

SÔNIA MADALI BOSEJA CAROLINO

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA BiP DE SOJA
INDUZIDA POR ESTRESSE OSMÓTICO E DÉFICIT HÍDRICO

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

SÔNIA MADALI BOSEJA CAROLINO

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA BiP DE SOJA
INDUZIDA POR ESTRESSE OSMÓTICO E DÉFICIT HÍDRICO

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

APROVADA: 28 de dezembro 2001.

Prof. Wagner Campos Otoni
(Conselheiro)

Prof. Carlos A. Martinez Y Huaman
(Conselheiro)

Prof. Sérgio H. Brommonshenkel

Prof^ª. Maria Cristina Baracat Pereira

Prof^ª. Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

A Deus e
à minha família.

AGRADECIMENTOS

À professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela orientação e dedicação neste trabalho.

Aos meus conselheiros, professores Wagner Campos Otoni e Carlos A. Martinez, pelo apoio e pelos ensinamentos.

A todos os professores e funcionários do Programa de Fisiologia Vegetal, pelo agradável convívio.

Aos meus amigos de laboratório Andréa, Joci, Adriana, Luís, Leonardo, Maxwel, Alessandro e Antônio, pelos bons momentos vividos juntos, e principalmente ao Cristiano, pela importante contribuição para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Núcleo de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO), pela colaboração.

À amiga Alessandra, secretária do BIOAGRO, pela amizade e presteza.

Ao amigo Eduardo, secretário da Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, pela atenção e cooperação.

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

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao seu Departamento de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realizar meu treinamento.

BIOGRAFIA

SÔNIA MADALI BOSEJA CAROLINO, filha de Noraldino Ramaioli Carolino e Sônia Boseja Carolino, nasceu em Ponte Nova, Estado de Minas Gerais.

Em 1993, bacharelou-se e licenciou-se em Química pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais.

Em fevereiro de 1997, concluiu o Curso de Mestrado em Agroquímica na UFRV.

Durante o ano de 1997, foi contratada como bolsista de DTI e desenvolveu suas atividades no laboratório de Biologia Molecular de Plantas do BIOAGRO/UFV.

Em dezembro de 2001, concluiu Programa de Pós-Graduação, em nível de doutorado, em Fisiologia Vegetal nessa mesma Universidade, com a defesa desta tese.

ÍNDICE

RESUMO	viii	
ABSTRACT	x	
1. INTRODUÇÃO GERAL	1	
2. REVISÃO DE LITERATURA	4	
2.1. Proteínas “heat shock protein” (Hsp)	4	
2.2. Interação de BiP com co-chaperones	5	
2.3. Via de dobramento de proteínas no RE	6	
2.4. Vias de respostas ao estresse no retículo endoplasmático	8	
2.5. Controle de qualidade da célula	12	
2.6. Modificações pós-traducionais de BiP	13	
CAPÍTULO I		
MODIFICAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL E ATIVIDADE DE LIGAÇÃO A PROTEÍNAS DE BiP SOB ESTRESSE OSMÓTICO		15
1. INTRODUÇÃO	16	
2. MATERIAL E MÉTODOS	18	
2.1. Tratamento com tunicamicina e PEG de células de soja em suspensão	18	
2.2. Indução do estresse por ataque de inseto	18	
2.3. Gradiente de sacarose	19	
2.4. Eletroforese SDS-PAGE e “immunoblotting”	19	

2.5. Ensaio de co-imunoprecipitação	20
3. RESULTADOS	23
3.1 O estresse osmótico induzido por PEG estimula a fosforilação de BiP mas não sua oligomerização	23
3.2. As isoformas de BiP induzidas por estresse hídrico exibem atividade de ligação à proteína	26
4. DISCUSSÃO	30
CAPÍTULO II	
O ACÚMULO DE BiP EM PLANTAS TRANSGÊNICAS CONFERE TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO.....	
1. INTRODUÇÃO	34
2. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1. Transformação e análise das plantas	38
2.2. Extração de proteínas e “immunoblotting”	38
2.3. Indução de estresse hídrico em plantas transgênicas de tabaco	39
2.4. Teor relativo de água	40
2.5. Parâmetros fisiológicos	43
2.6. Atividade da superóxido dismutase	43
3. RESULTADOS	45
3.1. Obtenção e análise das linhagens transgênicas	45
3.2. Os níveis de BiP correlacionam-se com a manutenção da turgescência de planta de tabaco sob condições de déficit hídrico	47
3.3. Baixos níveis endógenos de BiP anulam a tolerância ao estresse hídrico	49
3.4. Flutuações dos níveis de BiP correlacionam-se inversamente com a atividade de enzimas induzidas por estresse oxidativo	56
4. DISCUSSÃO	58
3. CONCLUSÕES GERAIS.....	64

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
-------------------------------------	----

RESUMO

CAROLINO, Sônia Madali Boseja, D.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2001. **Caracterização funcional da proteína BiP de soja induzida por estresse osmótico e déficit hídrico.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Conselheiros: Carlos Alberto Martinez Y Huaman e Wagner Campos Otoni.

O chaperone molecular residente do retículo endoplasmático (RE), denominado BiP “Binding Protein”, é membro da classe Hsp70 de proteína de estresse, sendo regulado em resposta a condições de estresse do RE, como acúmulo de proteínas desdobradas e desequilíbrio na homeostase de cálcio. Em condições normais, BiP de mamíferos sofre fosforilação e oligomerização. As modificações de BiP de mamíferos são restritas à forma oligomérica, sendo que a forma monomérica inalterada representa a espécie ativa. Recentemente, foi demonstrado que BiP de soja existe como formas fosforiladas e desfosforiladas interconvertíveis, e o equilíbrio pode ser deslocado em qualquer direção em respostas a diferentes estímulos. Em contraste com o tratamento com tunicamicina, o estresse osmótico estimula a fosforilação das espécies de BiP em cultura de células de soja. Nesta investigação foi demonstrado que, independentemente do seu estado de oligomerização, as isoformas de BiP de folhas, sob déficit hídrico, exibem atividade de ligação a proteínas, indicando que a regulação de BiP de plantas pode diferir de outros

eucariotos. Foi também caracterizado o estado de oligomerização das isoformas de BiP de soja induzidas por estresse osmótico e tunicamicina. Assim como em células de mamíferos, tanto a forma oligomérica como a monomérica foram detectadas em células de soja não-estressadas. A desfosforilação de BiP mediada por tunicamicina é acompanhada pela conversão da forma oligomérica para a monomérica. Entretanto, a forma fosforilada de BiP induzida por estresse osmótico existe predominantemente como espécie monomérica. Esses resultados indicam que a fosforilação de BiP induzida por estresse osmótico não media a oligomerização da proteína, e pode ter uma função regulatória distinta. A função protetora de BiP em planta foi examinada em condições de estresse hídrico. Plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* expressando constitutivamente níveis elevados de BiP ou seu cDNA anti-senso foram sujeitas à condição de déficit hídrico progressivo. Elevados níveis de BiP nas linhagens senso conferiram tolerância ao déficit hídrico durante o crescimento das plantas. Sob seca progressiva, os níveis de BiP foliar correlacionaram com a manutenção da turgescência celular e com o conteúdo de água da parte aérea. O efeito protetor da superexpressão de BiP contra estresse hídrico foi anulado pela repressão anti-senso. Embora a superexpressão de BiP previna a desidratação celular, a condutância estomática e a taxa transpiratória em folhas senso estressadas foram superiores em relação às folhas controles e anti-senso. Em plantas anti-senso, a indução do sistema de defesa antioxidativo foi maior do que nas plantas controle, enquanto que em folhas senso estressadas a indução da atividade da superóxido dismutase não foi observada. Coletivamente, esses resultados evidenciam que a superexpressão de BiP em plantas pode conferir tolerância à seca, prevenindo o estresse oxidativo endógeno.

ABSTRACT

CAROLINO, Sônia Madali Boseja, D.S., Universidade Federal de Viçosa, December, 2001. **Functional characterization of the soybean BiP protein induced by osmotic stress and water deficit.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Committee Members: Carlos Alberto Martinez Y Huaman and Wagner Campos Otoni.

The endoplasmic reticulum molecular chaperone BiP is a member of the Hsp70 family of stress-related protein, that is up-regulated in response to ER-stress condition, such as accumulation of unfolded protein and disruption of the cellular Ca^{2+} homeostasis. The mammalian BiP undergoes phosphorylation and oligomerization under normal conditions. Modification of mammalian BiP is restricted to the oligomeric form and the monomeric unmodified form represents the active species. In fact, the glycosylation inhibitor tunicamycin induces dephosphorylation of mammalian BiP, which is accompanied by conversion of the oligomeric BiP pool to the monomeric form. Recently, we have shown that the soybean BiP exists in interconvertible phosphorylated and unphosphorylated forms and the equilibrium can be shifted to either direction in response to different stimuli. In contrast to tunicamycin treatment, osmotic stress stimulates phosphorylation of BiP species in soybean cultured cells. Here we demonstrated that despite their phosphorylation state, the BiP isoforms from water-stressed leaves exhibited

protein-binding activity, suggesting that plant BiP functional regulation may differ from other eukaryotic BiPs. We have further characterized modifications of the tunicamycin and osmotic stress-induced soybean BiP forms. Like in mammalian cells, both monomeric and oligomeric soybean BiP species were detected in untreated soybean cells. Tunicamycin-mediated dephosphorylation of BiP is accompanied by the conversion of the oligomeric form to its monomeric form. Likewise, the hyperphosphorylated osmotic stress-induced soybean BiP exists predominantly as monomeric species. These results suggest that osmotic stress-induced phosphorylation of soybean BiP does not mediate oligomerization of the protein and may serve as a distinct regulatory function. We have also examined the protective function of BiP against water stress at the whole plant level. Transgenic *Nicotiana tabacum* plants constitutively expressing elevated levels of BiP or its antisense cDNA were subjected to progressive drought. Elevated levels of BiP in transgenic sense lines conferred tolerance to water deficit during plant growth. Under progressive drought, the leaf BiP levels correlated with the maintenance of the shoot cellular turgor and water content. The protective effect of BiP overexpression against water stress was disrupted by expression of an antisense BiP cDNA construct. Although overexpression of BiP prevented cellular dehydration, the stomatal conductance and transpiration rate in droughted sense leaves were higher than in control and antisense leaves. In antisense plants, the water-stress stimulation of the antioxidative defenses was higher than in control plants, whereas in droughted sense leaves an induction of superoxide dismutase activity was not observed. Collectively, these results demonstrate that overexpression of BiP in plants may confer tolerance to drought by preventing endogenous oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A seca é o principal fator limitante na produtividade das plantas. O efeito primário do déficit hídrico nas plantas é a diminuição do conteúdo de água e potencial hídrico. A diminuição do potencial hídrico afeta o movimento da água para as regiões de crescimento e a taxa de alongamento. O déficit hídrico prejudicam a morfologia e o metabolismo celular da planta. Entretanto, as respostas fisiológicas desta geralmente variam de acordo com as condições de aplicação do déficit hídrico e o estágio de desenvolvimento da planta.

O estresse hídrico induz várias respostas fisiológicas e bioquímicas na planta. Uma variedade de genes que respondem à seca tem sido descrita (Ingram e Bartels, 1996). Os genes induzidos durante condições de estresse hídrico funcionam não somente na proteção da célula à seca pela produção de proteínas metabólicas importantes, mas também na regulação de genes envolvidos na via de transdução de sinal como resposta ao déficit hídrico. Desse modo, o produto desses genes é classificado em dois grupos: um contém proteínas transdutores envolvidas na regulação da transdução de sinal; e o outro inclui proteínas que atuam no mecanismo de tolerância ao estresse, como proteínas que formam o canal de passagem de água através da membrana (aquaporinas), enzimas requeridas para biossíntese de vários osmoprotetores, proteases para o “turnover” de proteínas, enzimas de desintoxicação e proteínas que protegem macromoléculas e membranas.

Incluídos nessa última classe estão os chaperones moleculares (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

Esses chaperones compreendem várias famílias altamente conservadas de proteínas não relacionadas que assistem a correta montagem de outros peptídeos, sendo essenciais para a célula em condições normais de crescimento e em períodos de estresses (Feldman e Frydman, 2000). BiP é um chaperone do RE que pertence à família de proteínas relacionadas ao estresse, denominada Hsp70. Durante o processo de translocação co-traducional de proteínas secretórias, BiP associa-se com proteínas recém-sintetizadas, prevenindo interações improdutivas de intermediários de dobramento e subsequente agregação, atuando também no fechamento do poro de translocação, na extremidade voltada para o lúmen (Hamman *et al.*, 1998; Haigh e Johnson, 2002). Como outras Hsp70, a proteína BiP é regulada pela atividade de ATPase (Hartl, 1996; Pedrazzini e Vitale, 1996), que é estimulada por peptídeos sintéticos (Blond-Elguindi *et al.*, 1993)

Em mamíferos e leveduras, a espécie de BiP biologicamente ativa é a forma monomérica inalterada (Freiden *et al.*, 1992). Assim como em mamíferos, em espinafre somente a forma oligomérica é fosforilada *in vitro* (Anderson *et al.*, 1994). Entretanto, em soja, o estresse osmótico estimula a fosforilação dos monômeros de BiP em cultura de células em suspensão e em folhas estressadas (Cascardo *et al.*, 2000). Como as espécies de BiP biologicamente ativas são modificadas em condições de estresse osmótico, o primeiro capítulo desta investigação foi avaliar o estado de oligomerização e a atividade de chaperones das formas de BiP induzidas por estresse hídrico.

A proteína BiP é sintetizada em baixos níveis em condições normais de crescimento, sendo induzida pelo acúmulo de proteínas mal dobradas no RE, por meio de uma cascata de sinalização denominada via de resposta à proteína mal dobrada (UPR) (Gething e Sambrook, 1992; Lee, 1992). Esta via é caracterizada pela regulação transcricional coordenada de BiP e outros chaperones do RE, os quais estão envolvidos no dobramento de proteínas. Assim, a expressão de BiP de plantas é induzida por uma variedade de

condições de estresse bióticos e abióticos, cujo denominador comum é o acúmulo de proteínas mal dobradas no RE (Anderson *et al.*, 1994; Denecke *et al.*, 1995; Kalinski *et al.*, 1995; Figueiredo *et al.*, 1997). Considerando a atividade de chaperone de BiP, acredita-se que ele tenha função protetora no RE evitando a agregação de proteínas. Consistente com esta hipótese, estudos recentes têm demonstrado o papel protetor de BiP contra o estresse no RE em células cultivadas *in vitro* (Li e Lee, 1991; Li *et al.*, 1992; Gomer *et al.*, 1991; Morris *et al.*, 1997; Leborgne-Castel *et al.*, 1999). Entretanto, estes estudos não foram estendidos a organismos multicelulares intactos. Assim, no segundo capítulo desta investigação foi avaliado o efeito protetor de BiP na tolerância ao estresse hídrico em tabaco transgênico (*Nicotiana tabacum* L. cv. Havana), expressando um cDNA de BiP de soja na orientação senso e anti-senso.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Proteínas “heat shock protein” (Hsp)

Os chaperones moleculares são uma família única de proteínas, cuja função é mediar a montagem correta de outras proteínas, não participando da estrutura final das proteínas-substrato. Os chaperones são, em sua maioria, proteínas denominadas “heat shock proteins” (Hsp). Em particular, existe uma extensa família, conhecida como Hsp70, que participa de diversos processos, incluindo dobramento de proteínas recém-sintetizadas, tráfego intracelular de proteínas e proteção durante o estresse (McKay, 1993).

As proteínas da família Hsp70 são formadas por dois domínios funcionais: o domínio aminoterminal, altamente conservado, de ligação a ATP; e o domínio carboxiterminal, de ligação ao substrato (Milarski e Morimoto, 1989). As proteínas Hsp70s são reguladas pelo acoplamento da atividade de ATPase do domínio aminoterminal e ciclo de ligação e liberação de substrato do domínio carboxiterminal (Bukau e Horwich, 1998). A ligação de ATP ao domínio aminoterminal leva ao estado de baixa afinidade, caracterizado pela rápida troca de substrato. A hidrólise de ATP induz uma mudança conformacional que leva ao estado de alta afinidade, caracterizado pela baixa velocidade de liberação do polipeptídeo-sustrato (Schmid *et al.*,

1994). Acredita-se que esse ciclo impede a associação irreversível dos polipeptídeos e promove um processo de dobramento mais eficiente. A atividade máxima das Hsp70 requer a presença de co-chaperones como DnaJ, ou seu homólogo, e GrpE, no caso de procariotos e mitocôndria (Gamer *et al.*, 1992). Os melhores exemplos na literatura são com DnaJ de *E. coli* e vários homólogos em levedura, como Mdj1 e Ydj1 (Cyr *et al.*, 1994). A fraca atividade ATPase dos Hsp70, com uma taxa de “turnover” cerca de 0,02-0,05 minutos⁻¹, é lenta em relação à velocidade de dobramento de proteínas (Bukau e Horwich, 1998; Schmid *et al.*, 1994). Em *E. coli*, o co-chaperone DnaJ atua especificamente a reação de hidrólise de ATP do Hsp70, DnaK (Laufen *et al.*, 1999), ressaltando-se que GrpE aumenta a taxa de liberação de ADP (Packschies *et al.*, 1997). A atividade simultânea dos dois co-chaperones pode aumentar a atividade de ATPase de DnaK de 20 a 200 vezes (Pierpaoli *et al.*, 1997).

A maioria dos eucariotos possui múltiplas cópias dos Hsp70, encontrados em todas as organelas. Alguns membros mais conhecidos são Hsc70 (ou Hsp73), forma constitutiva do citossol; Hsp70 (ou Hsp72), forma citossólica induzida; mHsp70 (ou Grp75), forma do Hsp70 mitocondrial; e BiP (ou Grp78), a forma Hsp70 do RE em plantas e mamíferos, conhecido como Kar-2 em leveduras (Fink, 1999).

