



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

AMANDA BORTOLINI SILVEIRA

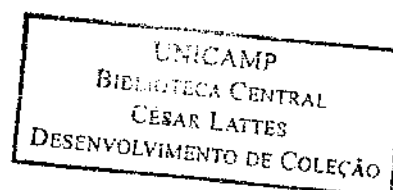
**“Análise funcional do regulador de transcrição do tipo
bZIP *AtbZIP9* de *Arabidopsis thaliana* através da
superexpressão de seus genes alvos”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
AMANDA BORTOLINI SILVEIRA
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título
de Mestre em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética
Vegetal e Melhoramento.

Orientador: Dr. Michel Georges Albert Vincentz

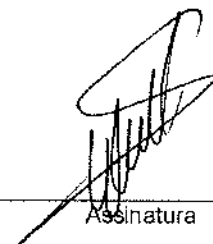
Campinas – 2007



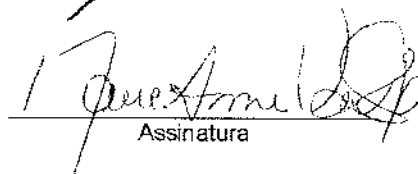
Campinas, 28 de março de 2007

BANCA EXAMINADORA

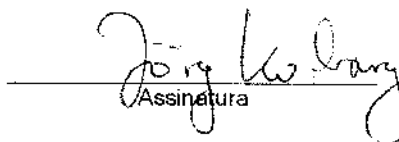
Prof. Dr. Michel G. A. Vincentz (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys


Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg


Assinatura

Prof. Dr. José Andrés Yunes

Assinatura

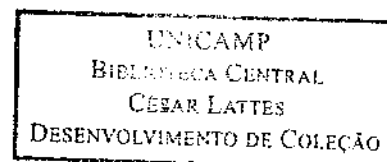
Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas

Assinatura

67209-000

"Não haverá parto se a semente não for plantada,
muito tempo antes... Não haverá borboletas se a
vida não passar por longas e silenciosas
metamorfoses..."

Rubem Alves

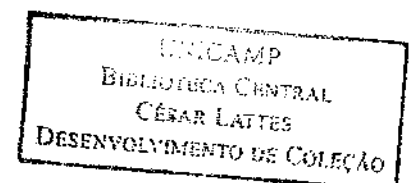


DEDICATÓRIA

9

*A meus pais, Selma e José Geraldo, por todo
amor, apoio, incentivo e dedicação. Eu não
poderia ter sido mais abençoada!*

v



AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar ao meu orientador, Michel, pela confiança, paciência, dedicação, apoio e excelente orientação nestes 4 anos de convivência, desde a iniciação científica. Não tenho palavras para agradecer tudo o que você fez por mim, principalmente nestes três últimos meses de luta. Agradeço a cada dia por ter um orientador como você!

Aos doutores Marie-Anne Van Sluys e Jörg Kobarg membros da banca examinadora. Obrigada pela compreensão com a demora na entrega do manuscrito.

Aos doutores Celso Eduardo Benedetti e Paulo Mazafera, membros da pré-banca pela atenção e sugestões.

A Dra. Sandra Carmelo-Guerreiro, do departamento de botânica da UNICAMP, por ceder o espaço e material de seu laboratório para realização dos cortes histológicos.

À Poliana pelo auxílio técnico com os cortes histológicos.

Ao Luiz Gustavo por ter me apresentado ao Michel e por ter guiado meus primeiros passos na biologia molecular. Alguns amigos a gente guarda pela vida toda e eu sei que, mesmo longe, você é um deles. Adoro você Harry's!

Aos meus companheiros do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas/Arabidopsis Juarez, Diana, Dudu, Talita, Zé, Luana e Aline pelos divertidos momentos juntos e discussões. Um agradecimento especial ao Juarez. Obrigada por fazer a vida no laboratório mais divertida, obrigada pela ajuda com os experimentos, obrigada pela sua grande amizade! Torço muito por você!

À Luana, minha primeira aluna de iniciação científica e a Érika pela ajuda com os experimentos. Obrigada por me ensinarem a ensinar!

À Sandra Lúcia Martins pelo grande apoio técnico e ajuda com o cultivo das plantas. Sua ajuda foi essencial. Muito obrigada!

Aos meus amigos e consultores para assuntos diversos, Lu Gauer, Mário, Sylvia, Natália, Thaís, Dudu, Marcelinho, Sandra, Vanusia, Renato, Ju, Dani e Luís Peroni. Obrigada pelo apoio. Aprendi muito com todos vocês!

Às meninas da secretaria do CBMEG, Sandra, Tânia e Andressa, vocês são ótimas! À Lourdes e ao Rafael da secretaria da Pós-graduação pela atenção.

A todo o pessoal do laboratório do Mano, da Ana Maria, da Anete, do Paulo Arruda, do Gonçalo, da Maricilda, da Edi e da Laura. Obrigada pelos imensos “quebra-galhos” e troca de idéias.

Aos amigos da Biologia 01D. Foi muito bom ter convivido pelo menos um pouquinho com cada um de vocês. Um agradecimento especial para as minhas queridas amigas Ângela, Júlia, Simone, Bel, Maria e aos meus grandes amigos Johnny e Renato. Obrigada pela companhia e por agüentarem muitas vezes meu mau-humor diário. Adoro vocês!

À Juliana Helena pela parceria na época da graduação e pelas dicas, reagentes e ajuda com a manipulação de proteínas.

À minha família pelo apoio nas horas difíceis, incentivo e dedicação. À meu querido irmão André pela ajuda na confecção de figuras e edição de imagens. Obrigada por sempre torcerem por mim!

E a você Joan, que estive ao meu lado todos estes anos. Só tenho a agradecer por toda a ajuda, companheirismo, ombro, paciência e amor. Sou muito feliz por ter encontrado uma pessoa tão especial quanto você!

E finalmente, À FAPESP pelo apoio financeiro concedido.

ÍNDICE

ÍNDICE	viii
LISTA DE ABREVIACÕES	x
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	xi
RESUMO	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUÇÃO	5
1. O controle da expressão gênica em eucariotos	5
1.1 O controle <i>cis</i> da transcrição	6
1.2 A cromatina e o controle <i>trans</i> da transcrição	7
2. A família dos fatores de transcrição do tipo <i>Basic-leucine zipper</i> (bZIP)	11
3. Os fatores de regulação da transcrição do tipo bZIP de plantas superiores	13
4. O Grupo C de fatores de transcrição do tipo bZIP	18
5. O fator de regulação da transcrição do tipo bZIP <i>AtbZIP9</i>	24
6. Regulações pós-transcricionais da atividade de fatores de transcrição	29
7. Redundância funcional em famílias multigênicas de fatores de transcrição.....	32
8. O domínio de transativação da transcrição da proteína VP16	34
OBJETIVOS	36
MATERIAL E MÉTODOS	37
1. Material vegetal e condições de crescimento	37
2. Manipulação de ácidos nucléicos	37
2.1 Construções gênicas	39
3. Transformação genética de <i>Arabidopsis</i> e seleção de plantas transgênicas.....	43
4. Coloração específica para o polímero lignina	44
5. Localização <i>in situ</i> da atividade de Gus	44
6. Técnicas histológicas e microscopia	45
7. Extração de RNA e RT-PCR semi-quantitativa	45
8. Extração de proteínas totais, SDS-PAGE e Western blot	48

RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
CAPÍTULO I	
Obtenção e análise fenotípica de plantas transgênicas expressando ativadores constitutivos fortes de <i>AtbZIP9</i>	49
1. Obtenção de transformantes primários	49
2. Versões ativadoras constitutivas de <i>AtbZIP9</i> induzem alterações de morfologia foliar e/ou fisiologia em transformantes primários	50
2.1 Alterações fenotípicas apresentadas por plantas T0 para ProbZIP9-VP16-cDNA.....	50
2.2 Alterações fenotípicas apresentadas por plantas T0 para ProbZIP9-VP16-bZIP.....	56
2.3 Alterações fenotípicas apresentadas por plantas T0 para 35S-VP16-bZIP	60
3. As alterações fenotípicas induzidas pelas versões ativadoras de <i>AtbZIP9</i> são específicas	66
4. Estabelecimento e análise de linhagens transgênicas F2 homozigóticas	67
CAPÍTULO II	
Análise detalhada de transformantes para ProbZIP9-VP16-cDNA	69
1. Análise detalhada de transformantes primários T0	70
1.1 Ensaios de expressão gênica revelaram a presença do transgene em transformantes primários	70
1.2 A proteína ativadora constitutiva da transcrição VP16- <i>AtbZIP9</i> promove alterações da estrutura do sistema vascular	73
2. Obtenção e análise de linhagens homozigóticas para um locus do transgene ...	79
2.1 Obtenção de linhagens expressando o ativador VP16- <i>AtbZIP9</i>	79
2.2 VP16- <i>AtbZIP9</i> altera a expressão floema específica do regulador da transcrição do tipo DOF At2g28810	81
CONCLUSÃO FINAL E PERSPECTIVAS	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO – Artigo aceito para publicação na Revista <i>Plant Science</i>	92

LISTA DE ABREVIACÕES

ABA	Ácido abscísico
<i>AtbZIP9</i>	Gene <i>AtbZIP9</i>
<i>atbzip9-1</i>	Alelo nulo do gene <i>AtbZIP9</i>
BSA	Albumina bovina sérica
bZIP	<i>Basic-leucine zipper</i>
Bzo2h	bZIP <i>Opaco-2</i> homologous gene
CaMV	Vírus do mosaico da couve flor
cDNA	DNA complementar
DAG	Dias após a germinação
DNA	Ácido desoxiribonucleico
Dnase	Desoxiribonuclease
dNTPs	2'-desoxinucleotídeos 5'-trifosfato
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
GFP	Green fluorescent protein
<i>GusA</i>	Gene β -glucuronidase de <i>Escherichi coli</i>
Gus	Enzima β -glucuronidase de <i>Escherichi coli</i>
HA	Tripla tag de hemaglutinina
kb	kilobases
kDa	kilodaltons
M	molar
mM	milimolar
μM	micromolar
ml	mililitro
μl	Microlitro
μg	micrograma
ng	nanograma
miRNA	micro-RNA
mRNA	RNA mensageiro
NJ	<i>Neighbor-joining</i>
<i>O2</i>	Gene <i>Opaco-2</i> de milho
o2	Mutação opaco-2
O2	Proteína Opaco-2
ORF	<i>Open reading frame</i>
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PoGO	Possível grupo de ortólogo
PolyA	Sinal de poliadenilação
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reverse transcriptase PCR
T-DNA	DNA de transferência de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
T0	Transformante primário
VP16	Domínio de ativação da transcrição da proteína VP16 do vírus <i>Herpes simplex</i>
X-Gluc	Ácido 5-bromo, 4-cloro, 3-indol, β -D-glucorônico

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Fases do controle da expressão gênica em eucariotos	6
Figura 2. Esquema do complexo de iniciação da transcrição	8
Figura 3. Representação esquemática da estrutura tridimensional do domínio conservado bZIP ligado ao DNA	12
Figura 4. Classificação das bZIPs de arroz e Arabidopsis	15
Figura 5. Árvore filogenética das bZIPs de mono e eudicotiledôneas do Grupo C.....	20
Figura 6. Rede de heterodimerização entre os fatores bZIP do Grupo C e do Grupo S	23
Figura 7. Padrão de expressão do gene <i>AtbZIP9</i>	25
Figura 8. Regulação da expressão de <i>AtbZIP9</i> em resposta a glicose, ácido abscísico e citocinina	26
Figura 9. Análise comparativa de linhagens expressando diferentes níveis do mRNA de <i>AtbZIP9</i>	29
Figura 10. Representação esquemática de um fator de transcrição selvagem e de uma versão modificada deste fator de transcrição fusionada com o domínio VP6	35
Figura 11. Esquema das construções gênicas para expressão de versões de <i>AtbZIP9</i> que codificam para ativadores constitutivos fortes da transcrição.....	40
Figura 12. Esquema da estratégia de clonagem utilizada para obtenção das construções ProbZIP9-VP16-bZIP e ProbZIP9-VP16-cDNA no vetor pCAMBIA 2300	42
Figura 13. Seleção de transformantes primários (T0) de <i>A. thaliana</i>	44
Figura 14. Alterações fenotípicas apresentadas por transformantes primários para ProbZIP9-VP16-cDNA pertencentes a classe I	53
Figura 15. Modificações fenotípicas apresentadas por transformantes primários para ProbZIP9-VP16-cDNA, pertencentes a classe II	54
Figura 16. Mudanças fenotípicas apresentadas por transformantes primários para ProbZIP9-VP16-cDNA pertencentes a classe II	55
Figura 17. Representação gráfica da possível correlação entre frequência de aparecimento das três classes fenotípicas apresentadas por transformantes primários para ProbZIP9-VP16-cDNA e nível de expressão do transgene	56
Figura 18. Alterações fenotípicas apresentadas por transformantes primários para ProbZIP9-VP16-bZIP pertencentes as classes III e IV	59

Figura 19. Secções transversais de hastes florais coradas com floroglucinol	59
Figura 20. Alterações fenotípicas apresentadas por transformantes primários para 35S-VP16-bZIP	64
Figura 21. Diagrama de Venn representando a distribuição e sobreposição das alterações fenotípicas apresentadas por plantas T0 transgênicas para ProbZIP9-VP16-cDNA, ProbZIP9-VP16-bZIP e 35S-VP16-bZIP	65
Figura 22. Análises de expressão por RT-PCR semi-quantitativa de plantas T0 para ProbZIP9-VP16-cDNA apresentando alterações das classes I e II	71
Figura 23. Análise de expressão gênica de populações F1 transgênicas para ProbZIP9-VP16-cDNA.....	72
Figura 24. Cortes histológicos de meristemas de plantas expressando o gene repórter <i>GusA</i> sob controle da seqüência promotora do gene <i>AtbZIP9</i>	74
Figura 25. Análise comparativa da anatomia do cilindro vascular de raízes de plantas selvagens e de transformantes primários para ProbZIP9-VP16-cDNA apresentando alterações fenotípicas de classe I e II	75
Figura 26. Análise comparativa da anatomia de folhas de plantas selvagens e de transformantes primários para ProbZIP9-VP16-cDNA apresentando alterações fenotípicas de classe I e II	76
Figura 27. Análise comparativa da anatomia do mesofilo de folhas de plantas selvagens e de transformantes primários para ProbZIP9-VP16-cDNA apresentando alterações fenotípicas de classe I e II	78
Figura 28. Análise de expressão por RT-PCR semi-quantitativa de linhagens F2 homozigotas para um locus do transgene de ProbZIP9-VP16-cDNA	80
Figura 29. Detecção da proteína recombinante VP16-AtbZIP9 em linhagens transgênicas homozigotas para um locus do transgene ProbZIP9-VP16-cDNA	81
Figura 30. Análises de expressão por RT-PCR semi-quantitativa de genes marcadores do floema e de possíveis genes alvos de <i>AtbZIP9</i> em linhagens homozigotas F2 para um locus do transgene de ProbZIP9-VP16-cDNA	83
Tabela I. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados nas amplificações por PCR para as clonagens e nas reações de seqüenciamento	38
Tabela II. Seqüência de oligonucleotídeos, temperatura de anelamento e número de ciclos utilizados nas amplificações por PCR	47
Tabela III. Classes de alterações fenotípicas apresentadas por plantas T0 provenientes de transformação com ProbZIP9-VP16-cDNA	51

