 2157 a 2184). Os oligonucleotídios específicos para o gene *nptII* foram 5'tcgacgttgtcactgaagcgcg 3' (posições 627 a 648) e 5'gcggtcagcccattcgccgcc 3' (coordenadas 1082 a 1102). As reações foram conduzidas por 30 ciclos (50 s a 94 °C, 75 s a 47 °C e 120 s a 72 °C), com uma extensão final a 72 °C por 10 min.

3.5. Análise da expressão do transgene

A expressão da proteína BiP em plantas transgênicas foi avaliada por meio de *immunoblottings*, conforme descrito por ALVIM et al. (2001). Resumidamente, as proteínas totais extraídas de folhas de plantas controles, plantas senso e plantas anti-senso foram fracionadas em géis de poliacrilamida 10% contendo SDS (LAEMMLI, 1970). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento TRANSBLOT da BIORAD. A membrana foi bloqueada com BSA 3% (p/v) em TBS-T (Tris HCl 100 Mm pH 8,0, NaCl 159 mM e Tween-20 0,05% (v/v)). As membranas foram, então, lavadas em solução de TBS-T e sondadas com o anticorpo preparado contra a proteína BiP recombinante expressa em *E. coli* (BUZELI et al., 2002).

3.6. Análise da tolerância a estresse hídrico mediado por BiP

3.6.1. Indução de estresse hídrico

Para indução de estresse hídrico, plantas transgênicas senso (35S-BiPS), antisenso (35S-BiPAS) e controle (transformadas apenas com o vetor binário pBI121) foram transplantadas individualmente para vasos após quatro semanas de germinação e transferidas para câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 h dia/12 h noite, temperatura de 25 °C, irradiância de 440 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e umidade relativa de 60%. Depois da determinação da capacidade de retenção de água pelo solo, determinou-se, através da capacidade de campo desse solo, que cada planta receberia um volume de 20 mL de água. Após 60 dias de crescimento recebendo suprimento normal de água, as condições de seca foram induzidas nas plântulas controle, senso e anti-senso pela suspensão gradativa de irrigação até a suspensão completa do suprimento de água. Quatro grupos de 80 plantas tiveram os suprimentos de água diários reduzidos a 95, 85, 75 e 65% do volume inicial (20 mL) no primeiro dia, com sucessivas diminuições de 10% diariamente até a interrupção total da irrigação. Como controle do experimento de estresse hídrico, amostras de todos os tratamentos receberam suprimento normal de água durante todo o período experimental.

3.6.2. Cinética de indução de BiP em resposta ao estresse hídrico

A indução de BiP em resposta ao déficit hídrico foi avaliada em folhas de plantas senso, anti-senso e controle em períodos sucessivos, durante a indução do estresse. Este experimento teve como objetivo avaliar a intensidade do estresse hídrico por meio de “immunoblottings”, usando-se anticorpos específicos para a proteína BiP.

3.7. Análise do potencial de BiP como gene de seleção em sistemas de transformação de plantas

Este experimento foi delineado de forma a explorar a capacidade do gene BiP endógeno de plantas em conferir às plantas transformadas tolerância à tunicamicina. Para isso, o processo de regeneração de planta de tabaco transformada via *Agrobacterium tumefaciens* foi conduzido em meio seletivo, meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) contendo concentrações crescentes de tunicamicina (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 5,0; e 10,0 µg/mL). Discos foliares obtidos de plantas transformadas foram incubados com tunicamicina, num primeiro experimento, por um período de 45 dias e, num segundo, por 48 horas. Após o período de incubação, os explantes transformados com o gene BiP, sob o controle do promotor 35S de CaMV e sinais de poliadenilação do gene *nos* (nopaline sintase), foram transferidos para o meio MS com concentrações decrescentes de tunicamicina, quando se avaliou a capacidade de recuperação do efeito tóxico de tunicamicina pela eficiência de regeneração dos transformantes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Obtenção e análise de linhagens transgênicas em homozigose expressando o gene *BiP* de soja nas orientações senso ou anti-senso

Plantas de *Nicotiana tabacum* foram transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* com o cDNA do gene *BiP*, nas orientações senso e anti-senso, sob o controle do promotor CaMV e o sinal de poliadenilação 3' do gene da nopalina sintetase (*nos*) (Figura 1). Os transformantes primários (T0) foram selecionados *in vitro* em função da resistência à canamicina e, posteriormente, tiveram a incorporação do gene *nptII* testada por meio de PCR e *Southern blots* (ALVIM et al., 2001). Várias linhagens transgênicas independentes senso e anti-senso foram estabelecidas em cultura de tecidos, transferidas para o solo e mantidas em casa de vegetação até a produção de sementes (sementes T1). O número de cópias dos transgenes nas plantas transformadas foi confirmado por análise da segregação do gene *nptII* na progênie de T0 (plantas T1) (ALVIM, 2000). Os resultados dessa análise permitiram a seleção de três linhagens transgênicas senso (T1-35S-BiPS1, T1-35S-BiPS5 e T1-35S-BiPS7) e três linhagens transgênicas anti-senso (T1-35S-BiPAS3, T1-35S-BiPAS6 e T1-35S-BiPAS9), com a razão da segregação mendeliana de 3:1 confirmada por meio do teste χ^2 a 5% de significância.

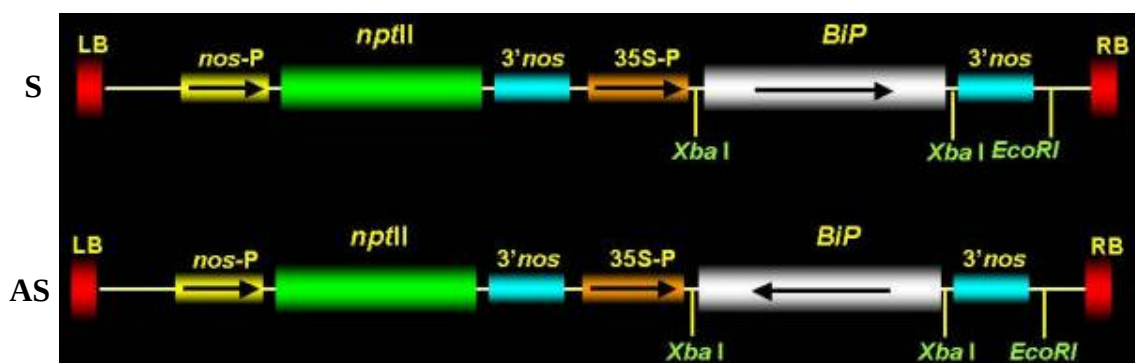


Figura 1 – Construções quiméricas de BiP usadas para a transformação de *Nicotiana tabacum*. O gene *BiP* da soja nas orientações senso (S) e anti-senso (AS) está sob o controle do promotor constitutivo CAMV35S (35S-P) e do sinal de poliadenilação 3'nos (3'nos). LB e RB correspondem às bordas esquerda e direita do T-DNA, respectivamente. A posição de alguns sítios de enzimas de restrição está indicada.

Para determinar se a expressão do transgene BiP da soja permaneceu estável nas gerações subseqüentes e obter linhagens homozigotas dominantes, algumas sementes T2 das progênes T1 selecionadas foram germinadas *in vitro*, na presença de canamicina. Uma vez que apenas cinco plantas de cada linhagem foram analisadas, não foi possível identificar homozigose para o loco T-DNA (dados não mostrados). O Quadro 1 ilustra a segregação de plantas individuais T2 que foram transferidas para casa de vegetação para obtenção das sementes T3. Enquanto a razão de segregação 3:1 foi confirmada nas progênes das linhagens senso analisadas, a encontrada nas progênes das linhagens anti-senso não foi coerente com aquela observada (3:1) na geração T1.

Análise de segregação do loco T-DNA baseado em análise da frequência de plântulas resistentes à canamicina tem sido empregada como um meio eficiente para determinar o número de cópias incorporadas de transgenes ligados ao gene *nptII* (PEDRA et al., 2000; WEIGEL, 2000; HONDA, 2002). Entretanto, diversos fatores podem contribuir para interpretações incorretas na razão de segregação, como ocorrência de fecundação cruzada, mutações por inserção em genes envolvidos na via de biossíntese de clorofila ou com o fenótipo GUN

Quadro 1 – Caracterização de sementes T2 de tabaco transformadas com as construções 35S-CaMV-BiPS e 35S-CaMV-BiPAS, com base na resistência à canamicina, conforme descrito por DEROL e GARDNER (1988)

Linhagem	Resistência à Canamicina Resistente/Suscetível	Razão Observada	χ^2	Razão Analisada
T2-35S-BiPS1.1	516/165	3,12	0,22	3:1
T2-35S-BiPS5.1	330/103	3,20	0,34	3:1
T2-35S-BiPS 7.2	592/220	2,69	1,88	3:1
T2-35S-BiPAS 3.2	355/198	1,79*	---	---
T2-35S-BiPAS 6.1	781/120	6,5*	---	---
T2-35S-BiPAS 9.1	396/248	1,6*	---	---

Observação: as plantas foram analisadas na razão 3:1 (Can^r:Can^s), usando-se o teste do χ^2 .

* Não houve segregação mendeliana.

(*genome uncoupled*), poder diferenciado de germinação das sementes e silenciamento do gene *nptII* em gerações subseqüentes. De fato, uma alta freqüência de silenciamento do gene *nptII* em gerações subseqüentes tem sido observada em *Arabidopsis thaliana* transformada, de forma que a análise de segregação de mutações por inserção tem sido conduzida por genotipagem de mutantes (TAIR, www.arabidopsis.com). No entanto, no caso dos transformantes de tabaco descritos nesta investigação, a análise de segregação por genotipagem não foi possível por falta de marcadores moleculares específicos para o loco onde ocorreu a inserção. Assim, a análise de segregação das progênies da geração T2 foi também conduzida por meio da análise de freqüência do fenótipo de resistência à canamicina.

As sementes T3 provenientes das plantas T2 selecionadas (Quadro 1) foram plaqueadas em meio MS com 150 mg.L⁻¹ de canamicina, para análise de segregação do gene *nptII* na quarta geração, plantas T3 (Figura 2). Na presença da canamicina, a ausência do gene *nptII* causa clorose nas plântulas (controle),

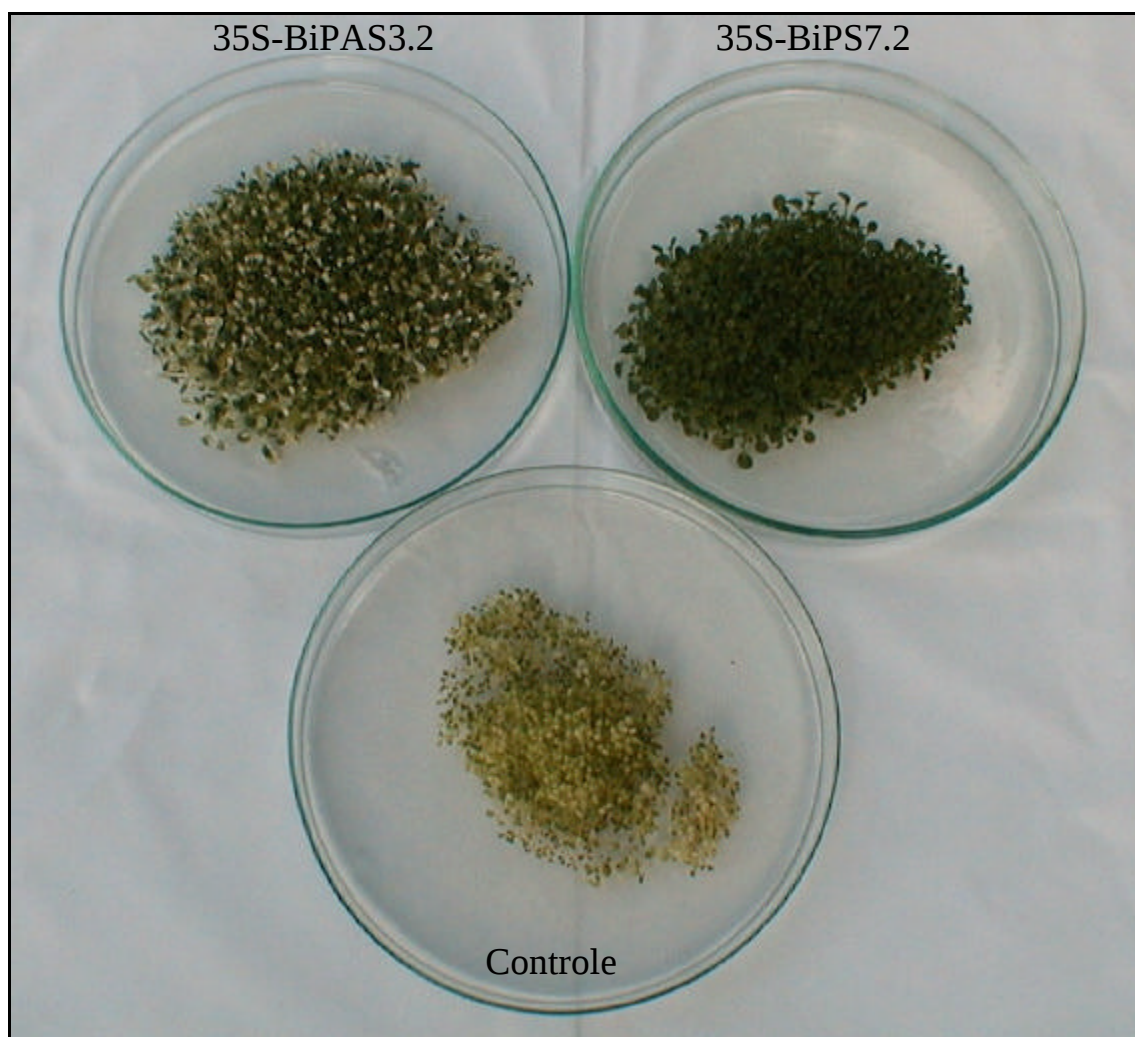


Figura 2 – Fenótipo de resistência à canamicina das sementes de tabaco transgênico. As sementes controle e a terceira geração de sementes senso (T3-35S-BiPS7.2-XI) e anti-senso (T3-35S-BiPAS3.2-IX) foram germinadas em meio MS sólido suplementado com 150 mg.mL^{-1} de canamicina por um mês.