2.2. Interação de BiP com co-chaperones

A atividade de chaperone de BiP, como de outros Hsps, é estimulada por membros da família de co-chaperones, Hsp40, também conhecida como DnaJ (Suh *et al.*, 1999). Estes co-chaperones são caracterizados pela presença de uma seqüência de 75 aminoácidos altamente conservada no aminoterminal, que é responsável pela interação com os Hsp70 (Greene *et al.*, 1998). Em humanos, foi clonado e caracterizado um novo chaperone Hsp40, chamado de HEDJ (Yu *et al.*, 2000). Experimentos *in vitro* demonstraram que o domínio J de HEDJ interage com BiP de maneira dependente de ATP, sendo capaz de

estimular sua atividade de ATPase (Yu *et al.*, 2000). Assim também, uma proteína tipo DnaJ, MmDjC7, em camundongos, estimula a atividade de ATPase de BiP, Hsc70 e DnaK em diferente estequiometria, sugerindo que a nova proteína DnaJ possa, possivelmente, interagir com mais de um Hsp70 (Kroczyńska e Blond, 2001).

Durante a translocação pós-traducional de proteínas para o lúmen do RE de leveduras, BiP interage com o domínio J de Sec63, ancorado na membrana do RE (Brodsky e Schekman, 1993). Acredita-se que Sec63, o qual faz parte do canal de translocação, atrai BiP para o sítio de importação de proteínas via domínio J. Sob ativação por Sec63, BiP liga-se à cadeia polipeptídica nascente e assiste a importação da proteína (Matlack *et al.*, 1999). BiP participa também na retrotranslocação de proteínas que não conseguiram obter sua conformação funcional e que permaneceram no RE. As funções de BiP na importação e exportação de proteínas parecem ser distintas. Provavelmente, na retrotranslocação BiP interage com outro Hsp40, diferente de Sec63 (Brodsky *et al.*, 1999). Além disso, BiP controla a abertura do poro do canal de translocação, sendo requerido para selar o lado deste voltado para o lúmen durante a integração de proteínas de membrana (Hamman *et al.*, 1998). Essa atividade requer hidrólise de ATP, indicando que BiP deve utilizar mecanismos similares à sua função de chaperone para selar o poro (Haigh e Johnson, 2002).

2.3. Via de dobramento de proteínas no RE

Vários chaperones moleculares e enzimas assistem ao dobramento de proteínas recém-sintetizadas no RE, com a ressalva de que as proteínas interagem diferentemente com os chaperones. Algumas interagem inicialmente com BiP e outras com a via calnexina/calreticulina. No caso de glicoproteína, a escolha do chaperone, na etapa inicial da via de dobramento, depende da localização do N-glicosídeo na cadeia nascente. Molinari e Helenius (2000) mostraram que glicoproteínas do vírus SFV (“vírus forest

Semliki”) que possuem o N-glicosídeo próximo ao aminoterminal, como a p62, entram diretamente na via calnexina/calreticulina sem prévia associação com BiP. Entretanto, quando a via calnexina/calreticulina é inibida, a proteína p62 associa-se à BiP. Isso mostra que a presença do N-glicosídeo não impede a interação da proteína com BiP, mas promove a associação com chaperones alternativos. Entretanto, as glicoproteínas que possuem o N-glicosídeo próximo ao carboxiteminal, como a proteína E1, associam-se com BiP tão logo são sintetizadas (Molinari e Helenius, 2000). Assim, a direta interação com o complexo calreticulina/calnexina sem prévia ligação com BiP foi observada somente em glicoproteínas, cujo N-glicosídeo se localiza entre os 50 resíduos iniciais na região aminoterminal das glicoproteínas.

No que se refere a glicoproteínas, a função de chaperone da calnexina e de BiP foi analisada com mais detalhes *in vitro* (Stronge *et al.*, 2001). Ambos os chaperones preveniram efetivamente a agregação da citrato sintase não-glicosilada, indicando que o sítio de ligação da calnexina é capaz de funcionar similarmente ao sítio de BiP. Entretanto, para o caso de substratos como glicoproteínas, o sítio lecitina da calnexina mostrou significativa vantagem sobre BiP na supressão da agregação. A calnexina também cooperou com BiP e o domínio J de Sec63p na via de dobramento de substratos glicosilados e não-glicosilados, de maneira dependente de ATP. O sítio lecitina da calnexina foi essencial no redobramento de glicoproteínas. Desse modo, considerando proteínas glicosiladas, a calnexina mostrou vantagens em relação a outros chaperones (Stronge *et al.*, 2001).

Evidências na literatura têm demonstrado que os Hsps atuam de modo aditivo. Acredita-se que o dobramento de proteínas recém-sintetizadas *in vivo* seja facilitado pela interação cooperativa de chaperones. No citossol de células de mamíferos, Hsp70 e Hsp90 são as classes de chaperones que predominam na interação com peptídeos nascentes. Em *E. coli*, o homólogo Hsp104 (ClpB) coopera com outros grupos de chaperones (DnaK, DnaJ, GrpE) para impedir e reverter os agregados de proteínas. Esses resultados indicam a existência de uma cooperação funcional entre Hsp100, Hsp70 e Hsp40, tanto em procarioto

como em eucarioto (Zolkiewski, 1999). Lee e Vierling (2000), trabalhando com ervilha, demonstraram que a família de pequenos Hsps (sHsp) funciona em cooperação com Hsp70 para reativar proteínas desnaturadas. A proteína luciferase desnaturada pelo calor liga-se ao sHsp18.1 e se associa com Hsc/Hsp70 de diversos eucariotos e procariotos e seus homólogos DnaJs para ser redobrada. Em humanos, cinco chaperones participam do processamento e transporte da COMP (proteína oligomérica da matriz de cartilagem). Análises de imunoprecipitação e “immunoblotting” indicaram que calreticulina (CRT), dissulfeto isomerase (PDI) e Grp94 (“glucose regulated protein”) associam-se e transportam a proteína COMP normal e mutante; e BiP associa-se ao mutante COMP (Hecht *et al.*, 2001).

2.4. Vias de respostas ao estresse no retículo endoplasmático

As células respondem ao aumento da atividade secretória resultante de eventos do desenvolvimento ou de condições de estresses fisiológicos que promovem acúmulo de proteínas mal dobradas no RE (Boston *et al.*, 1996; Denecke, 1996; Gething, 1999). O acúmulo de proteínas mal dobradas no RE induz uma resposta conhecida como UPR (resposta à proteína mal dobrada), que resulta na indução de chaperones residentes no RE, principalmente a proteína BiP. Essa via de sinalização interorganelar foi elucidada em leveduras e envolve uma cinase transmembrana do RE (Ire1) e um fator de transcrição (Hac1p) com um domínio zipper de leucina, cujo nível é modulado por uma via de processamento do mRNA altamente regulada e independente do “spliceosome” (Shamu e Walter, 1996; Sidrauski e Walter, 1997; Yoshida *et al.*, 1998).

Em células de mamíferos e protoplastos de folha de tabaco foi demonstrado que BiP atenua o estresse do RE (Morris *et al.*, 1997; Laitusis *et al.*, 1999; Leborgne-Castel *et al.*, 1999). Em condições de estresse, ocorre rápida desnaturação ou perda de função de proteínas. BiP associa-se às proteínas desnaturadas, impedindo a formação de agregados, que por sua vez

poderiam produzir danos permanentes na célula. Células expressando níveis elevados de BiP mostraram reduzida sensibilidade à via UPR (Bertolotti *et al.*, 2000).

BiP também age como sensor na via UPR monitorando o estresse do RE. O requerimento da proteína BiP para interagir com proteínas mal dobradas no RE previne a interação de BiP com a maquinaria da UPR (Ire1). Em condições normais, BiP liga-se ao domínio luminal de Ire1, inibindo sua ativação. Sob estresse, Ire1 livre torna-se ativa e sofre clivagem proteolítica de seu domínio citossólico. O domínio citossólico de Ire1 acumula-se no núcleo, onde atua como transcritor de genes específicos (Lee *et al.*, 2002). Duas proteínas Ire1 foram caracterizadas em células de humanos (hIre1) e camundongos (mIre1). A superexpressão das hIre1 e mIre1 ativa constitutivamente a via UPR, enquanto a expressão da proteína mutante que não tem atividade de cinase reprime a UPR (Tirasophon *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998).

Recentemente, tem sido demonstrado, em células de mamíferos, que o fator de transcrição, ATF6, é crítico para indução de BiP (Haze *et al.*, 1999). O domínio aminoterminal do ATF6 é responsável pela ativação da transcrição, enquanto a sua região central possui um domínio b-zip que é característica de algumas proteínas de ligação ao DNA. Sob condições de estresse, a região aminoterminal da proteína, localizada no citossol, é liberada via proteólise (Haze *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 2000). Após a clivagem proteolítica, o fragmento aminoterminal, que possui vários sinais de localização nuclear em potencial, transloca-se para o núcleo, no qual se associa a várias outras proteínas para formar um complexo que se liga ao ERSE (elemento de resposta à proteína mal dobrada), ativando a transcrição de proteínas de resposta ao estresse do RE. O envolvimento de ATF6 na resposta ao estresse do RE foi demonstrado em células de mamíferos (Haze *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 2000). As células de miócitos cardíacos possuem o retículo sarcoplásmico (SR), uma forma especializada do RE, que é responsável pela manutenção dos níveis de cálcio. A ausência de cálcio no SR promoveu rápida translocação de ATF6 do

RE para o núcleo, ativando o promotor da SERCA2, ATPase de cálcio do SR, e produzindo aumento nos níveis dessa proteína (Thuerauf *et al.*, 2001).

A célula também responde ao estresse do RE por meio da inibição da síntese de proteínas. Recentemente, uma nova proteína cinase de mamíferos, PERK, que possui 20% de homologia com o domínio luminal de Ire1, foi caracterizada (Harding *et al.*, 1999). PERK, assim como Ire1, é uma cinase transmembrana que sofre proteólise sob estresse e fosforila o co-fator da tradução α IF2, inibindo a tradução, o qual pode potencialmente levar à apoptose da célula (Gething, 1999; Bertolotti *et al.*, 2000). A superexpressão de PERK em células atenua a inibição de síntese de proteínas provocada por estresses típicos do RE (Harding *et al.*, 2000).

O estresse prolongado no RE pode levar à apoptose (morte celular programada), porém o mecanismo do RE que engatilha o processo de apoptose não está claro (Yu *et al.*, 1999). Recentemente, foi descoberta uma nova organela encontrada exclusivamente em células de planta, chamada ricinossomo (vesícula precursora de protease), que se origina do RE em tecidos senescentes. O ricinossomo foi descrito e caracterizado inicialmente no endosperma de *Ricinus communis* (Schimid *et al.*, 2001). Uma evidência bioquímica da origem do ricinossomo é a presença em alta concentração da protease pró-cisteína (CysEP) contendo a seqüência carboxiterminal KDEL. Como células de plantas em processo de senescência por morte celular programada expressam essa endoprotease cisteína, a sua presença indica que ela sai direto do RE para o ricinossomo, e a via secretora não está envolvida na biogênese do ricinossomo (Schmid *et al.*, 2001). Assim, a biogênese do ricinossomo parece ser similar à formação de corpos protéicos de reserva em milho e arroz (Li *et al.*, 1993). O envolvimento da proteína BiP e PDI (dissulfeto isomerase) na formação dos ricinossomos foi demonstrado por ensaios de “immunoblotting” e imunofluorescência. Ambas as proteínas apareceram associadas com a CysEP nos ricinossomos (Schmid *et al.*, 2001).

Em mamíferos, foi demonstrado aumento na sensibilidade à apoptose em células do neurônio, ou células epiteliais, quando a expressão de BiP foi

reduzida pela construção anti-senso (Yu *et al.*, 1999). Em ratos, nas linhagens de células de fibrossarcoma cancerosas, as quais produzem progressivos tumores, o vetor BiP anti-senso promoveu a regressão do tumor, devido à resposta citotóxica do linfócito T (CTL) (Jamora *et al.*, 1996). Essas células cancerosas normalmente superexpressam BiP e são menos suscetíveis ao controle imune.

Tem sido demonstrado que a expressão de BiP de plantas responde a uma variedade de estresses abióticos e bióticos, como estresse hídrico, infestação com fungo, ataque por inseto, estresse nutricional e elicitores de resposta da planta à patogênese (Anderson *et al.*, 1994; Kalinski *et al.*, 1995, Figueiredo *et al.*, 1997; Fontes *et al.*, 1999). Estudos recentes na regulação de BiP em resposta a condições de estresses fisiológicos têm demonstrado que mecanismos regulatórios complexos e múltiplos controlam a expressão de BiP de plantas. Durante a interação patógeno-planta e em condições de estresse osmótico, a indução de BiP é sinalizada por vias de transdução diferentes da via UPR (Jelitto-Van Dooren *et al.*, 1999; Cascardo *et al.*, 2000). Além disso, em algumas espécies de plantas, condições de estresses específicos e eventos de desenvolvimento alteram o acúmulo de mRNA de BiP e da proteína em diferentes níveis, indicando que mecanismos pós-traducionais possam estar envolvidos na regulação da síntese de BiP de plantas (Anderson *et al.*, 1994; Kalinski *et al.*, 1995). Alternativamente, ou adicionalmente, essas discrepâncias no nível do mRNA e da proteína BiP podem ser o resultado de uma expressão diferencial da família de genes BiP de plantas, uma vez que o genoma de diversas espécies de plantas é representado por múltiplos genes de BiP (Kalinski *et al.*, 1995; Denecke *et al.*, 1991; Figueiredo *et al.*, 1997; Wrobel *et al.*, 1997). De fato, tem sido relatado que os membros da família gênica de BiP de soja são diferencialmente regulados durante o desenvolvimento e em diferentes órgãos (Carcardo *et al.*, 2001; Kalinski *et al.*, 1995). Além disso, enquanto todos os genes de BiP de soja isolados (soyBiPA, soyBiPB, soyBiPC e soyBiPD) são induzidos por tunicamicina, apenas o soyBiPA responde ao estresse osmótico. Entretanto, se os membros

individuais da família gênica de BiP de plantas exibem especificidade ao substrato ou funções distintas, permanece ainda para ser determinado.

Consistente com a indução da expressão de BiP em resposta ao estresse no RE, o ataque de plantas por patógenos induz a síntese de BiP sistematicamente por toda a planta. Além disso, a indução ocorre rapidamente e precede a expressão dos genes que codificam as proteínas relacionadas à patogenicidade (PR). Várias proteínas secretórias são sintetizadas durante a interação planta-patógeno. Assim, a indução da expressão de BiP é requerida como resposta inicial para suportar a síntese de proteínas PR no RE, por meio de uma nova via de transdução de sinal distinta da UPR (Jelitto-Van Dooren *et al.*, 1999). O aumento nos níveis de BiP em células infectadas com viroses também tem sido demonstrado. A infecção do rotavírus e do vírus da hepatite C em células animais induz o aumento dos níveis de BiP (Xu *et al.*, 1998; Liberman *et al.*, 1999). Além disso, para o vírus do herpes, a infecção viral resultou em diferentes níveis de BiP, dependentes da estirpe do vírus. Nas estirpes do vírus do herpes tipo 1 (HSV-1) SP7 e 490, ocorreu aumento dos níveis de BiP, enquanto o acúmulo de BiP na estirpe atenuada KOS foi diminuído. Acredita-se que elevados níveis de BiP em células infectadas por vírus SP7 e 490 devem retardar a morte celular iniciada pelo estresse endógeno induzido pelo vírus ou resposta imune, permitindo, desse modo, que o vírus continue a replicar e, conseqüentemente, a causar a doença (Mao *et al.*, 2001).

2.5. Controle de qualidade da célula

As proteínas secretórias que não atingirem a conformação funcional são retidas no RE e, então, endereçadas para a maquinaria de proteólise no citossol. A proteína BiP participa diretamente desse mecanismo de controle de qualidade da célula. De maneira geral, os principais mecanismos que asseguram a fidelidade da expressão gênica no nível pós-traducional incluem a retenção e degradação associadas ao RE, retorno ao RE de proteínas que

deixaram a organela sem adquirir a conformação apropriada e transporte vesicular retrógrado (Ellgaard *et al.*, 1999). Dentre os processos citados anteriormente, o mais frequente é o mecanismo que envolve a associação de proteínas mal dobradas com chaperones e enzimas de dobramento do RE, sendo BiP o principal componente. Nesta via, proteínas anormais são endereçadas para rotas de degradação no citoplasma após a retenção prolongada no RE (Brodsky e McCracken, 1999). Este processo é chamado de degradação de proteína associada ao RE (ERAD) e exerce papel fundamental no controle de qualidade, degradando seletivamente proteínas que não conseguiram dobrar-se corretamente (Brodsky e McCracken, 1999; Brodsky *et al.*, 1999). O processo ERAD para a maioria das proteínas requer o proteossoma 26S localizado no citossol, indicando que essas proteínas são retrotranslocadas do RE para o citossol (Römisch, 1999).

BiP e outros chaperones são requeridos para facilitar o processo de degradação de proteínas associado ao RE. Em célula de levedura mutante para o gene BiP, *Kar2*, ocorrem a estabilização e agregação de substratos solúveis do processo do ERAD, como CPY* (carboxipeptidase Y vacuolar mutada) e um variante do inibidor de α 1-protease, A1PiZ. O mesmo fenômeno foi observado em células que não expressam o gene que codifica a proteína DnaJ (Jem1p e Scj1p). Em contraste, a deleção do *JEMI* e *SCJ1* teve pouco efeito no processo do ERAD para o caso de proteínas de membrana (Nishikawa *et al.*, 2001). O envolvimento de BiP no processo do ERAD também foi demonstrado pela sua associação com outro substrato da via proteossomal, PrP32, um metabólico neurotóxico mutado (Jin *et al.*, 2000).

2.6. Modificações pós-traducionais de BiP

Além da regulação da expressão de BiP no nível transcricional, a proteína é regulada por modificações pós-traducionais. Em células de mamíferos, BiP é pós-traducionalmente modificada por fosforilação e ADP-ribosilação, existindo um “pool” de formas oligoméricas e monoméricas

interconversíveis (Carlsson e Lazarides, 1983; Hendershot *et al.*, 1987). O domínio carboxiterminal parece ser o único responsável pela propriedade de oligomerização da proteína (Benaroudj *et al.*, 1997; Fouchaq *et al.*, 1999). A ligação do polipeptídeo substrato ao domínio carboxiterminal, ou ligação de ATP ao aminoterminal, promove despolimerização e estabilização dos monômeros. O nível basal da atividade de ATPase de BiP varia com o grau de oligomerização de BiP, ressaltando-se que as formas oligoméricas apresentam menor atividade (Blond-Elguindi *et al.*, 1993). Peptídeos sintéticos que exibem alta afinidade por BiP são também mais eficientes em estimular sua atividade catalítica e estabilizar as espécies monoméricas (Blond-Elguindi *et al.*, 1993; Flynn *et al.*, 1991). Na ausência de substrato, as espécies monoméricas de BiP tornam-se modificadas, sendo a oligomerização favorecida (Blond-Elguindi *et al.*, 1993).