Tabela IV. Classes de alterações fenotípicas apresentadas por plantas T0 provenientes de transformação com ProbZIP9-VP16-bZIP.....	57
Tabela V. Classes de alterações fenotípicas apresentadas por plantas T0 provenientes de transformação com 35S-VP16-bZIP	61
Tabela VI. Resumo das alterações fenotípicas apresentados por transformantes primários expressando ProbZIP9-VP16-bZIP, ProbZIP9-VP16-cDNA e 35S-VP16-bZIP	65
Tabela VII. Etapas de seleção e análise de transformantes para ProbZIP9-VP16-bZIP, ProbZIP9-VP16-cDNA e 35S-VP16-bZIP	68

RESUMO

O crescimento e o desenvolvimento dos organismos são baseados na capacidade celular de expressão gênica diferencial que resulta, principalmente, do controle da taxa de iniciação da transcrição por fatores reguladores de transcrição (FTs). FTs do tipo *Basic Leucine Zipper* (bZIP) foram descritos em todos os eucariotos. Seu domínio conservado é constituído de uma região de ligação ao DNA rica em aminoácidos básicos, flanqueada a um zíper de leucinas responsável pela dimerização. Em angiospermas, os bZIPs são reguladores importantes de processos específicos como fotomorfogênese, desenvolvimento de órgãos, alongação celular, controle do balanço de carbono/nitrogênio, mecanismos de defesa, via de sinalização de hormônios e sacarose, controle osmótico e florescimento. Mostramos que os genomas de *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* codificam para um conjunto completo e não redundante de 76 e 113 fatores bZIP respectivamente, que foram organizados em 11 grupos de proteínas evolutivamente relacionadas e 33 Possíveis Grupos de Genes Ortólogos (PoGO) de mono e eudicotiledôneas, o que deve permitir racionalizar o processo de caracterização funcional destes fatores em angiospermas. O Grupo C, que inclui genes homólogos ao locus de regulação *Opaco-2* (O2) de milho, está organizado em três PoGOS, que possivelmente desempenham três funções ancestrais de angiospermas. Em *Arabidopsis* estas três possíveis funções ancestrais estão representadas por quatro genes (*bZIP O2 homologous*, *Bzo2h*), *Bzo2h3/AtbZIP63* (PoGO C1), *Bzo2h1/AtbZIP10* e *Bzo2h4/AtbZIP25* (PoGO C2) e *Bzo2h2/AtbZIP9* (PoGO C3). Visando um melhor conhecimento sobre a evolução das funções dos fatores bZIP de angiospermas do Grupo C, iniciamos a caracterização funcional destes quatro reguladores, focando principalmente em *AtbZIP9*, um gene único representativo de uma função ancestral de angiospermas e cujo papel ainda é desconhecido. Notamos que a expressão de *AtbZIP9* é restrita às células do floema e regulada por glicose, ácido abscísico e citocinina, sugerindo que este gene integra as vias de sinalização destes sinais metabólicos e hormonais no floema. Abordagens de genética reversa como RNAi, *knockout* e superexpressão não permitiram

elucidar de maneira clara a atuação de *AtbZIP9* no ciclo de vida de *Arabidopsis*, indicando que mecanismos de regulação pós-transcricional e/ou redundância genética atuam sobre este gene. Visando dar continuidade e ampliar o estudo funcional de *AtbZIP9*, foram obtidas linhagens transgênicas de *Arabidopsis* expressando versões modificadas deste gene que codificam para proteínas ativadoras constitutivas fortes da transcrição. Estas novas versões de *AtbZIP9* são teoricamente capazes de ativar de maneira constitutiva a expressão dos genes alvos de *AtbZIP9*, contornando assim, as dificuldades decorrentes da análise de famílias gênicas que apresentam redundância funcional. Quando comparados a plantas selvagens, transformantes primários para ativadores constitutivos fortes apresentaram diversas alterações de morfologia foliar, além de mudanças metabólicas e fisiológicas como acúmulo de compostos fenólicos em folhas, sintomas de morte celular e senescência. A análise destes transformantes ainda sugere uma possível participação de *AtbZIP9* no controle do desenvolvimento do sistema vascular de raízes e folhas. Suspeitamos que as alterações de morfologia foliar e fisiologia observadas possivelmente representem consequências de mudanças nas propriedades funcionais de transporte do floema, decorrentes de defeitos no processo de diferenciação e organização das células do cilindro vascular.

ABSTRACT

Transcriptional regulatory factors (TFs) play an important role in controlling growth and development of all organisms. bZIPs TFs have been described in all eukaryotes and are characterized by a basic aminoacid rich DNA binding domain and a leucine zipper, responsible for dimerization. bZIPs have been reported to act in several different plant-specific processes such as organ development, cell elongation, defense mechanism, hormones and sucrose signalization, light response, control of nitrogen/carbon balance, osmotic control and flowering. We showed that *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* genomes encode a complete and non-redundant set of 76 and 113 bZIP transcription factors, respectively, which were divided into 11 unique groups of homologous genes. More detailed phylogenetic analysis led to the identification of 33 Possible Groups of Monocot and Eudicot Orthologous Genes (PoGO), which allows rationalizing functional studies in angiosperms. Group C, which includes genes homologous to the maize *Opaque-2* locus, is formed by three PoGOs, suggesting that this group represents three ancestral functions among angiosperms. In *Arabidopsis* these three possible ancestral functions may be represented by the bZIP *Opaque-2* homologous genes (*Bzo2h*), *Bzo2h3/AtbZIP63* (PoGO C1), *Bzo2h1/AtbZIP10* and *Bzo2h4/AtbZIP25* (PoGO C2) and *Bzo2h2/AtbZIP9* (PoGO C3). To get insight into the evolution pattern and function of Group C members, we have initiated the functional characterization of the *Bzo2h* genes concentrating initially on *AtbZIP9*, a unique gene that represents an ancestral function and for which no functional information is available. We showed that *AtbZIP9* expression is restricted to phloem cells and regulated by glucose, abscisic acid and cytokinin, suggesting that this gene is an element of the signalization pathways of these metabolic and hormonal signals in the phloem. Reverse genetic approaches such as RNAi, *knockout* and superexpression failed to reveal the biological function of *AtbZIP9* in *Arabidopsis* life cycle and suggested that post-transcriptional regulation and/or functional redundancy may act on *AtbZIP9*. In order to improve our knowledge on *AtbZIP9* function, *Arabidopsis* transgenic lines expressing constitutive transcriptional activator versions of *AtbZIP9* were

obtained. Since such modified versions of *AtbZIP9* are theoretically able to promote the superexpression of *AtbZIP9* target genes, this strategy should be independent of functional redundancy. When compared to wild type plants, primary transformants for constitutive transcriptional activator versions of *AtbZIP9* showed alterations of leaf morphology, as well as metabolic and physiologic modifications, such as phenolic compound accumulation in leaves, cell death and senescence symptoms. Analyses of this transformants also suggest that *AtbZIP9* is possibly involved in the control of leaf and root vascular system development. We suspect that the alteration of leaf morphology and physiology observed in primary transformants possibly reflects consequences of changes in phloem transport functional properties, due to defects in vascular cylinder cell differentiation and organization.

INTRODUÇÃO

1. O controle da expressão gênica em eucariotos

A eficiência dos mecanismos moleculares e bioquímicos que controlam fenômenos biológicos tais como diferenciação, controle do ciclo celular, desenvolvimento e resposta a estímulos ambientais está estritamente relacionada com a regulação fina da expressão gênica (Riechmann *et al.*, 2000). Esta regulação assegura que uma determinada proteína seja produzida em sua exata quantidade, no exato momento e no local apropriado para que sua função biológica no desenvolvimento do organismo seja cumprida (Naar *et al.*, 2001). Em células eucarióticas, a indução da expressão gênica e da atividade de proteínas biologicamente ativas pode ser regulada em diversos níveis da via DNA-RNA - Proteína (Figura 1; Meshi & Iwabuchi, 1995; Beckett, 2001; Warren, 2002; Wray *et al.*, 2003; Mata *et al.*, 2005).

Exemplos de regulação em cada um destes passos são conhecidos (Kuhlemeier, 1992; Day & Tuite, 1998; Mata *et al.*, 2005), embora para a maioria dos genes o principal nível de regulação ocorra durante a transcrição do DNA em mRNA (Meshi & Iwabuchi, 1995; Riechmann *et al.*, 2000), o que reflete na porcentagem do genoma de plantas e outros eucariotos dedicada a fatores reguladores de transcrição (3.5 – 7%; Sigh, 1998; Riechmann *et al.*, 2000).

Os processos que proporcionam a modulação transcricional são extremamente complexos e se dão através de uma intrínseca rede de interações envolvendo inúmeros componentes em resposta a sinais endógenos e exógenos (Maldonato & Reinberg, 1995). A taxa de transcrição não é determinada apenas pelas propriedades de um único fator de regulação de transcrição, mas pela complexa interação entre vários fatores e seus respectivos sítios e também, pela interação desses fatores com outras proteínas regulatórias (Sigh, 1998).

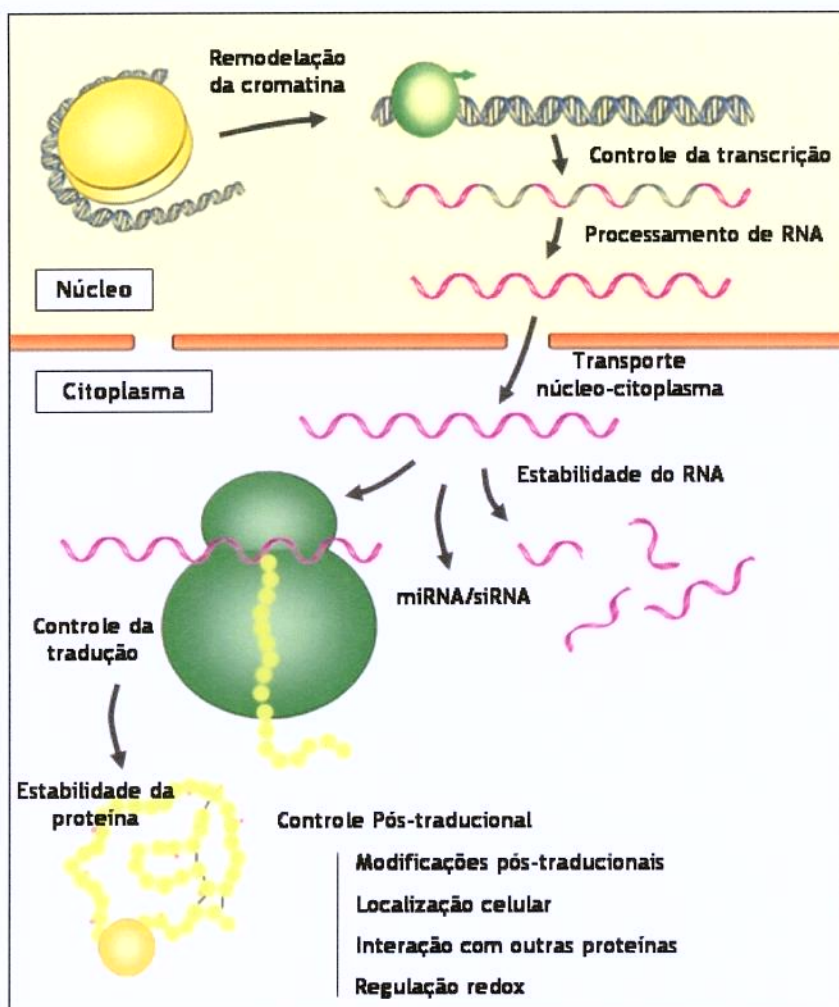


Figura 1. Fases do controle da expressão gênica em eucariotos.

1.1 O controle *cis* da transcrição

Seqüências de DNA envolvidas no controle da expressão gênica são chamadas de elementos *cis*, podendo ser divididas em três classes gerais: promotores, elementos proximais a promotores, *enhancers* e *silencers* (Lee & Young, 2000). Promotores são necessários ao início da transcrição, enquanto elementos proximais a promotores e *enhancers* maximizam a taxa de transcrição dos promotores, o oposto ocorrendo com os *silencers*, envolvidos com a repressão deste processo (Blackwood & Kadonaga, 1998; Lee & Young, 2000). Estes sítios foram originalmente distinguidos pela distância do ponto de início da transcrição no qual eles operam. Promotores e elementos proximais a

promotores atuam próximos ao ponto de início da transcrição enquanto *enhancers* e *silencers* podem agir a distâncias maiores, às vezes de até 50Kb, atuando também independentemente da sua orientação, ou seja *upstream* ou *downstream* ao promotor que controlam (Blackwood & Kadonaga, 1998).