enquanto a resistência à canamicina, conferida pela presença do gene *nptII* (em heterozigose ou homozigose), resulta em plantas com fenótipo normal verde. A frequência dos fenótipos plântulas verdes e plântulas cloróticas permitiu a identificação de plantas T2 em heterozigose (T3-35S-BiPAS3.2-IX) com pelo menos uma cópia transgênica em homozigose (T3-35S-BiPS7.2-XI e 100% de plântulas verdes).

Essas análises de segregação foram realizadas nas linhagens T3-35S-BiPS7.2, T3-35S-BiPS5.1, T3-35S-BiPS1.1, T3-35S-BiPAS3.2, T3-35S-BiPAS6.1 e T3-35S-BiPAS9.1 (Quadro 2). As plantas individuais da linhagem T3-35S-BiPS7.2 em homozigose (I, II, IV, V, VI, VII, IX, XI, XII e XV) e alguns exemplares da linhagem T3-35S-BiPAS3.2 com pelo menos um loco T-DNA em homozigose (III, XIII e XV) foram escolhidas para análises adicionais moleculares e fenotípicas resultantes da expressão do transgene *BiP*.

4.2. Alto nível constitutivo de acúmulo de BiP na linhagem T3-35S-BiPS7.2

Os resultados da análise de segregação foram baseados na expressão do transgene *nptII*, ressaltando-se que, em alguns transformantes independentes como as plantas anti-senso, o número de cópias inseridas, determinado pela análise de segregação nas progênes dos transformantes primários, não foi confirmado nas gerações subseqüentes. Além disso, embora o silenciamento do transgene *BiP* nas gerações T2 e T3 não seja provável de ocorrer devido ao caráter letal de *BiP*, a presença de várias cópias do gene *BiP* no genoma de tabaco possibilita o silenciamento diferenciado de cópias gênicas mais conservadas em seqüência. Assim, os níveis de BiP foram avaliados por *immunoblottings* em todas as linhagens selecionadas. Em condições normais, os níveis de expressão da proteína BiP observados nas plantas transgênicas senso da geração T4 (T3-35S-BiPS 7.2) em homozigose (Figura 3, linhas 2 a 13) foram maiores do que nas plantas controle (Figura 3, linha 1).

Quadro 2 – Análise de segregação do caráter resistência à canamicina das sementes de *Nicotiana tabacum* transformadas com as construções 35S-BiPS e 35S-BiPAS

Linhagem	Plantas Analisadas	Resistência à Canamicina (Resistentes/Suscetíveis)	Razão Observada	χ^2	Razão Testada
T3-35SBIPS 1.1	I, II, VII, VIII,X	100%/ 0%	---	---	---
	V	280/40	7*	---	---
	VI	190/30	6.3*	---	---
	IX	520/80	6.5*	---	---
T3-35SBIPS 5.1	II	130/110	1.2*	---	---
	V	150/110	1.4*	---	---
	VII	120/90	1.3*	---	---
	IX	200/120	1.7*	---	---
T3-35SBIPS 7.2	I, II, IV, V, VI, VII, IX, XI, XII, XV	100%/ 0%	---	---	---
T3-35SBIPAS 3.2	III, XIII,XV	100%/ 0%	---	---	---
	VI	550/ 30	18.3	1,15	15:1
	IX	210/60	3.5	1,11	3:1
	XIV	230/50	4.6	---	---
T3-35SBIPAS 6.1	I	390/140	2.8	0,56	3:1
	II	420/90	4.7	---	---
	III	280/30	9.3*	---	---
	IV	390/45	8.7*	---	---
	VII	350/30	11.7*	---	---
	X	270/25	10.8*	---	---
	XI	420/170	2.5	---	---
	VII	460/150	3.1	0,05	3:1
T3-35SBIPAS 9.1	X, XII, XIII	100%/ 0%	---	---	---
	VIII	530/40	13.3	0,573	15:1
	XI	820/16	51.3*	---	---
Controle ¹		0/620			
Controle ²		280/85	3,3	0,57	15:1

¹ Plantas controle.

² Plantas transformadas com o vetor pBI121.

* Não houve segregação de acordo com as proporções mendelianas.

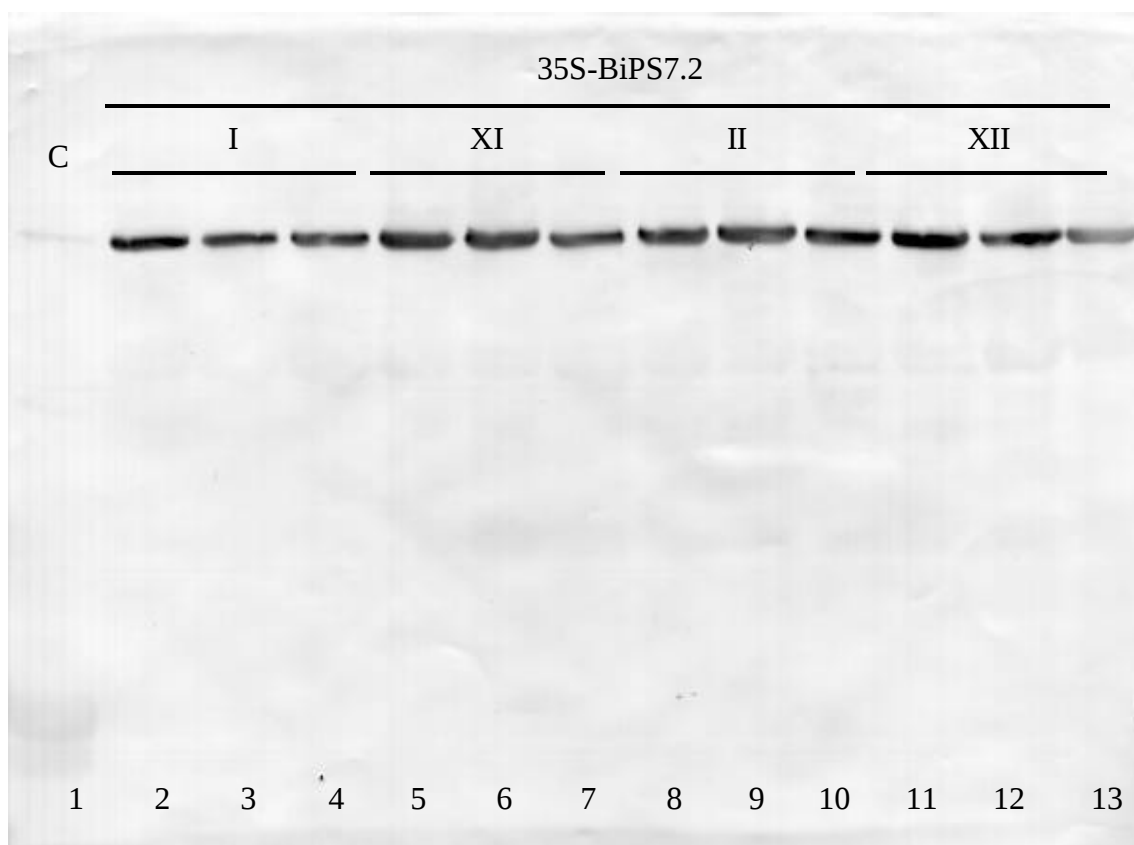


Figura 3 – Níveis de expressão de BiP em plantas transgênicas senso de *Nicotiana tabacum*. Quantidades equivalentes de proteína total (30 µg) extraídas de folhas de tabacos transgênicos senso da quarta geração da linhagem T3-35S-BiPS7.2 das plantas I, XI, II, XII; e das controle (C) foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas com anticorpo contra BiP de soja.

Esses resultados indicam que as plantas transgênicas homozigotas selecionadas mantiveram a superexpressão do transgene *BiP* até a quarta geração avaliada (plantas T3). Entretanto, o nível de BiP presente nas plantas transgênicas anti-senso, linhagem T3-35S-BiPAS3.2, apresentando pelo menos um loco T-DNA inserido em homozigose (Figura 4, linhas 9, 10 e 11), foi similar ao das plantas controle (Figura 4, linha 1).

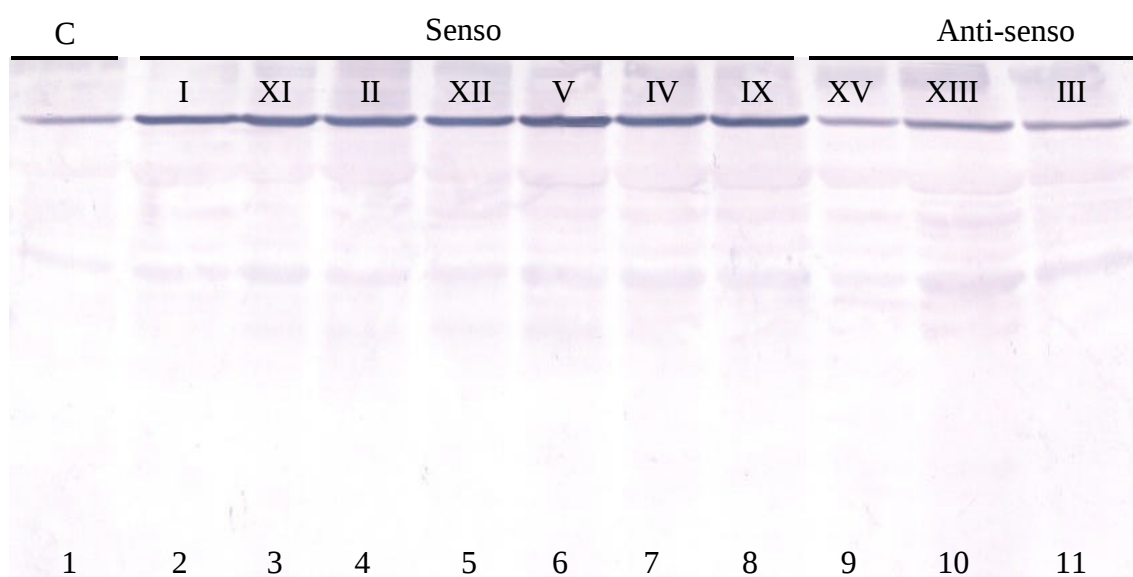


Figura 4 – Níveis de expressão de BiP em plantas transgênicas T3 senso e anti-senso de *Nicotiana tabacum*. Quantidades equivalentes de proteína total (30 µg) extraídas de folhas de tabacos transgênicos senso da quarta geração da linhagem T3-35S-BiPS7.2 das plantas I, XI, II, XII, V, IV e IX; de tabacos transgênicos anti-senso da quarta geração da linhagem T3-35S-BiPAS3.2 das plantas XV, XIII e III; e das controle (C) foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas com anticorpo contra BiP de soja.