Em plantas, tem sido demonstrado que o estado de fosforilação das isoformas de BiP é diferencialmente regulado em resposta a diferentes condições de estresse abióticos (Cascardo *et al.*, 2001). Enquanto o tratamento de células de plantas com tunicamicina induz desfosforilação das isoformas de BiP, o estresse osmótico estimula a fosforilação da proteína. Contudo, a possível relação entre fosforilação de BiP de plantas e aspectos centrais de sua função molecular, como oligomerização e atividade de ligação à proteína nascente, ainda não foi elucidada e constitui um dos objetivos desta investigação.

CAPÍTULO I

MODIFICAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL E ATIVIDADE DE LIGAÇÃO A PROTEÍNAS DE BiP SOB ESTRESSE OSMÓTICO

1. INTRODUÇÃO

O retículo endoplasmático (RE) fornece um ambiente favorável para a síntese, o dobramento e a montagem de proteínas secretórias e de membranas. A aquisição da conformação correta é um pré-requisito para que as proteínas nascentes deixem o RE e prossigam na via secretora (Pelham, 1989; Denecke, 1996). Um conjunto de proteínas residentes do retículo, incluindo chaperones moleculares, auxiliam nesse processo de dobramento correto e montagem de complexos oligoméricos no lúmen do RE (Denecke, 1996; Gething e Sambrook, 1992; Hammond e Helenius, 1995). A proteína BiP é um dos chaperones moleculares mais bem caracterizados do RE.

A proteína BiP existe como formas monoméricas e oligoméricas interconversíveis e é regulada pós-traducionalmente por modificações como fosforilação e ADP-ribosilação (Carlsson e Lazarides, 1983; Hendershot *et al.*, 1987). Essas modificações ocorrem assim que BiP dissocia-se de proteínas recém-sintetizadas, na presença de ATP, e podem ser revertidas sob condições de estresses que aumentam o nível de polipeptídeos mal dobrados no RE. Uma vez que em mamíferos as modificações por fosforilação e ADP-ribosilação parecem ser restritas às formas oligoméricas de BiP, que não se associam a polipeptídeos nascentes, acredita-se que os monômeros, que correspondem às formas de BiP não modificadas, sejam as espécies biologicamente ativas

(Freiden *et al.*, 1992). A forma monomérica livre, que corresponde à forma ativa de BiP, é um componente fundamental da função constitutiva do RE. Em células de mamífero, foi demonstrado que o monômero de BiP atua como modulador de vários processos celulares básicos associados ao RE, incluindo regulação da cinase eIF-2 e da tradução de mRNA, regulação de sua própria expressão, catálise no processo de dobramento de proteínas e endereçamento de proteínas mal dobradas para a via de degradação (Laitusis *et al.*, 1999).

O estado de fosforilação de BiP de planta foi examinado em cultura de células em suspensão de soja e em plantas submetidas a estresse hídrico (Cascardo *et al.*, 2000). Em condições normais, tanto a forma fosforilada como a forma desfosforilada são encontradas em cultura de células de soja, de maneira similar à modificação pós-traducional que ocorre em BiP de mamíferos. O tratamento das células com tunicamicina promove a desfosforilação de BiP de soja, enquanto que o estresse osmótico estimula a sua fosforilação em cultura de células e em folhas estressadas (Cascardo *et al.*, 2000). Uma vez que as modificações de BiP em células de mamíferos são restritas às formas oligoméricas que são consideradas inativas, o objetivo principal desta investigação foi avaliar a possível relação entre fosforilação de BiP da soja e aspectos centrais de sua função como chaperone molecular. Assim, o estado de oligomerização e a atividade de ligação a proteínas das formas de BiP induzidas por estresse hídrico foram avaliados, como uma etapa inicial para o entendimento do papel da fosforilação diferenciada na função de BiP durante estresse hídrico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Tratamento com tunicamicina e PEG de células de soja em suspensão

A solução de tunicamicina a 5 mg.mL^{-1} em DMSO foi adicionada à cultura de células de soja em suspensão, no quarto dia após o subcultivo em meio de crescimento MS (Murashige e Skoog, 1962), numa concentração final de 10 mg.L^{-1} , seguida de incubação por 36 horas. Para indução do estresse hídrico, no quarto dia após o subcultivo foi acrescentada uma solução de PEG-8000 (polietileno glicol) 30% (p/v) ao meio de crescimento MS, na concentração final de 10% (p/v), o que correspondeu a um potencial de água de $-1,4 \text{ MPa}$, e incubada durante 36 horas.

2.2. Indução de estresse por ataque de inseto

Plantas de soja da variedade IAC-12 foram cultivadas em casa de vegetação sob condições naturais de luz, umidade relativa e temperatura controlada entre 16 e 32 °C. Para indução do estresse, após a terceira semana do plantio, colocaram-se plantas de soja saudáveis ao lado de plantas infestadas por ácaro, *Tetranychus urticae*, dentro de uma câmara cercada com tela. Sendo as condições da casa de vegetação propícias para o contágio, houve manifestação dos sintomas aproximadamente 20 dias após o contágio.

Coletaram-se as folhas com sinais de maior infestação, que foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3. Gradiente de sacarose

Após o tratamento, as células foram filtradas a vácuo e lisadas em HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM e Triton X-100 0,2% (v/v), numa proporção 1:1. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 10.000 g por 10 minutos, e ao sobrenadante foi adicionado glicerol na concentração final de 3% (v/v).

Extrato protéico (0,2 mL) foi aplicado, cuidadosamente, ao gradiente descontínuo de sacarose 5-20% (p/v). O gradiente foi formado com cinco frações de 0,9 mL cada, nas concentrações de 5,0; 8,75; 12,5; 16,0; e 20,0% (p/v) de sacarose em HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, MgCl_2 10 mM, Triton X-100 a 0,1% (v/v), e incubado durante aproximadamente 12 horas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para atingir o equilíbrio. Os tubos contendo gradientes de sacarose e as amostras foram centrifugados a 45.000 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por seis horas, em um rotor Beckman SW50.1. Similarmente, as amostras das proteínas-padrão (Pharmacia) BSA (67 kDa), aldolase (158 kDa) e catalase (232 kDa) foram individualmente aplicadas ao gradiente de sacarose. Após a centrifugação, 44 frações de 0,1 mL foram coletadas no topo do gradiente.

2.4. Eletroforese SDS-PAGE e “immunoblotting”

Quantidades equivalentes de amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida contendo SDS, preparado basicamente conforme descrito por Laemmli (1970), exceto a concentração do gel empilhador, que foi de 5% (p/v). O extrato de proteína foi fervido por três minutos em tampão da amostra [glicerol 10% (v/v), SDS 2,3% (p/v), azul-de-bromofenol 0,25% (p/v), 2-mercaptoetanol 5% (v/v) e Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8] antes de ser aplicado no gel. A eletroforese foi conduzida por aproximadamente 12 horas, a 48 V,

no tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM, EDTA 1 mM e SDS 3,5 mM). Para as amostras das proteínas-padrão, o gel foi corado com solução corante [metanol 40% (v/v), CH₃COOH 7,5% (v/v) e “coomassie brilhant blue” R-250 a 0,01% (p/v)], por aproximadamente seis horas, e descorado em solução de metanol 10% (v/v) e ácido acético 7,5% (v/v).

Alternativamente, após a eletroforese, as proteínas das amostras de células de soja, tratadas e não-tratadas, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, usando-se o sistema de transferência da BIORAD, de acordo com as instruções do fabricante. Após a transferência (por aproximadamente uma hora a 700 mA), a membrana de nitrocelulose foi bloqueada com TBS-T [Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, Tween-20 a 0,1% (v/v)] por uma hora, à temperatura ambiente, e incubada com o anticorpo contra BiP, anti-carboxi (Figueiredo *et al.*, 1997) ou anti-BiP soja (Carolino, 1997), numa diluição de 1:1000 por duas a quatro horas, sob agitação. Após o período de incubação, a membrana foi lavada com TBS-T três vezes, por 15 minutos cada, e, em seguida, incubada com o anticorpo contra IgG conjugada à fosfatase alcalina (Sigma), numa diluição de 1:5000, por aproximadamente duas horas. A membrana foi lavada extensivamente com TBS-T e, subseqüentemente, incubada com tampão da enzima (Tris-HCl 100 mM, pH 9,8, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM) por cinco minutos. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada, usando-se os substratos NBT (azul-de-nitrotetrazólio, Gibco/BRL) e BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, Gibco/BRL).

2.5. Ensaio de co-imunoprecipitação

Todos os procedimentos foram conduzidos a 4 °C. Proteínas totais de folhas de soja submetidas ao déficit hídrico foram extraídas com tampão de lise [Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, Triton X-100 a 0,5 % (v/v) e PMSF 1 mM] na proporção de 1:2 (g/mL). Após a incubação do extrato protéico por 10 minutos, o material insolúvel foi removido por centrifugação a

13.000 g, por cinco minutos. As imunoprecipitações, utilizando-se os anticorpos anticarboxi (Figueiredo *et al.*, 1997) ou anti-BiP soja (Carolino, 1997), foram conduzidas na ausência de ATP, enzimaticamente removido pela adição de solução contendo 2 U/mL da enzima apirase, ou na presença de ATP 2 mM.

Os ensaios de imunoprecipitação foram conduzidos como descrito por Li *et al.* (1998) com algumas modificações. O sobrenadante (1 mL) foi incubado por uma hora com 100 µL de suspensão de proteína A-Sepharose (Pharmacia) 50% (v/v) em TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 140 mM) e anti-IgG-agarose de coelho em TBS. Após a incubação, as proteínas que se ligaram de maneira inespecífica com a proteína A ou anti-IgG foram removidas por centrifugação. O sobrenadante foi incubado com 100 µL do anticorpo policlonal anticarboxi (Figueiredo *et al.*, 1997) por duas horas, sob agitação, seguida de incubação com 30 µl de 50% (v/v) de proteína A-Sepharose e anti-IgG-agarose, por quatro horas. Os imunocomplexos foram sedimentados por centrifugação a 8.000 g por cinco minutos. A resina de Sepharose foi extensivamente lavada com 1 mL de tampão de lise e ressuspendida em 40 µL de tampão da amostra para SDS-PAGE (Laemmli, 1970). As proteínas imunoprecipitadas foram analisadas por SDS-PAGE, seguido por “immunoblotting”, usando-se o anticorpo contra BiP de folhas estressadas por déficit hídrico (anti-WSBiP), anti-IgG de galinha conjugado com a fosfatase alcalina (Sigma), como segundo anticorpo, e o sistema de detecção NBT/BCIP (Gibco/BRL).

O anticorpo anti-WSBiP foi gerado em galinha contra uma fração de BiP purificada de folhas estressadas por déficit hídrico, essencialmente como descrito por Fontes *et al.* (1991), à exceção da cromatografia de afinidade em ATP-agarose, que foi substituída por imunoprecipitação, usando-se anticarboxi (Figueiredo *et al.*, 1997) ligado à proteína A-sepharose (Pharmacia). Cerca de 50 µg de BiP purificado de folhas estressadas por déficit hídrico foram emulsificados com reagente adjuvante completo de Freund e injetados subcutaneamente em galinha. Para as injeções

subseqüentes, em intervalos de 14 dias, foi usado adjuvante incompleto de Freund. Após a terceira injeção, os ovos foram coletados e o anticorpo anti-WSBiP, purificado de acordo com Carroll e Stollar (1983).

Para obtenção de membranas microsossomais, folhas de plantas de soja normal e submetidas ao déficit hídrico foram homogeneizadas em Tris-HCl 25 mM, pH 7,0, sacarose 250 mM, DTT 2,5 mM, MgSO₄ 10 mM, gelatina 0,5% (p/v) e PMSF 0,5 mM. A suspensão foi filtrada e centrifugada a 13.000 g, a 4 °C, por 15 minutos. As frações microsossomais foram isoladas por centrifugação a 80.000 g por 45 minutos e, subseqüentemente, por gradiente de sacarose (Helm *et al.*, 1993).

3. RESULTADOS

3.1. O estresse osmótico induzido por PEG estimula a fosforilação de BiP, mas não sua oligomerização

Com a finalidade de determinar a relação entre a fosforilação de BiP de soja e seu estado de oligomerização, a proteína BiP de célula de soja foi fracionada num gradiente de sacarose, e as frações de BiP foram monitoradas por meio de “immunoblottings”. O gradiente de sacarose de 5-20% foi calibrado, inicialmente, com marcadores moleculares (Figura 1). Em células de soja não-tratadas, controle, o “pool” de BiP foi fracionado com massa molecular na faixa de 70 kDa a 150 kDa (Figura 2A). O comportamento dessas espécies durante a sedimentação foi homólogo à formação de monômeros e dímeros de BiP, respectivamente. Esses resultados indicam que, em condições normais, BiP de soja existe como um “pool” de espécies monoméricas e diméricas.

O tratamento de células de soja com tunicamicina induz a síntese e desfosforilação de BiP (Cascardo *et al.*, 2000) e, em células de mamíferos, promove concomitante conversão das formas de BiP oligoméricas para suas formas monoméricas (Blond-Elguindi *et al.*, 1993). Foi também determinado se a desfosforilação de BiP de soja resulta em uma mudança no seu estado de oligomerização. O fracionamento de extratos celulares tratados com

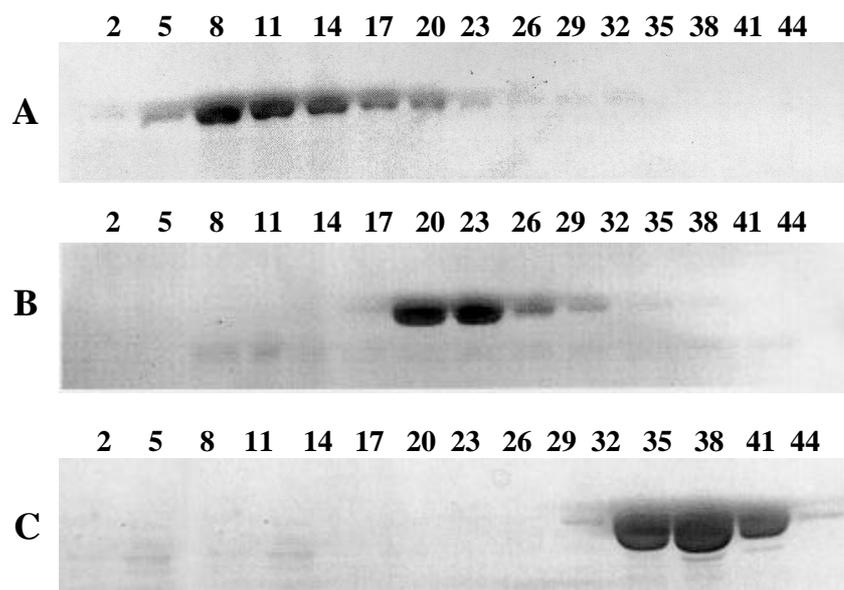


Figura 1- Calibração do gradiente de sacarose. BSA, 67 kDa (A), aldolase, 158 kDa (B) e catalase, 232 kDa (C) foram fracionadas individualmente no gradiente descontínuo de sacarose de 5-20% (p/v), e 44 frações foram coletadas a partir do topo do tubo. Algumas frações foram separadas e analisadas em gel de SDS-PAGE e reveladas com “coomassie brilliant blue”.

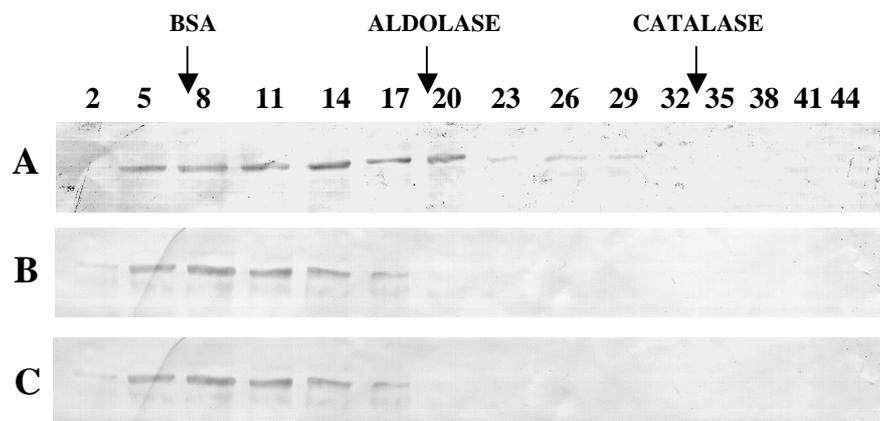


Figura 2- O estado de oligomerização de BiP sob tratamento com tunicamicina e PEG. Extratos protéicos não-tratados, controle (A), tratados com tunicamicina (B) e tratados com PEG (C) de células em suspensão de soja foram fracionados no gradiente descontínuo de sacarose de 5-20% (p/v), e 44 frações foram coletadas a partir do topo do tubo. As frações foram separadas em SDS-PAGE, transferidas para nitrocelulose e sondadas com anticorpo anti-BiP de soja. Setas verticais indicam as frações onde os marcadores moleculares sedimentaram.

tunicamicina em gradiente de sacarose demonstrou que o “pool” de BiP foi completamente convertido à forma de monômeros nessas condições (Figura 2B). Todavia, apesar do estado de fosforilação das espécies de BiP induzidas por estresse osmótico, BiP de células tratadas com PEG também fracionou, predominantemente, como monômeros (Figura 2C). Assim, o estresse osmótico resulta em fosforilação de BiP (Cascardo *et al.*, 2000) e simultânea conversão dos dímeros existentes para os monômeros, diferencialmente modificados. Esses resultados indicaram que a fosforilação de BiP de soja induzida por estresse osmótico possa ter uma função regulatória distinta e, uma vez que não é restrita à forma oligomérica de BiP, deve ocorrer em sítios distintos.