Nos sistemas eucarióticos existem 3 RNA polimerases diferentes, estando a RNA polimerase II encarregada da síntese de mRNA (Kornberg, 1999; Lee & Young, 2000; Riechmann, 2002). Em muitos promotores da RNA polimerase II foi identificada uma seqüência conservada, formada pelo consenso TATAa/tAa/t e localizada a -25 ou -30 pb do local de início da transcrição. Esta seqüência foi chamada TATA box e está envolvida no direcionamento da polimerase com relação ao sítio de iniciação da transcrição (Lee & Young, 2000; Smale & Kadonaga, 2003). Apesar de vários promotores de genes apresentarem claramente o elemento TATA box, muitos não o fazem, sendo que alguns possuem sucessões A + T ricas que parecem funcionar de maneira semelhante a este elemento. Embora a região TATA box seja bem caracterizada, as TATA *binding proteins* (TBP) ligam-se a uma ampla gama de seqüências derivadas de TATA box, o que pode explicar a variação encontrada neste sítio alvo, embora estas proteínas sejam as mais conservadas encontradas em eucariotos (Smale & Kadonaga, 2003).

Ao contrário dos promotores procarióticos, os promotores eucarióticos não fornecem sinais de reconhecimento suficientes para que a RNA polimerase II inicie a transcrição *in vivo*. O TATA box e os outros elementos *cis* regulatórios devem ser, cada um, reconhecidos por proteínas regulatórias de ação *trans*, que interagem com estes sítios para que a RNA polimerase possa se ligar e iniciar a transcrição adequadamente (Meshi & Iwabushi, 1995; Kornberg, 1999; Lee & Young, 2000).

1.2 A cromatina e o controle *trans* da transcrição

Em células eucarióticas o DNA apresenta-se complexado a proteínas específicas denominadas histonas, formando a cromatina. A compactação do DNA na cromatina é importante para a organização do mesmo dentro dos limites do núcleo celular e na própria regulação gênica, uma vez que representa uma barreira significativa a vários processos

celulares, entre eles, o acesso de proteínas que participam da transcrição (Lee & Young, 2000; Myers & Kornberg, 2000; Riechmann, 2002).

Para que a transcrição gênica possa ocorrer, a estrutura da cromatina precisa ser remodelada a fim de permitir o acesso da RNA polimerase II e dos fatores reguladores de transcrição (Kornberg, 1999). A acetilação de histonas foi a primeira modificação a ser relacionada com a competência transcricional e provavelmente representa o evento que inicia a liberação da estrutura da cromatina (Struhl, 1998). No entanto, mudanças conformacionais ainda podem ocorrer em resposta a deacetilação, metilação e fosforilação (Lee & Young, 2000; Myers & Kornberg, 2000; Narlikar *et al.*, 2002).

Fatores de transcrição podem ser divididos em 2 classes principais. A primeira corresponde a fatores basais como TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE e TFIIH, que se ligam às regiões promotoras dos genes e auxiliam a RNA polimerase II a iniciar a transcrição, não sendo capazes, entretanto, de aumentar ou diminuir a sua taxa. Estes fatores estão presentes em todas as células e são ativos nas mais diversas condições. A segunda classe engloba fatores de transcrição sítios-específicos, presentes apenas nos tipos celulares onde atuam e/ou em determinado momento do ciclo de vida do organismo. Estes, por sua vez, podem se ligar a regiões de *enhancers* ou *silencers*, ativando ou reprimindo a transcrição através de interação com a maquinaria basal de transcrição (fatores basais de transcrição juntamente com a RNA polimerase II) por intermédio de cofatores (Figura 2; Kuhlemeier, 1992, Kornberg, 1999, Lee & Young, 2000).

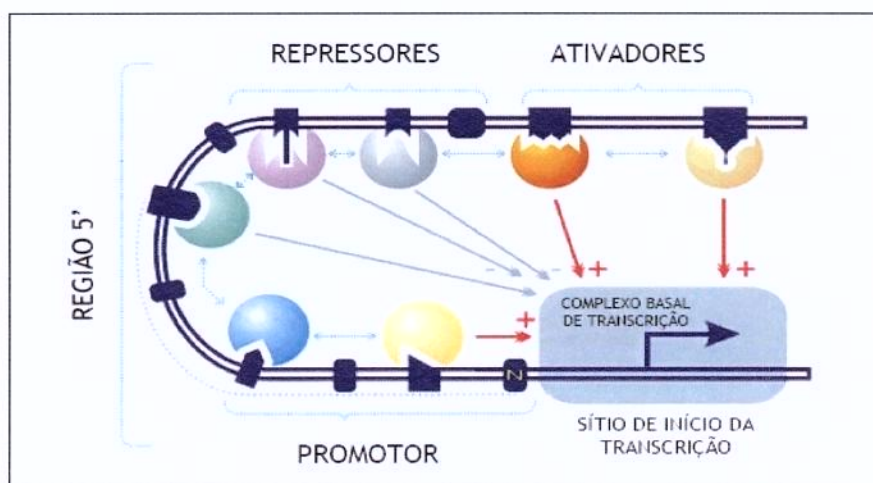


Figura 2. Esquema do complexo de iniciação da transcrição, contendo o complexo basal associado à RNA Polimerase II, os ativadores e os repressores ligados ao promotor do gene a ser transcrito (adaptado de GeneNetWorksTM).

De um modo geral, a expressão gênica em eucariotos é normalmente regulada por um complexo multiproteico composto por diferentes polipeptídicos, que se ligam ao DNA de uma maneira seqüência específica, interagindo diretamente ou indiretamente com a maquinaria basal de transcrição (Tijan & Maniatis, 1994). Este tipo de regulação transcricional é chamado de controle combinatorial, gerando uma complexa rede regulatória. A regulação de um único gene por mais de uma proteína fornece uma eficiente maneira para integrar as repostas de uma variedade de sinais ambientais ou endógenos (Wolberger, 1999).

Um fator de regulação da transcrição típico possui uma estrutura modular, geralmente composta por um domínio de ativação, no caso dos reguladores positivos, por um domínio de ligação ao DNA e por um domínio envolvido com a multimerização (Tijan & Maniatis, 1994). Esta organização permite que um conjunto relativamente pequeno de módulos gere fatores de transcrição altamente especializados (Tijan & Maniatis, 1994). Em muitos casos, incluindo vários fatores de transcrição de plantas, estes domínios retêm suas funções correspondentes mesmo quando separados fisicamente ou recombinados artificialmente para gerar proteínas quiméricas (Schindler *et al.*, 1992).

Os domínios de ativação descritos até o momento apresentam seqüências de aminoácidos características. Entre os mais comuns destacam-se os domínios de ativação ácidos (Ma & Ptashne, 1987; Ptashne, 1988), os ricos em glutamina (Courey & Tijan, 1988) e os ricos em prolina (Mermoud *et al.*, 1989). A identificação destes domínios em proteínas que interagem com o DNA sugere que estas proteínas possam atuar como reguladores positivos de transcrição. Os domínios de multimerização são responsáveis pela formação de dímeros, tetrâmeros ou outros multímeros. Fatores de transcrição podem formar homo ou heterodímeros funcionais, o que influencia a especificidade de ligação ao DNA, a afinidade do fator pelas seqüências alvo nos promotores e a localização nuclear (Lee & Young, 2000).

Com base nas similaridades entre seqüências de aminoácidos e entre as estruturas dos domínios de ligação ao DNA e de multimerização, os fatores de regulação da transcrição podem ser classificados em diferentes famílias multigênicas, caracterizadas por motivos conservados. Desta forma, temos a família dos Homeodomínios (HD), dos *Zinc Fingers*, dos *Helix-Loop-Helix* (HLH) e *Basic-Helix-Loop-Helix* (BHLH), dos *Helix-Turn-Helix*, que inclui as proteínas MYB, dos MADS-box, dos

NACs, dos DOFs (*DNA Binding with one finger*), dos *Basic-Leucine Zipper* (bZIP), entre outras (Singh, 1998; Riechmann *et al.*, 2000; Wingender *et al.*, 2000; Warren *et al.*, 2002). Muitos fatores de transcrição ainda não pertencem a uma determinada família e imagina-se que outras ainda serão descobertas.

Algumas famílias de fatores de transcrição como BHLH, MYB e bZIP podem ser encontradas em todos os eucariotos, desde as leveduras até os mamíferos, incluindo as plantas. Esta conservação indica que estes domínios de ligação ao DNA surgiram cedo na evolução, possivelmente antes da divergência das principais linhagens eucarióticas há aproximadamente 1,5 bilhões de anos atrás, tendo sido incorporados nos mecanismos regulatórios de uma grande variedade de genes em diferentes organismos (Riechmann *et al.*, 2000; Wingender *et al.*, 2000; Riechmann, 2002).

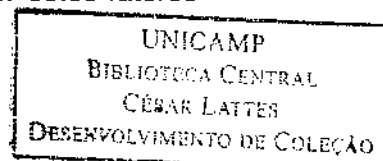
Apesar de presentes em todos os eucariotos, muitas destas famílias de fatores de transcrição exibem grande disparidade em abundância entre diferentes organismos. Grupos como MYB, MADs-box e bZIPs que não são muito numerosos em animais e leveduras, foram significativamente amplificados na linhagem das plantas (Riechmann & Ratcliffe, 2000; Riechmann, 2002). A família MADS-box, por exemplo, possui 2 representantes em *Drosophila*, 2 em *C. elegans*, 4 em *S. cerevisiae* e mais de 100 membros em *Arabidopsis* (Riechmann, 2002; Parenicova *et al.*, 2003).

Cada uma destas linhagens evolutivas também desenvolveu seu próprio conjunto de famílias de fatores de transcrição. Membros de famílias de fatores de transcrição de uma linhagem específica representam aproximadamente 45%, 47% e 32% dos fatores de transcrição de *Arabidopsis*, *C. elegans* e levedura, respectivamente, sendo praticamente toda a fração restante relativa a fatores de transcrição presentes nos três grandes reinos. Em cada organismo apenas uma pequena fração (2-5%) dos fatores de transcrição pertencem a famílias encontradas somente em dois dos três reinos, ou seja, em animais e levedura (SOX/TCF, *Fork head* e RFX1-like) ou em plantas e animais (famílias TULP, CPP e E2F/DP). Como exemplo de famílias de fatores de transcrição que são encontrados somente em plantas podemos citar AP2/EREBP (*APETALA2/Ethylene responsive element binding protein*), NAC, WRKY, Dofs, ARFs (*AUXIN RESPONSE FACTORS*) e proteínas AUX/IAA (que não se ligam diretamente ao DNA, mas interagem com proteínas ARF). Exemplos de famílias encontradas somente em animais são NHR e Adf-1 e somente em fungos, C6 e Swi4/Swi6 (Riechmann *et al.*, 2000; Riechmann, 2002).

2. A família dos fatores de regulação do tipo *Basic Leucine Zipper* (bZIP)

Os fatores de regulação da transcrição do tipo bZIP foram descritos em todos os eucariotos (Wingender *et al.*, 2000) e são caracterizados por um domínio conservado de 40 a 80 aminoácidos, conhecido como domínio bZIP. Este domínio é formado por dois motivos distintos, uma região básica e um zíper de leucinas (Figura 3). A região básica é composta por cerca de 30 resíduos, principalmente de aminoácidos básicos, sendo responsável pela interação com o sítio-alvo do DNA (Izawa *et al.*, 1993). O domínio básico parece também estar envolvido com o transporte das proteínas bZIP para o núcleo celular (Varagona & Raikhell, 1994). Esta região se encaixa no sulco maior da sequência de DNA alvo, onde são estabelecidas ligações hidrofóbicas ou pontes de hidrogênio entre as cadeias laterais de aminoácidos e os nucleotídeos da sequência (Ellenberg *et al.*, 1992; Hurst, 1995), sendo o conjunto destas interações responsável pela determinação da afinidade do domínio bZIP pela sequência alvo específica (Hurst, 1995).

O zíper de leucinas é constituído por repetições de resíduos hidrofóbicos, principalmente de leucina a cada sete aminoácidos, em uma extensão de 20 a 40 resíduos, sendo que o número de repetições pode variar de três a nove (Hurst, 1995; Jacoby *et al.*, 2002). O zíper de leucinas, devido a sua característica hidrofóbica, é responsável por interações com outras moléculas de proteínas, sendo que a dimerização pode ocorrer entre subunidades idênticas, formando homodímeros, ou entre subunidades diferentes, formando heterodímeros funcionais (Singh, 1998). A capacidade de dimerização é influenciada por atração ou repulsão eletrostática de resíduos polares que flanqueiam a superfície de interação hidrofóbica das hélices (Hurst, 1995). Alguns fatores bZIP podem formar apenas homodímeros funcionais como GCN4, enquanto outros como a família Fos são ativos apenas na forma de heterodímeros (O'Shea *et al.*, 1989). Existem porém, bZIPs como Jun que podem formar tanto homo quanto heterodímeros (Kouzarides & Ziff, 1989). A capacidade dos fatores bZIP de formarem homo ou heterodímeros pode ter importantes consequências em suas funções regulatórias. Diferentes combinações entre proteínas bZIP podem proporcionar diferentes níveis de controle de expressão gênica, uma vez que tais combinações podem alterar a afinidade e a especificidade de ligação aos sítios-alvo, mudando assim o espectro de genes regulados por estes fatores (Singh, 1998; Wray *et al.*, 2003).



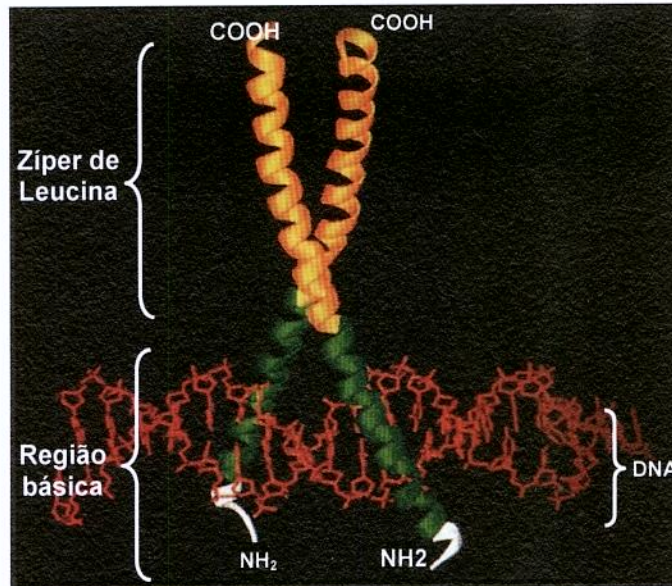


Figura 3. Representação esquemática da estrutura tridimensional do domínio conservado bZIP ligado ao DNA. A dimerização ocorre através do zíper de leucinas e a ligação ao sulco maior da sequência de DNA pelo domínio básico. Na região do zíper de leucinas, as α -hélices dos dois monômeros são empacotadas através de interações de van der Waals, produzindo uma estrutura do tipo *coiled-coil*, a qual é responsável pelo correto posicionamento do domínio básico no sulco maior do DNA (Ellenberg *et al.*, 1992).