O caráter vital do gene *BiP* impede que seja obtida a inibição completa da expressão dos genes endógenos que codificam BiP (LI et al., 1992; SIMONS et al., 1998; LEBOURGE-CASTEL et al., 1999). É possível que durante o processo de regeneração dos transformantes primários anti-senso tenha ocorrido uma

seleção natural de transformantes com baixa expressão do gene anti-senso, uma vez que a inibição em níveis mais elevados inviabiliza a sobrevivência celular. De fato, a inibição completa da expressão de KAR2/BiP em leveduras provoca a morte celular, evidenciando que esse chaperone molecular é essencial para a viabilidade da célula (ROSE et al., 1989). Além disso, tem sido demonstrado que os genes *BiP* são auto-regulados pelos níveis de BiP no RE por meio da via UPR (ALVIM, 2000; LEBOURGE-CASTEL et al., 1999).

Mecanismos que monitoram o nível de BiP no RE, aumentando a transcrição desse chaperone molecular quando a sua concentração se encontra em níveis abaixo do normal, têm sido descritos em mamíferos e leveduras (BREWER et al., 1997; MA e HENDERSHOT, 2003). A falta de co-regulação entre o promotor 35S da construção anti-senso e o promotor endógeno dos genes *BiP* regulado pela via UPR e o caráter essencial de *BiP* em plantas podem explicar o nível normal da proteína nas plantas anti-senso.

Evidências suportam a hipótese de que BiP desempenha papel-chave na via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR) não apenas como chaperone, mas também como sensor de estresse do RE (MORRIS et al., 1997), sendo positivamente regulada pela via UPR (PATIL e WALTER, 2001). Como sensor de estresses no RE, os níveis de BiP são críticos para indução da UPR. De fato, em células de mamíferos, foi demonstrado que a expressão de BiP é também controlada em nível traducional (GÜLOW et al., 2002). Em condições normais, a eficiência de tradução do mRNA de BiP é inibida, enquanto em condições de estresses típicos do RE essa inibição traducional é aliviada, permitindo a síntese de elevados níveis de BiP.

Essas observações suportam o argumento de que a superexpressão de *BiP* em condições normais de desenvolvimento da planta pode desencadear um controle em nível da tradução protéica. Consistente com tal hipótese tem sido demonstrado que, nas suspensões celulares provenientes das linhagens senso, o nível do mRNA de BiP é desproporcionalmente superior ao acúmulo da proteína, indicando que a superexpressão de BiP desencadeia alguma regulação negativa em nível de tradução ou que o *turnover* da proteína BiP, nessas condições, é maior (ALVIM et al., 2000). Uma acentuada discrepância entre o nível do

mRNA e o da proteína BiP foi também observada em plantas de tabaco transgênicas e leveduras superexpressando uma isoforma de *BiP* de tabaco (DENECKE et al., 1991; LEBORGNE-CASTEL et al., 1999). Em ambos os trabalhos foram observados produtos de degradação de BiP, evidenciando a existência de uma regulação pós-traducional.

Em concordância com essas observações prévias, nas plantas senso homozigotas, geração T3, que expressavam os níveis mais elevados de BiP, observou-se a existência de produtos de degradação, o que suporta uma correlação entre o aumento da expressão de *BiP* e o maior *turnover* dessa proteína. Tais resultados também indicam que provavelmente, nas linhagens senso homozigotas, geração T4, os níveis de BiP atingiram um patamar máximo, em condições normais de desenvolvimento da planta.

4.3. Correlação entre os níveis de BiP e tolerância ao estresse hídrico

A síntese de BiP de planta é induzida por uma gama de estresses ambientais, incluindo o estresse hídrico (FIGUEIREDO et al., 1997; CASCARDO et al., 2000; CASCARDO et al., 2001). Previamente foi demonstrado que a superexpressão constitutiva do gene BiP conferia a plantas transgênicas de *N. tabacum* tolerância a estresse hídrico (ALVIM et al., 2001). Entretanto, esses experimentos foram realizados com os transformantes primários (T0).

Com a finalidade de avaliar se o caráter tolerância a estresse hídrico era transmissível para as progênies subseqüentes e dependente de dosagem gênica do transgene *BiP*, as plantas T3 homozigotas para o loco T-DNA foram submetidas a déficit hídrico e a respostas dos tabacos transgênicos senso e anti-senso, avaliadas. Em todos os tratamentos, independentemente da severidade do estresse hídrico aplicado (Figuras 5, 6, 7, 8), as linhagens senso (T3-35SBiPS7.2-IX) exibiram o fenótipo típico de tolerância a estresse hídrico, mantendo o nível de turgescência foliar superior ao das plantas controle e das linhagens anti-senso. Esse fenótipo foi similar àquele descrito para os transformantes primários senso (ALVIM et al., 2001).

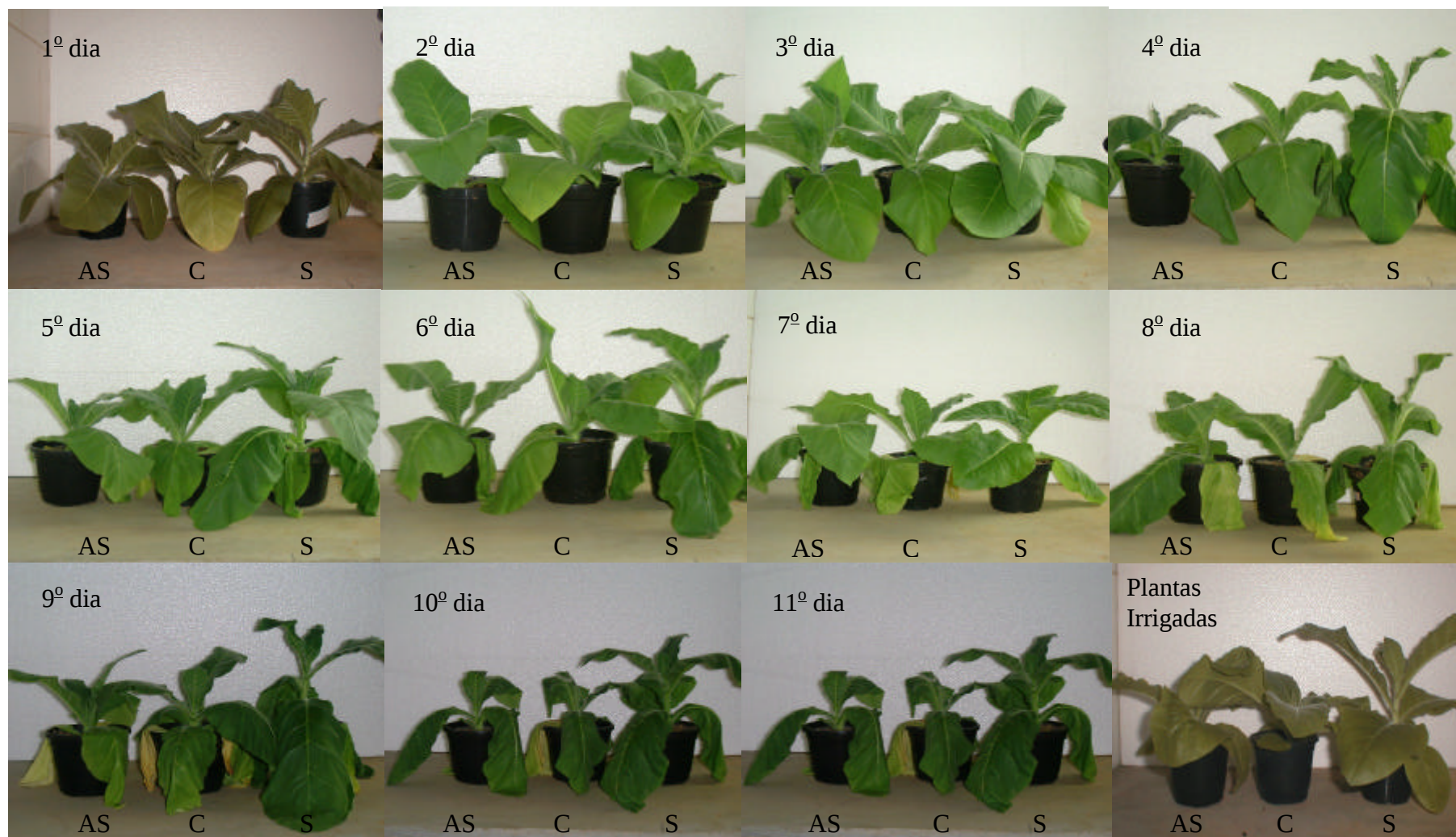


Figura 5 – Fenótipo de linhagens senso e anti-senso submetidas ao estresse hídrico gradual com redução inicial de 5% do suprimento de água. As condições de estresse hídrico foram estabelecidas progressivamente pela diminuição inicial de 5% do suprimento de água (dia 1), seguida por reduções sucessivas de 10% até a suspensão total do suprimento de água no 11º dia.

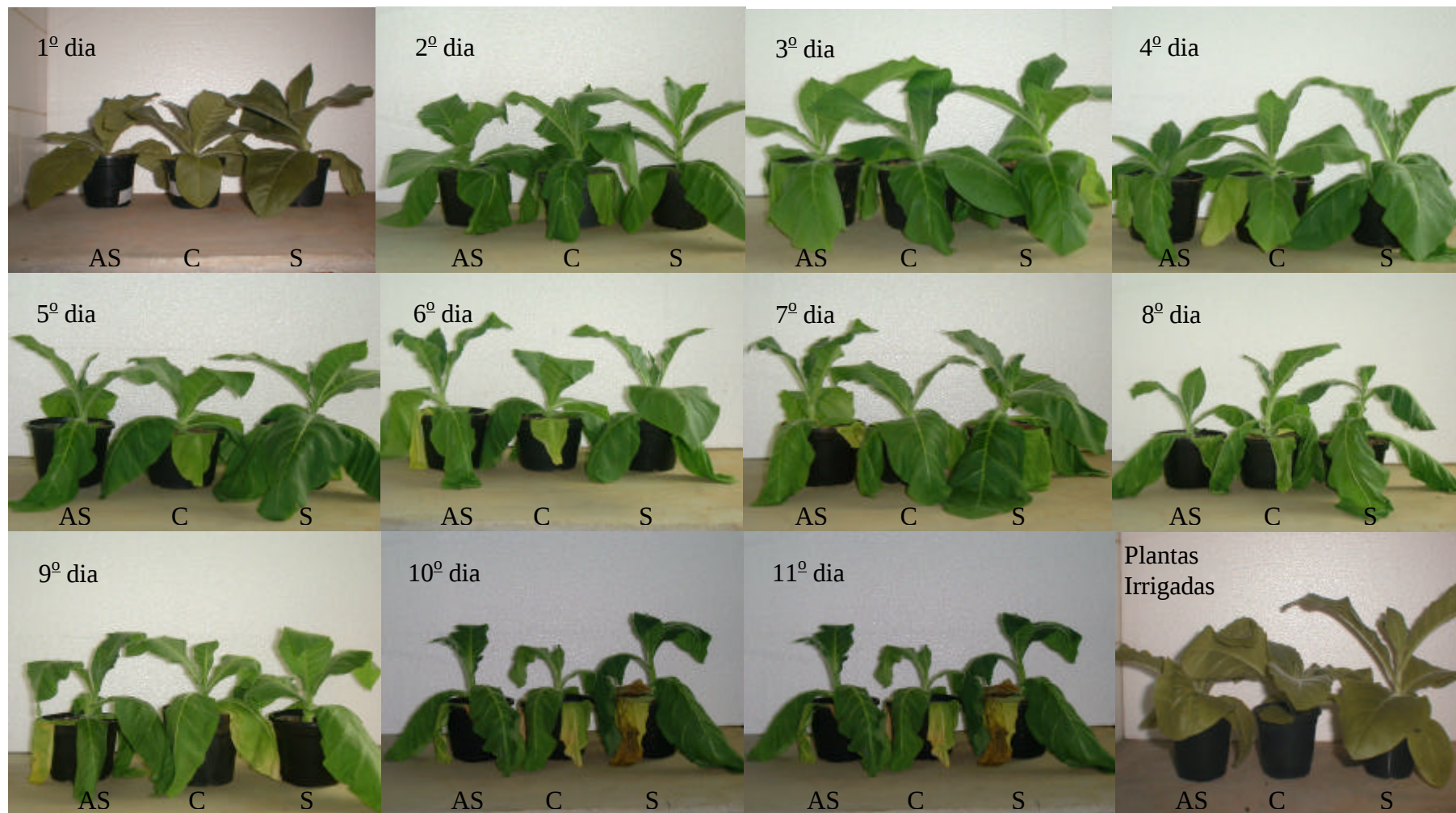


Figura 6 – Fenótipo de linhagens senso e anti-senso submetidas ao estresse hídrico gradual com redução inicial de 15% do suprimento de água. As condições de estresse hídrico foram estabelecidas progressivamente pela diminuição inicial de 15% do suprimento de água (dia 1), seguida por reduções sucessivas de 10% até a suspensão total do suprimento de água no 11º dia.