3.2. As isoformas de BiP induzidas por estresse hídrico exibem atividade de ligação à proteína

A observação de que as isoformas de BiP de soja induzidas por tunicamicina e PEG eram diferencialmente modificadas gerou a possibilidade de que as espécies fosforiladas induzidas por estresse osmótico não fossem funcionais ou possuísem função distinta. Uma propriedade inerente dos chaperones moleculares é a sua capacidade de associar com proteínas de maneira dependente de ATP. Para analisar a atividade de se ligar à proteína-substrato, ensaios de co-imunoprecipitação foram conduzidos entre BiP e proteínas induzidas por estresse hídrico. Em folhas estressadas por déficit hídrico, foi observada a indução de um polipeptídeo de 28 kDa (Figura 3A e B, linha 3), que não foi detectado em folhas normais (Figura 3A, linha 1) e folhas submetidas ao ataque de inseto (Figura 3A, linha 2). O anticorpo preparado contra a fração de BiP purificada de folhas estressadas por deficiência de água, referido como anti-WSBiP, reconheceu o polipeptídeo de 28 kDa (Figura 3B, linha 3), enquanto o anticorpo preparado contra a região carboxiterminal de BiP de soja (Figueiredo *et al.*, 1997), referido como

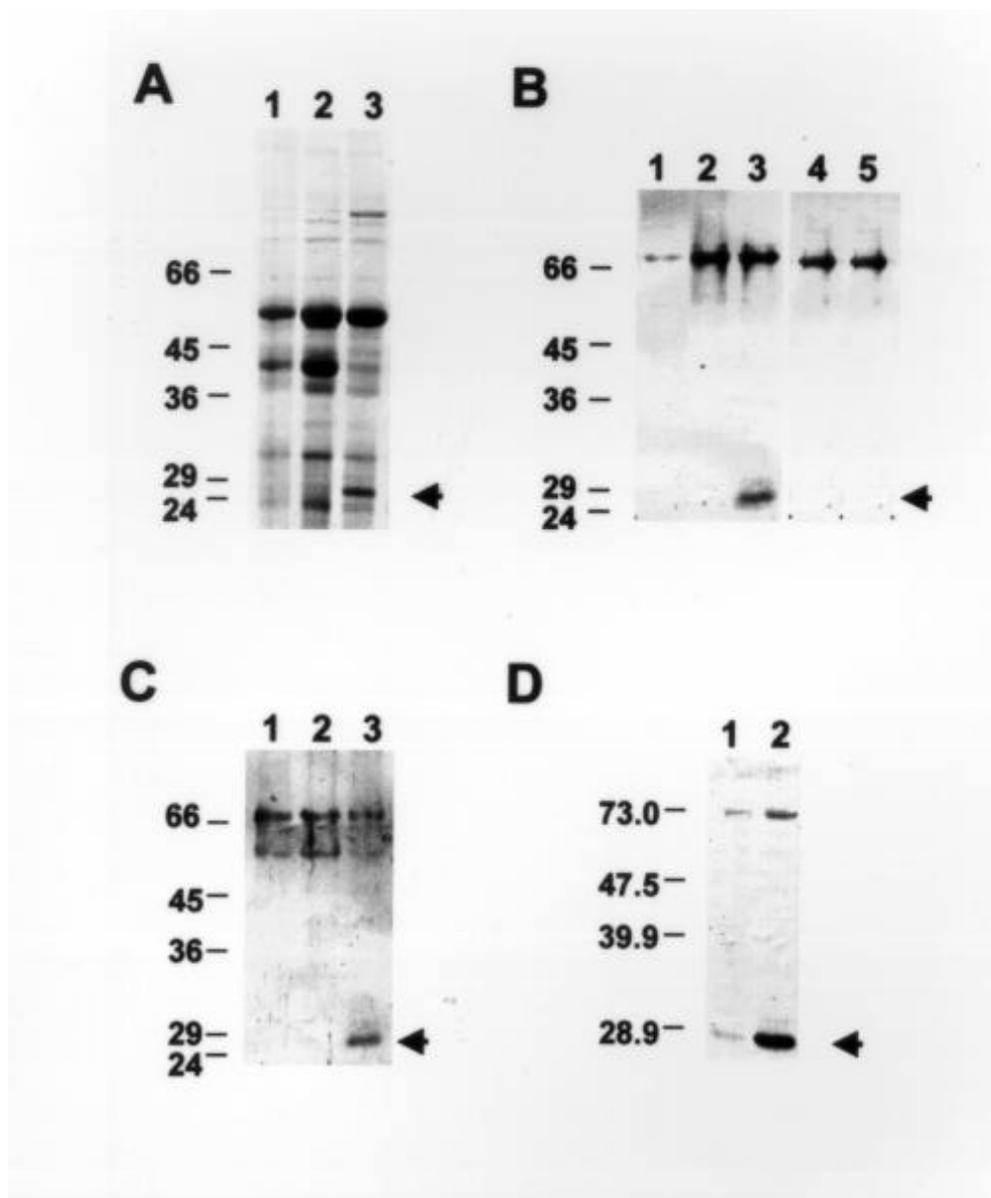


Figura 3- Atividade de ligação à proteína da proteína BiP induzida por PEG (via legenda no verso da página 26)

anticarboxi, foi específico para BiP e não reconheceu o polipeptídeo de 28 kDa induzido por estresse hídrico (Figura 3B, linha 5). A proteína de 28 kDa não era um produto de degradação de BiP, porque os anticorpos preparados contra BiP purificada de sementes de soja (Carolino, 1997) ou milho (Fontes *et al.*, 1991, 1996) reagiram com todas as isoformas de BiP de folhas de soja induzidas por deficiência de água, mas não reconheceram o polipeptídeo de 28 kDa induzido por déficit hídrico (dados não mostrados). Esse resultado indicou que a proteína de 28 kDa não possui epitopos conservados com BiP. Provavelmente, este polipeptídeo corresponde a um contaminante na fração purificada de BiP usada para produção do anticorpo anti-WSBiP. Assim, a reatividade cruzada do anticorpo anti-WSBiP gerou a possibilidade de que o polipeptídeo de 28 kDa contaminante tenha sido co-purificado com BiP como resultado de associação prévia entre essas proteínas nos extratos de folhas de soja submetidas ao déficit hídrico.

A interação específica entre BiP e a proteína de 28 kDa induzida por estresse hídrico foi confirmada por imunoprecipitação de extratos de proteína de folhas submetidas ao déficit hídrico com anticorpo anticarboxi, seguido de “immunoblotting” com anticorpo anti-WSBiP (Figura 3C). Embora o soro anticarboxi não tenha reagido com a proteína de 28 kDa, esta proteína induzida por estresse hídrico foi co-imunoprecipitada pelo anticorpo específico de BiP, na ausência de ATP (Figura 3C, linha 3). A precipitação do polipeptídeo de 28 kDa pelo soro anticarboxi não foi devida a interações inespecíficas, pois anticorpos não relacionados não precipitaram a proteína induzida por estresse hídrico (dados não mostrados). A adição de ATP nos ensaios de imunoprecipitação preveniu a associação das proteínas BiP:28 kDa (Figura 3C, linhas 1 e 2). Este resultado está de acordo com precedentes na literatura que demonstraram que a associação de BiP com o substrato é completamente revertida pela adição de ATP, uma propriedade bioquímica de associações mediadas por chaperones moleculares (Gilinkin *et al.*, 1995; Fontes *et al.*, 1996). Além disso, a proteína de 28 kDa induzida por estresse hídrico foi identificada em frações microssomais derivadas do sistema de

endomembranas (Figura 3D, linha 2). A localização subcelular da proteína-substrato de BiP *in vitro* indica que a associação de BiP com o polipeptídeo de 28 kDa induzido por déficit hídrico pode ser biologicamente relevante.

4. DISCUSSÃO

Em células de animais, as espécies de BiP biologicamente ativas na via de dobramento de proteínas constituem a forma desfosforilada (Freiden *et al.*, 1992). Em cultura de células de soja tratadas com tunicamicina, as formas de BiP encontradas são desfosforiladas, enquanto que, quando as células são submetidas ao estresse osmótico as formas induzidas de BiP são pós-traducionalmente fosforiladas (Cascardo *et al.*, 2000). Assim, a modificação da proteína BiP de planta em relação ao estresse hídrico difere do padrão comum de modificações pós-traducionais de BiP eucariotos.

Com a finalidade de avaliar uma possível relação funcional entre a fosforilação de BiP de soja e aspectos centrais de sua função molecular, o estado de oligomerização das isoformas induzidas por estresse osmótico e a sua atividade de interação com proteína substrato foram analisados. Em células de soja, BiP existe como um pool de formas oligoméricas e monoméricas. Tratamento das células com tunicamicina induz a desfosforilação da proteína, e as formas oligoméricas são convertidas a monômeros (Figure 2). Esses resultados são consistentes com o padrão de regulação pós-traducional demonstrado para BiP de mamíferos (Carlsson e Lazarides, 1983; Hendershot *et al.*, 1987) e indicam que a forma monomérica não modificada de BiP de plantas corresponde à espécie biologicamente ativa

na via de dobramento de proteínas. Embora as formas de BiP induzidas por estresse osmótico sejam pós-traducionalmente fosforiladas, elas foram fracionadas no gradiente de sacarose como monômeros, assim como BiP de células tratadas com tunicamicina. Tais resultados indicam que a fosforilação induzida por estresse osmótico na forma monomérica ocorre em sítios distintos daqueles que ocorrem nas formas oligoméricas.

Uma possível explicação para a aparente contradição entre desfosforilação em resposta a certos estresses, como tunicamicina, e fosforilação em resposta a estresse osmótico seria que, além de sua função como chaperone molecular, BiP de soja exibe regulação diferenciada e funções biológicas distintas sob estresse hídrico. Alternativamente, BiP de planta possui mecanismos regulatórios independentes, de forma a coordenar mais eficientemente a demanda da função de chaperone molecular com a indução de um grupo específico de proteínas secretórias por estresse hídrico, que provavelmente estão envolvidas no mecanismo de resposta a estresse hídrico (Ingram e Bartels, 1996). Consistente com essa hipótese, foi demonstrado que a isoforma de BiP induzida por estresse hídrico interage com um polipeptídeo de 28 kDa induzido por déficit hídrico. Embora não se tenha conhecimento da identidade do polipeptídeo induzido por estresse hídrico, duas linhas de evidência indicam que a associação entre BiP e o polipeptídeo de 28 kDa não é um artefato de ensaios *in vitro* e pode ser, fisiologicamente, relevante. Inicialmente, o polipeptídeo de 28 kDa foi localizado em membranas microssomais compostas principalmente de vesículas de endomembranas derivadas do RE, Golgi e tonoplastos. Sendo uma proteína secretória, é esperado que o polipeptídeo de 28 kDa seja co-localizado com BiP, assim que ele entra no RE. Além disso, o complexo BiP:polipeptídeo de 28 kDa foi sensível à ATP, uma propriedade de interações mediadas por chaperones moleculares. Logo, a fosforilação de BiP por estresse osmótico não pode ser atribuída simplesmente à inativação de isoformas de BiP induzidas.

Foi demonstrado que o estresse osmótico induziu a fosforilação de BiP e uma concomitante conversão dos oligômeros existentes, previamente modificados, para os monômeros, diferencialmente modificados. Embora a indução de fosforilação de BiP por estresse osmótico possa ser um mecanismo responsável por conferir especificidade de substrato ou função distinta para as isoformas de BiP induzidas, o processo de desidratação celular pode eventualmente promover uma desnaturação geral de proteínas, como o tratamento por tunicamicina. Nesse caso, as formas fosforiladas de BiP poderiam servir como um “pool” de armazenamento que poderia ser rapidamente desfosforilado em condições de acúmulo de proteínas mal dobradas no RE. Isso forneceria um meio eficiente para controlar a concentração efetiva de BiP no RE antes de a via UPR ser ativada. De fato, em mamíferos, experimentos *in vitro* evidenciaram que a forma oligomérica modificada na presença de peptídeos sintéticos é convertida em espécies monoméricas ativas e inalteradas (Blond-Elguindi *et al.*, 1993). Entretanto, os resultados desta pesquisa desfavorecem essa hipótese, uma vez que foi demonstrado que as condições de estresse osmótico estimulam fosforilação, mas não oligomerização da proteína BiP induzida.

Embora se acredita que a resposta geral ao estresse do RE em plantas seja semelhante àquela de mamíferos e leveduras, os resultados apresentados nesta investigação indicam que a resposta de BiP a condições de estresses pode diferir significativamente em plantas. Nesse contexto, várias diferenças importantes na regulação da expressão do chaperone molecular BiP de soja sob condições de estresses abióticos foram identificadas. Essas diferenças podem estar relacionadas à existência de múltiplos genes de BiP em plantas e ao desafio único que condições de estresses representam a plantas, em comparação com outro eucarioto. Como plantas não podem evitar mudanças ambientais, elas estão constantemente sujeitas a uma variedade de condições de estresses. A aclimação para diferentes mudanças ambientais requer respostas contra danos celulares, como preservação de membranas e estruturas de proteínas que possibilitam à planta tolerar e minimizar o efeito deletério do

estresse abiótico. Possivelmente, os membros da família gênica de BiP de plantas evoluíram mecanismos regulatórios independentes para assegurar níveis altos de expressão sob extensa gama de condições de estresses bióticos e abióticos para proteger a planta contra danos celulares. Nesse contexto, seria interessante identificar se outros chaperones moleculares do RE de soja exibem regulação similar em resposta ao estresse osmótico.

CAPÍTULO II

O ACÚMULO DE BiP EM PLANTAS TRANSGÊNICAS CONFERE TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO

1. INTRODUÇÃO

O dobramento de proteínas no retículo endoplasmático (RE) é facilitado por chaperones moleculares, que auxiliam o dobramento e a montagem corretos das proteínas, impedindo interações intra e intermoleculares dos intermediários de montagem, que levariam à formação de agregados protéicos no lúmen do RE (Hammond e Helenius, 1995). A expressão desses chaperones é regulada de acordo com as exigências celulares. Assim, tanto o aumento da atividade secretória como o acúmulo de proteínas mal dobradas no RE resultam na indução de chaperones moleculares no RE (Lee, 1992). Essa indução ocorre por meio de uma via de sinalização denominada via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR – “unfolded protein response pathway”), a qual regula a transcrição de um grupo de proteínas residentes do RE, incluindo o chaperone molecular BiP (“binding protein”) (Lee, 1992).

Em plantas, a regulação da expressão do gene BiP tem sido examinada principalmente pela detecção dos níveis de RNA e da proteína BiP sob condições de estresse e em diferentes estádios de desenvolvimento da planta (Denecke, 1996). Em geral, eventos do desenvolvimento que são associados com alta atividade secretória celular e a exposição das células a agentes que resultam no acúmulo de proteínas mal dobradas no RE causam indução de BiP (Boston *et al.*, 1996; Galili *et al.*, 1998). A expressão de BiP de planta também responde a uma variedade de condições de estresses bióticos e abióticos, como

déficit hídrico, infestação de fungo, ataque de inseto, estresse nutricional, aclimação ao frio e resposta a elicitores de patógenos de planta (Anderson *et al.*, 1994; Denecke *et al.*, 1995; Kalinski *et al.*, 1995; Fontes *et al.*, 1996; Figueiredo *et al.*, 1997; Fontes *et al.*, 1999). Em um mutante do milho, *floury-2*, a síntese no endosperma de uma proteína de reserva mutada, cuja seqüência-sinal não é clivada, é associada com aumento do acúmulo de BiP (Boston *et al.*, 1991; Fontes *et al.*, 1991; Coleman *et al.*, 1995; Gillikin *et al.*, 1997). Similarmente, a expressão de um mutante defeituoso para a montagem da proteína de reserva do feijão, faseolina, induz a síntese de BiP em protoplastos de folha de tabaco (Pedrazzini *et al.*, 1994). Além disso, tunicamicina, um potente ativador da via UPR induz com eficácia a expressão do mRNA e da proteína BiP em várias espécies de planta (Fontes *et al.*, 1991; D'amico *et al.*, 1992; Figueiredo *et al.*, 1997). Esses resultados indicam que, assim como BiP de mamífero e levedura, BiP de planta é regulado pela via UPR.

Diversos componentes da via de sinalização UPR têm sido descritos em *Sacharomyces cerevisiae*. Um componente caracterizado é uma proteína transmembrana bifuncional do RE denominada Ire1p. Acredita-se que Ire1p seja responsável por monitorar e transmitir o sinal da presença de proteínas mal dobradas para o componente subsequente da via (Cox *et al.*, 1993; Mori *et al.*, 1993). A região carboxiterminal da proteína, voltada ou para o núcleo ou para o citossol, exibe atividades de cinase e endonuclease. Ativação da atividade de cinase ocorre por meio de oligomerização e transfosforilação de proteínas Ire1p vizinhas na membrana, o que, por sua vez, leva à ativação da atividade de endonuclease (Shamu e Walter, 1996). Com a ativação da via UPR, a atividade de endonuclease de Ire1 inicia o processamento do pré-mRNA que codifica o transfator Hac1, específico para transativação de genes regulados pela via UPR (Sidrauski e Walter, 1997). A ligação do mRNA clivado pela Ire1p é conduzida pela tRNA ligase (Sidrauski *et al.*, 1996). Esse evento de regulação do processamento do mRNA de Hac1 é totalmente independente da formação do “spliceosome” e modula o nível de síntese de

Hac1. O transativador Hac1 associa-se ao cis-elemento UPRE (elemento de resposta a proteínas mal dobradas) e ativa a transcrição de genes que codificam proteínas residentes no RE (Mori *et al.*, 1992; Cox e Walter, 1996).

Recentemente, a descoberta de homólogos de Ire1p em células de mamíferos forneceu evidência direta de que o mecanismo de resposta a estresses do RE, mediado pela rota UPR, é conservado entre os eucariotos (Wang *et al.*, 1998). Considerando que essas proteínas induzidas pela UPR agem como chaperones, acredita-se que elas tenham uma função protetora dentro do RE evitando a agregação de proteínas. De fato, a superexpressão de BiP em células de mamífero (Morris *et al.*, 1997) e protoplastos de tabaco (Leborgne-Castel *et al.*, 1999) previne a indução de genes regulados pela UPR e aumenta a tolerância da célula ao estresse, evidenciando que BiP atua diretamente, atenuando o estresse no RE. Além disso, a transfecção de células de mamíferos com um mRNA de BiP anti-senso suprimiu a sua indução sem alterar os níveis basais da proteína. Essas células também mostraram maior sensibilidade a ionóforos (Li e Lee, 1991; Li *et al.*, 1992), estresse oxidativo (Gomer *et al.*, 1991) e toxicidade celular (Sugawara *et al.*, 1993). Embora esses estudos indicaram claramente um papel protetor de BiP contra o estresse no RE em células cultivadas *in vitro*, eles não foram estendidos a organismos multicelulares intactos. Nesta investigação, o efeito das variações dos níveis de BiP na tolerância ao estresse hídrico em tabaco transgênico (*Nicotiana tabacum* L. cv. Havana) expressando um cDNA de BiP de soja nas orientações senso e anti-senso foi avaliado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Transformação e análise das plantas

Todos os procedimentos com DNA foram realizados de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Os plasmídeos usados para transformação de tabaco (*Nicotiana tabacum*), pUFVBiPS e pUFVBiPAS, contêm o cDNA de BiP nas orientações senso e anti-senso, respectivamente, sob o controle do promotor CaMV 35S e o sinal de poliadenilação (nos) do gene nopalina sintase, e foram obtidos previamente (Alvim *et al.*, 2001).