Apesar dos reguladores do tipo bZIP apresentarem um domínio relativamente simples de ligação com o DNA, eles são capazes de reconhecer um grande número de seqüências, discriminando-as suficientemente a fim de regular a transcrição de diversos genes com diferentes promotores (Riechmann, 2002). Uma característica interessante dos fatores bZIP é que o zíper de leucinas e o domínio básico são subdomínios funcionais distintos, uma vez que podem ser trocados entre diferentes membros da família, gerando proteínas quiméricas com manutenção das capacidades de dimerização e/ou especificidade de interação com o DNA originais (Agre *et al.*, 1989).

Estudos cristalográficos com o fator bZIP GCN4 de levedura demonstraram que os monômeros formam α -hélices contínuas na região do bZIP, sendo que, na região do zíper de leucinas, estas hélices são empacotadas através de ligações de van der Waals, produzindo uma estrutura do tipo *coiled coil*, que é responsável pelo posicionamento do domínio básico no sulco maior do DNA (Hurst, 1995; Luscombe *et al.*, 2000; Ellenberg *et al.*, 2002).

Fatores de transcrição bZIP se ligam preferencialmente a seqüências de DNA com *core* ACGT, sendo a especificidade de ligação regulada por nucleotídeos que flanqueiam esta seqüência. bZIPs de plantas geralmente se ligam a seqüências A-box (TACGTA), C-box (GACGTC) e G-box (CACGTG) (Izawa *et al.*, 1993), no entanto, existem alguns exemplos de ligação a seqüências não palindrômicas (Choi *et al.*, 2000; Fukazawa *et al.*, 2000).

3. Os fatores de regulação da transcrição do tipo bZIP de plantas superiores

Fatores de transcrição do tipo bZIP representam uma das maiores famílias de fatores de transcrição encontradas nos genomas de plantas (Riechmann & Ratcliffe, 2000). Análises genéticas, moleculares e bioquímicas indicam que os fatores bZIP são reguladores importantes (ativadores ou repressores) de uma ampla gama de processos específicos em angiospermas como resposta à luz com a participação dos fatores HY5, CPRF2, CPRF4, GBF1, GBF2 e GBF3 (Schindler *et al.*, 1992; Wellmer *et al.*, 1999; Osterlund *et al.*, 2000; Ulm, *et al.*, 2004), desenvolvimento de órgãos com os fatores PERIANTHIA e LIGULELESS2 (Walsh *et al.*, 1997; Chuang *et al.*, 1999), alongação e a morfogênese celular com os fatores RSG e RF2a (Yin *et al.*, 1997; Fukuzawa *et al.*, 2000), controle do balanço de carbono/nitrogênio durante o desenvolvimento da semente de milho por O2 (Ciceri *et al.*, 1999), o controle de mecanismos de defesa com os fatores TGA2, OBFs e *AtbZIP10* (Niggeweg *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1999; Despres *et al.*, 2000; Pontier *et al.*, 2001; Kaminaka *et al.*, 2006), via de sinalização de hormônios com os fatores ABI5, ABF, TRAB, e TGA e de sacarose com o fator ATB2 (Rook *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2000; Finkelstein & Lynch, 2000; Uno *et al.*, 2000; Niggeweg *et al.*, 2000), controle osmótico com os fatores ATB2, *AtbZIP53* e *AtbZIP10* (Satoh *et al.*, 2004; Weltmeier *et al.*, 2006) e florescimento com o fator FD (Abe, *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005). Estas observações sugerem que a evolução das plantas se beneficiou amplamente das propriedades regulatórias de fatores de transcrição do tipo bZIP.

Recentemente, com a disponibilização das seqüências genômicas de *Arabidopsis* (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) e arroz (Sasaki *et al.*, 2000; Goff *et al.*, 2002; Ouyang *et al.*, 2007), representantes dos maiores grupos monofiléticos de angiospermas, mono e eudicotiledôneas, respectivamente, criou-se uma oportunidade única para o

estudo da evolução de famílias multigênicas e de suas funções associadas em angiospermas. Pela primeira vez pôde-se questionar até que ponto o conjunto de fatores de transcrição de *Arabidopsis* pode representar o presente em outras angiospermas.

Dentro deste contexto, um dos aspectos desta abordagem comparativa envolve o estabelecimento de relações entre fatores de transcrição destes diferentes genomas em um sistema de genes homólogos, que inclui genes ortólogos e parálogos (Tatusov *et al.*, 1997; Vincentz *et al.*, 2003). O termo ortólogo refere-se a genes homólogos que divergiram através de um evento de especiação (são versões de um mesmo gene em organismos diferentes) e parálogo, a genes homólogos que resultaram de um evento de duplicação dentro de um genoma (Fitch, 2000; Meyerowitz, 2002). Genes ortólogos normalmente conservam a mesma função enquanto genes parálogos podem vir a desenvolver novas funções.

Até o momento foram preditos 1789 fatores de transcrição em *Arabidopsis* (Guo *et al.*, 2005) e 2344 em arroz (Wu *et al.*, 2006), o que representa para ambos os organismos praticamente 6% do total de genes codificados pelo genoma. Análises desenvolvidas em nosso laboratório identificaram um conjunto completo e não redundante de 76 fatores de transcrição bZIP em *Arabidopsis* e 113 em arroz, que possivelmente representam o conjunto de funções essenciais associadas a estes fatores em angiospermas (Corrêa, 2004).

Baseado em análises filogenéticas estes fatores foram então agrupados em 11 grupos de genes homólogos de mono e eucotiledôneas, identificados de A a J e mais um grupo S (Figura 4; Corrêa, 2004). Análises filogenéticas mais detalhadas dentro de cada um destes grupos, incluindo seqüências encontradas em bancos de EST (*Expressed Sequence Tag*) que possivelmente codificam para bZIPs de outras mono e eucotiledôneas, permitiram uma reorganização destes 11 grupos em 33 Possíveis Grupos de Genes Ortólogos de mono e eucotiledôneas (PoGO, Figura 4; Corrêa, 2004). Esta última abordagem deve facilitar a transferência de informações bioquímicas, estruturais e funcionais de uma proteína para outra, uma vez que é possível admitir que existe uma grande probabilidade de que todos os genes de um PoGO desempenhem a mesma função (Corrêa, 2004).

bZIPno.	Gene Code	Published	GenBank
OsZIP23			
OsZIP24			
OsZIP26			
OsZIP29			PoGO A1
AtZIP12	At2g41070	DPBF4	AF334209
AtZIP66	At3g56850	AREB3	AB017162
OsZIP30			
OsZIP34			
OsZIP37			PoGO A2
AtZIP14	At4g35900		BN000021
AtZIP27	At2g17770		BN000022
OsZIP25			
OsZIP33		OSE2	AAF65459 PoGO A3
AtZIP13	At5g44080		BN000023
AtZIP40	At1g03970	GBF4	U01823
OsZIP35			
OsZIP38			PoGO A4
AtZIP39	At2g36270	ABI5	AF334206
AtZIP67	At3g44460	DPBF2	AJ419600
OsZIP27			
OsZIP28			
OsZIP31			
OsZIP32		TRAB1	BAA83740
OsZIP36			PoGO A5
AtZIP15			
AtZIP35	At1g49720	ABF1	AF093544
AtZIP36		ABF2	AF093545
AtZIP37	At4g34000	ABF3	AF093546
AtZIP38	At3g19290	ABF4	AF093547
OsZIP76			
OsZIP78			
AtZIP17	At2g40950		AV441374 PoGO B1
AtZIP28	At3g10800		AJ419850
AtZIP49	At3g56660		AJ419851
OsZIP61		REB	BAA11431
AtZIP63		RISBZ1	BAB39173 PoGO C1
AtZIP63	At5g28770	BZO2H3	
OsZIP62		RBZO2H	
AtZIP10	At4g02640	BZO2H1	PoGO C2
AtZIP25	At3g54620	BZO2H4	
OsZIP58		RITA1	AAC37418
OsZIP59		RISBZ4	BAB39174 PoGO C3
OsZIP60		RISBZ5	BAB39175
OsZIP61		REB	BAA11431
AtZIP9	At5g24800	BZO2H2	AF310223
OsZIP6			PoGO D1
OsZIP10			
OsZIP21			
AtZIP65	At5g06839		AJ314787
OsZIP8			
OsZIP11			
OsZIP16			PoGO D2
OsZIP17			
AtZIP21	At1g08320		AJ314757
OsZIP7			
OsZIP15			
OsZIP20			
AtZIP22	At1g22070	TGA3	L10209 PoGO D3
AtZIP47	At5g65210	TGA1	X68053
AtZIP50	At1g77920		AJ315736
AtZIP57	At5g10030	OBF4	X69899
OsZIP13			
AtZIP46	At1g68640	PAN	AF111711 PoGO D4
OsZIP9			
OsZIP12			
OsZIP14			
OsZIP18			PoGO D5
OsZIP19		HBP-1b	BAB44077
OsZIP22			
AtZIP20	At5g06950	TGA2	D10042
AtZIP26	At5g06960	HBP-1b	X69900
AtZIP45	At3g12250	TGA6	AJ320540
OsZIP82			
OsZIP86			
AtZIP76			AC079604 PoGO E1
AtZIP77			AC023064
OsZIP83			
OsZIP84			
OsZIP85			PoGO E2
AtZIP34	At2g42380		AF401299
AtZIP61	At3g58120		AF401300
OsZIP1			
OsZIP3			
OsZIP4			PoGO F1
OsZIP5			
AtZIP24	At3g51960		AI994442
OsZIP2			
AtZIP19	At4g35040		N65677 PoGO F2
AtZIP23	At2g16770		AV544638

A



(1) LRRTES

B



(1) MPMYPAMYPLMPWMPHPYPMRGSQVPLVIPRLKPKQ
(2) KAVEEKAKKTKTKKVASISLLGLL

C



D



(1) GAMAFDMFYARWLEEHNRHINELRTAVNAHA
(2) HYDEIFRMKGVAADVFHVMGSMWKTPAERC
FMWIGGFRPSELLKVLVPHLEPLTE
(3) QQIMGICNLQSCQQAEDALSQGMELQQLA
ETLAGGSP

E



(1) ETDTKRAKQY

F



(1) THTCTHTHTCIPPGP

Fatores do Grupo A provavelmente estão envolvidos na via de sinalização de ácido abscísico (ABA) e de estresse abiótico em sementes e tecidos vegetativos. Estes bZPs são capazes de se ligar a seqüências de elementos de resposta a ABA (ARE) para regular a taxa de transcrição de genes do tipo LEA (*Late embryogenesis abundant*)

O Grupo C abriga genes homólogos ao fator Opaco-2 de milho, envolvido na regulação da expressão de genes de proteínas de reserva da semente e no controle do metabolismo de carbono/nitrogênio. Os ortólogos de Opaco-2 de Arabidopsis estão envolvidos com o controle do acúmulo de proteínas de reserva no endosperma, metabolismo do aminoácido prolina e resposta hipersensitiva (HR) e processos de defesa basal da planta. O fator BZI-1 de tabaco, possivelmente possui um papel na via de sinalização de auxina e na resposta a patógeno.

Genes do Grupo D podem atuar em dois processos: desenvolvimento e defesa contra patógenos. O gene LG2 do milho atua na formação da lígula e o gene PAN de Arabidopsis, no controle do número de órgãos florais. Os fatores TGA de Arabidopsis estão envolvidos com o processo de resposta sistêmica adquirida (SAR).

bZIP No. Gene Code Published GenBank

OsbZIP65			
OsbZIP66			
OsbZIP72		OsZIP-2a AAC49557	PoGO G1
OsbZIP73		OsZIP-2b AAC49558	
AtbZIP62	At1g19490		
OsbZIP67			
OsbZIP74		OSBZ8 AAB40291	PoGO G2
OsbZIP75			
AtbZIP54	At4g01120	GBF2 AF053228	
AtbZIP55	At2g46270	GBF3 U51850	
OsbZIP70			
AtbZIP41	At4g36730	GBF1 X63894	PoGO G3
OsbZIP69			
OsbZIP71		GBF-1a T03241	
AtbZIP16			PoGO G4
AtbZIP68	At1g32150		
OsbZIP64			
OsbZIP68			PoGO G5
OsbZIP81		THY5 BAB62558	
AtbZIP64	At3g17609	HY5-like AF453477	PoGO H1
OsbZIP77			
OsbZIP79			PoGO H2
AtbZIP56	At5g11260	HY5 AB005295	
OsbZIP80			
AtbZIP60	At1g42990	AY045964	PoGO H3
OsbZIP91			
OsbZIP94			PoGO I1
AtbZIP51	At1g43700	VIP1 AF225983	
OsbZIP88			
OsbZIP95		RF2a AAC49832	
AtbZIP59	At2g31370	PosF21 X61031	PoGO I2
AtbZIP69	At1g06070	AJ419854	
OsbZIP89			
OsbZIP90			
AtbZIP18	At2g40620	AY074426	PoGO I3
AtbZIP52	At1g06850	AAF63137	
OsbZIP87			
OsbZIP92			
OsbZIP93			
OsbZIP96			PoGO I4
AtbZIP29	At4g38900	AF401297	
AtbZIP30	At2g21230	AF401298	
AtbZIP31	At2g13150	AF401301	
AtbZIP32	At2g12980	AV566578	
AtbZIP33	At2g12900		PoGP I1
AtbZIP71	At2g24340		
AtbZIP74	At2g21235		
OsbZIP51			
OsbZIP52			
OsbZIP53			
OsbZIP54			
OsbZIP57			
AtbZIP3	At5g15830	AV549429	PoGO J1
AtbZIP8	At1g68880	AF400621	
AtbZIP42	At3g30530	BAB01020	
AtbZIP43	At5g38800		
AtbZIP48	At2g04038	AC007178	
AtbZIP58	At1g13600	AF332430	
OsbZIP39			
OsbZIP40			
OsbZIP39			
OsbZIP40			
OsbZIP41			
OsbZIP42			
OsbZIP43			
OsbZIP44			
OsbZIP45			
OsbZIP46			
OsbZIP47		LIP19 CAA40596	
OsbZIP48			
OsbZIP49			
OsbZIP50			
OsbZIP55			
OsbZIP56			
AtbZIP1	At5g49450	AF400618	
AtbZIP2	At2g18160	GBF5 AF53939	
AtbZIP4	At1g59530	AF400619	
AtbZIP5	At3g49760		
AtbZIP6	At2g22850		
AtbZIP7	At4g37730		
AtbZIP11	At434590	ATB2 AV566155	
AtbZIP44	At1g75390	AF400620	
AtbZIP53	At3g62420		
AtbZIP70	At5g60830		
AtbZIP75	At5g08141		
AtbZIP72	At5g08141		

G



H



I



(1) DTTGLTENNELKIRLQAMEQQAHLRDALNE
ALKEEVQRLK

J



S



No Grupo G, genes como GBF e CPRF são elementos da via de sinalização da luz e podem atuar como homo ou heterodímeros. Os genes ROM1 e ROM2 possivelmente atuam na regulação da expressão de genes de proteínas de reserva, o que indica que este Grupo pode ter um papel na maturação de sementes.