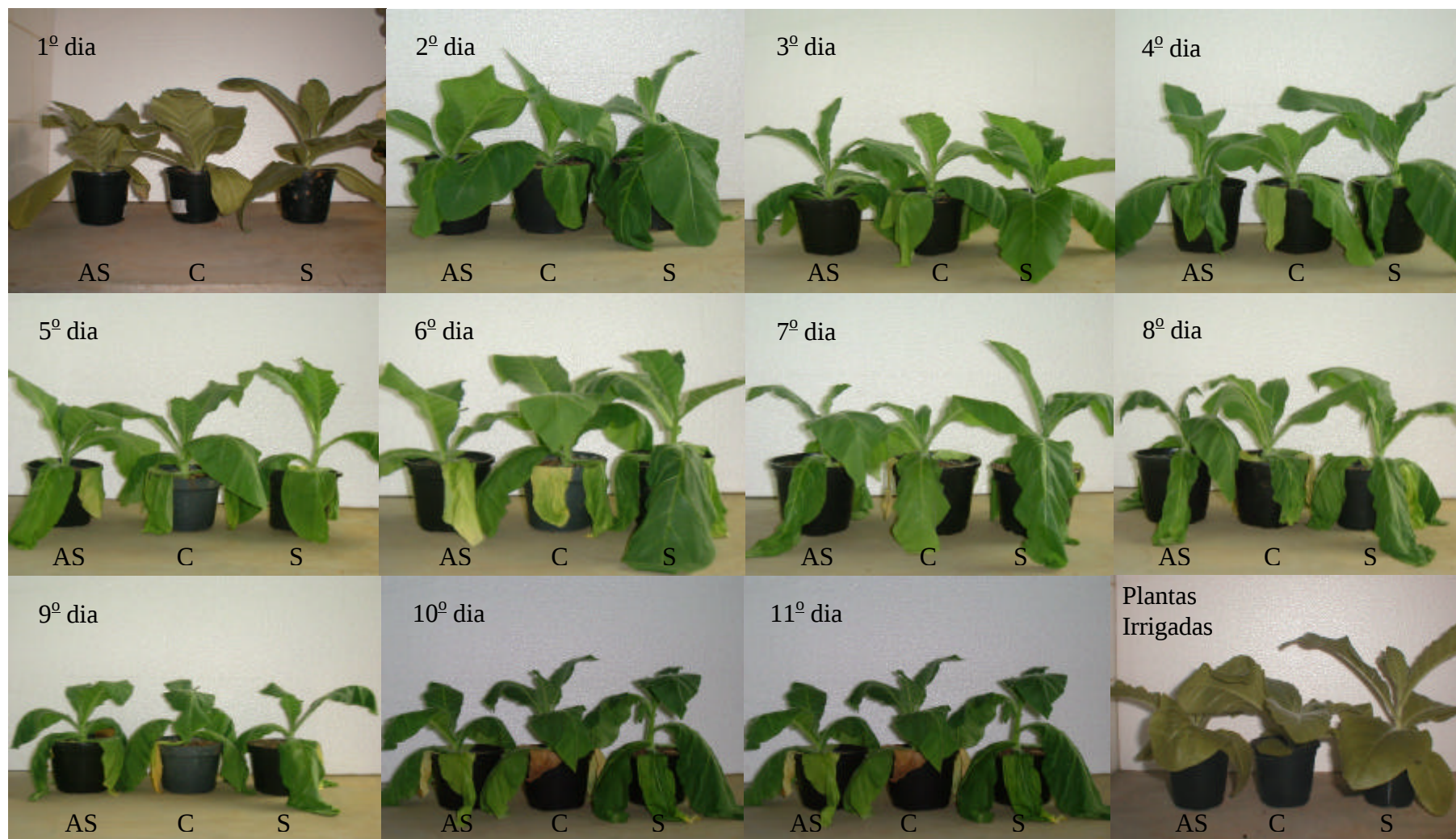


Figura 7 – Fenótipo de linhagens senso e anti-senso submetidas ao estresse hídrico gradual com redução inicial de 25% do suprimento de água. As condições de estresse hídrico foram estabelecidas progressivamente pela diminuição inicial de 25% do suprimento de água (dia 1), seguida por reduções sucessivas de 10% até a suspensão total do suprimento de água no 11º dia.

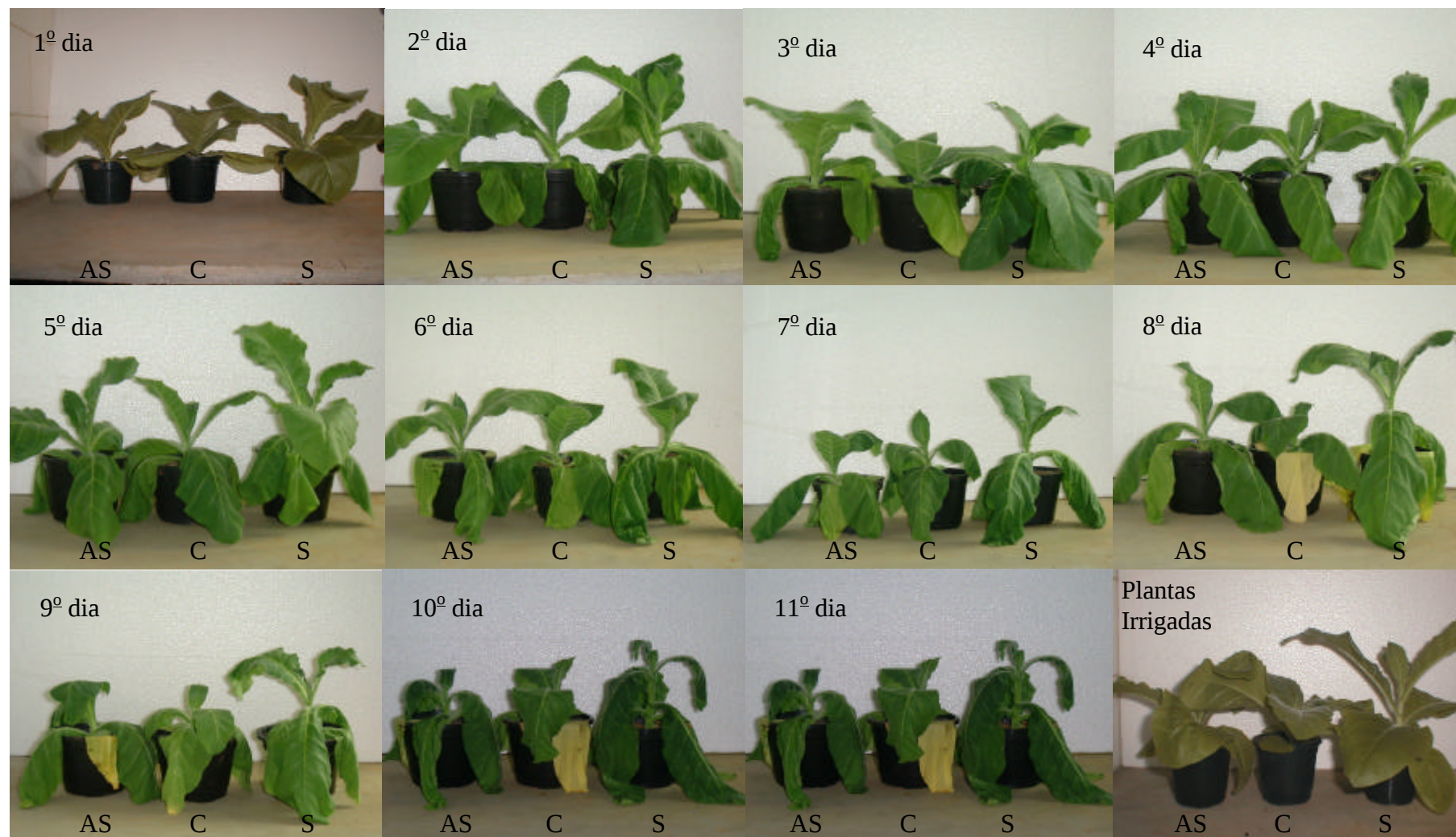


Figura 8 – Fenótipo de linhagens senso e anti-senso submetidas ao estresse hídrico gradual com redução inicial de 35% do suprimento de água. As condições de estresse hídrico foram estabelecidas progressivamente pela diminuição inicial de 35% do suprimento de água (dia 1), seguida por reduções sucessivas de 10% até a suspensão total do suprimento de água no 11º dia.

Consistentes com um mecanismo de tolerância mediado por superexpressão de BiP, os níveis de BiP nas linhagens senso se mantiveram altos durante todo o período de estresse (Figura 9, T3-35SBiPS7.2). Em contraste, nas folhas das plantas controle, embora tenha ocorrido aumento nos níveis de BiP endógeno em resposta ao déficit hídrico (Figura 9, linha 8), a indução de BiP não persistiu com o prolongamento do estresse. O processo de murcha das folhas das plantas controle se acentuou a partir do 13^o dia de estresse (dado não mostrado), coincidindo com o declínio nos níveis de BiP endógeno. Assim, sob estresse progressivo, os níveis de BiP foliares foram correlacionados com a manutenção da turgescência celular. Uma vez que BiP funciona como chaperone molecular, altos níveis de BiP em plantas podem conferir tolerância ao estresse hídrico por meio da preservação da integridade das membranas e estruturas das proteínas.

A associação entre o fenótipo de tolerância ao estresse hídrico e os níveis de BiP foi confirmada previamente por meio de repressão anti-senso (ALVIM et al., 2001). Uma correlação inversa de efeitos foi observada nos transformantes primários das plantas transgênicas anti-senso, demonstrando que a diminuição dos níveis de BiP endógeno aumentou a suscetibilidade da planta ao déficit hídrico. Na geração homozigota T3 para o transgene anti-senso, em alguns tratamentos (Figura 7, 25% de redução; e Figura 8, 35% de redução) o princípio do processo de murcha das folhas das plantas anti-senso precedeu o início do murchamento foliar das plantas controle (Figura 7, 8^o dia e Figura 8, 7^o dia). Entretanto, nos tratamentos mais brandos de déficit hídrico (Figuras 5 e 6), as plantas anti-senso exibiram um fenótipo similar àquele das plantas controle. Esses resultados indicam que a diminuição dos níveis de BiP foi, devido à expressão de seu mRNA anti-senso, compensada pela ativação da via UPR, a qual aumenta os níveis de BiP endógeno. De fato, no tratamento correspondente à redução inicial de 5% do volume de água de irrigação, os níveis de acúmulo de BiP durante o período de estresse foi similar àquele das plantas controle, exceto o fato de que, com a persistência do estresse, o declínio dos níveis de BiP foi superior nas plantas T3-35SBiPAS3.2 (compare linhas 5 e 8 da Figura 9). Além disso, o efeito inibidor do déficit hídrico no desenvolvimento geral e crescimento