A transformação das plantas de tabaco com as construções citadas anteriormente e da planta controle, contendo apenas o vetor binário pBI121, foi feita por Alvim *et al.* (2001). Foram utilizadas as técnicas de PCR e “Southern blot” para detectar a presença do gene *nptII*, que confere resistência à canamicina. Para análise de segregação, as sementes foram germinadas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), contendo canamicina 150 mg.L⁻¹. O acúmulo de BiP foi monitorado em cada geração, por meio de imunoenaios. As linhagens 35S-BiPS2, 35S-BiPS3, 35S-BiPAS5 e 35S-BiPAS10 foram selecionadas para os estudos subseqüentes. Na nomenclatura adotada para definir as linhagens transgênicas, S refere-se às plantas transformadas com a construção senso e AS, àquelas transformadas com a construção anti-senso. Os

números diferentes após as letras S e AS indicam que as plantas transgênicas foram originadas de eventos de transformação independentes.

2.2. Extração de proteínas e “immunoblotting”

Os extratos de proteína total foram preparados de acordo com Görg *et al.* (1988), com algumas adaptações. Aproximadamente, 2 g de tecido de folha de tabaco transgênico foram triturados em nitrogênio líquido e homogeneizados com ácido tricloroacético 10% (v/v), em acetona contendo 2-mercaptoetanol 0,07% (v/v). A fração de proteína total foi precipitada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 40 minutos, centrifugada a 16.000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 15, minutos e lavada 2-3 vezes com acetona contendo 0,07% (v/v) e 2-mercaptoetanol. O precipitado foi secado à vácuo, ressuspendido em Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, SDS 1% (p/v) e EDTA 25 mM, numa proporção de $100\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Após nova centrifugação a 25.000 g por 20 minutos, a concentração de proteína no sobrenadante foi determinada como descrito por Bradford (1976).

Quantidades equivalentes de proteína total (30 mg) foram fracionadas em SDS-PAGE (Laemmli, 1970) e transferidas para membrana de nitrocelulose, utilizando-se o sistema de transferência da BIORAD, de acordo com as instruções do fabricante. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi bloqueada com TBS-T [Tris-HCl 100 mM, pH 8, NaCl 150 mM, Tween-20 a 0,1% (v/v)]. Para detecção da proteína BiP, foi utilizado um anticorpo policlonal gerado contra uma versão truncada da região carboxi-terminal de BiP, numa diluição 1:1000 (Figueiredo *et al.*, 1997); e um segundo anticorpo contra IgG conjugado com a fosfatase alcalina (Sigma), numa diluição de 1:5000. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada, usando-se os substratos NBT (azul-de-nitrotetrazólio, Gibco/BRL) e BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, Gibco/BRL).

2.3. Indução de estresse hídrico em plantas transgênicas de tabaco

O experimento do estresse hídrico foi conduzido, utilizando-se plântulas de tabaco não-transformado (wt) e os transformantes primários (T0) do controle (apenas o vetor pBI121) das plantas senso (35S-BiPS) e anti-senso (35S-BiPAS). O teor relativo de água do substrato foi medido de acordo com Slavik (1974).

Após o crescimento das plântulas *in vitro* (cerca de 30 dias), estas foram aclimatadas, transferidas para substrato (PLANTAGRO), e então levadas para câmara de crescimento em condições controladas (fotoperíodo de 12 horas, temperatura de 23 °C dia/18 °C à noite, 240 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância e umidade relativa do ar de 70%). Após 30 dias de crescimento com provisão normal de água, foram selecionadas plantas nas mesmas condições de disponibilidade de água e desenvolvimento para o início da indução. O déficit hídrico foi induzido, em 50% das plantas, pela cessação da irrigação, durante um período de duas semanas. No outro conjunto restante, que corresponde ao controle absoluto, a irrigação foi mantida. O conjunto de cada tratamento, irrigado e estressado, era constituído de cinco clones de cada transformante independente e do tabaco não-transformado. O conteúdo de água do substrato dos dois tratamentos foi monitorado durante o período da experiência, por meio da variação de peso do substrato (Figura 1).

O potencial hídrico do solo pode ser encontrado a partir do teor relativo de água (TRA) do solo e da curva de retenção de água do substrato. Para obtenção da curva de umidade do solo, foi utilizado o aparelho extrator de Richards, de acordo com o protocolo do Manual de Métodos de Análise de Solos (CNPS, 1997). Entretanto, as propriedades físico-químicas do substrato e as condições do método utilizado não permitiram uma curva de retenção de água que refletisse as condições reais do substrato (Figura 2).

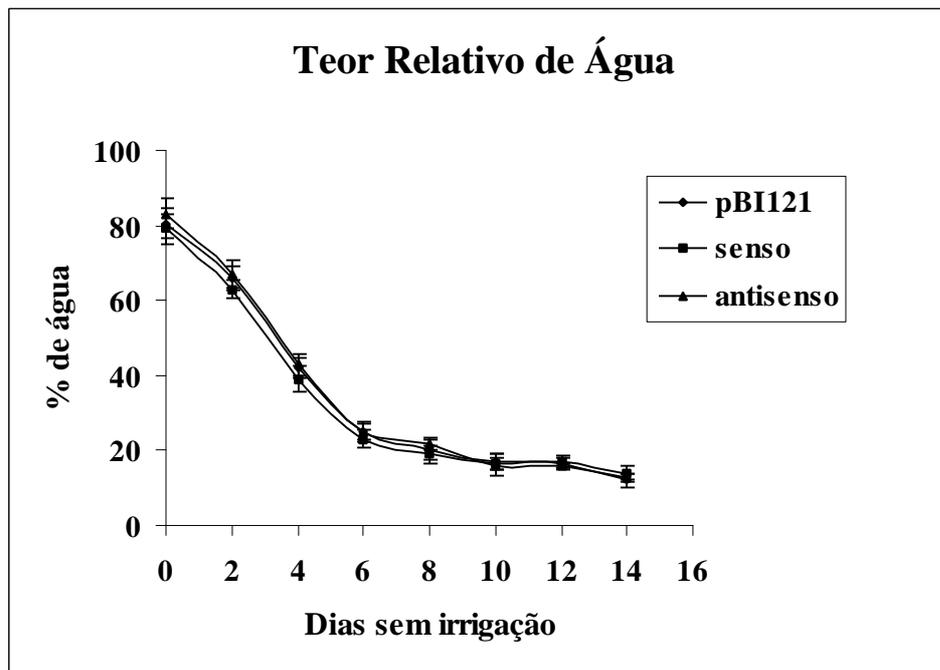


Figura 1- Curva do teor relativo de água do substrato das plantas submetidas ao déficit hídrico.

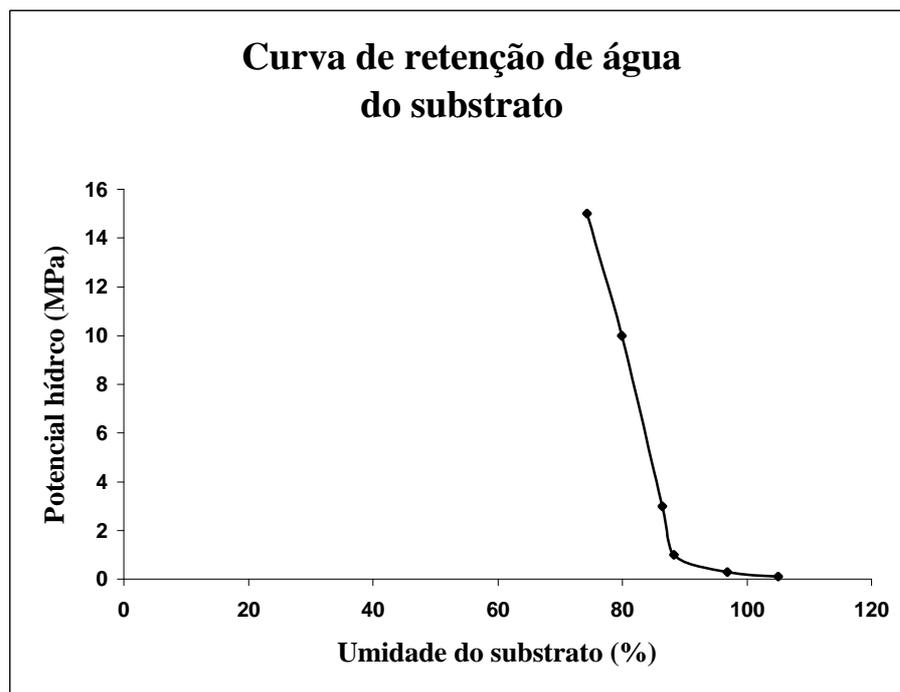


Figura 2- Curva de retenção de água do substrato.

2.4. Teor relativo de água

O teor relativo de água (TRA) nas folhas foi determinado de acordo com o método de Catský (1974), com algumas alterações. Um conjunto de três discos foliares por tratamento foi coletado e pesado, para obter seu peso fresco (PF). O conjunto de discos foi colocado em uma placa de Petri com água destilada por quatro horas, secado rapidamente para retirar o excesso de água e pesado para obtenção do peso máximo (PM). Para obtenção do peso seco (PS), esses discos foram mantidos em estufa a 60 °C, por aproximadamente seis horas. A partir dos pesos fresco, máximo e seco, foi possível calcular o TRA:

$$TRA = \frac{PF - PS}{PM - PS} \times 100$$

2.5. Parâmetros fisiológicos

A assimilação fotossintética de CO₂, a taxa transpiratória e a condutância estomática foram medidas na terceira folha completamente expandida das plantas pelo analisador portátil de CO₂ IRGA, modelo LCA-2 (“Analytical Development Co. Ltd.”, Hoddeston, Reino Unido), por irradiância de 600 μmol m⁻² s⁻¹, durante o período do experimento.

2.6. Atividade da superóxido dismutase

Para determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD), 1 g de folhas foi homogeneizado com 3 mL de fosfato de sódio 200 mM, pH 7,8, contendo EDTA 2 mM e ácido L-ascórbico 80 mM. Após a centrifugação a 10.000 g e a 4 °C por 25 minutos, a quantidade de proteína total foi determinada pelo método de Bradford (1976). A atividade da SOD total foi analisada por sua habilidade em inibir a redução fotoquímica do azul-de-nitrotetrazólio (NBT), determinada a 560 nm. A mistura de reação consistiu de

fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, L-metionina 13 mM, riboflavina 2 mM, EDTA 0,1 mM e NBT 75 mM. Uma unidade da enzima é definida como a quantidade da enzima requerida para inibir em 50% a redução de NBT (Giannopolitis e Ries, 1977).

3. RESULTADOS

3.1. Obtenção e análise das linhagens transgênicas

As plantas de *Nicotiana tabacum* foram transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* com o gene BiP, nas orientações senso e anti-senso, sob o controle do promotor 35S CaMV e o sinal de poliadenilação 3' nos. Os transformantes primários foram selecionados *in vitro* em função da resistência à canamicina e testados, posteriormente, pela incorporação do gene *nptII* por análise de PCR. Várias linhagens independentes foram estabelecidas, transferidas para solo e crescidas em casa de vegetação, para produzir sementes (plantas T1). A integração e o número de cópias da construção nas plantas transformadas foram determinados por análise de “Southern blot” e análise de segregação do gene *nptII* na geração T1 (Alvim *et al.*, 2001).

O acúmulo de BiP foi monitorado nas linhagens transgênicas por análise de “immunoblotting”. As plantas selecionadas para o experimento de estresse hídrico foram as linhagens 35S-BiPS2, 35S-BiPS3, 35S-BiPAS5 e 35S-BiPAS10 (Figura 3). Sob condições normais, condições não-estressantes, os níveis da proteína BiP foram maiores nas folhas das plantas BiP senso (Figura 3, linhas 35SBiPS2 e 35SBiPS3) do que nas plantas silvestre e controle (Figura 3, linhas silvestre e controle).

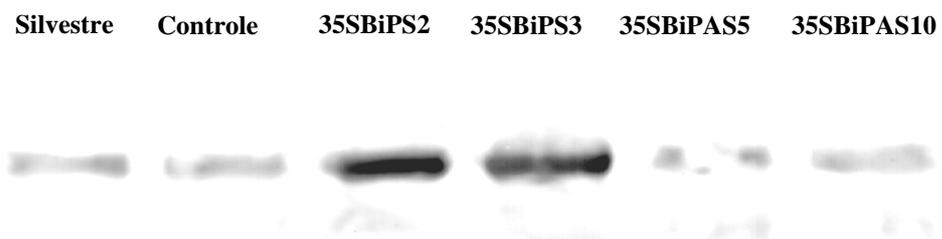


Figura 3- Análise da expressão BiP nas folhas de tabaco transgênico.

Quantidades similares de proteínas totais, extraídas de folhas de plantas transformadas com o gene BiP na orientação senso (35SBiPS2 e 35SBiPS3) e com o gene BiP na orientação anti-senso (35SBiPAS5 e 35SBiPAS10), com o vetor pBI121 (controle) e de plantas não-transformadas (silvestre) foram separadas por SDS-PAGE e sondadas com anticorpo contra BiP de soja.

3.2. Os níveis de BiP correlacionam-se com a manutenção da turgescência de planta de tabaco sob condições de déficit hídrico

A síntese de BiP de planta é induzida por uma variedade de estresses ambientais, incluindo o estresse hídrico (Figueiredo *et al.*, 1997; Cascardo *et al.*, 2000). Assim, a resposta do tabaco transgênico foi analisada sob condições de déficit hídrico, similarmente àquelas que ocorrem no campo. A condição de seca foi gradualmente estabelecida, cessando a irrigação das plantas crescidas na câmara de crescimento. Após 15 dias sob progressiva desidratação, foi observado um fenótipo tolerante nas plantas superexpressando o gene BiP ou plantas senso (Figura 4). Enquanto as folhas da planta controle murcharam (Figura 4), aquelas das linhagens transgênicas senso mantiveram um nível normal de turgescência (Figura 4). A condição de seca prolongada inibiu completamente o crescimento das plantas tabaco-silvestre e controle pBI121. Enquanto quase todas as plantas 35S-BiPS foram tolerantes ao estresse hídrico, menos que 5% de plantas controle sobreviveram ao déficit hídrico (Alvim *et al.*, 2001).

Após 15 dias de privação de água, o acúmulo de BiP nas linhagens senso e controle foi monitorado por análise de “immunoblotting”. Nas plantas controle, como resultado direto do déficit de água, ocorreu indução da síntese de BiP endógeno, mas, com a persistência da condição de estresse, o acúmulo de BiP diminuiu a níveis não detectáveis (dados não mostrados). A diminuição dos níveis de BiP coincidiu com o aparecimento do fenótipo de murcha no controle, enquanto na linhagem transgênica 35S-BiPS os níveis de BiP foram mantidos altos durante todo o período de estresse. Conseqüentemente, sob condições de déficit hídrico progressivo, os níveis de BiP nas folhas correlacionaram-se com a manutenção da turgescência foliar. Além disso, o fenótipo tolerante ao estresse hídrico segregou com o transgene de BiP nas progênies de T0 (Alvim *et al.*, 2001). Esses resultados representam a primeira

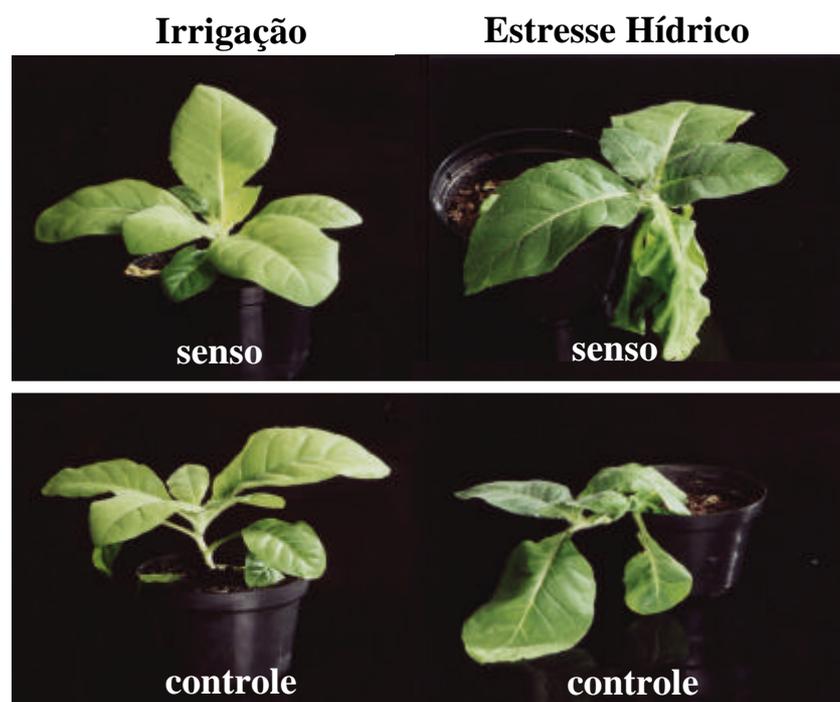


Figura 4- Fenótipo das plantas transgênicas de tabaco após 15 dias de déficit hídrico. Plantas de tabaco transgênicas transformadas apenas com o vetor pBI121 (controle) ou transformadas com construção 35S-BiPS (senso) foram mantidas sob irrigação (à esquerda) ou submetidas ao déficit hídrico (à direita).

demonstração de que os níveis elevados de BiP aumentam a tolerância de plantas ao déficit hídrico.