O Grupo H possui dois membros amplamente estudados, HY5 e HY5-like de Arabidopsis que atuam na fotomorfogênese através da regulação de genes induzidos pela luz. AtbZIP60 está associado a resposta a estresse associado ao retículo endoplasmático.

Estudos com diversos bZIPs do Grupo I indicam que eles estão relacionados ao desenvolvimento vascular. RF2a de arroz possivelmente caracteriza-se como um ativador floema-específico e VSF-1 apresenta-se expresso em tecidos vasculares ativando um gene que codifica uma proteína estrutural da parede celular.

O Grupo S apresenta como particularidade o fato de nenhum de seus membros possuir íntrons. A formação de PoGOs não é evidente dentro deste Grupo. Um subgrupo formado por AtbZIP1, AtbZIP2, AtbZIP11, AtbZIP44 e AtbZIP53 pode heterodimerizar com os fatores do Grupo C AtbZIP9, AtbZIP10, AtbZIP25 e AtbZIP63. Existem evidências de que AtbZIP11 e AtbZIP53 estejam envolvidos com o controle osmótico.

Figura 4. Classificação das bZIPs de arroz e *Arabidopsis*. Onze grupos de genes homólogos (A a J e S) foram definidos a partir de análises filogenéticas por NJ do conjunto de bZIPs de arroz e *Arabidopsis*. A organização em PoGOs foi realizada com base em análises filogenéticas mais detalhadas, de cada Grupo de genes homólogos, usando NJ. Esta análise incluiu, além das proteínas de arroz e *Arabidopsis*, proteínas de outras mono e eudicotiledôneas, e foi realizada utilizando motivos conservados entre membros de cada Grupo. Os motivos conservados foram evidenciados por alinhamentos ou pelo programa MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/website/intro.html>). O esquema representativo de uma proteína bZIP de cada Grupo ilustra a posição do seu domínio bZIP e dos demais blocos conservados. A sequência referente a um motivo conservado reflete um consenso em multinível obtido por MEME. As funções conhecidas de membros de cada família estão relatadas. As colunas Código, Publicado e GenBank se referem ao código no MATDB (<http://mips.gsf.de/proj/plant/jsf/athal/index.jsp>), ao nome com o qual foram publicados e o número de acesso no GenBank, respectivamente. AtbZIP72 não foi incluída em nenhum grupo de genes ortólogos, uma vez que seu posicionamento não é claro. A posição conservada de íntron na estrutura do gene *AtbZIP72* sugere que ele está mais relacionado aos Grupos B e H. PoGP - Possível Grupo de Parálogos (Corrêa, 2004).

Esta observação pode ser ilustrada com alguns exemplos de genes já caracterizados. Foi demonstrado, por exemplo, que os parálogos de *Arabidopsis* TGA2, TGA6 e HBP-1b, presentes no PoGO D5, apresentam redundância funcional e atuam na defesa contra patógenos, mais especificamente na resistência sistêmica (Zhang *et al.*, 2003). De acordo com estes dados, os prováveis ortólogos destes genes em arroz, feijão, tabaco e batata identificados pelas análises filogenéticas, apresentam, como esperado, funções relacionadas a defesa a patógenos (Fetkamp *et al.*, 1994; Niggeweg *et al.*, 2000; Tucker *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2005).

A organização em PoGO também permitiu identificar vários genes únicos de *Arabidopsis* e/ou arroz que possivelmente representam funções ancestrais de angiospermas. Tais genes, pela possível ausência de redundância de função constituem-se em alvos privilegiados para estudos funcionais envolvendo técnicas de genética reversa como RNAi, *knockout* e superexpressão (Corrêa, 2004). Os PoGOs D4 e H3 ilustram bem esta última observação uma vez que são formados por apenas um representante de *Arabidopsis* e um de arroz. Além disso, os fatores de *Arabidopsis* destes dois PoGOs já foram caracterizados. O fator PAN do PoGO D4 está envolvido no controle do número de órgãos florais (Chuang *et al.*, 1999) e o fator *AtbZIP60* do PoGO H3 com resposta a estresse associado ao retículo endoplasmático (Iwata & Koisume, 2005). Desta

maneira, os ortólogos destes genes em arroz, por serem genes únicos, devem provavelmente estar relacionados a processos biológicos semelhantes.

4. O grupo C de fatores de transcrição do tipo bZIP

Dentro da classificação em 11 Grupos de bZIPs homólogas de mono e eudicotiledôneas proposta por nosso grupo está o Grupo C, que abriga fatores de transcrição homólogos ao conhecido locus de regulação *Opaco-2* (*O2*) do milho. A expressão de *O2* é restrita ao endosperma da semente em desenvolvimento, onde ele possui um papel na regulação da síntese das prolaminas, a principal classe de proteínas de reserva de milho, que são codificadas por uma complexa família multigênica (Ciceri *et al.*, 1999; Hunter *et al.*, 2002). Análises genéticas e moleculares indicam que, no endosperma da semente de milho, *O2* parece ser importante para integrar o metabolismo de carbono e nitrogênio com a síntese das proteínas de reserva α e β zeínas (Schmidt *et al.*, 1992; Cord Neto, 1998; Damerval & Le Guilloux, 1998).

A mutação recessiva *o2* confere um aspecto opaco à semente de milho madura, além de alguns outros efeitos pleiotrópicos. Mutantes *o2* apresentam um decréscimo de 50 a 70% das zeínas, principalmente devido à redução de 90% no nível das zeínas de 22kDa, e um aumento no conteúdo de lisina e triptofano (Habben *et al.*, 1993). O aumento relativo no conteúdo desses dois aminoácidos é uma consequência de expressão reduzida das zeínas, que são pobres em lisina e triptofano (Schmidt, 1993) e de uma redução de atividade da enzima lisina cetoglutarato redutase/succinato desidrogenase (LKR/SDH) que degrada a lisina (Kemper *et al.*, 1999). Outro aspecto do metabolismo da semente que também parece estar modificado relaciona-se a alterações no conteúdo de várias proteínas e enzimas envolvidas com o metabolismo de aminoácidos, principalmente da via do aspartato (Yunes *et al.*, 1994). Os mutantes *o2* também apresentam uma maior susceptibilidade a patógenos. A baixa resistência ao ataque de insetos e patógenos pode estar associada, nas sementes *o2*, a um decréscimo significativo nos níveis da albumina *b-32*, uma proteína que tem atividade de inativação de ribossomos, atuando como agente de defesa (Lohmer *et al.*, 1991).

Sabe-se que o grupo de ortólogos de *Opaco-2* em outras monocotiledôneas como *OsZIP63* de arroz (Onodera *et al.*, 2001), *SPA* de trigo (Albani *et al.*, 1997), *BLZ2* de cevada (Onâte *et al.*, 1999), *O2* de sorgo (Pirovano *et al.*, 1994) e *O2* de coix (Vettore *et al.*, 1998) conservam o padrão de expressão endosperma específico. No entanto, os demais bZIPs de angiospermas deste grupo parecem não seguir este mesmo padrão. Até que ponto a função de *O2* é conservada entre as eudicotiledôneas é uma questão que ainda precisa ser esclarecida.

Análises filogenéticas detalhadas das bZIPs pertencentes ao Grupo C indicam que ele é formado por 3 PoGOs de mono e eudicotiledôneas (PoGO C1, PoGO C2 e PoGO C3; Figura 5), sugerindo que ele possivelmente representa três possíveis funções ancestrais de angiospermas. Em *Arabidopsis* estas três possíveis funções ancestrais estão representadas por quatro genes que formam um grupo chamado de “bZIP O2 homologous” (*Bzo2h*), com os genes *Bzo2h3/AtbZIP63* (PoGO C1), *Bzo2h1/AtbZIP10* e *Bzo2h4/AtbZIP25* (PoGO C2) e *Bzo2h2/AtbZIP9* (PoGO C3). Visando um melhor entendimento da regulação do mecanismo de balanço de carbono/nitrogênio e de sua evolução em angiospermas, iniciamos em nosso laboratório a caracterização funcional dos fatores *Bzo2h* de *Arabidopsis* que possivelmente desempenham alguma função similar a *O2* de milho.

As análises filogenéticas indicam que entre estes quatro genes de *Arabidopsis* mencionados, *AtbZIP63* do PoGO C1 representa o mais provável gene ortólogo a *O2* (Vincentz *et al.*, 2003; Figura 5). No entanto, este gene apresenta-se fracamente expresso na semente (Lara *et al.*, 2003). Através de fusões com o gene repórter *GusA*, mostramos que o promotor de *AtbZIP63* dirige uma expressão nos feixes de xilema e floema do sistema vascular da planta. Através de análises de RT-PCR quantitativa mostramos também que a expressão deste gene é regulada positivamente por citocinina e negativamente por glicose, ácido abscísico e manose, indicando uma possível atuação nas vias de sinalização destes sinais metabólicos e hormonais (resultados não mostrados, trabalho para obtenção do título de doutor Juarez Pires Thomaz).

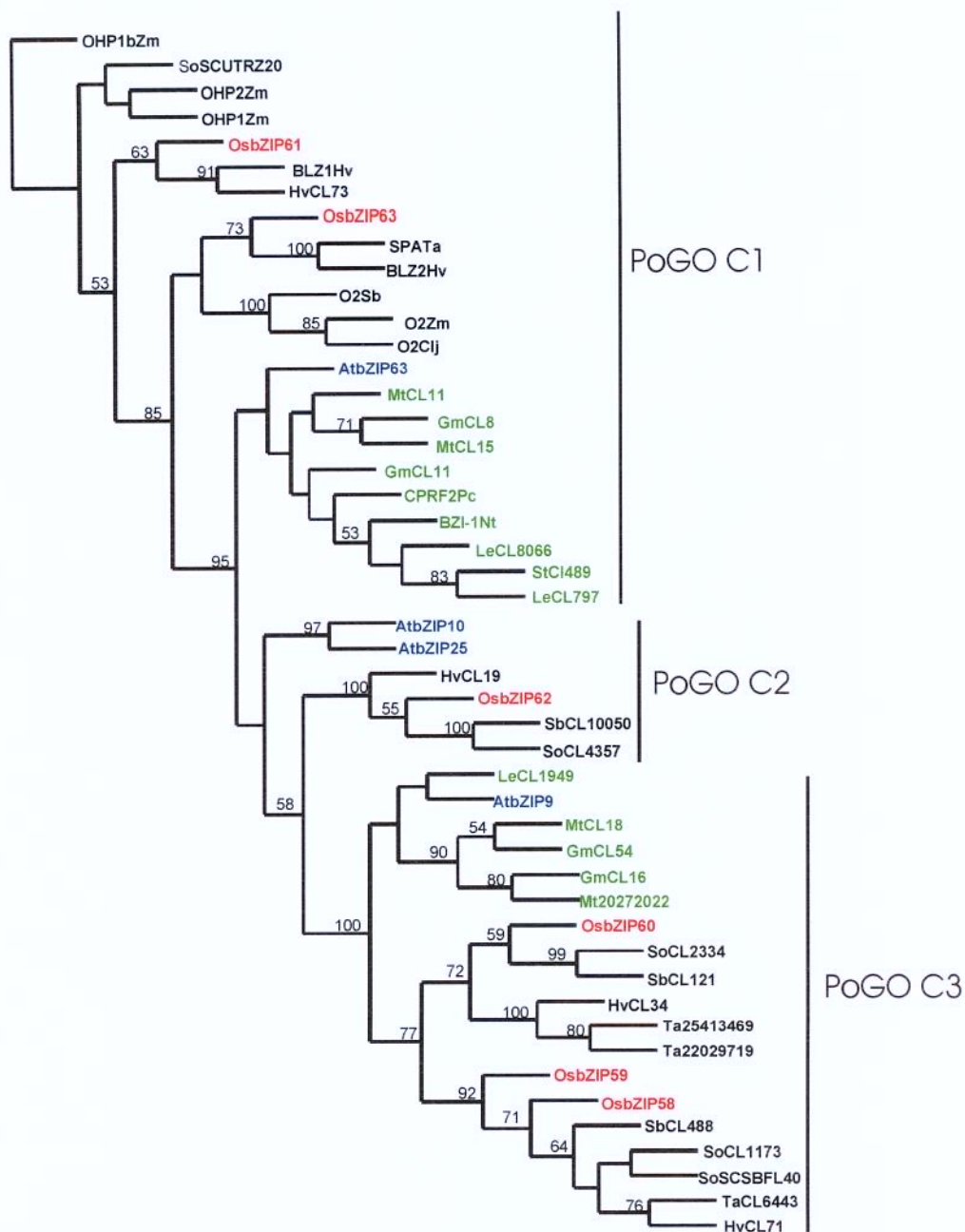


Figura 5. Árvore filogenética das bZIPs de mono e eudicotiledôneas do Grupo C. Este grupo é formado por 3 Possíveis Grupos de genes Qrtólogos (PoGO), que possivelmente representam 3 funções ancestrais entre as angiospermas. *AtbZIP9* de Arabidopsis é um gene único entre membros do PoGO C3 e provavelmente representa uma função ancestral conservada entre mono e eudicotiledôneas. A árvore sem raiz foi obtida por uma análise NJ das distâncias obtidas a partir do alinhamento do motivo bZIP, mais os demais motivos conservados, usando uma matriz de distâncias do tipo PAM. Os valores de bootstrap correspondem a 1000 repetições e estão indicados em porcentagem nos ramos. Em azul, os bZIPs de Arabidopsis; em vermelho, os de arroz; em verde os das demais eudicotiledôneas e em preto, os das demais monocotiledôneas. Abreviações: At, *Arabidopsis thaliana*; Gm, *Glycine Max*; Hv, *Hordeum vulgare*; Le, *Lycopersicon esculentum*; Mt, *Medicago truncatula*; Nt, *Nicotiana tabacum*; Pc, *Petroselinum crispum*; Sb, *Sorghum bicolor*; So, *Sacharumm ssp.*; St, *Solanum tuberosum*; Ta, *Triticum aestivum*; Zm, *Zea mays* (Corrêa, 2004).