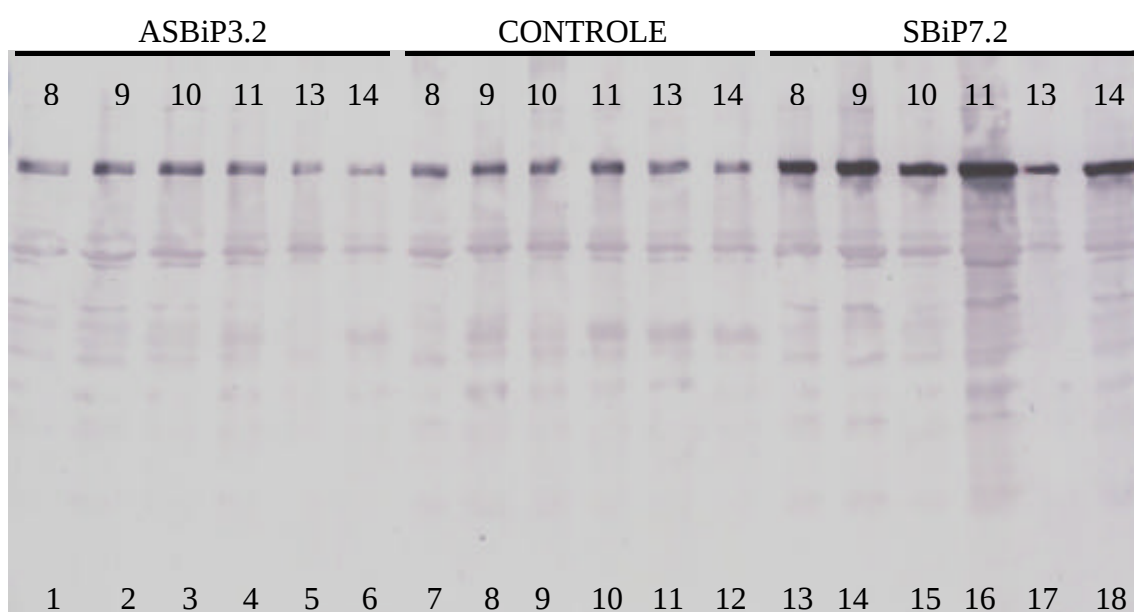


Figura 9 – Acúmulo de BiP em plantas transgênicas senso, anti-senso e controle durante o déficit hídrico progressivo. Proteínas solúveis totais (12 µg) extraídas de folhas de tabacos transgênico senso (T3-35S-BiPS7.2-IX), anti-senso (T3-35SBiPAS3.2-XV) e controle (C) mantidos sob déficit hídrico por um período de 14 dias, foram separadas em SDS PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas com um anticorpo contra BiP de soja. Os números acima das linhas correspondem aos dias de duração do estresse, ressaltando-se que, no tratamento específico de 5% de diminuição inicial no suprimento de água, no oitavo dia a redução foi de 75% e, no 11º em diante, houve privação total de água.

das plantas foi similar nas plantas controle e linhagens anti-senso. Tais resultados evidenciam que o nível de repressão anti-senso nas linhagens T3 não se manteve similar àquele observado nos transformantes primários (ALVIM et al., 2001). Em condições de estresse hídrico, o efeito da repressão anti-senso nos transformantes primários foi claramente observado pela maior suscetibilidade das linhagens anti-senso ao déficit hídrico, em comparação com as plantas controle.

Um nível basal de BiP, em células de levedura e mamífero, é requerido para o crescimento e desenvolvimentos celular (ROSE et al., 1992; LI et al., 1992). De forma similar, o estudo da repressão anti-senso em células de plantas indica que a completa repressão da função de BiP tem efeito letal nas células (LEBORGNE-CASTEL et al., 1999; ALVIM, 2000). Devido ao caráter letal dos genes *BiP*, é provável que nas gerações subseqüentes (T2, T3 e T4) tenha ocorrido uma pressão seletiva para silenciamento do transgene anti-senso, de forma a diminuir a eficiência de inibição da expressão dos genes endógenos. Essa interpretação também explicaria a ausência de correlação mendeliana na frequência de segregação do loco T-DNA, observada nas linhagens anti-senso nas gerações T3 e T4, já que em certa porcentagem das progênes o silenciamento do transgene anti-senso pode provocar silenciamento total do loco T-DNA.

Em contraste ao desempenho das plantas controle e linhagens anti-senso, em termos de desenvolvimento geral, as linhagens senso apresentaram desempenho muito superior em condições de deficiência de água (Figuras 5, 6, 7 e 8). Recentemente, foi demonstrado que linhagens superexpressando BiP mantêm a taxa fotossintética, condutância estomática e taxa de transpiração em níveis superiores aos das linhagens anti-senso e controle, mesmo em condições de estresse hídrico (ALVIM et al., 2001). Uma alta eficiência de fotossíntese das linhagens senso pode explicar um melhor desempenho dessas linhagens em termos de desenvolvimento. Essa possibilidade também é consistente com a observação de que a superexpressão de BiP foi associada com um fenótipo de tolerância à seca que levou à manutenção da turgescência foliar, indicando que BiP estaria envolvida em prevenir a desidratação celular.

Provavelmente, certo grau de ajuste osmótico pode ter ocorrido nas folhas das linhagens senso, submetidas às condições de estresse hídrico, inibindo a perda de turgidez e desidratação foliar. De fato, a combinação dos efeitos, a alta taxa de fotossíntese e a inibição de crescimento provocada por estresse hídrico que leva à redução na utilização de fotoassimilados podem causar aumento na concentração de solutos nas folhas das linhagens senso. Evidências na literatura têm demonstrado que a fotossíntese constitui uma das maiores fontes de acúmulo de solutos orgânicos sob condições de estresse hídrico (LUDLOW et al., 1983; MEYER e BOYER, 1972; MEYER e BOYER, 1981; KUTSCHERA e KÖHLER, 1994).

Alternativamente, o papel protetor de BiP contra estresse hídrico pode estar simplesmente associado à sua função como chaperone molecular. Em nível celular, as respostas das plantas à desidratação podem resultar em danos na estrutura das membranas e proteínas, enquanto outras respostas correspondem a processos adaptativos (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997). Baseado na função e regulação de *BiP* em resposta a estresse, a *BiP* pode atuar em ambos os mecanismos. Como consequência, o papel protetor de *BiP* contra o estresse hídrico pode estar associado com a preservação da estrutura das proteínas e membranas, bem assim com a manutenção de uma alta atividade secretora desencadeada como resposta a uma adaptação celular ao estresse hídrico (INGRAM e BARTELS, 1996).

Como mecanismo de defesa da planta ao estresse hídrico, a composição química e as propriedades físicas da parede celular são ativamente modificadas, resultando em uma estrutura reforçada que restringe a perda de água dos tecidos internos (NEUMAN, 1995). Assim, em condições de déficit hídrico, a função de *BiP* pode ser requerida como resultado de uma intensa atividade secretora causada pelo processo de remodelamento da parede celular. Além disso, *BiP* poderia facilitar o dobramento correto e a maturação de um grupo de proteínas secretórias induzidas pelo estresse hídrico, as quais provavelmente estão envolvidas no mecanismo de resposta ao estresse osmótico. De fato, tem sido demonstrado que *BiP* se associa com proteínas induzidas por estresse hídrico

(CASCARDO et al., 2000). Além disso, diversas proteínas secretórias que são induzidas pelo estresse hídrico já foram identificadas em uma ampla gama de espécies vegetais (INGRAM e BARTELS, 1996; RICCARDI et al., 1998).

Em ambas as situações anteriormente referidas, a superexpressão de *BiP* pode promover um efeito indireto na tolerância ao estresse, permitindo que as células controlem mais eficientemente a arquitetura da parede celular e a concentração de proteínas de defesa específicas, antes que a condição de estresse alcance seu efeito deletério máximo. O estabelecimento de condições ótimas de estresse hídrico para avaliação da tolerância mediada por BiP e a obtenção de linhagens de plantas homozigotas superexpressando BiP, como resultados diretos dessa investigação, constituem os meios e as ferramentas moleculares para que ambas as hipóteses sejam futuramente avaliadas.

4.4. Análise do potencial de BiP como gene de seleção em sistemas de transformação de plantas

Recentemente foi demonstrado que o aumento constitutivo no acúmulo de BiP confere às plantas transgênicas senso T1 tolerância contra estresses típicos do RE, durante a germinação das sementes (ALVIM et al., 2001). Nesses estudos, a função protetora de BiP contra tunicamicina, que inibe a glicosilação das proteínas do RE e ativa a via UPR, foi avaliada pela capacidade de plântulas transgênicas senso de se recuperarem da exposição ao antibiótico e se desenvolverem normalmente. Em contraste, plântulas originadas de sementes controle, germinadas por cinco dias na presença de tunicamicina, não se recuperam quando transferidas para um meio isento de antibiótico e eventualmente morrem.

Nessa investigação, o caráter tolerância à tunicamicina foi avaliado durante a germinação das sementes T3-35S-BiPS7.2- I, II, IV, V, VI, VII, IX, XI, XII e XV, a terceira geração dos transformantes obtidos por ALVIM (2001), por meio do experimento de germinação/sobrevivência na presença de tunicamicina. Assim, as sementes senso e controle foram germinadas em meio sólido MS

suplementado com 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de tunicamicina e, em seguida, transferidas para o meio MS, isento do antibiótico.

As plântulas transgênicas senso (T4-35S-BiPS7.2) conseguiram se recuperar do efeito tóxico de tunicamicina e se desenvolveram normalmente. No entanto, as plântulas controle não conseguiram se restabelecer e morreram (dados não mostrados). Tais resultados confirmam que o caráter tolerância à tunicamicina durante a germinação de sementes é conferido pela superexpressão do gene *BiP*, sendo transmitido para as gerações que mantêm altos níveis do chaperone molecular.

Uma vez que BiP confere tolerância ao antibiótico tunicamicina durante a germinação da semente, foi também avaliado o potencial do gene *BiP* como agente de seleção em sistemas de transformação e regeneração de plantas. A otimização de metodologias para uso de *BiP* como gene marcador em sistemas de transformação de plantas eliminaria a necessidade da incorporação de genes bacterianos de resistência a antibióticos em genomas de plantas para seleção de transformantes, restringindo a possibilidade de disseminação de genes indesejados para o meio ambiente. Nesse contexto, vale ressaltar que o gene *BiP* está presente no genoma de todos os eucariotos, sendo considerados um gene essencial envolvido na função constitutiva do RE. Assim, para verificar a possibilidade de utilização de BiP como um marcador molecular para seleção de plantas transformadas, o efeito tóxico do antibiótico tunicamicina durante a regeneração de explantes foliares de tabaco foi inicialmente avaliado por meio da curva de morte de discos foliares expostos a concentrações crescentes de tunicamicina, por um período de 45 dias (Figura 10).

Em baixas concentrações de tunicamicina (0,2 e 0,4 mg/mL), a eficiência do processo de regeneração dos explantes transgênicos senso foi superior à do controle, conforme julgado pela maior frequência de brotação dos discos foliares. A maior eficiência de regeneração dos discos foliares senso observada em baixas concentrações de tunicamicina foi similar àquela descrita para os transformantes primários senso em condições normais (ALVIM, 2000). Com o aumento da concentração de tunicamicina, o efeito tóxico do antibiótico foi evidenciado,

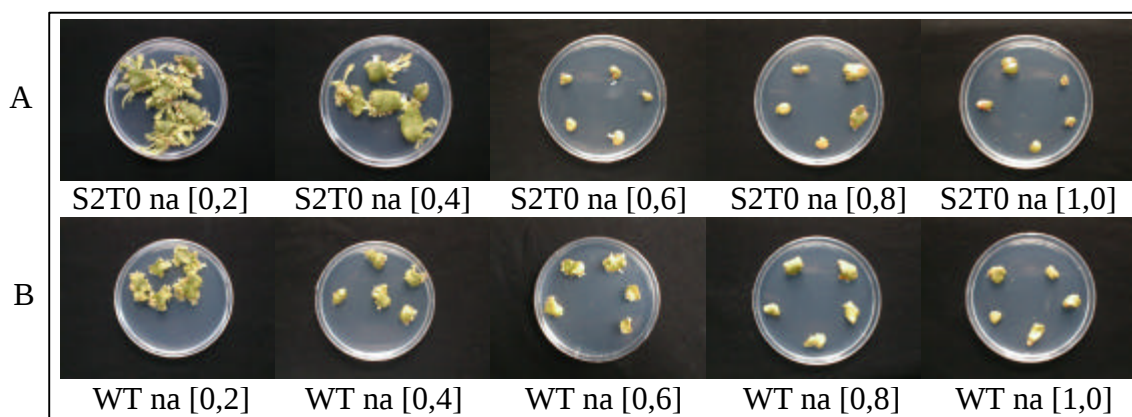


Figura 10 – Efeito de tunicamicina na regeneração de discos foliares senso e controle. Discos foliares dos transformantes primários senso T0-35SBiPS2 (A) e de plantas controle foram colocados em meios de regeneração suplementados com concentrações crescentes de tunicamicina (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; e 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

ocorrendo inibição no processo de regeneração e eventualmente morte dos discos foliares. Entretanto, em concentrações superiores de tunicamicina (0,6-1,0 mg/mL), o grau de inibição no processo de regeneração dos explantes senso foi superior, em comparação com o controle. Esses resultados indicam que, em condições de estresses típicos do RE, a superexpressão constitutiva de BiP tem efeito deletério na regeneração de tecidos vegetais.

Com o objetivo de monitorar o grau de estresse intracelular causado pelas diferentes concentrações de tunicamicina, os níveis induzidos de BiP foram avaliados por *immunoblottings* de extratos protéicos dos discos foliares expostos ao antibiótico. Em baixas concentrações de tunicamicina, a indução de BiP endógeno nos discos foliares de plantas não-transformadas foi mínima (Figura 11, linhas 2, 3 e 4), evidenciando que essas concentrações de tunicamicina não foram suficientes para promover um acúmulo de proteínas mal dobradas no RE e ativar a via UPR. Em contraste, os tratamentos com 0,8 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de tunicamicina promoveram aumento acentuado nos níveis de BiP, nos explantes das plantas controle (Figura 11, linhas 5 e 6). A indução da síntese de BiP parece ser coordenada com a degradação específica da proteína, já que o acúmulo máximo de BiP coincide com a indução no acúmulo de produtos de degradação de massa molecular aproximada de 25 a 28 kDA.