3.3. Baixos níveis endógenos de BiP anulam a tolerância ao estresse hídrico

Se o fenótipo de tolerância ao estresse hídrico (Figura 4) observado é realmente resultado do aumento da expressão de BiP, pode-se antecipar que a repressão anti-senso do gene BiP debilite ainda mais a planta sob condição de deficiência hídrica. De fato, tem sido demonstrado que a inibição de BiP por meio da expressão de seu cDNA anti-senso previne a indução de seu gene e de outras proteínas do RE relacionadas com estresse, interrompendo o mecanismo de resposta ao estresse do RE (Little e Lee 1995; Liu *et al.*, 1997; e dados não mostrados). Assim, a tecnologia de repressão anti-senso foi utilizada como um meio de inibir o acúmulo de BiP endógeno em tabaco. Entretanto, plantas de tabaco transformadas com cDNA de BiP de soja na orientação inversa, sob condições não-estressantes, acumularam níveis normais de BiP (Figura 3), indicando que a inibição dos níveis de BiP devido à expressão de seu mRNA anti-senso pode ser compensada pela ativação da via UPR, aumentando os níveis endógenos de BiP. A falta de co-regulação entre o promotor 35S da construção anti-senso e do promotor endógeno de BiP regulado pela via UPR, juntamente com a natureza essencial de BiP, podem explicar o nível normal da proteína nas plantas anti-senso.

Em células de levedura e mamífero, um nível basal mínimo de BiP é requerido para a viabilidade de célula (Rose *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1992). Similarmente, o estudo da repressão anti-senso em células de planta indica que a completa repressão da função de BiP pode resultar em letalidade da célula (Leborgne-Castel *et al.*, 1999). Contudo, a expressão do gene BiP anti-senso previne a indução de BiP em resposta ao estresse do RE (Little e Lee, 1995; Liu *et al.*, 1997; e dados não mostrados).

Devido a essas observações, a resposta da linha anti-senso ao déficit hídrico foi analisada. As plantas transgênicas foram transferidas para uma câmara de crescimento, onde a metade das plantas não recebeu irrigação e o restante foi irrigado ao longo do experimento. As plantas controle transformadas com o vetor pBI121 toleraram relativamente bem o tratamento de estresse durante o período do experimento. Em contraste, as plantas anti-senso mostraram elevada sensibilidade ao déficit hídrico, já que suas folhas murcharam completamente após 15 dias de indução do estresse (Figura 5B, comparar controle e anti-senso). Conseqüentemente, a deficiência na indução de BiP nas plantas anti-senso correlacionou-se com um aumento na sensibilidade à seca, em comparação com as plantas controle. Uma correlação inversa dos efeitos de BiP ficou evidente em plantas senso submetidas ao déficit hídrico (Figura 5), confirmando resultados anteriores (Figura 4).

Embora nas plantas transgênicas 35S-BiPS as folhas mantiveram um nível normal de turgescência sob condições de privação de água, a taxa transpiratória e a condutância estomática foram superiores ao observado nas plantas controle (Figura 6C e D). Assim, o fenótipo de tolerância à deficiência de água das plantas transgênicas BiP senso ou a manutenção da turgescência não foram resultado do fechamento dos estômatos. A manutenção da turgescência e o conteúdo celular de água nas plantas senso estressadas (Figura 6A) evidenciam que um provável ajuste osmótico impediu a desidratação celular.

As taxas fotossintética e transpiratória e a condutância estomática de todas as plantas transgênicas que permaneceram sob irrigação não diferiram significativamente entre si (Figura 7A, C, E). Porém, sob regime de deficiência de água, a assimilação fotossintética de CO₂ diminuiu diferentemente nas três transgênicas (Figuras 6B e 7B). Após 10 dias de deficiência de água, a assimilação de CO₂ diminuiu rapidamente, alcançando um mínimo no décimo quinto dia de estresse nas plantas anti-senso (0% do valor inicial), nas plantas controle (30% do valor inicial) e nas plantas senso

A**B**

Figura 5- Fenótipo das plantas de tabaco transgênicas após 15 dias de déficit hídrico. Plantas de tabaco transgênicas controle (pBI121), 35S-BiPS (senso) e 35S-BiPAS (anti-senso) foram mantidas sob irrigação (A) ou submetidas ao déficit hídrico (B).

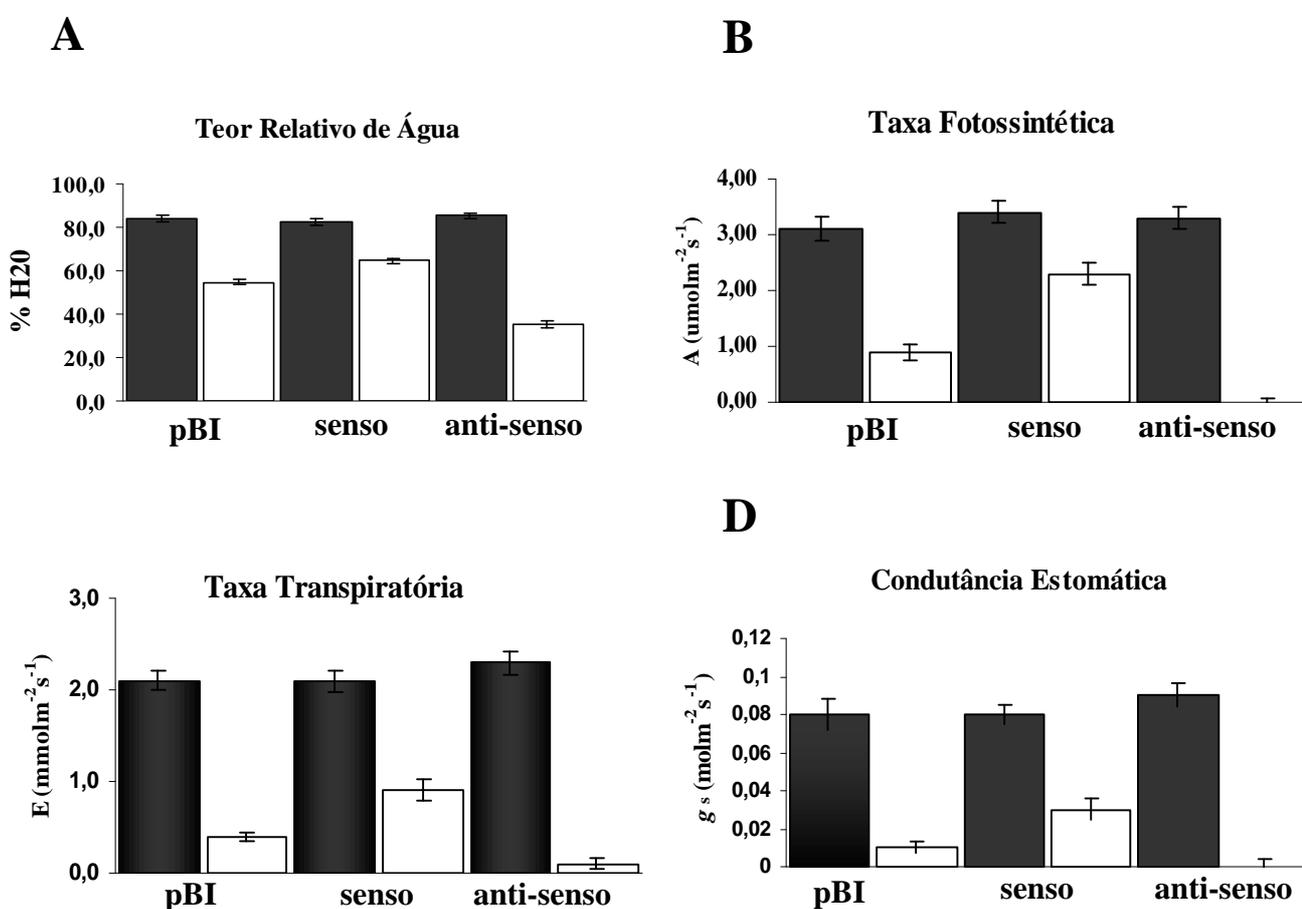


Figura 6- Parâmetros fisiológicos das plantas de tabaco transgênicas em condições normais de irrigação (barras pretas) e após 15 dias de déficit hídrico (barras brancas). Ao término do experimento, 15 dias após a indução, o teor relativo de água (TRA) (A), a taxa fotossintética (B), a taxa transpiratória (C) e a condutância estomática (D) da terceira folha das plantas foram medidas pelo IRGA – LCA-2 à irradiância de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores representam a média \pm DP de cinco réplicas.

(80% do valor inicial). A perda da capacidade de assimilação de CO₂ nas folhas das plantas anti-senso estressadas foi maior do que nas folhas das plantas controle; nas senso estressadas, foi menos afetada. Assim, sob condições de seca progressiva, a taxa fotossintética em folhas de plantas senso diminuiu numa extensão muito menor do que nas plantas controle e anti-senso.

Alterações da taxa fotossintética podem ser resultado do fechamento estomático ou da degradação de aparelho fotossintético pelas condições de estresse. O efeito do estresse hídrico na integridade do aparelho fotossintético foi analisado pela determinação da taxa de fluorescência (Fv/Fm), como uma medida da eficiência fotoquímica do fotossistema II (PS2). Sob condições de seca progressiva, a razão Fv/Fm permaneceu inalterada nas plantas controle, senso e anti-senso e foi similar aos valores encontrados nas plantas que permaneceram sob irrigação (Tabela I). Em contraste, a condutância estomática variou em diferentes níveis nas folhas das plantas anti-senso, senso e controle, tendo correlacionado com a taxa fotossintética dessas plantas (Figuras 6D e 7B). Consistente com uma taxa fotossintética superior em plantas senso, a condutância estomática foi maior em folhas senso que em plantas controle e anti-senso (Figuras 6B e 7F). Variação na taxa transpiratória seguiu o mesmo padrão da condutância estomática (Figura 6D). Coletivamente, esses resultados indicam que a diminuição significativa na taxa fotossintética das plantas anti-senso sob déficit hídrico foi devido ao fechamento estomático e não em razão de algum dano no aparelho fotossintético.

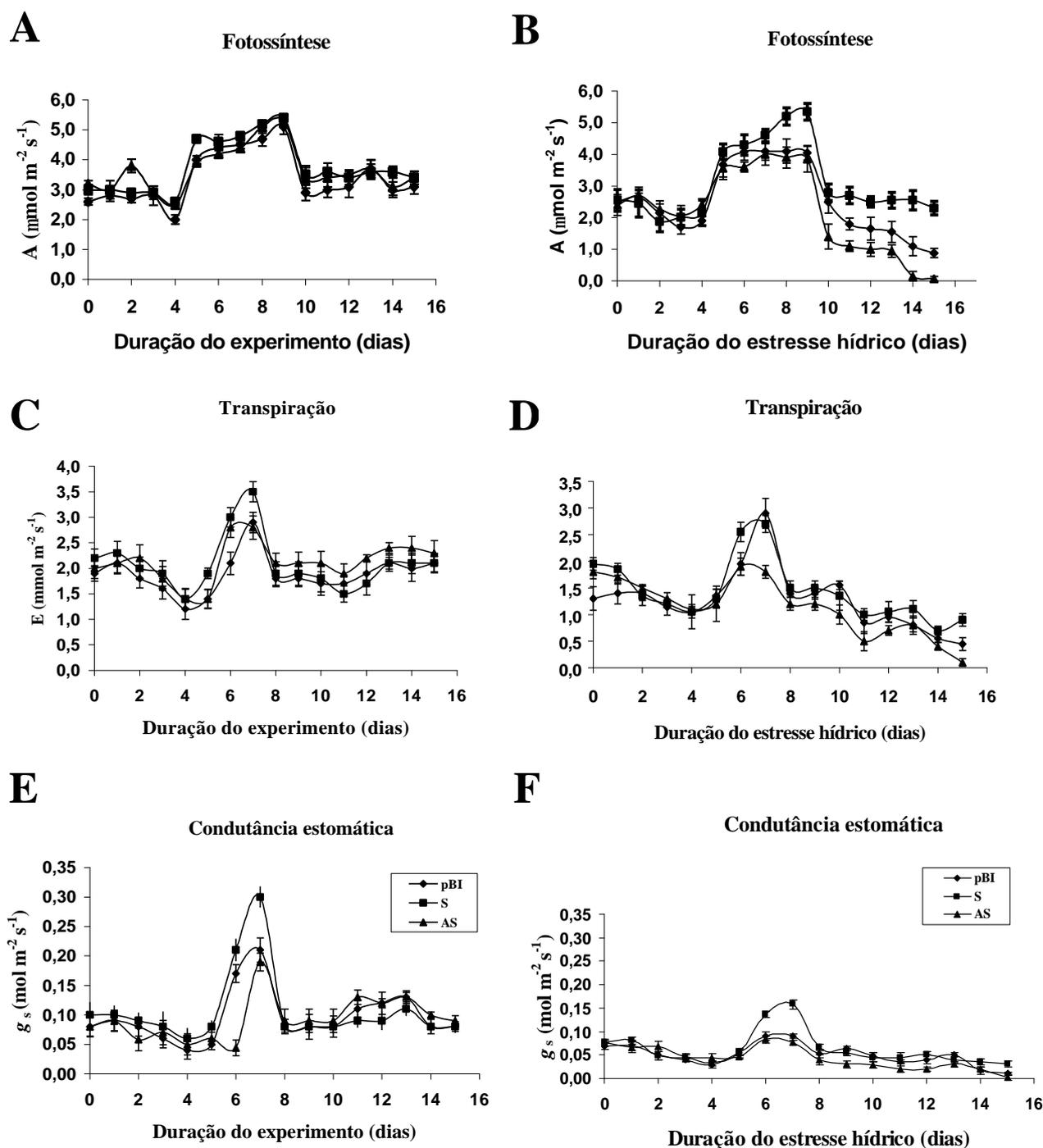


Figura 7- Parâmetros fisiológicos de plantas transgênicas de tabaco sob déficit hídrico. Plantas de tabaco controle (pBI), senso (S) e anti-senso (AS) foram expostas ao seguinte regime de água: mantidas sob irrigação (A, C e E) e sob déficit hídrico (B, D e F) durante 15 dias. A taxa fotossintética (A, B), taxa transpiratória (C, D) e condutância estomática (E, F) da terceira folha de plantas transgênicas foram medidas pelo analisador de gás IRGA, modelo LCA-2, à irradiância de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante o período do experimento. Cada valor representa a média \pm DP (n=5).

Tabela I- Análise da eficiência fotossintética do PSII, razão Fv/Fm, durante o período de déficit hídrico. Os parâmetros fotossintéticos foram medidos na terceira folha de plantas de tabaco controle (pBI), 35S-BiPS (senso) e 35S-BiPAS (AS), que foram mantidas sob irrigação (IR) ou submetidas ao déficit hídrico (EH). Os valores representam a média \pm DP (n=5)

Dias sem Irrigação	pBI (IR)	pBI (EH)	Senso (IR)	Senso (EH)	Anti-senso (IR)	Anti-senso (EH)
0	0,846 \pm 0,015	0,853 \pm 0,021	0,846 \pm	0,852 \pm 0,023	0,847 \pm 0,013	0,839 \pm 0,018
5	0,845 \pm 0,020	0,839 \pm 0,017	0,833 \pm	0,853 \pm 0,029	0,835 \pm 0,027	0,848 \pm 0,024
10	0,843 \pm 0,056	0,854 \pm 0,015	0,846 \pm	0,852 \pm 0,019	0,843 \pm 0,021	0,845 \pm 0,025
15	0,830 \pm 0,023	0,845 \pm	0,827 \pm 0,019	0,858 \pm 0,017	0,830 \pm 0,011	0,840 \pm 0,009

3.4. Flutuações dos níveis de BiP correlacionam-se inversamente com a atividade de enzimas induzidas por estresse oxidativo

Apesar da observação de que o aumento do acúmulo de BiP parece prevenir a desidratação celular, os resultados apresentados indicam que, provavelmente, a manutenção da turgescência normal das folhas das plantas senso, sob déficit hídrico, não foi uma consequência do fechamento estomático. Nesse caso, BiP pode estar agindo diretamente para aliviar o estresse intracelular causado pelo déficit hídrico.

Um dos efeitos de estresse hídrico severo é o aumento da produção de espécies de oxigênio reativas (ROS), levando ao estresse oxidativo, que por sua vez estimula o aumento nos níveis ou atividades de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD). Em razão disso, a atividade da SOD em plantas senso, anti-senso e controle foi determinada como um meio de monitorar o estresse intracelular (Tabela II). De fato, o déficit hídrico causou aumento da atividade da SOD em plantas controle. A atividade de SOD permaneceu praticamente inalterada em plantas senso, em comparação com as senso irrigadas, enquanto em plantas anti-senso o grau do aumento da atividade da SOD, causada pela deficiência de água, foi muito maior que em plantas controle.

Coletivamente, esses resultados são consistentes com um mecanismo de tolerância mediado por BiP, que atua de forma a aliviar o estresse oxidativo endógeno causado pelo déficit hídrico.

Tabela II – Atividade total da superóxido dismutase (SOD) em folhas de tabaco transgênico (*Nicotiana tabacum*) que permaneceram irrigadas (irrigadas) ou após 15 dias de déficit hídrico (estressadas). Os valores representam a média \pm DP (n=5)

Regime de água	Atividade da SOD (unidade mg^{-1})		
	pBI ^a	senso ^b	anti-senso ^c
Irigadas	13,656 \pm 2,702	12,384 \pm 0,541	11,810 \pm 0,806
Estressadas	17,302 \pm 1,354	13,470 \pm 1,641	24,423 \pm 0,538

a- Plantas controle pBI.

b- Plantas BiP senso (35S-BiPS).

c- Plantas BiP anti-senso (35S-BiPAS).

4. DISCUSSÃO

O chaperone molecular BiP está presente no RE de todas as células eucarióticas e constitui um componente importante da função constitutiva do RE. Além de assistir ao dobramento e à montagem de proteínas secretórias, BiP é essencial na translocação de proteínas recém-sintetizadas para o RE (Hammond e Helenius, 1995). Recentemente, foi demonstrado que BiP participa diretamente no mecanismo de controle da permeabilidade da membrana do RE, selando os poros do “translocon”, onde os ribossomos livres se ligam (Hamman *et al.*, 1998). Consistente com suas funções, a síntese de BiP é induzida por (a) eventos do desenvolvimento associados com alta atividade secretória celular e (b) condições de estresses fisiológicos que promovem acumulação de proteínas mal dobradas no RE (Boston *et al.*, 1996; Denecke, 1996). De acordo com estas observações, nesta investigação foi demonstrado que a superexpressão de BiP em tabaco conferiu tolerância a estresses abióticos.