BZI-1 que representa o ortólogo de *O2* e *AtbZIP63* de tabaco (PoGO C1), possui um papel na via de sinalização por auxina (Heinekamp *et al.*, 2004). Além disso, plantas de tabaco superexpressando uma versão negativa de *BZI-I*, que não possui um domínio N-terminal de ativação, mostraram-se mais susceptíveis a infecção por vírus do mosaico do tabaco, indicando um possível papel de *BZI-I* na resposta a patógeno (Kuhlmann *et al.*, 2003).

Foi demonstrado que os genes parálogos *AtbZIP10* e *AtbZIP25* (PoGO C2) estão altamente expressos na semente, desde os primeiros estágios de desenvolvimento até a fase de maturação do grão. Estes fatores podem interagir com o regulador de transcrição *ABI3* (*ABA insensitive mutant 3*) para controlar a atividade de promotor do gene de reserva da semente *At2S1*, que codifica para uma albumina (Lara *et al.*, 2003). *AtbZIP10* e *AtbZIP25*, desta maneira, parecem estar funcionalmente mais relacionados a *O2* que *AtbZIP63*, seu ortólogo direto. Estas últimas evidências, de certa maneira, sugerem conservação durante a evolução dos mecanismos que controlam o desenvolvimento da semente em mono e eudicotiledôneas (Lara *et al.*, 2003).

Mostramos em nosso laboratório, no entanto, que a expressão destes fatores não está restrita a semente, o que sugere que eles também estejam envolvidos no controle de outros processos biológicos. Assim como *AtbZIP63*, *AtbZIP10* apresenta-se expresso nos feixes de xilema e floema de vários órgãos da planta, enquanto seu parálogo *AtbZIP25* possui, principalmente, um padrão de expressão periférico ao sistema vascular, sendo o único dos 4 genes homólogos expresso também em grãos de pólen. Mostramos ainda que a hexose manose pode induzir a expressão de *AtbZIP10* e reprimir a de *AtbZIP25*. *AtbZIP10* também se apresenta regulado positivamente por glicose (dados não mostrados, trabalho para obtenção do título de doutor Juarez Pires Thomaz).

Recentemente foi comprovado que *AtbZIP10* também pode agir como regulador positivo de resposta hipersensitiva (HR) e processos de defesa basal da planta após infecção por patógeno, sendo sua atividade regulada pelo fator *zinc-finger* *LSD1* (*Lesions Simulating Disease resistance 1*) por meio de um mecanismo de retenção citoplasmática (Kaminaka *et al.*, 2006). *LSD1* é um regulador negativo de morte celular que atua na proteção das células da planta contra estresses induzidos por espécies reativas de oxigênio (Kaminaka *et al.*, 2006). O modelo de interação proposto para estes dois fatores supõe que na ausência de sinais endógenos e ambientais adequados, *LSD1* retém

AtbZIP10 no citoplasma, inibindo assim seus efeitos regulatórios. Após infecção por patógeno e conseqüente liberação de sinais apropriados derivados de espécies reativas de oxigênio, a ativação de AtbZIP10 leva a sua dissociação de LSD1, seguida por transporte da proteína ao núcleo, onde ela irá induzir a expressão de genes relacionados a HR e defesa basal da planta. Uma vez que AtbZIP10 parece ser ativamente exportado do núcleo, a ativação de seus genes alvos passa a depender de três fatores principais: quantidade intracelular relativa das proteínas LSD1 e AtbZIP10, atividade de retenção mediada por LSD1 e, por último, do tempo de permanência deste fator no núcleo celular. Este mecanismo de controle permite uma fina regulação e um correto ajuste dos processos de morte celular programada em resposta a estresses oxidativos (Kaminaka *et al.*, 2006).

Existem evidências de que AtbZIP10 ainda esteja envolvido no controle do metabolismo da prolina. Foi demonstrado que, em resposta a condições de hipoosmolaridade, este fator pode formar heterodímeros funcionais com AtbZIP53, um membro do Grupo S de homólogos (Figura 4; Corrêa, 2004), para ativar a transcrição do gene da prolina desidrogenase (*PRODH*), enzima envolvida no primeiro passo da via de degradação do aminoácido prolina (Weltmeier *et al.*, 2006). O metabolismo da prolina tem sido associado em plantas a estresses abióticos. Em resposta a condições ambientais que geram estresse osmótico como seca, alta salinidade ou frio, muitas plantas acumulam L-Pro (Parvanova *et al.*, 2004), um osmólito protetor que possui papel essencial no ajuste osmótico das células (Voertberg & Sharp, 1991), na manutenção da integridade estrutural de proteínas e membranas (Chen & Murata, 2002) e na captação de radicais livres (Hong *et al.*, 2000). Em resposta a rehidratação, L-Pro é degradada por uma via localizada na mitocôndria que envolve principalmente a atividade das enzimas ProDH e P5C dehidrogenase (P5CDH) (Yoshida *et al.*, 1999). Uma vez que o acúmulo deste composto também é tóxico para as células, um possível papel de L-Pro e seus metabólitos como moléculas sinalizadoras de morte celular programada induzida por estresse tem sido discutido (Deusche *et al.*, 2004). L-Pro parece ainda possuir um papel relacionado a resposta hipersensitiva induzida por patógeno (Fabro *et al.*, 2004). Existem evidências *in vivo* de que o gene da *ProDH* não seja regulado somente por um fator bZIP, mas sim por uma complexa rede de heterodimerização entre fatores do Grupo C e do Grupo S (Weltmeier *et al.*, 2006).

De fato, através de experimentos de duplo híbrido em protoplastos de *Arabidopsis*, uma rede específica de heterodimerização entre o Grupo C e alguns fatores específicos do Grupo S (Figura 4), como AtbZIP1, AtbZIP2, AtbZIP11, AtbZIP44 e AtbZIP53 foi traçada (Figura 6; Ehlert *et al.*, 2006). A formação de homo ou heterodímeros oferece uma grande flexibilidade combinatória aos sistemas regulatórios (Ehlert *et al.*, 2006) o que, somado ao fato de fatores bZIP não se heterodimerizarem promiscuamente mas sim especificamente (Deppmann *et al.*, 2004), sugere que a dimerização desempenhe uma importante função na regulação gênica (Ehlert *et al.*, 2006). Através da heterodimerização, a especificidade e a afinidade de ligação ao DNA, as propriedades de transativação e conseqüentemente a fisiologia celular podem ser alteradas (Naar *et al.*, 2001). Baseado nessas evidências, Weltmeier *et al.*, 2006 propõe que a rede de interação C/S possivelmente represente um circuito regulatório geral de proteção contra espécies reativas de oxigênio.

Conforme o apresentado anteriormente, existem dados funcionais, ao menos parciais, para alguns dos integrantes dos PoGOs C1 e C2, que podem dar pistas sobre as duas possíveis funções ancestrais desempenhadas por estes grupos de ortólogos. Entretanto, até o momento não está disponível nenhuma informação relacionada a função desempenhada por membros do PoGO C3 no desenvolvimento de *Arabidopsis*. Este trabalho tem como objetivo principal a análise funcional detalhada de *AtbZIP9*, o único representante de *Arabidopsis* deste PoGO C3 e que potencialmente apresenta uma possível função ancestral de angiospermas.

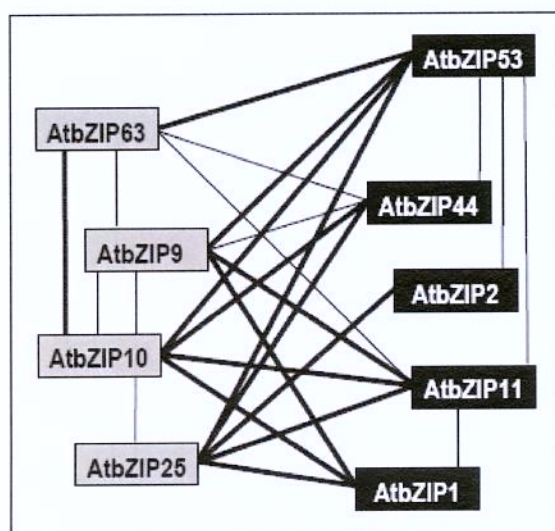


Figura 6. Rede de heterodimerização entre os fatores bZIP do Grupo C e do Grupo S identificada através de experimentos de duplo híbrido em protoplastos de *Arabidopsis*. Interações fracas estão demonstradas por linhas finas e interações fortes, por linhas grossas (Ehlert *et al.*, 2006).

5. O fator de regulação da transcrição do tipo bZIP *AtbZIP9*

Dados obtidos anteriormente em nosso laboratório mostram que linhagens homozigóticas para um locus de um transgene formado pelo gene marcador *GusA* (β -glucuronidase) sob o controle do promotor do gene *AtbZIP9*, apresentam uma expressão do gene marcador restrita ao sistema vascular de todos os órgãos da planta: raízes, hipocótilo, cotilédones, folhas, flores e vagens (Figura 7 A e B; Gauer, 2004), o que concorda com dados de hibridização *in situ* que detectaram a presença do mRNA deste fator no sistema vascular (Gauer, 2004). Estes dados sugerem que a sequência promotora de *AtbZIP9* é suficiente para reproduzir o perfil de expressão *in vivo* do mRNA deste fator. Estes resultados também indicam que *AtbZIP9* possivelmente esteja envolvido no controle de algum aspecto da fisiologia do sistema vascular (i.e. transporte de nutrientes, hormônios ou macromoléculas; Ruiz Medrano *et al.*, 2001).

Mais especificamente a atividade glucuronidase está localizada nas células do floema de todos os órgãos (Figura 7 C e D; Gauer, 2004). Na raiz, a atividade Gus se restringe ao floema e possivelmente às células do periciclo adjacentes, definindo assim, uma simetria bilateral (Figura 7 E). *AtbZIP9* ainda se encontra expresso na zona de diferenciação e alongamento celular das células do cilindro vascular da raiz (Figura 7 F), o que sugere que este fator possa também atuar na diferenciação das células do floema (Gauer, 2004). Esta última observação está de acordo com a atividade deste gene em células não diferenciadas do procambio de embriões em fase de maturação (Figuras 7 G a H). A expressão floema específica de *AtbZIP9* descrita anteriormente está de acordo com dados recentes do transcriptoma do floema de *Arabidopsis* (Zaho *et al.*, 2005) e por detecção *in vivo* de fusões traductionais com o gene marcador GFP (Lee *et al.*, 2006).

Investigamos também a regulação da expressão de *AtbZIP9* em resposta ao metabólito glicose e alguns hormônios vegetais. Auxina, etileno, ácido jasmônico e ácido giberélico não são capazes de promover alteração no nível de expressão do mRNA de *AtbZIP9*. Entretanto, dentro de um intervalo de 4 horas a expressão deste gene apresenta-se reprimida por glicose e induzida por ácido abscísico (ABA) e citocinina (Figura 8), indicando que *AtbZIP9* possivelmente participa das vias de sinalização por glicose, ABA e citocinina para controlar algum aspecto do desenvolvimento e/ou funcionalidade do floema (Manuscrito em preparação).