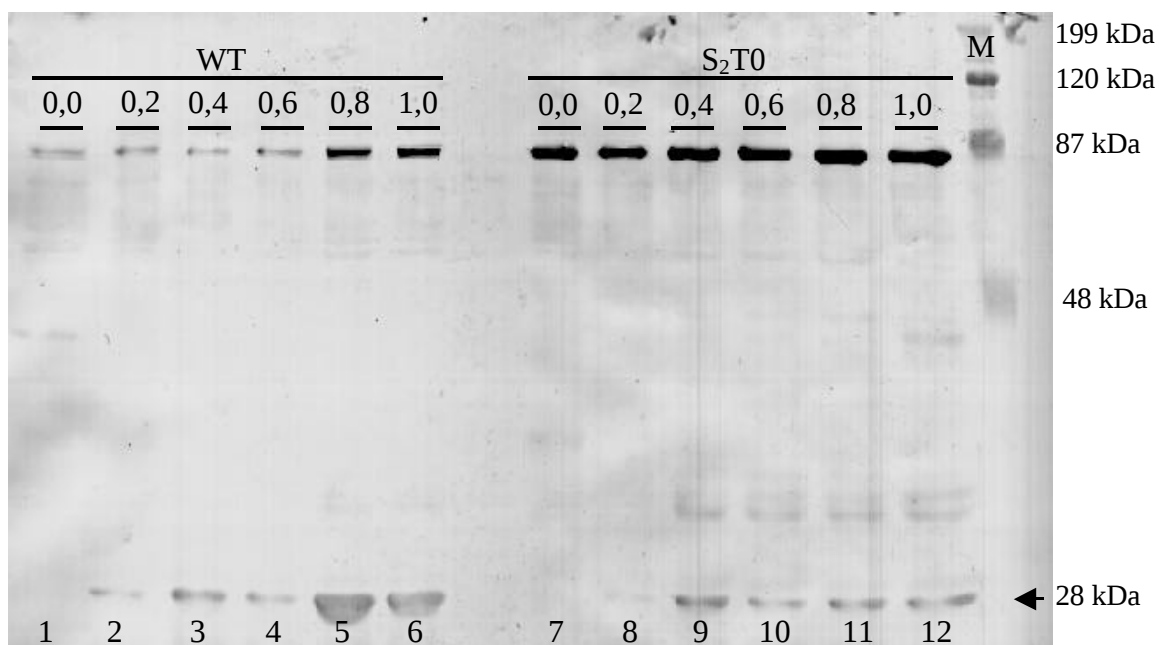


Figura 11 – Níveis de BiP em discos foliares de *Nicotiana tabacum*, submetidos a diferentes concentrações de tunicamicina. Discos foliares de tabacos transgênico T0-35SBiPS2 (S₂T0) e controle (WT) foram colocados em meio de regeneração com diferentes concentrações de tunicamicina (0,4; 0,6; 0,8; e 1,0 mg/mL) por 45 dias. Os extratos de proteína total foram obtidos pelo método ADP e quantificados por BRADFORD. Quantidades equivalentes de proteína total (12 µg) foram extraídas desses discos foliares, separadas por SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas com anticorpo contra BiP de soja. A seta indica o produto de degradação específica de BiP de 25-28 kDa. A relativa posição eletroforética de marcadores de massa molecular é indicada à direita da figura, em kDa.

Em mamíferos, tem sido demonstrado que a via UPR, além de induzir a transcrição de um conjunto de genes envolvidos no processamento de proteínas secretórias e de atenuar a síntese global de proteínas, ativa coordenadamente o sistema de degradação de proteínas associadas ao RE (sistema ERAD) (HAMPTON, 2002). Esse sistema tem sido descrito como integrante fundamental no controle de qualidade exercido pelo RE e compreende o processo de descarte de proteínas secretórias anormais que, após a retrotranslocação do lúmen do RE para o citosol, são degradadas via proteassomo (DI COLA et al., 2001). Em leveduras, a via UPR coordenadamente ativa um conjunto de genes que codificam chaperones moleculares e genes envolvidos no sistema ERAD (TRAVERS et al., 2000). Evidências da existência de co-regulação entre a via UPR e o sistema ERAD em células de plantas foram fornecidas em experimentos de hibridização utilizando o método *microarray* para detecção do conjunto de genes ativados pela via UPR em *Arabidopsis thaliana* (MARTINEZ e CHRISPEELS, 2003).

A análise do transcriptoma induzido pela via UPR em *Arabidopsis* revelou a regulação coordenada e positiva de pelo menos dois genes com o potencial para atuarem no mecanismo de controle de qualidade exercido pelo RE em condições de estresse (MARTINEZ e CHRISPEELS, 2003). Esses genes codificam uma ubiquitina putativa e uma ATPase do tipo AAA que, provavelmente, participam do processo de degradação de proteínas. Entretanto, evidências diretas e conclusivas de que um sistema ERAD atua em plantas, sendo coordenadamente ativado pela via UPR, ainda não foram fornecidas.

Em discos foliares, provenientes dos transformantes primários T0-35SBiPS2 e de linhagens transgênicas da quarta geração, T3-35SBiPS7.2-XI, o tratamento com tunicamicina por 45 dias (Figura 11) ou 48 horas (Figura 12) não promoveu acúmulo adicional de BiP, e os níveis de BiP se mantiveram similares em qualquer concentração de tunicamicina. Esses resultados indicam que níveis elevados de BiP presentes nas células vegetais podem inibir a ativação da via UPR. Tal interpretação já foi considerada em estudos anteriores que demonstraram que a superexpressão de um gene de *BiP* em protoplastos

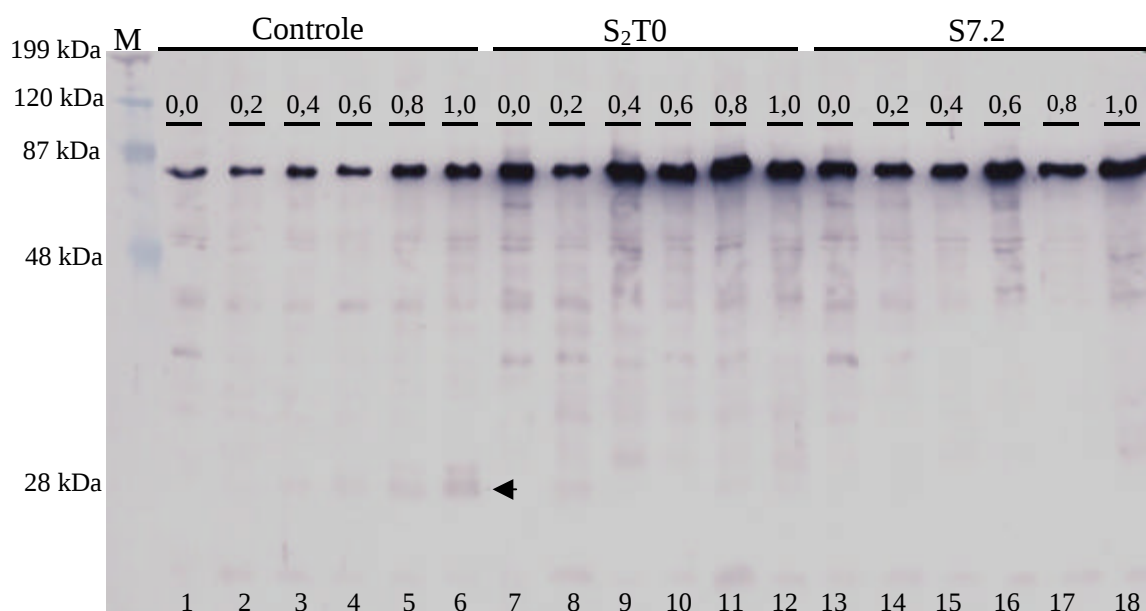


Figura 12 – Discos foliares de plantas da geração T4 da linhagem T3-35SBiPS7.2 (S7.2) e de controles (WT) foram colocados em meio de regeneração com diferentes concentrações de tunicamicina (0,0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; e 10,0 mg/mL) por 48 horas. Os extratos de proteína total foram obtidos pelo método ADP e quantificados por BRADFORD. Quantidades equivalentes de proteína total (12 µg) foram extraídas destes discos foliares, separadas por SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas com anticorpo contra BiP de soja. A seta indica o produto de degradação específica de BiP de 25-28 kDa. A relativa posição eletroforética de marcadores de massa molecular é indicada à esquerda da figura, em kDa.

originados de folhas de tabaco transgênico previne tanto a indução transcricional do *BiP* endógeno quanto a ativação de outros genes da via UPR induzidos por tunicamicina (LEBORGNE-CASTEL et al., 1999; ALVIM et al., 2000). Coerente com um mecanismo de co-regulação entre a via UPR e o sistema de degradação de proteínas em condições de estresse típico do RE, nos discos foliares senso a degradação específica de BiP não foi estimulada pelo tratamento com tunicamicina, não sendo observado indução no acúmulo do polipeptídeo de 25-28 kDa (Figuras 11 e 12). Em geral, intermediários de degradação de BiP de massa molecular, na faixa de 35-55 kDa, foram identificados em maior proporção nos discos foliares senso. Porém, o aparecimento desses produtos de degradação não foi induzido pelo tratamento com tunicamicina nem nos discos foliares obtidos de plantas controle, indicando não serem parte de um mecanismo de resposta a estresses típicos do RE.

O aparecimento do produto de degradação de BiP de 25-28 kDa parece estar associado às respostas da célula vegetal aos estresses típicos do RE. Enquanto a tunicamicina induz ao acúmulo do produto de degradação de 25-28 kDa em discos foliares de plantas controle (Figuras 11 e 12), estresse hídrico estimula a síntese de BiP endógeno, mas não promove a degradação específica da proteína (Figura 9). Além disso, a inibição da via UPR por superexpressão de BiP também previne o aparecimento do produto de degradação específico de 25-28 kDa. Provavelmente o produto da degradação específica de BiP seja o resultado de ativação do sistema ERAD, que está associado com o mecanismo de resposta a estresses típicos do RE. Coletivamente, esses resultados evidenciam a existência de mecanismos de co-regulação entre ativação da via UPR e indução do processo de degradação específica de BiP, em células de plantas. A análise da indução da expressão de genes do sistema ERAD por tunicamicina, potente ativador da via UPR, em discos foliares controle e transgênicos senso possibilitará confirmar essa hipótese.

Em resumo, os resultados dessa investigação indicam que, ao contrário da hipótese original, os genes *BiP* não constituem alternativas eficientes para os genes bacterianos de seleção em sistema de transformação e regeneração de

plantas, usando tunicamicina como agente de seleção. Em condições de estresses típicos do RE, o sistema de degradação de proteínas associadas ao RE (sistema ERAD) é requerido para degradação de proteínas mal dobradas, que não conseguem adquirir uma conformação funcional. Assim também a via UPR é ativada, promovendo a ativação de diversos genes-alvo, envolvidos no processamento e transporte do excesso de proteínas ao vacúolo para reciclagem, evitando o desequilíbrio das atividades celulares (SPEAR e NG, 2003; CABRAL et al., 2002). Uma vez que BiP funciona como proteína sensora da via UPR, a superexpressão de BiP previne a ativação da via UPR e, provavelmente, inibe a ativação do sistema ERAD, comprometendo a regeneração dos tecidos em condições de estresses típicos do RE. O sistema transgênico desenvolvido e o estabelecimento das condições de indução de estresses do RE em discos foliares possibilitarão analisar a possível co-regulação entre a via UPR e o sistema ERAD em plantas.

5. CONCLUSÕES

Em condições de estresse, o acúmulo de proteínas mal dobradas compromete o funcionamento normal das células eucarióticas, impedindo a manutenção da homeostase celular. A proteína BiP tem sido descrita como um importante componente do processo de dobramento e montagem de proteínas secretórias. Consistente com sua função de chaperone molecular, a BiP é induzida em resposta a diversos estresses bióticos e abióticos, como estresse hídrico, ataque de fitopatógenos e estresse nutricional.