Estudos da superexpressão de genes BiP em células de mamífero e protoplastos de folha de tabaco evidenciaram que BiP atenua o estresse do RE causado por ionóforos ou tunicamicina (Morris *et al.*, 1997; Laitusis *et al.*, 1999; Leborgne-Castel *et al.*, 1999). Em ambos os casos, foi mostrado que a indução de BiP protege contra a inibição da síntese de proteínas causada por

agentes que provocam estresses no RE. Também, tem sido demonstrado que o efeito protetor de BiP contra estresse do RE causado pelo acúmulo de proteínas mal dobradas pode ser estendido para organismos intactos (Alvim *et al.*, 2001). O bloqueio da glicosilação de proteínas por tunicamicina, as quais não podem dobrar-se corretamente, resulta no acúmulo de proteínas mal dobradas ou não-funcionais dentro do RE. Em tal ambiente de alta concentração de proteína mal dobrada, cadeias laterais hidrofóbicas expostas pelas proteínas desnaturadas poderão interagir com outras proteínas mal dobradas ou com superfícies hidrofóbicas de proteínas em processo de síntese ou montagem, induzindo a agregação de proteínas. Provavelmente, em alta concentração de BiP, os domínios hidrofóbicos expostos das proteínas desdobradas terão maior probabilidade de interagir com BiP do que com outras superfícies reativas. Em tais circunstâncias, o aumento do acúmulo de BiP possibilitaria a capacidade de processamento do RE, que, por sua vez, permitiria taxas altas de síntese de proteína. Existe relação dinâmica entre a taxa de processamento da proteína e a tradução do mRNA. Evidências na literatura reforçam a hipótese de que BiP atua coordenando as respectivas taxas de processamento das proteínas no RE e tradução do mRNA. Em células de mamífero, alterações na disponibilidade de BiP afetaram o início da tradução e o grau de fosforilação de eIF-2 (Morris *et al.*, 1997; Laitusis *et al.*, 1999). Similarmente, em protoplastos de tabaco, a expressão de BiP conferiu tolerância à inibição da tradução em resposta ao estresse do RE (Leborgne-Castel *et al.*, 1999).

Nessa investigação, foi demonstrado que a superexpressão constitutiva de BiP em tabaco também conferiu tolerância ao estresse hídrico. No nível celular, algumas respostas da planta à desidratação podem ser resultado de danos provocados na estrutura de proteínas e membranas, enquanto outras respostas correspondem a processos adaptativos (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Baseado na função de BiP como chaperone molecular e na regulação de sua expressão em resposta a estresses, BiP pode agir em ambos os mecanismos. Como consequência, o papel protetor de BiP contra estresse

hídrico pode estar associado à preservação da estrutura de proteínas e integridade de membranas, como também com a manutenção da alta atividade secretória mediada pela resposta celular de adaptação ao estresse hídrico (Ingram e Bartels, 1996).

Em plantas e fungos, grande parte da atividade secretória é função da produção de enzimas e polissacarídeos da parede celular. Como um mecanismo de defesa da planta ao estresse hídrico, a composição química e propriedades físicas da parede celular são ativamente alteradas, o que resulta em uma estrutura reforçada para restringir a perda de água dos tecidos internos (Neuman, 1995). Esse fenômeno de endurecimento da parede celular foi observado em folhas de milho expostas ao estresse osmótico (Chazen e Neuman, 1994) e em raízes de sorgo sujeitas ao estresse hídrico severo (Cruz *et al.*, 1992). Nesse caso, a função de BiP seria requerida em razão da intensa atividade secretória causada pelo processo de remodelagem da parede celular. Além disso, BiP poderia facilitar o dobramento e a montagem de um grupo selecionado de proteínas secretórias induzidas por estresse hídrico, que estariam provavelmente envolvidas no mecanismo de resposta ao estresse osmótico.

De fato, proteínas induzidas pelo déficit hídrico, que são enviadas à via secretora, foram identificadas em uma extensiva gama de espécies de planta (Ingram e Bartels, 1996; Riccardi *et al.*, 1998), sendo demonstrado que BiP associa-se com essas proteínas induzidas (Cascardo *et al.*, 2000). Em ambos os casos, a superexpressão de BiP pode causar efeito indireto na tolerância ao estresse, permitindo que as células controlem mais eficazmente a arquitetura da parede celular e a concentração de proteínas de defesa específicas, antes que a condição de estresse alcance seu efeito deletério máximo. A investigação da cinética de proteínas induzidas pelo estresse hídrico em células superexpressando BiP permitirá analisar essas possibilidades, esclarecendo os mecanismos de tolerância à seca mediados por BiP.

Com base no fenótipo das linhagens transgênicas tolerantes à seca, a superexpressão de BiP foi associada com o mecanismo de tolerância ao

estresse, que resulta na manutenção da turgescência e do conteúdo de água celular. Esse fenótipo indica que BiP também poderia estar prevenindo a desidratação celular. O fechamento estomático em resposta ao estresse hídrico constitui um dos mecanismos de adaptação à seca mais bem caracterizados. Contudo, sob déficit hídrico, a condutância estomática e a taxa transpiratória nas folhas senso foram maiores que as do controle e anti-senso. Provavelmente, a ocorrência de um ajuste osmótico preveniu perda da turgescência e a desidratação em plantas transgênicas senso. Essa possibilidade é consistente com a observação de que, sob condições de seca progressivas, a taxa de fotossíntese em folhas senso foi muito menos afetada que em folhas controle e anti-senso. Assim, enquanto a assimilação de CO₂ é mantida em folhas senso estressadas, o seu crescimento é inibido (dados não mostrados). Isso leva a uma utilização reduzida dos fotoassimilados, o que poderia justificar o aumento da concentração de solutos em tecidos de folhas senso.

Em *Centrosema* o fechamento estomático causa a cessação do ajuste osmótico (Ludlow *et al.*, 1983). Igualmente, a excisão de cotilédones de soja e plântulas de girassol previnem acumulação de solutos e o ajuste osmótico, causando significativa diminuição na turgescência (Meyer e Boyer, 1972, 1981; Kutschera e Köhler, 1994). As altas taxas de assimilação de CO₂ em folhas senso estressadas podem ser correlacionadas com sua condutância estomática sob déficit de água. Uma correlação inversa de efeitos foi observada em plantas anti-senso. Uma vez que não foram detectados danos no aparelho fotossintético, induzidos pelo estresse hídrico nas plantas transgênicas, a diminuição da taxa fotossintética nas plantas anti-senso sob déficit de água foi, provavelmente, consequência do fechamento estomático.

A via de transdução de sinal do cálcio (Ca²⁺) citoplasmático pode regular a turgescência das células de planta e coordenar respostas estomáticas em função da desidratação foliar (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Durante o fechamento estomático, o nível de Ca²⁺ citoplasmático aumenta como resultado da mobilização de Ca²⁺ mediada por IP3 (1,4,5-trifosfato

inositol), a partir de estoques intracelulares. De fato, aumentos na concentração de Ca^{2+} citoplasmático podem iniciar o fechamento dos estômatos em tabaco. Embora as informações disponíveis não sejam suficientes para avaliar uma conexão direta entre a função de BiP, liberação de Ca^{2+} do RE e turgescência celular, sabe-se que a depleção gradual de Ca^{2+} de estoques intracelulares promove a regulação de genes BiP por uma via distinta daquela induzida por tunicamicina (Roy *et al.*, 1996; McCormick *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 1997). Além disso, tem-se demonstrado que BiP exerce papel direto e relevante na liberação de Ca^{2+} para dentro do lúmen do RE, e variações na concentração da proteína induzem o ajuste da homeostase celular de Ca^{2+} (Lièvreumont *et al.*, 1997). Assim, a superexpressão de BiP em plantas senso pode aumentar a capacidade de armazenamento de Ca^{+2} no RE, afetando o funcionamento do estômato.

O presente trabalho indicou que a magnitude da resposta do sistema de proteção antioxidativo ao estresse hídrico se correlacionou inversamente com os níveis de BiP. Pelo menos um componente do sistema de defesa antioxidativo, SOD, foi investigado, e o aumento de sua atividade foi maior em folhas estressadas de tabaco anti-senso do que no controle, enquanto nas folhas senso a atividade da SOD permaneceu praticamente inalterada durante o período de deficiência de água. Como as plantas anti-senso exibiram um aumento na sensibilidade ao déficit de água e a SOD contribuiu para a remoção de O^{2-} , é provável que o aumento da atividade de SOD em folhas anti-senso desidratadas reflita a magnitude do estresse oxidativo induzido pelo estresse hídrico, em vez de refletir a intensidade da resposta do mecanismo de proteção em folhas anti-senso.

Em contraste com as plantas anti-senso, a superexpressão de BiP foi aparentemente associada com uma diminuição da resposta de enzimas do sistema antioxidativo sob déficit de água. O estresse oxidativo pode ter sido limitado em plantas senso, porque a superexpressão de BiP preveniu o estresse endógeno. Em células de mamíferos, o controle da liberação de Ca^{2+} do RE por BiP preveniu o estresse oxidativo (Liu *et al.*, 1997, 1998). Embora estudos

adicionais sejam necessários para discernir o mecanismo preciso de tolerância ao estresse hídrico mediado por BiP, o envolvimento de BiP em potencial no controle da homeostase de Ca^{2+} do RE pode justificar os efeitos fisiológicos pleiotrópicos das propriedades protetoras de BiP sob estresse hídrico. Entretanto, pelos resultados apresentados, não se descarta a possibilidade de que a produção de O_2^- tenha sido reduzida em folhas de plantas senso por ativação de vias dissipativas alternativas.

Plantas respondem ao estresse hídrico por ajustes morfológicos, fisiológicos e metabólicos, e algumas das respostas celulares adaptativas são interconectadas claramente com outras respostas de estresses ambientais. Em condições naturais, o déficit hídrico isoladamente é improvável de ocorrer, uma vez que ele afeta a absorção de nutrientes essenciais, levando ao estresse nutricional. Do mesmo modo, o déficit hídrico celular resulta em estresse osmótico, o qual também pode ser devido ao estresse salino. Por consequência, em situações de estresse hídrico, os estresses nutricional, osmótico e salino por certo ocorrem simultaneamente e contribuem para debilitar a planta. Nessa complexa interação de estresses fisiológicos, proteínas relacionadas a estresses que permitam uma coordenada resposta celular adaptativa sob uma variedade de condições de estresse são mais prováveis de desenvolver funções protetoras e vantagem fisiológica para as plantas sob condições de campo.

Assim, a efetividade da superexpressão de BiP na proteção da planta contra estresses pode estar relacionada à sua indução por uma grande variedade de condições de estresses fisiológicos (Galili *et al.*, 1998). As bases fundamentais para essas vantagens fisiológicas adquiridas podem ser exploradas no nível agrônomo e estendidas a outras culturas economicamente importantes.

3. CONCLUSÕES GERAIS

É geralmente aceito que a espécie ativa de BiP é a forma monomérica em que, em resposta a estímulos, os monômeros são pós-traducionalmente modificados, formando um “pool” de BiP na forma oligomérica. Embora as formas de BiP induzidas por estresse osmótico sejam fosforiladas, elas foram fracionadas no gradiente de sacarose como monômeros, assim como BiP de células tratadas com tunicamicina. Assim, é provável que a fosforilação de BiP estimulada por estresse osmótico ocorra em sítios diferenciados e represente um mecanismo alternativo para conferir às isoformas de BiP especificidade e funções biológicas distintas em condições de estresse osmótico.

Os resultados dessa investigação também forneceram evidências conclusivas de que a indução da expressão do gene BiP é suficiente para conferir tolerância ao estresse hídrico. Inicialmente, sob condições de seca progressiva, o nível de acúmulo de BiP correlacionou-se com a manutenção de turgescência celular. As plantas transgênicas superexpressando BiP mantiveram níveis altos da proteína durante o período experimental. Em contraste, embora o déficit hídrico tenha causado indução dos níveis de BiP endógeno, eles retornaram ao nível basal com a persistência das condições de estresse. A diminuição dos níveis de BiP correlacionou-se com a murcha das

folhas. Além disso, a repressão da expressão de BiP aumentou a sensibilidade ao estresse hídrico das plantas anti-senso.

O fechamento estomático em resposta ao estresse hídrico constitui um dos mecanismos de adaptação à seca mais bem caracterizados. Contudo, sob condições de déficit de água, a condutância estomática e a taxa transpiratória nas folhas da planta senso foram maiores que nas folhas controle e anti-senso. Provavelmente, um maior ajustamento osmótico preveniu a perda da turgidez e a desidratação em plantas senso. Tal possibilidade é consistente com a observação de que sob condições de seca progressivas a taxa de fotossíntese em folhas senso foi muito menos afetada do que em folhas controle e anti-senso. Assim, enquanto assimilação de CO₂ é mantida em folhas senso estressadas, o seu crescimento é inibido devido ao déficit de água. Desde que não se detectou nenhum dano ao aparelho fotossintético induzido pelo estresse nas plantas transgênicas, a diminuição da taxa fotossintética de plantas anti-senso sob déficit de água foi em consequência do fechamento estomático.

No presente trabalho, constatou-se que a magnitude da resposta do sistema de proteção antioxidativo ao estresse hídrico se correlacionou inversamente com os níveis de BiP. Pelo menos um componente do sistema de defesa antioxidativo, SOD, foi investigado, e o aumento de sua atividade foi maior em folhas estressadas de tabaco anti-senso do que no controle, enquanto nas folhas senso a atividade da SOD permaneceu praticamente inalterada durante o período de deficiência de água. Como as plantas anti-senso exibiram aumento na sensibilidade ao déficit de água e a SOD contribuiu para a remoção de O²⁻, é provável que o aumento da atividade de SOD em folhas anti-senso desidratadas reflita a magnitude do estresse oxidativo induzido pelo estresse hídrico, em vez de refletir a intensidade da resposta do mecanismo de proteção em folhas anti-senso.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvim, F.C., Carolino, S.M.B., Cascardo, J.C.M., Nunes, C.C., Martinez, C.A., Otoni, W.C., Fontes, E.P.B. (2001). Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to abiotic stress. **Plant Physiol.**, 126:1042-1054.
- Anderson, J.V., Li, Q.B., Haskell, D.W., Guy, C.L. (1994) Structural organization of the spinach endoplasmic reticulum-lúmenal 70-kilodalton heat-shock cognate gene and expression of 70-kilodalton heat-shock genes during cold acclimation. **Plant Physiol.**, 104:1395-1370.
- Benaroudj, N., Fouchaq, B., Ladjimi, M.M. (1997) The COOH-Terminal Peptide Binding Domain Is Essential for Self-association of the Molecular Chaperone HSC70. **J. Biol. Chem.**, 272:8744-8751.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., Ron, D. (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. **Nat. Cell Biol.**, 2:326-332.
- Blond-Elguindi, S., Fourie, A.M., Sambrook, J.F., Gething, M.-J.H. (1993) Regulation and Phosphorylation of the Soybean BiP Forms. **J. Biol. Chem.**, 268:12730–12735.
- Boston, R.S., Fontes, E.P.B., Shank, B.B., Wrobel, R.L. (1991) Increased expression of the maize immunoglobulin binding protein homolog b-70 in three zein regulatory mutants. **Plant Cell**, 3:497-505.
- Boston, R.S., Viitanen, P.V., Vierling, E. (1996) Molecular chaperones and protein folding in the plants. **Plant Mol. Biol.**, 34:191-222.

- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72:248-254.
- Brodsky, J.L., Schekman, R. (1993) A Sec63p complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. **J. Cell. Biol.**, 123:1355-1363.
- Brodsky J.L., McCracken, A.A.(1999) ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. **Semin. Cell Dev. Biol.**, 10:507-513.
- Brodsky, J.L., Wemer, E.D., Dubas, M.E., Goeckeler, J.L., Kruse, K.B. McCracken, A.A. (1999) The requirement for molecular chaperone during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. **J. Biol. Chem.**, 74:3453-3460.
- Bukau, B., Horwich, A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell**, 92:351-366.
- Carolino, S.M.B. (1997) **Caracterização biológica e purificação da proteína BiP da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Tese de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 65 p.
- Carlsson, L., Lazarides, E. (1983) 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. USA**, 80:4664-4668.
- Carroll, S.B., Stollar, B.D. (1983) Antibodies to calf thymus RNA polymerase II from egg yolks of immunized hens. **J. Biol. Chem.**, 258:24-26.
- Cascardo, J.C.M., Almeida, R.S., Buzeli, R.A.A., Carolino, S.M.B., Otoni, W.C., Fontes, E.P.B. (2000) The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses. **J. Biol. Chem.**, 275:14494-14500.
- Cascardo, J.C.M., Buzeli, R.A.A., Almeida, R.S., Otoni, W.C., Fontes, E.P.B. (2001) Differential expression of the soybean BiP gene family. **Plant Science**, 160:273-281.
- Catský, J. Water saturation deficit (Relative water content) In: SLAVÍK, B. **Methods of studying plant water relations**. Prague, Springer-Verlag, 1974, p.136–151.

- Chazen, O., Neuman, P.M. (1994) Hydraulic signal from the roots and rapid cell-wall hardening in growing maize (*Zea mays* L.) leaves are primary responses to polyethylene glycol-induced water deficits. **Plant Physiol.**, 104:1385-1392.
- Chevalier, M., Rhee, H., Elguindi, E.C., Blond, S.T. (2000) Interaction of murine BiP/Grp78 with the DnaJ homologue MTJ1. **J. Biol. Chem.**, 275:19620-19627.
- CNPS (1997) **Manual de Métodos de análise de Solos**. Centro Nacional de Pesquisa de Solos., 2^a edição, Revista atual, 212 p.
- Coleman, C.E., Lopes, M.A., Gillikin, J.W., Boston, R.S., Larkins, B.A. (1995) A defective signal peptide in the maize high-lysine mutant *floury-2*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 92:6828-6831.
- Cox, J.S., Walter, P. (1996) A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. **Cell**, 87:391-404.
- Cyr, D.M., Langer, T., Douglas, M. G. (1994) DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. **Trends Biochem.**, 19:176-181.
- D'amico, L., Valsania, B., Daminati, M.G., Fabrini, M.S., Nitti, G., Bollini, R., Ceriotti, A., Vitale, A. (1992) Bean homologues of the mammalian glucose regulated proteins: induction by tunicamycin and interaction with newly-synthesized storage proteins in the endoplasmic reticulum. **Plant J.**, 2:443-445.
- Denecke, J. (1996) Soluble endoplasmic reticulum resident proteins and their function in protein synthesis and transport. **Plant Physiol. Biochem.**, 34:197-205.
- Denecke, J., Carlsson, L.E., Vidal, S., Höglund, A-S, Ek, B., van Zeiji, M.J., Sinjorgo, K.M.C., Palva, E.T. (1995) The tobacco homolog of mammalian calreticulin is present in protein complexes in vivo. **Plant Cell**, 7:391-406.
- Denecke, J., Goldman, M.H.S., Demolder, J. (1991) The tobacco luminal binding protein is encoded by a multigene family. **Plant Cell**, 3:51-59.
- Ellgaard, L., Molinari, M., Helenius, A. (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. **Science**, 286:1882-1888.
- Feldman, D.E., Frydman, J. (2000) Protein folding *in vivo*: the importance of molecular chaperones. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, 10:26-33.