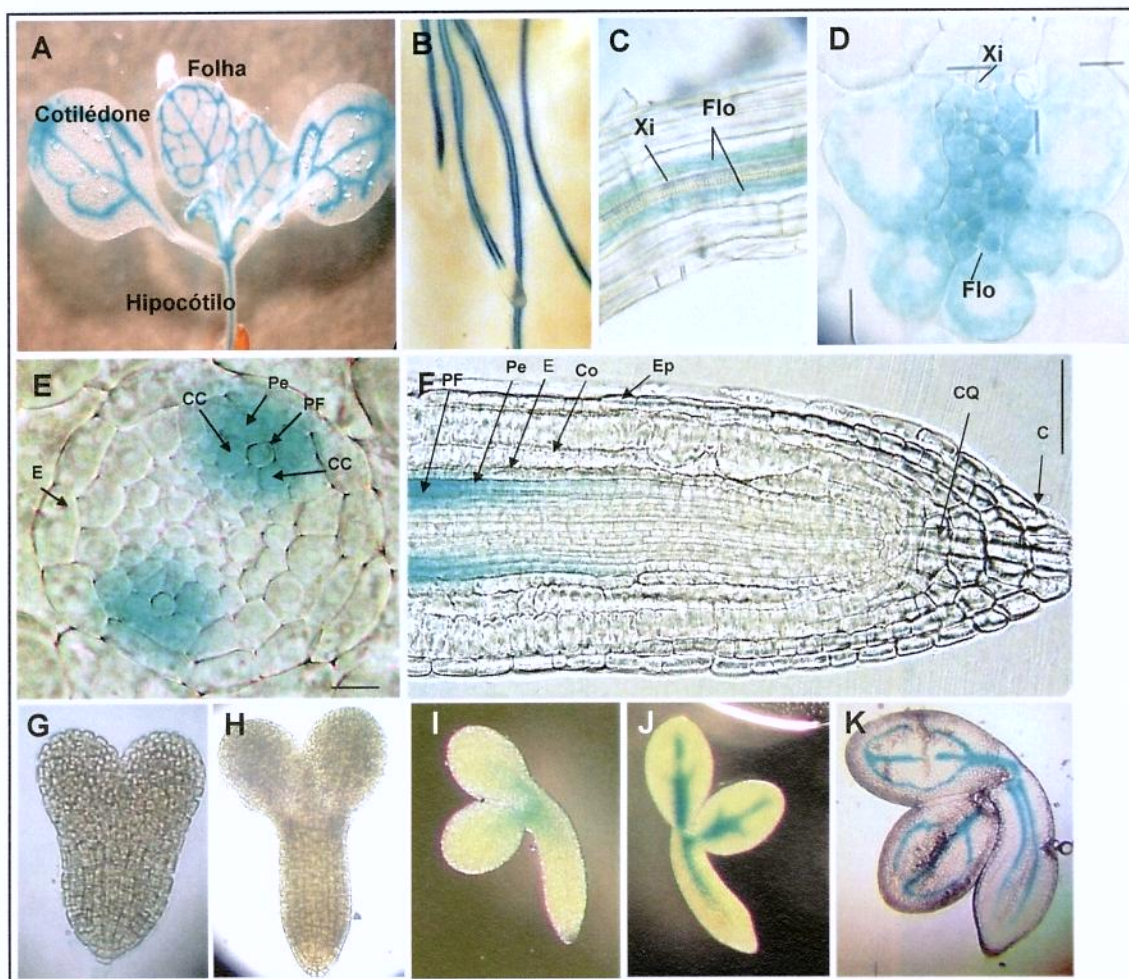


Figura 7. Padrão de expressão do gene *AtbZIP9*. **A-F.** Linhagens transgênicas expressando o gene marcador *GusA* sobre o controle do promotor de *AtbZIP9* mostram uma expressão restrita ao sistema vascular (Xi, xilema; Flo, floema) e mais especificamente no floema (**C a F**). **B e C.** Raiz **D.** Corte transversal de folha jovem. **E.** Corte transversal da raiz mostrando a atividade específica do gene marcador no protofloema (PF), células companheiras (CC) e às células do periciclo adjacente (Pe). E, endoderme. **F.** Corte longitudinal de raiz, mostrando a presença de atividade de *Gus* na provável zona de alongamento e diferenciação. C, coifa; CQ, centro quiescente; Ep, epiderme; Co, córtex. **G a K.** Embriogênese. **G.** Estágio de coração. **H.** Estágio torpedo. **I e J.** Estágio de maturação e crescimento do embrião; **K.** Embrião maduro. Escalas: E, 10 μ m e F, 50 μ m.

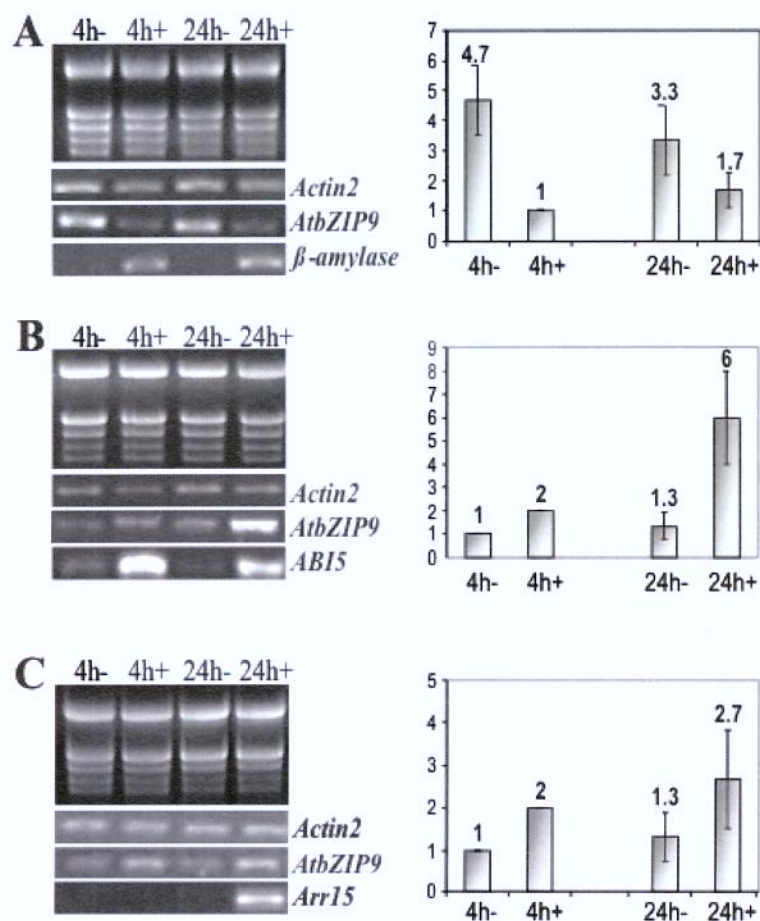


Figura 8. Regulação da expressão de *AtbZIP9* em resposta a glicose, ácido abscísico (ABA) e citocinina. Plantas crescidas por 5 dias em meio líquido Murashine & Skoog diluído 2 vezes, a 22°C, 67 rpm e sob regime de luz contínua, foram tratadas com 2% de glicose (**A**), 100 μ M de ABA (**B**) e 50 μ M de citocinina (**C**) por 4 (4h+) e 24 horas (24h+). Para cada tratamento controles não tratados foram obtidos (4h-; 24h-). A integridade do RNA total (3 μ g) foi verificada em gel desnaturante de agarose (coluna da esquerda, parte superior em A, B e C). Os produtos das reações de RT-PCR de *AtbZIP9*, *Actin2* e genes controle para cada tratamento, β -amilase para glicose, *ABI5* para ABA e *Arr15* para citocinina estão mostrados. *Actin2* foi usado como controle interno de padronização da quantidade de cDNA usada nas reações. A fase linear da reação exponencial de PCR foi verificada para cada gene. Para cada tratamento, uma quantificação relativa foi realizada por diluições seriadas dos produtos de PCR e a média de três experimentos está mostrada nos gráficos à direita (barras representam o desvio padrão).

Para investigar mais precisamente a função de *AtbZIP9*, analisamos um mutante *knockout* por inserção de T-DNA (*atbZIP9-1*; Figura 9 A) e uma linhagem superexpressando o mRNA de *AtbZIP9* através do promotor 35S do CaMV (35S-*AtbZIP9*; Figura 9 B). Análises comparativas de crescimento e desenvolvimento em condições de crescimento padrão não mostraram nenhuma alteração fenotípica detectável nos mutantes *atbzip9-1* e 35S-*AtbZIP9* em relação a plantas selvagens (Figura 9 C; Gauer, 2004). Outros tratamentos como alterações no balanço nitrogênio/carbono, ausência de luz e alterações de temperatura também não permitiram diferenciar os alelos de *AtbZIP9* gerados (Gauer, 2004).

Levando em consideração o padrão de expressão floema específico de *AtbZIP9* e seu possível envolvimento no processo de desenvolvimento deste órgão, análises comparativas da anatomia do cilindro vascular entre os mutantes *atbzip9-1*, 35S-*AtbZIP9* e plantas selvagens foram conduzidas. No entanto, a estrutura do sistema vascular mostrou-se semelhante nos três genótipos (Figura 9 D), sugerindo que *AtbZIP9*, aparentemente, não é essencial para o desenvolvimento do floema podendo, entretanto, ser considerado como um marcador de determinação e diferenciação das células deste tecido (Gauer, 2004). Estes dados estão de acordo com informações de expressão obtidas utilizando-se o mutante letal *apl* (*altered phloem development*; Bonke *et al.*, 2003), para o qual não existe a diferenciação do floema. Surpreendentemente, mostramos que a expressão de *AtbZIP9* não está afetada no mutante *apl*, o que confirma o não envolvimento deste fator com a diferenciação deste tecido, a não ser que exista uma fase independente de *Apl* no programa de desenvolvimento do floema (dado não mostrado, trabalho para obtenção do título de doutor Juarez Pires Tomaz).

A falta de efeitos fenotípicos claros em plantas superexpressando mRNA de *AtbZIP9* pode ser interpretada como reflexo de existência de regulações pós-transcricionais da expressão deste gene. Além disso, a ausência de alterações fenotípicas no mutante *knockout* sugere a existência de redundância funcional entre os 4 bZIPs de *Arabidopsis* pertencentes ao Grupo C de genes homólogos (Figuras 4 e 5). Como citado anteriormente, *AtbZIP10* e *AtbZIP63* também se apresentam expressos no cilindro vascular da planta, o que de certa forma caracteriza-se com uma primeira evidência de existência de redundância entre estes fatores. Somado a esta observação Weltmeier *et al.*, 2006 afirma que *AtbZIP10* não seja o único fator do Grupo C relacionado ao controle

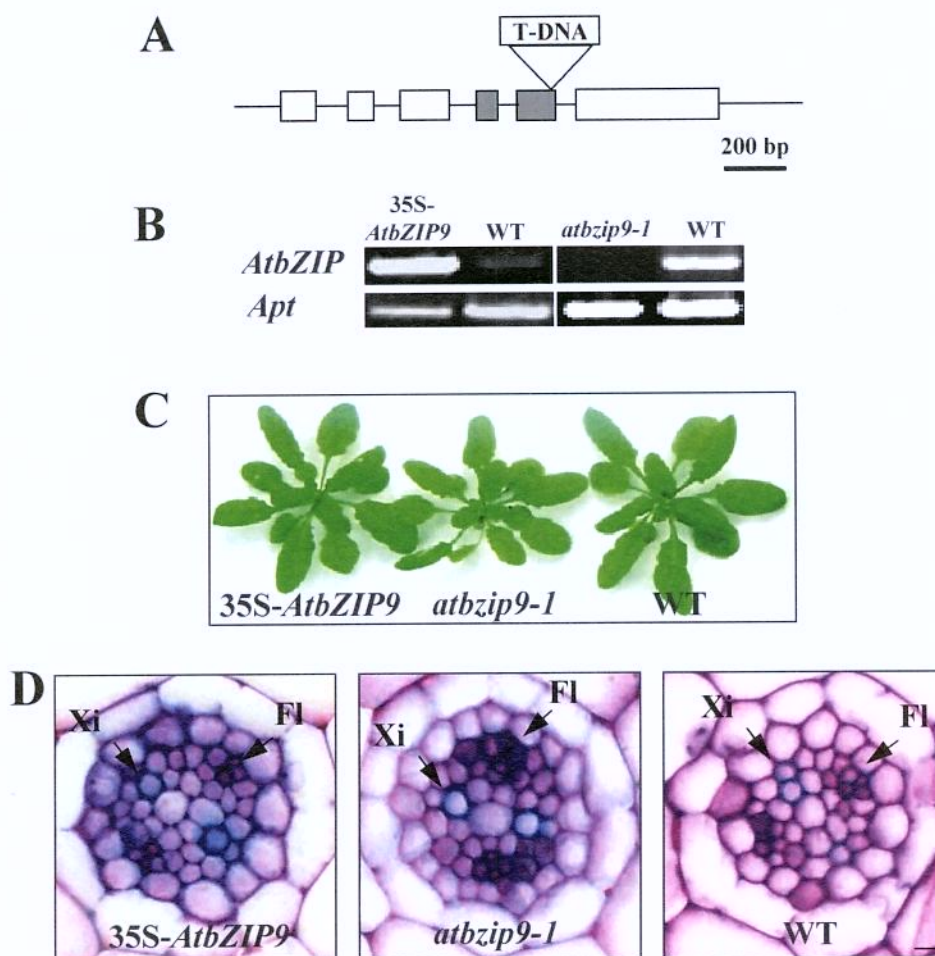


Figura 9. Análise comparativa de linhagens expressando diferentes níveis do mRNA de *AtbZIP9*. **A.** Representação esquemática da estrutura éxon-intron do gene *AtbZIP9*. Caixas representam éxons, linhas introns e caixas cinza indicam os éxons que codificam para o motivo bZIP de *AtbZIP9*. O T-DNA está inserido no final do quinto éxon (Syngenta nº acesso 569C12) e neste esquema não está desenhado em escala. **B.** Análise por RT-PCR semi-quantitativa do nível de mRNA de *AtbZIP9* em linhagens do mutante *knockout* por inserção de T-DNA *atbzip9-1*, em linhagens superexpressando o gene *AtbZIP9* (35S-*AtbZIP9*) e em plantas selvagens (WT). O gene *Apt1* (adenosina fosforibosil transferase) foi usado como controle interno da padronização da quantidade de RNA. O cDNA foi obtido a partir de 1,2µg de RNA total e amplificado com 30 ciclos usando uma temperatura de anelamento de 60°C. **C.** Comparação de crescimento e desenvolvimento entre os diferentes genótipos e plantas selvagens, crescidos em terra por 25 dias após a germinação com um fotoperíodo de 16 horas de luz e uma temperatura de 22°C. **D.** Análise do cilindro vascular dos diferentes genótipos e plantas selvagens. Os cortes foram realizados na ponta da raiz onde acontece o início da diferenciação do xilema e do floema. Xi, xilema; Fl, floema. Escala 4 µm.

da expressão da enzima prolina desidrogenase, o que de certa forma caracteriza-se como uma segunda evidência de redundância funcional entre estes fatores.

6. Regulações pós-transcricionais da atividade de fatores de transcrição

Como citado anteriormente, alguns fatores de regulação da transcrição estão presentes na maioria das células e estão ativos nas mais diversas condições. Outros, porém, são absolutamente específicos. Estes últimos podem ser produzidos somente no local e momento certos para promover a síntese de uma determinada proteína, ou então, eles podem já estar presentes, porém, em uma forma inativa, sendo ativados nos tecidos e estágios de desenvolvimento adequados (Kuhlemeier, 1992).

Dentro deste contexto, a existência de mecanismos de regulação pós-transcricionais, representa uma gama suplementar de pontos de controle da expressão gênica que permite um ajuste regulatório fino, assegurando que uma resposta adequada seja criada mediante a um determinado sinal (Mata *et al.*, 2005). A importância da regulação da expressão gênica a nível pós-transcricional e o envolvimento de proteínas ligantes de RNA (*RNA binding proteins* – RBP) e pequenos RNAs como RNA de interferência (RNAi) e microRNAs (miRNA) neste processo têm se tornado cada vez mais evidentes (Mata *et al.*, 2005).