Recentemente, a equipe do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas estendeu o nível de investigação sobre o papel protetor de BiP contra o estresse no RE para organismos multicelulares intactos, por meio de repressão anti-senso e superexpressão de genes *BiP* em plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum*. Esses estudos demonstraram que níveis elevados de BiP em plantas transgênicas conferiram tolerância a estresse hídrico durante o crescimento da planta.

Para determinação da estabilidade do transgene BiP da soja na quarta geração e obtenção de linhagens homozigotas dominantes, sementes de *Nicotiana tabacum* da terceira geração foram plaqueadas em meio MS suplementado com 150 mg.L⁻¹ de canamicina para análise de segregação. Tal análise permitiu a identificação de plantas individuais da linhagem T3-35S-BiPS7.2 em homozigose (I, II, IV, V, VI, VII, IX, XI, XII e XV) e alguns

exemplares da linhagem T3-35S-BiPAS3.2, com pelo menos uma cópia transgênica em homozigose.

A obtenção de linhagens de plantas homozigotas superexpressando BiP e a determinação de condições ótimas de estresse hídrico para avaliação da tolerância mediada por BiP, como resultados diretos dessa investigação, estabelecem meios e ferramentas moleculares para que as hipóteses de BiP tenham sua função requerida como resultado do fato de uma alta atividade secretora causada pelo processo de remodelamento da parede celular e, ou, de BiP facilitar o dobramento correto e a maturação de um grupo de proteínas secretórias induzidas pelo estresse hídrico. Tais proteínas provavelmente estão envolvidas no mecanismo de resposta ao estresse osmótico para que sejam futuramente avaliadas.

A equipe do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas também demonstrou que o aumento constitutivo de BiP confere às plantas transgênicas senso tolerância à tunicamicina, um estressor típico do RE, durante a germinação das sementes. Uma vez que a tolerância não era proveniente do T-DNA inserido em seu genoma, a função protetora de BiP contra o antibiótico foi avaliada de forma a estabelecer condições que permitissem o seu uso como gene marcador no processo de seleção de plantas transformadas.

A otimização da metodologia do uso de *BiP* como gene marcador em sistemas de transformação de plantas representa um potencial inegável para a biotecnologia vegetal, à medida que sua utilização eliminaria a necessidade da incorporação de genes bacterianos de resistência a antibióticos em genomas de plantas para seleção de transformantes, visto que o gene *BiP* está presente no genoma de mamíferos e de plantas, sendo considerado um gene essencial. Entretanto, tal utilização não é possível ser feita, pois, como BiP é uma proteína sensora, sua superexpressão inibe a ativação da via UPR e provavelmente a via ERAD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVIM, F. C. **Estudos funcionais de BiP em plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum***. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 200. 53 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ALVIM, F. C.; CAROLINO, S. M. B.; CASCARDO, J. C. M.; NUNES, C. C.; MARTINEZ, C. A.; OTONI, W. C.; FONTES, E. P. B. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. **Plant Physiol.**, n. 126, p. 1024-1054, 2001.

ANDERSON, J.; NEVEN, L.; LI, Q.; HASKELL, D.; GUY, C. A cDNA encoding the endoplasmic reticulum-luminal heat-shock protein from spinach (*Spinacia oleracea* L.). **Plant Physiol.**, n. 104, p. 303-304, 1994.

BOSTON, R. S.; VIITANEN, P. V.; VIERLING, E. Molecular chaperones and protein folding in the plants. **Plant Mol. Biol.**, v. 34, p. 191-222, 1996.

BOSTON, R. S.; VIITANEN, P. V.; VIERLING, E. Molecular chaperones and protein folding in the plants. **Plant Mol. Biol.**, v. 34, p. 191-222, 1996.

BOSTON, R.; FONTES, E.; SHANK, B.; WROBEL, R. Increased expression of the maize Immunoglobulin binding protein homolog b-70 in three zein regulatory mutants. **The Plant Cell**, v. 3, p. 497-505, 1991.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREWER, J. W.; CLEVELAND, J. L.; HENDERSHOT, L. M. A pathway distinct from the mammalian unfolded protein response regulates expression of endoplasmic reticulum chaperones in non-stressed cells. **EMBO J.**, v. 16, n. 23, p. 7207–7216, 1997.

BUZELI, R. A. A.; CASCARDO, J. C. M.; RODRIGUES, L. A. Z.; ANDRADE, M. O.; LOUREIRO, M. E.; OTONI, W. C.; FONTES, E. P. B. Tissue-specific regulation of *Bip/Grp78* genes: a cis-acting regulatory domain is required for BiP promoter activity in plant meristems. **Plant Mol. Biol.**, v. 50, p. 757-771, 2002.

CABRAL, C. M.; LIU, Y.; MOREMEN, K. W.; SIFERS, R. N. Organization diversity among distinct glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation programs. **Mol. Biol. Cell**, v. 13, p. 2639-2650, 2002.

CARLSSON, L.; LAZARIDES, E. ADP-ribosylation of the Mr 83,000 stress-inducible and glucose-regulated protein in avian and mammalian cells: modulation by heat shock and glucose starvation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 80, p. 4664-4668, 1983.

CAROLINO, S. M. B.; FONTES, E. P. B. Interconversion of monomeric and oligomeric forms of Soybean BiP under normal and stress conditions. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FISILOGIA VEGETAL, 8., 2001, Ilhéus. **Annals...** Ilhéus, BA, Brasil: [s. n.], 2001. p. 865 (1-3).

CASCARDO, J. C. M.; BUZELI, R. A. A.; ALMEIDA, R. S.; OTONI, W. C.; FONTES, E. P. B. Differential expression of the soybean BiP gene family. **Plant Science**, n. 160, p. 273-281, 2001.

CASCARDO, J.C. M.; ALMEIDA, R. S.; BUZELI, R. A. A.; CAROLINO, S. M. B.; OTONI, W. C.; FONTES, E. P.B. The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stress. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 19, p. 14494-14500, 2000.

COLEMAN, C. E.; LOPES, M. A.; GILLIKIN, J. W.; BOSTON, R. S.; LARKINS, B. A. A defective signal peptide in the maize high-lysine mutant *floury-2*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 6828-6831, 1995.

D'AMICO, L.; VALSANIA, B.; DAMINATI, M. G.; FABRINI, M. S.; NITTI, G.; BOLLINI, R.; CERIOTTI, A.; VITALE, A. Bean homologues of the mammalian glucose regulated proteins: induction by tunicamycin and interaction with newly-synthesized storage proteins in the endoplasmic reticulum. **Plant J.**, v. 2, p. 443-445, 1992.

DENECKE, J. Soluble endoplasmic reticulum resident proteins and their function in protein synthesis and transport. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 34, p.197-205, 1996.

DENECKE, J.; GOLDMAN, M.; DEMOLDER, J.; SEURINCK, J.; BOTTERMAN, J. The tobacco luminal binding protein is encoded by a multigene family. **The Plant Cell**, v. 3, p. 1025-1035, 1991.

DEROL, S.; GARDNER, R. Expression and inheritance of kanamycin resistance in a large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium* mediated transformation. **PLANT MOL. BIOL.**, v. 11, p. 355-364, 1988.

DI COLA, A.; FRIGERIO, L.; LORD, J. M.; CERIOTTI, A.; ROBERTS, L. M. Ricin A chain without its partner B chain is degraded after retrotranslocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol in plant cells. **PNAS**, v. 98, n. 25, p. 14726-14731, 2001.

DUPONT, F. M.; HURKMAN, W. J.; TANAKA, C. K.; CHAN, R. BiP, HSP70, NDK and PDI in wheat endosperm: I. Accumulation of mRNA and protein during grain development. **Physiol. Plant.**, v. 103, p. 70-79, 1998.

FIGUEIREDO, J.; CASCARDO, J.; CAROLINO, S.; ALVIN, F.; FONTES, E. Water-stress regulation and molecular analysis of the soybean BiP gene family. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 9, n. 2, p. 103-110, 1997.

FINK, A. L. Chaperone-mediated protein folding. **Physiol. Rev.**, v. 79, n. 2, p. 425-449, 1999.

FONTES, E. P. B.; SHANK, B. B.; WROBEL, R. L.; MOOSE, S. P.; O'BRIAN, G. R.; WURTZEL, E. T.; BOSTON, R. S. Characterization of an immunoglobulin binding protein homolog in the maize *floury-2* endosperm mutant. **Plant Cell**, v. 3, p. 483-496, 1991.

FONTES, E.; SILVA, C.; CAROLINO, S.; FIGUEIREDO, J.; BATISTA, D. A soybean binding protein (BiP) homolog is temporally regulated in soybean seeds and associates detectably with normal storage proteins in vitro. **Braz. J. Genet.**, v. 19, n. 2, p. 305-312, 1996.

FONTES, M. A.; OTONI, W. C.; CAROLINO, S. M. B.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; FONTES, E. P. B.; FÁRI, M.; LOURO, R. P. Hyperhydricity in pepper plants regenerated in vitro: involvement of BiP (Binding Protein) and ultrastructural aspects. **Plant Cell Rep.**, v. 19, p. 81-87, 1999.

FREIDEN, P.; GAUT, J. HENDERSHOT, L. Interconversion of three differentially modified and assembled forms of BiP. **EMBO J.**, v. 11, p. 63-70, 1992.

GALILI, G.; SENGUPTA-GOPALAM, C.; CERIOTTI, A. The endoplasmic reticulum of plant cells and its role in protein maturation and biogenesis of oil bodies. **Plant Mol. Biol.**, v. 38, p. 1-29, 1998.

GETHING, M. J.; SAMBROOK, J. Protein folding in the cell. **Nature**, n. 355, p. 33-45, 1992.

GILLINKI, J. W.; ZHANG, F.; COLEMAN, C. E.; BASS, H. W.; LARKINS, B. A.; BOSTON, R. S. A defective signal peptide tethers the *floury-2* zein to the endoplasmic reticulum membrane. **Plant Physiol.**, n. 114, p. 345-352, 1997.

GOMER, C. J.; FERRARIO, A.; RUCKER, N.; WONG, S.; LEE, A. S. Glucose regulated protein induction and cellular resistance to oxidative stress mediated by porphyrin photosensitization. **Cancer Res.**, v. 15, p. 6574-6579, 1991.

GÖRG, A.; POSTEL, W.; GÜNTHER, S. Two-dimensional electrophoresis. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 9, p. 531-546, 1988.

GUILFOYLE, T.; HAGEN, G.; ULMASOV, T.; MURFETT, J. How does auxin turn on genes? **Plant Physiol.**, v. 118, p. 341-347, 1998.

GÜLOW, K.; BIENERT, D.; HAAS, I. BiP is feed-back regulated by control of protein translation efficiency. **J. Cell Sci.**, v. 115, p. 2443-2452, 2002.

HAIGH, N. G.; JOHNSON, A. E. A new role for BiP: closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane. **J. Cell Biol.**, v. 156, n. 2, p. 261-270, 2002.

HAMMAN, B. D.; HENDERSHOT, L. M.; JOHNSON, A. E. BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. **Cell**, v. 92, p. 747-758, 1998.

HAMMOND, C.; HELENIUS, A. Quality control in the secretory pathway. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 7, p. 523-529, 1995.

HAMPTON, R. Y. (2002) ER- associated degradation in protein quality control and cellular regulation. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 14, p. 476-482, 2002.

HARDING, H. P.; ZHANG, Y.; RON, D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. **Nature**, n. 397, p. 271-274, 1999.

HARDING, H.P.; NOVOA, I.; ZHANG, Y.; ZENG, H.; WEK, R.; SCHAPIRA, M.; RON, D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. **Mol. Cell**, v. 6, p. 1099-1108, 2000.

HARTL, F. V. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, n. 381, p. 571-580, 1996.

HASS, I. G.; WABL, M. Immunoglobulin heavy chain binding protein. **Nature**, n. 306, p. 387-389, 1983.

HATANO, K.; SHIMADA, T.; HIRAIWA, N.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. A rapid increase in the level of binding protein (BiP) is accompanied by synthesis and degradation of storage proteins in pumpkin cotyledons. **Plant Cell Physiol.**, v. 38, p. 344-351, 1997.

HAZE, K.; YOSHIDA, H.; YANAGI, H.; YURA, T.; MORI, K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. **Mol. Biol. Cell**, v. 10, p. 3787-3799, 1999.

HELLMAN, R.; VANHOVE, M.; LEJEUNE, A.; STEVENS, F. J.; HENDERSHOT, L. M. The in vivo association of BiP with newly synthesized proteins is dependent on the rate and stability of folding and not simply on the presence of sequences that can bind to BiP. **The J. Cell Biol.**, n. 144, p. 21-30, 1999.