- Figueiredo, J.E.F., Cascardo, J.C.M., Carolino, S.M.B., Alvim, F.C., Fontes, E.P.B. (1997) Water-stress regulation and molecular analysis of the soybean BiP gene family. **Braz. J. Plant Physiol.**, 9:103-110.
- Flynn, G.C., Pohl, J., Flocco, M.T. (1991) Peptide- binding specificity of the molecular chaperone BiP. **Nature**, 353:726-730.
- Fink, A.L. (1999) Chaperone-mediated protein folding. **Physiol. Rev.**, 79:425-449.
- Fontes, M.A., Otoni, W.C., Carolino, S.M.B., Brommonschenkel, S.H., Fontes, E.P.B., Fári, M., Louro, R.P. (1999) Hyperhydricity in pepper plants regenerated in vitro: involvement of BiP (Binding Protein) and ultrastructural aspects. **Plant Cell Rep.**, 19:81-87.
- Fontes, E.P.B., Shank, B.B., Wrobel, R.L., Moose, S.P., O'Brian, G.R., Wurtzel, E.T., Boston, R.S. (1991) Characterization of an immunoglobulin binding protein homolog in the maize *floury-2* endosperm mutant. **Plant Cell**, 3:483-496.
- Fontes, E.P.B., Silva, C.J., Carolino, S.M.B., Figueiredo, J.E.F., Batista, D.P.O. (1996) A soybean binding protein (BiP) homolog is temporally regulated in soybean seeds and associates detectably with normal storage proteins in vitro. **Braz. J. Genet.**, 19:306-312.
- Fouchaq, B., Benaroudj, N., Ebel, C., Ladjimi, M.M. (1999) Oligomerization of the 17-kDa peptide-binding domain of the molecular chaperone HSC70. **Eur. J. Biochem.**, 259:379-384.
- Freiden, P.J., Gaut, J.R., Hendershot, L.M. (1992) Interconversion of three differential modified and assembled forms of BiP. **EMBO J.**, 11:63-70.
- Frigerio, L., Pastres, A., Prada, A., Vitale, A. (2001) Influence of KDEL on the fate of trimeric or assembly-defective phaseolin: selective use of an alternative route to vacuoles. **Plant Cell**, 13:1109-1126.
- Galili, G., Sengupta-Gopalam, C., Ceriotti, A. (1998) The endoplasmic reticulum of plant cells and its role in protein maturation and biogenesis of oil bodies. **Plant Mol. Biol.**, 38:1-29.
- Gamer, J., Bujard, H., Bukau, B. (1992) Physical interaction between heat shock protein DnaK, DnaJ, and GrpE and the bacterial heat shock transcription factor-sigma (32). **Cell**, 69:833-842.
- Gething, M.J. (1999) Role and regulation of the ER chaperone BiP. **Sem. Cell Dev. Biol.**, 10:465-472.

- Gething, M.-J., Sambrook, J. (1992) Protein folding in the cell. **Nature**, 355:33-45.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K. (1977) Superoxide dismutase. I. occurrence in higher plants. **Plant Physiol.**, 59:309-314.
- Gillinkin, J.W., Zhang, F., Coleman, C.E., Bass, H.W., Larkins, B.A., Boston, R.S. (1997) A defective signal peptide tethers the *floury-2* zein to the endoplasmic reticulum membrane. **Plant Physiol.**, 114:345-352.
- Gomer, C.J., Ferrario, A., Rucker, N., Wong, S., Lee, A.S. (1991) Glucose regulated protein induction and cellular resistance to oxidative stress mediated by porphyrin photosensitization. **Cancer Res.**, 15:6574-6579.
- Görg, A., Postel, W., Günther, S. (1988) Two-dimensional electrophoresis. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, 9:531-546.
- Greene, M.K., Maskos, K., Landry, S.J. (1998) Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95:6108-6113.
- Haigh, N.G., Johson, A.E. (2002) A new role for BiP: closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane. **J. Cell. Biol.**, 156:261-270.
- Hamman, B.D., Hendershot, L.M., Johnson, A.E. (1998) BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the lumenal end of the translocon pore before and early in translocation. **Cell**, 92:747-758.
- Hammond, C., Helenius, A. (1995) Quality control in the secretory pathway. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 7:523-529.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., Ron, D. (2000) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. **Mol. Cell**, 5:897-904.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D. (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. **Nature**, 397:271-274.
- Hartl, F.-U. (1996) Molecular chaperone in protein folding. **Nature**, 381:571-580.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K. (1999) Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane

protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. **Mol. Biol. Cell**, 10:3787-3799.

Hecht, J.T., Hayes, E., Snuggs, M., Decker, G., Montufar-Solis, D., Doege, K., Mwwalle, F., Poole, R., Stevens, J., Duke, P.J. (2001) Calreticulin, PDI, Grp94, and BiP chaperone proteins are associated with retained COMP in pseudoachondroplasia chondrocytes. **Matrix Biol.: J. Internat. Soc. Matrix Biol.**, 20:251-262.

Helm, K.W., Lafayette, P.R., Nagao, R.T., Key, J.L., Vierling, E. (1993) Localization of small heat shock proteins to the higher plant endomembrane system. **Mol. Cell. Biol.**, 13:238-247.

Hendershot, L.M, Bole, D., Kohler, G. (1987) Assembly and secretion of heavy chains that do not associate posttranslationally with immunoglobulin heavy chain-binding protein. **J. Cell. Biol.**, 104:761-767.

Ingram, J., Bartels, D. (1996) The molecular basis of dehydration in plants. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 47:377-403.

Jamora, C., Dennert., G., Lee, A.S. (1996) Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma B/C10ME. **Proc. Acad. Sci. USA**, 93:7690-7694.

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

Jin, T., Gu, Y., Zanusso, G., Sy, M., Kumar, A., Cohen, L. (2000) The chaperone protein BiP binds to a mutant prion protein and mediates its degradation by the proteasome. **J. of Biol. Chem.**, 275:38699-38704.

Kalinski, A., Rowley, D.L., Loer, D.S., Foley, C., Buta, G., Herman, E.M. (1995) Binding-protein expression is subject to temporal, developmental and stress-induced regulation in terminally differentiated soybean organs. **Planta**, 195:611-621.

Kroczyńska, B., Blond, S.Y. (2001) Cloning and characterization of a new soluble murine J-domain protein that stimulates BiP, Hsc70 and DnaK ATPase activity with different efficiencies. **Gene**, 273:267-274.

Kutschera, U., Köhler, K. (1994) Cell elongation, turgor and osmotic pressure in developing sunflower hypocotyls. **J. Exp. Bot.**, 45:591-595.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-685.

- Laitusis, A.L., Brostrom, M.A., Brostrom, C.O. (1999) The dynamic role of GRP78/BiP in the coordination of mRNA translation with protein processing. **J. Biol. Chem.**, 274:486-493.
- Laufen, T., Mayer, M.P., Beise, C., Klostermeier, D., Mogk, A., Reinstein J., Bukau, B. (1999). Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 96:5452-5457.
- Leborgne-Castel, N., Jelitto-Van Dooren, E.P.W.M., Crofts, A.J., Denecke, J. (1999) Overexpression of BiP in tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress. **Plant Cell**, 11:459-469.
- Lee, A.S. (1992) Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 4:267-273.
- Lee, G.J., Vierling, E. (2000) A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. **Plant Physiol.**, 122:189-198.
- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K., Kaufman, R.J. (2002) IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. **Genes & Dev.**, 16:452-466.
- Li, L.J., Li, X.A., Ferrario, A., Rucker, N., Liu, E.S., Wong, S., Gomer, C.J., Lee, A.S. (1992) Establishment of a Chinese hamster ovary cell line that expresses grp78 anti-sense transcripts and suppresses A23187 induction of both GRP78 and GRP94. **J. Cell Physiol.**, 153:575-582.
- LI, X., Wu, Y., Zhang, D.Z. (1993) Rice prolamine protein body biogenesis: a BiP-mediated process. **Science**, 226:1054-1056.
- Li, X.A., Lee, A.S. (1991) 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.**, 11:3446-3453.
- Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D. (1991) *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of dnaK. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88:2874-2878.
- Liberman, F., Fong, Y.L., Selby, M.J., Choo, Q.L., Cousens, L., Houghton, M., Yen, T.S. (1999) Activation of the grp78 and grp94 promoters by hepatitis C virus E2 envelope protein. **J. Virol.**, 73:3718-3722.

- Lièvremont, J.-P., Rizzuto, R., Hendeershot, L., Meldolesi, J. (1997) BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca^{2+} . **J. Biol. Chem.**, 272:30873-30879.
- Little, E., Lee, A.S. (1995) Generation of a mammalian cell line deficient in glucose-regulated protein stress induction through targeted ribozyme driven by a stress-inducible promoter. **J. Biol. Chem.**, 270:9526-9534.
- Liu, H., Bowes, I.R.C., van de Water, B., Sillence, C., Nagelkerke, J.F., Stevens, J.L. (1997) Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca^{2+} disturbances, and cell death in renal epithelial cells. **J. Biol. Chem.**, 272:21751-21759.
- Liu, H., Miller, E., van de Water, B., Steven, J.L. (1998) Endoplasmic reticulum stress proteins block oxidant-induced Ca^{2+} increases and cell death. **J. Biol. Chem.**, 273:12858-12862.
- Ludlow, M.M., Chu, A.C.P., Clements, R.J., Kerslake, R.G. (1983) Adaptation of species of *Centrosema* to water stress. **Aust. J. Plant Physiol.**, 10:119-130.
- Mao, H., Palmer, D., Kenneth, S.R. (2001) Changes in BiP (GRP78) levels upon HSV-1 infection are strain dependent. **Virus Res.**, 76:127-135.
- Matlack, K.E., Misselwitz, B., Plath, K., Rapoport, T.A. (1999) BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. **Cell**, 97:553-564.
- McCormick, T.S., McColl, K.S., Distelhorst, C.M. (1997) Mouse lymphoma cells destined to undergo apoptosis in response of thapsigargin fail to generate a calcium-mediated *grp78/grp98* stress response. **J. Biol. Chem.**, 272:6087-6092.
- McKay, D. B. (1993) Structure and mechanism of the 70-kDa heat-shock-related proteins. **Adv. Prot. Chem.**, 44:67-98.
- Meyer, R.F., Boyer, J.S. (1972) Sensitivity of cell division and cell elongation to water potentials in soybean hypocotyls. **Planta**, 108:77-87.
- Meyer, R.F., Boyer, J.S. (1981) Osmoregulation, soluble distribution and growth in soybean seedlings having low water potentials. **Planta**, 151:482-489.
- Molinari, M., Helenius, A. (2001) Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. **Science**, 14:288-225.

- Mori, K., Ma, W., Gething, M.-J., Sambrook, J.F. (1993) A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. **Cell**, 74:743-756.
- Mori, K., Sant, A., Khono, K., Normington, K., Gething, M.-J., Sambrook, J.F. (1992) A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins. **EMBO J.**, 11:2583-2593.
- Morris, J.A., Dorner, A.J., Edwards, C.A., Hendershot, L.M., Kaufman, J. (1997) Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. **J. Biol. Chem.**, 272:4327-4334.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiol.**, 15:473-497.
- Neumam, P.M. (1995) The role of cell wall adjustment in plant resistance to water deficits. **Crop Sci.**, 35:1258-1266.
- Nishikawa, S.-I., Fewell, S.W., Kato, Y., Brodsky, J.L., Endo, T. (2001) Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retotranslocation and degradation. **J. Cell. Biol.**, 153:1061-1069.
- Packschies, L., Theyssen, H., Buchberger, A., Bukau, B., Goody, R.S., Reinstein, J. (1997) GrpE accelerates nucleotide exchange of the molecular chaperone DnaK with an associative displacement mechanism. **Biochemistry**, 36:3471-3422.
- Pedrazzini, E., Giovinazzo, G., Bollini, R., Ceriotti, A., Vitale, A. (1994) Binding of BiP to an assembly-defective protein in plant cells. **Plant J.**, 5:103-110.
- Pedrazzini, E., Vitale, A. (1996) The binding protein (BiP) and the synthesis of secretory proteins. **Plant Physiol. Biochem.**, 34:207-216.
- Pelham, H.R.B. (1989) Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. **Ann. Rev. Cell Biol.**, 5:1-23.
- Pierpaoli, E.V., Sandmeier, E., Schonfeld, H.J., Christen, P. (1998) Control of the DnaK chaperone cycle by substoichiometric concentrations of the co-chaperones DnaJ and GrpE. **J. Biol. Chem.**, 273:6643-6649.
- Riccardi, F., Gazeau, P., Vienne, D., Zivy, M. (1998) Protein changes in response to progressive water deficit in maize. **Plant Physiol.**, 117:1253-1263.

- Römisch, K. (1999) Surfing the Sec61 channel: Bidirectional protein translocation across the ER membrane. **J. Cell Sci.** 112:4185-4119.
- Rose, M.D., Misra, L.M., Vogel, J.P. (1989) Kar2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78. **Gene.** Cell 57:1211-1221.
- Roy, B., Li, W.W., Lee, A.S. (1996) Calcium-sensitive transcriptional activation of the proximal CCAAT regulatory element of the *grp78*/BiP promoter by human nuclear factor CBF/NF-Y. **J. Biol. Chem.**, 271:28995-29002.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) **Molecular Cloning- A Laboratory Manual.** 2th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York .
- Schmid, D., Baici, A., Gehring, H., Christen, P. (1994) Kinetics of molecular chaperone action. **Science**, 263:971-973.
- Schmid, M., Simpson, D.J., Sarioglu, H., Lottspeich, F., Gietl, C. (2001) The rinosomes of senescing plant tissue bud from the endoplasmic reticulum. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 98:5353-5358.
- Shamu, C.E., Walter, P. (1996) Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. **EMBO J.**, 15:3028-3039.
- Slavik, B. (1974) **Methods of studying plant water relations.** Springer-Verlag, Berlin.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiol.**, 115:327-334.
- Sidrauski, C., Cox, J.S., Walter, P. (1996) tRNA ligase is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response. **Cell**, 87:405-413.
- Sidrauski, C., Walter, P. (1997) The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. **Cell**, 90:1031-1039.
- Stronge, V.S., Saito, Y., Ihara, Y., Williams, D.B. (2001) Relationship between calnexin and BiP in suppressing aggregation and promoting refolding of protein and glycoprotein substrates. **J. Biol. Chem.**, 276:39779-39787.

- Suh, W.-C., Lu, C.Z., Gross, C.A. (1999) Structural features required for the interaction of the Hsp70 molecular chaperone DnaK with its cochaperone DnaJ. **J. Biol. Chem.**, 274:30534-30539.
- Sugawara, S., Takeda, K., Lee, A.S., Dennert, G. (1993) Suppression of stress protein GRP78 induction in tumor B/C10ME eliminates resistance to cell mediated cytotoxicity. **Cancer Res.**, 53:6001-6005.
- Thuerauf, D.J., Hoover, H., Meller, J., Hernandez, J., Su, L., Andrews, C., Dillmann, W.H., McDonough, P.M., Glembotski, C.C. (2001) Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase-2 expression is regulated by ATF6 during the endoplasmic reticulum stress. **J. Biol. Chem.**, 246:48309-48317.
- Tirasophon, W., Welihinda, A.A., Kaufman, R.J. (1998) A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1) in mammalian cells. **Genes Dev.**, 12:1812-1824.
- Urano, F., Wang, W., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., Ron, D.(2000) Coupling of stress in the ER of activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. **Science**, 287:664-666.
- Wang, X.Z., Harding, H.P., Zhang, Y., Jolicoeur, H.P., Kuroda, M., Ron, D. (1998) Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. **EMBO J.**, 19: 5708-5717.
- Wickener, S., Maurizi, M.R., Gottesman, S. (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. **Science**, 286:1888-1893.
- Wickner, S. H., Skowyra, D., Hoskins. J. (1992) KnaJ, DnaK and GrpE heat shock proteins are required in ori P1 DNA replication solely at the RepA monomerization step. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89:10345-10349.
- Wrobel, R.L., Obrian, G.R., Boston, R.S. (1997) Comparative analysis of BiP gene expression in maize endosperm. **Gene**, 204:105-113.
- Xu, A., Bellamy, A.R., Taylor, J.A. (1998) BiP (GRP78) and endoplasmic reticulum chaperone (GRP94) are induced following rotavirus infection and bind transiently to an endoplasmic reticulum-localized virion component. **J. Virol.**, 72:9865-9872.
- Yoshida, H., Hase, K., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K. (1998) Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins.

INVOLVMENT OF BASIC LEUCINE ZIPPER TRANSCRIPTION. **J. Biol. Chem.**, 273:33741-33749.

Yoshida, H., Okada, T., Hase, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., Mori, K. (2000) ATP6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the *cis*-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. **Mol. Cell. Biol.**, 20:6755-6767.

Yu, M., Haslam, H.A., Haslam, D.B. (2000) HEDJ, an Hsp40 co-chaperone localized to the endoplasmic reticulum of human cells. **J. Biol. Chem.**, 275:24984-24992.

Yu, Z., Luo, H., Fu, W., Mattson, M.P. (1999) The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis. **Exp. Neurol.**, 155:302-314.

Zolkiewski, M. (1999) ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing proteins aggregation. **J. Biol. Chem.**, 274:28083-28086.