HENDERSHOT, L. M.; TING, J.; LEE, A. Identity of the immunoglobulin heavy-chain-binding protein with the 78,000 dalton glucose-regulated protein and the role of post-translational modification in its binding function. **J. Mol. Cell. Biol.**, v. 8, p. 4250-4256, 1988.

HONDA, M.; MURAMOTO, Y.; KUZUGUCHI, T.; SAWANO, S.; MACHIDA, M.; KOYAMA, H. Determination of gene copy number and genotype of transgenic *Arabidopsis thaliana* by competitive PCR. **J. Exp. Bot.**, v. 53, n. 373, p. 1515-1320, 2002.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration in plants. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 377-403, 1996.

IWAWAKI, T.; HOSODA, A.; OKUDA, T.; KAMIGORI, Y.; NOMURA-FURUWATARI, C.; KIMATA, Y.; TSURU, A.; KOHNO, K. Translation control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. **Nature Cell Biology**, v. 3, p. 158-164, 2001.

JELITTO-VAN DOOREN, E. P. W. M.; VIDAL, S.; DENECKE, J. Anticipating endoplasmic reticulum stress: A novel early response before pathogenesis-related gene induction. **The Plant Cell**, v. 11, p. 1935-1943, 1999.

KABANI, M.; KELLEY, S. S.; MORROW, M. W.; MONTGOMERY, D. L.; SIVENDRAN, R.; ROSE, M. D.; GIERASCH, L. M.; BRODSKY, J. L. Dependence of endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD) on the peptide binding domain and concentration of BiP. **MBC**, v. 14, p. 3437-3448, 2003.

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

KAUFMAN, R. J. Orchestrating the unfold protein response in health and disease. **J. Clin. Invest.**, v. 110, p. 1389-1398, 2002.

KAUFMAN, R. J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translation controls. **Genes & Dev.**, v. 13, p. 1211-1233, 1999.

KIMATA, Y.; KIMATA, Y. I.; SHIMIZU, Y.; ABE, H.; FARCASANU, I. C.; TAKEUCHI, M.; ROSE, M. D.; KOHNO, K. Genetic evidence for a role of BiP/Kar2 that regulates Ire1p in response to accumulation of unfolded proteins. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, p. 2559-2569, 2003.

KOIZUMI, N. Isolation and responses to stress of a gene that encodes a luminal binding protein in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol.**, v. 37, p. 862-865, 1996.

KOIZUMI, N.; MARTINEZ, I. M.; KIMATA, Y.; KOHNO, K.; SANO, H.; CHRISPEELS, M. J. Molecular characterization of two *Arabidopsis* Ire1 homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases. **Plant Physiol.**, v. 127, p. 949-962, 2001.

KOKAME, K.; KATO, H.; MIYATA, T. Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. **JBC**, v. 276, n. 12, p. 9199-9205, 2001.

KUTSCHERA, U.; KÖHLER, K. Cell elongation, turgor and osmotic pressure in developing sunflower hypocotyls. **J. Exp. Bot.**, v. 45, p. 591-595, 1994.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, n. 227, p. 680-685, 1970.

LAITUSIS, A. L.; BROSTROM, M. A.; BROSTROM, C. O. The dynamic role of GRP78/BiP in the coordination of mRNA translation with protein processing. **J. Biol. Chem.**, n. 274, p. 486-493, 1999.

LEBORGNE-CASTEL, N.; JELITTO-VAN DOORE, E. P. W. M.; CROFTS, A. J.; DENECKE, J. Overexpression of BiP in tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress. **Plant Cell**, v. 11, p. 459-469, 1999.

LEE, A. S. A mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 4, p. 267-273, 1992.

LEE, A. S. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. **TIBS**, v. 26, p. 504-510, 2001.

LI, L. J.; LI, X. A.; FERRARIO, A.; RUCKER, N.; LIU, E. S.; WONG, S.; GOMER, C.J.; LEE, A. S. Establishment of a Chinese hamster ovary cell line that expresses grp78 antisense transcripts and suppresses A23187 induction of both GRP78 and GRP94. **J. Cell Physiol.**, v. 153, p. 575-582, 1992.

LI, X. A.; LEE, A. S. Competitive inhibition of a set of endoplasmic reticulum protein genes (GRP78, GRP94 and Erp72) retards cell growth and lowers viability after ionophore treatment. **Mol. Cell. Biol.**, v. 11, p. 3446-3453, 1991.

LIU, C. Y.; WONG, H. N.; SCHAUERTE, J.A.; KAUFMAN, R.J. The protein kinase/endoribonuclease IRE1 α that signals the unfolded protein response has a luminal N-terminal ligand-independent dimerization domain. **J. Biol. Chem.**, n. 277, p. 18346-18356, 2002.

LUDLOW, M. M.; CHU, A. C. P.; CLEMENTS, R. J.; KERSLAKE, R. G. Adaptation of species of *Centrosema* to water stress. **Aust. J. Plant Physiology**, v. 10, p. 119-130, 1983.

MA, K.; VATTEM, K. M.; WEK, R. C. Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. **J. Biol. Chem.**, n. 277, p. 18728-18735, 2002.

MA, Y.; HENDERSHOT, L. M. Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during ER stress. **JBC**, v. 278, p. 34864-34873, 2003.

MARTINEZ, I. M.; CHRISPEELS, M. J. Genomic analysis of the unfolded protein response in Arabidopsis shows its connection to important cellular processes. **Plant Cell**, v. 15, p. 561-576, 2003.

MATLACK, K. E.; MISSELWITZ, B.; PLATH, K.; RAPOPORT, T. A. BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro- α factor across the ER membrane. **Cell**, v. 97, p. 553-564, 1999.

MEUNIER, L.; USHERWOOD, Y.; CHUNG, K.; HENDERSHOT, L. A subset of chaperones and folding enzymes from multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. **Mol. Biol. Cell**, v. 13, p. 4456-4469, 2002.

MEYER, R. F.; BOYER, J. S. Osmoregulation, soluble distribution and growth in soybean seedlings having low water potentials. **Planta**, v. 151, p. 482-489, 1981.

MEYER, R. F.; BOYER, J. S. Sensitive of cell division and cell elongation to water potentials in soybean hypocotyls. **Planta**, v. 108, p. 77-87, 1972.

MORRIS, J. A.; DORNER, A. J.; EDWARDS, C. A.; HENDERSHOT, L. M.; KAUFMAN, R. J. Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 7, n. 272, p. 4327-4334, 1997.

MUENCH, D. G.; WU, Y.; ZHANG, Y.; LI, X.; BOSTON, R. S.; OKITA, T. W. Molecular cloning, expression and subcellular localization of a BiP homolog from rice endosperm tissue. **Plant Cell Physiol.**, v. 38, p. 404-412, 1997.

MUNRO, S.; PELHAM, H. R. B. An Hsp 70-like protein in the ER: Identity with the 78 Kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. **Cell**, v. 46, p. 291-300, 1996.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NEUMAN, P. M. The role of cell wall adjustment in plant resistance to water deficits. **Crop Science**, v. 35, p. 1258-1266, 1995.

NICCHITTA, C. V.; BLOBEL, G. Luminal proteins of the mammalian endoplasmic reticulum are required to complete protein translocation. **Cell**, v. 73, p. 989-998, 1993.

NOVOA, I.; ZENG, H.; HARDING, H.; RON, D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α . **J. Cell Biol.**, v. 5, n. 153, p. 1011-1021, 1991.

OKADA, T.; YOSHIDA, H.; AKEZAWA, R.; NEGISHI, M.; MORI, K. Distinct roles of ATF6 and PERK in transcription during mammalian unfolded protein response. **Biochem. J.**, n. 366, p. 585-594, 2002.

OKUSHIMA, Y.; KOIZUMI, N.; YAMAGUCHI, Y.; KIMATA, Y.; KOHNO, K.; SANO, H. Isolation and characterization of a putative transducer of endoplasmic reticulum stress in *Oryza sativa*. **Plant Cell Physiol.**, v. 43, p. 532-539, 2002.

PEDRA, J. H. F.; DELÚ-FILHO, N.; PIROVANI, C. P.; CONTIM, L. A. S.; DEWEY, R. E.; OTONI, W. C.; FONTES, E. P. B. Antisense and sense expression of a sucrose binding protein homologue gene from soybean in transgenic tobacco affects plant growth and carbohydrate partitioning in leaves. **Plant Sci.**, n. 152, p. 87-98, 2000.

PEDRAZZINI, A.; VITALE, A. The binding protein (BiP) and the synthesis of secretory proteins. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 34, p. 207-216, 1996.

PEDRAZZINI, E.; GIOVINAZZO, G.; BOLLINI, R.; CERIOTTI, A.; VITALE, A. Binding of BiP to an assembly-defective protein in plant cells. **Plant J.**, v. 5, p. 103-110, 1994.

PICOLI, E.; OTONI, W.; FIGUEIRA, M.; CAROLINO, S.; ALMEIDA, R.; SILVA, E.; CARVALHO, C.; FONTES, E. P. B. Hyperhydricity in vitro eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). **Plant Sci.**, n. 160, p. 857-868, 2001.

ROSE, M.; MISRA, L. M.; VOGEL, J. P. KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of mammalian BiP/GRP78 gene. **Cell**, v. 57, p. 1211-1221, 1989.

RUEGSEGGER, U.; LEBER, J. H.; WALTER, P. Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. **Cell**, n. 107, p. 103-114, 2001.

SHI, Y.; VATTEM, K. M.; SOOD, R.; AN, J.; LIANG, J.; STRAMM, L.; WEK, R.C. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. **Mol Cell. Biol.**, v. 18, p. 7499-7509, 1998.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology**, n. 115, p. 327-334, 1997.

SPEAR, E. D.; NG, D. T. W. Stress tolerance of misfolded carboxypeptidase Y requires maintenance of protein trafficking and degradative pathways. **Mol. Biol. Cell**, v. 14, p. 2756-2767, 2003.

SUGAWARA, S.; TAKEDA, K.; LEE, A. S.; DENNERT, G. Suppression of stress protein GRP78 induction in tumor B/C10ME eliminates resistance to cell mediated cytotoxicity. **Cancer Res.**, v. 53, p. 6001-6005, 1993.

SUNG, D. Y.; VIERLING, E.; GUY, C. L. Comprehensive expression profile analysis of the Arabidopsis Hsp70 gene family. **Plant Physiol.**, n. 126, p. 789-800, 2001.

TIRASOPHON, W.; LEE, K.; CALLAGHAN, B.; WELIHINDA, A.; KAUFMAN, R. J. The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. **Genes & Development**, v. 14, p. 2725-2736, 2000.

TIRASOPHON, W.; WELIHINDA, A. A.; KAUFMAN, R.J. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. **Genes & Dev**, v. 12, p. 1812-1824, 1998.

TRAVERS, K. J.; PATIL, C. K.; WODICKA, L.; LOCKHART, D. J.; WEISSMAN, J. S.; WALTER, P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. **Cell**, n. 101, p. 249-258, 2000.

VOELTZ, G. K.; ROLLS, M. M.; RAPOPORT, T. A. Structural organization of the endoplasmic reticulum. **EMBO Reports**, v. 3, n. 10, p. 944-950, 2002.

WEIGEL, D.; AHN, J. H.; BLÁZQUEZ, M. A.; BOREVITZ, J. O.; CHRISTENSEN, S. K.; FANKHAUSER, C.; FERRÁNDIZ, C.; KARDAILSKY, I.; MALANCHARUVIL, E. J.; NEFF, M. M.; NGUYEN, J. T.; SATO, S.; WANG, Z-Y.; XIA, Y.; DIXON, R. A.; HARRISON, M. J.; LAMB, C. J.; YANOFSKY, M. F.; CHORY, J. Activation Tagging in Arabidopsis. **Plant Physiol.**, n. 122, p. 1003-1013, 2000.

WROBEL, R. L.; O'BRIAN, G. R.; BOSTON, R. S. Comparative analysis of BiP gene expression in maize endosperm. **Gene**, n. 204, p. 105-113, 1997.

YOSHIDA, H.; OKADA, T.; HAZE, K.; YANAGI, H.; YURA, T.; NEGISHI, M.; MORI, K. Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription 6 α and 6 β that activates the mammalian unfolded protein response. **Mol. Cel. Biol.**, v. 4, n. 21, p. 1239-1248, 2001.

YOUNG, B. P.; CRAVEN, R. A.; REID, P. J.; WILLER, M.; STIRLING, C. J. Sec63p and Kar2p are required for the translocation of SRP-dependent precursors into the yeast endoplasmic reticulum in vivo. **EMBO J.**, v. 20, p. 262-271, 2001.