Os mecanismos de regulação pós-transcricional podem ocorrer em vários níveis (Figura 1; Day & Tuite, 1998; Yanagisawa, 1998; Mata *et al.*, 2005), tais como:

1. Na fase de processamento do mRNA, uma vez que a ocorrência de *splicing* alternativo pode levar a formação de RNAs maduros diferenciados a partir de um mesmo pré-mRNA. Existem evidências de que o fator do tipo MADs-box FLC, envolvido na repressão da floração em *Arabidopsis*, possa autoregular a produção de sua própria proteína favorecendo ou não a ocorrência de *splicing* alternativo que leva a produção de proteínas truncadas não funcionais (Caicedo *et al.*, 2004);

2. Durante o transporte do mRNA do núcleo ao citoplasma, onde este será traduzido;

3. Na relativa estabilidade do mRNA a ser traduzido, sendo a degradação regulada tanto por vias exonucleotíficas, que geralmente envolvem a presença de sinais para rápida degradação nas sequências 3' não traduzidas e proteínas com atividade

exonuclease, quanto pela via de degradação endonucleolítica, relacionada aos mecanismos e a maquinaria de interferência de RNA (Mata *et al.*, 2005);

4. No controle transcrito-específico da iniciação da tradução, mediado por uma grande diversidade de mecanismos que envolvem proteínas ligantes de RNA (RNA *binding proteins* – RBP) que, associadas a elementos controle presente nas regiões não traduzidas dos transcritos, modulam a tradução. Três seqüências no líder (5' não traduzido) no mRNA do ativador de transcrição O2 de milho, por exemplo reduzem a eficiência da tradução do mRNA de O2 (Lohmer *et al.*, 1993). Um fenômeno similar também foi reportado para outro fator de milho, o locus Lc e para o fator bZIP ATB2 de *Arabidopsis*. A presença de uma ORF (*Open reading frame*) na região 5' não traduzida do mRNA destes fatores reprime sua expressão *in vivo* (Damiani & Wessler, 1993; Wiese *et al.*, 2004). O controle da tradução também pode ser regulado por microRNAs específicos. Estes estão envolvidos com os processos de desenvolvimento e geralmente regulam a expressão gênica especificamente através do bloqueio da tradução. Recentemente foi demonstrado que o locus *SERRATE* (SE) de *Arabidopsis* conhecido por seu envolvimento no controle do desenvolvimento de folhas, atividade meristemática e arquitetura de inflorescências, participa da etapa de processamento de alguns miRNAs específicos que, por sua vez, bloqueiam a tradução dos fatores *PHABULOSA* e *PHAVOLUTA*, envolvidos com estes processos (Yang *et al.*, 2006);

5. Nas modificações pós-traducionais das proteínas, sendo que entre as mais comuns estão a fosforilação, a glicosilação, a acetilação e a formação de pontes dissulfeto. No entanto, a fosforilação é o tipo de modificação pós-transcricional mais bem estudado. Existem três níveis em que a fosforilação pode modular a atividade de fatores de transcrição. O primeiro relaciona-se a translocação para o núcleo uma vez que certas proteínas necessitam ser fosforiladas para serem endereçadas ao núcleo celular. Caso contrário, elas permanecem retidas no citoplasma. Este é o caso do fator bZIP de salsa CPRF2, que é mantido no citosol no escuro. No entanto, em resposta a luz este fator é rapidamente fosforilado tendo como consequência seu endereçamento nuclear (Dröge-Laser *et al.*, 1997). Segundo, a fosforilação pode modular a atividade de ligação ao DNA de certos fatores de transcrição. Fosforilação do fator bZIP GBF1 de *Arabidopsis*, por exemplo, proporciona um aumento de 10-20 vezes na capacidade de ligação a seqüência do G-Box e esta capacidade é praticamente abolida após tratamento com fosfatase

alcalina (Klimczak *et al.*, 1992). Existem evidências de uma natureza multifosforilada de O2 de milho, na qual diferentes isoformas da proteína podem ser produzidas como resultado de fosforilação diferencial durante o ciclo dia-noite. Somente O2 não fosforilado e hipofosforilado são capazes de se ligar a seqüências alvo de DNA (Ciceri *et al.*, 1997). Terceiro, a fosforilação pode impedir o contato do domínio de ativação do fator de transcrição com a maquinaria transcricional. Interessantemente, um mesmo fator transcricional pode responder aos três níveis de regulação, pois, em princípio, a fosforilação em múltiplos sítios por diferentes proteínas quinases resulta em um mecanismo de regulação mais acurado (Hunter & Karin, 1992);

6. No transporte da proteína para seu sítio de ação, já mencionado acima. Além da fosforilação, outros fatores podem estar envolvidos com a localização celular de fatores de transcrição, entre eles, a interação com outras proteínas e o controle redox. Os fatores MADS-box APETALA3 (AP3) e PISTILLATA (PI) de *Arabidopsis* representam genes homeóticos requeridos para o desenvolvimento de pétala e estames. Análise da localização subcelular de AP3 e PI revelaram que tanto AP3 quanto PI podem ser encontrados sozinhos no citosol, enquanto co-expressão das duas proteínas resulta na entrada de ambas no núcleo (McGonigle *et al.*, 1996). Outro exemplo refere-se a interação LSD1-AtbZIP10 descrita anteriormente, que retém o fator AtbZIP10 no citoplasma (Kaminaka *et al.*, 2006). Um terceiro exemplo refere-se ao controle redox exercido sobre os fatores NPR1 e TGA1, envolvidos com o processo de resposta sistêmica adquirida (SAR). Em condições normais, NPR1 é mantido no citoplasma na forma de complexos multiméricos unidos por pontes dissulfeto. Durante o processo de SAR, no entanto, a redução destas pontes dissulfeto leva a liberação dos monômeros de NPR1, que se movem para o núcleo, onde interagem com os fatores TGA1 para ativar a expressão de genes de defesa da planta (Fedoroff, 2006).

7. No controle da estabilidade da proteína. Fatores bZIP TGA possuem papel importante na regulação gênica durante o desenvolvimento e em resposta a estresses e hormônios. Entretanto, para o controle adequado destes processos fatores TGA específicos devem estar presentes em diferentes tecidos e em diferentes estágios do desenvolvimento, sendo o mecanismo de regulação pós-transcricional, principalmente da velocidade de degradação destas proteínas, responsável por esta organização espacial e temporal (Pontier *et al.*, 2002). Foi demonstrado também que a modulação da atividade

do fator bZIP ABI5 através do controle da taxa de degradação de sua proteína é essencial a indução ou a supressão de eventos pós-germinativos na presença ou ausência de ABA, respectivamente (Stone *et al.*, 2006);

8. Por último como já mencionado anteriormente, existe regulação relacionada a interação entre proteínas. Além das interações por homo ou heterodimerização entre membros de uma mesma família multigênica, exemplificado, por exemplo, pelos grupos C e S de fatores bZIP de *Arabidopsis*, interação entre fatores de diferentes famílias foram reportadas em plantas, sendo que esta interação combinatória entre esses fatores de transcrição pode desempenhar uma importante função na regulação dos genes alvo. Um exemplo bem caracterizado é a interação entre fatores Dof e bZIPs. Um fator Dof de *Arabidopsis* interage com os bZIP OBFs e esta interação aumenta a ligação ao DNA de OBFs (Yanagisawa, 1998). Outra interação Dof - bZIP também foi encontrada entre as proteínas de milho PBF e O2 sendo os sítios de ligação destes fatores localizados bem próximos um do outro em genes de zeínas. (Vicente-Carbajosa *et al.*, 1997). Um terceiro exemplo refere-se a regulação da expressão de genes de defesa mediada pela interação nuclear NPR1 e TGA1 citada acima, que promove um aumento da atividade de ligação ao DNA de TGA1. Interessantemente, a interação entre estes fatores está sujeita a regulação redox. Pontes dissulfeto formadas entre as cisteínas 260 e 266 do fator TGA1 impedem a interação deste fator com NPR1, sendo esta interação possível somente após a quebra destas pontes dissulfeto em resposta ao acúmulo de ácido salicílico nas células (Fedoroff, 2006)

7. Redundância funcional em famílias multigênicas de fatores de transcrição

O genoma de *Arabidopsis* é formado por duplicações gênicas extensivas. Estas incluem muitas duplicações gênicas em *tandem* assim como duplicações em larga escala em cromossomos diferentes, e que provavelmente cobrem mais de 60% do genoma (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000, Blanc *et al.*, 2000; Sterck *et al.*, 2007). Apesar de algumas destas duplicações terem sido seguidas por rearranjos e evolução divergente, mais de 40% dos genes de *Arabidopsis* ainda compreendem pares de seqüências altamente relacionadas. Neste contexto, *Arabidopsis* é similar a 3 outros organismos eucariotos. O genoma de *S. cerevisiae* é resultado de uma duplicação genômica ancestral

completa seguida de rearranjos e deleções extensivas. Em leveduras, aproximadamente 30% dos genes formam pares duplicados. Similarmente, genes duplicados estão presentes em aproximadamente 48 e 40% do total de genes de *C. elegans* e drosófila, respectivamente (Riechmann *et al.*, 2000). Fatores de transcrição seguem estas observações gerais. Uma comparação do conteúdo total de fatores de transcrição de *Arabidopsis* contra ele mesmo revelou que, em média, 45% dos genes dentro das principais famílias multigênicas apresentam seqüências altamente relacionadas (Riechmann *et al.*, 2000).

A prevalência de duplicações gênicas em *Arabidopsis* sugere que a redundância pode fornecer um obstáculo à análise funcional de genes (Riechmann *et al.*, 2000; Riechmann & Ratcliffe, 2000; Riechmann, 2002). De fato, em *C. elegans*, por exemplo, 86% dos genes preditos já foram nocauteados, mas somente 10% dos mutantes revelaram algum tipo de alteração fenotípica (Zhang, 2003). Apesar de o genoma de *Arabidopsis* já ter sido completamente saturado com inserções de T-DNA ou elementos transponíveis, pouca informação funcional foi revelada a partir destes mutantes (Bouché & Bouchez, 2001). Menos de 10% dos fatores de transcrição presentes em *Arabidopsis* foram caracterizados geneticamente e funcionalmente (Riechmann, 2002).

A extensão da redundância funcional entre fatores de transcrição em *Arabidopsis* pode ser ilustrada tomando-se como exemplo os fatores MADS-box. Genes MADS-box são numerosos em plantas e controlam muitos aspectos do desenvolvimento, como o de flores, frutos e raízes, estando também envolvidos com o tempo de floração. A redundância dentro desta classe foi primeiramente demonstrada entre os genes de identidade de meristema floral CAULIFLOWER (CAL) e AP1 (Kempin *et al.*, 1995). Outro exemplo relaciona-se aos fatores SHATTERPROOF1 (SPH1) e SHATTERPROOF2 (SPH2), envolvidos no processo de deiscência do fruto. Estes fatores apresentam 87% de similaridade na seqüência de aminoácidos e padrão de expressão semelhante. Os mutantes *sph1* e *sph2* são fenotipicamente semelhantes a plantas selvagens, no entanto, o mutante duplo *sph1/sph2* produz frutos indeiscentes (Liljegren *et al.*, 2000).

Outra classe de fatores em que podem ser encontrados exemplos de redundância genética é a família bZIP. Zhang *et al.*, 2003 demonstrou a existência de redundância entre os fatores TGA2, TGA5 e TGA6, que atuam como reguladores positivos de indução de resposta sistêmica adquirida (SAR) em *Arabidopsis*. Um caso de redundância

funcional parcial foi demonstrado para o fator de Arabidopsis FRUITFULL (FUL). Além de regular o desenvolvimento do fruto, FUL age de maneira redundante com os fatores filogeneticamente relacionados AP1 e CAL, no controle da arquitetura da inflorescência (Ferrándiz *et al.*, 2000).

Todos os trabalhos citados anteriormente relatam problemas ao tentar caracterizar uma função baseado apenas em mutantes *knockout*. Dentro deste contexto algumas estratégias alternativas para o estudo de fatores de transcrição pertencentes a famílias multigênicas que apresentam redundância funcional podem ser traçadas, destacando-se entre elas, a obtenção de linhagens silenciando estes genes simultaneamente ou a expressão de versões modificadas destes genes que codifiquem para proteínas ativadoras ou repressoras constitutivas da transcrição. Estas versões modificadas podem ser obtidas através de fusões com domínios heterólogos de transativação ou repressão da transcrição, sendo que em plantas o domínio de transativação VP16 do vírus *Herpes simplex* e o domínio repressor *En* do gene *Engrailed* de drosófila vem sendo utilizados com sucesso (Markel *et al.*, 2002; Besmihen *et al.*, 2004). Estes variantes são capazes de promover a ativação ou repressão elevada e constitutiva da transcrição de genes alvos, e desta maneira, atuam independentemente do grau de redundância funcional existente, havendo assim maior probabilidade de obtenção de um fenótipo diferenciado (Zhang, 2003). No entanto, esta estratégia é eficiente apenas quando a regulação da expressão não é majoritariamente pós-transcricional.

8. O domínio de transativação da transcrição da proteína VP16

O domínio de ativação da proteína VP16 do vírus *Herpes simplex* representa um domínio de ativação da transcrição ácido (Ma & Ptashne, 1987; Ptashne, 1988). Este domínio não se liga diretamente ao DNA, mas pode interagir com complexos remodeladores de cromatina e proteínas da maquinaria basal de transcrição como TBP (*TATA binding protein*) e os fatores basais de transcrição TFIIB e TFIIF, assim como com alguns cofatores e proteínas adaptadoras (Lin *et al.*, 1991; Shen *et al.*, 1996; Hall & Struhl, 2002). Desta maneira, a presença deste domínio de transativação da transcrição torna dispensável a presença de cofatores para que a transcrição seja iniciada, resultando em taxas mais elevadas de transcritos.

O fato deste domínio de ativação ser funcional em outros sistemas biológicos, como em plantas, por exemplo, permite que ele seja utilizado na caracterização funcional de fatores de transcrição. Fusões entre fatores de transcrição com o domínio VP16 resultam na elevada expressão dos genes alvos regulados por este fator de transcrição (Figura 10), de forma que estas fusões vem sendo amplamente utilizadas tanto para obtenção de pistas informativas com relação a função de fatores pertencentes a famílias multigênicas que apresentam redundância funcional quanto para a confirmação de genes alvos candidatos (Parcy *et al.*, 1998; Bush *et al.*, 1999; Parcy *et al.*, 2002; Besmihen *et al.*, 2004; Heinekamp *et al.*, 2004).

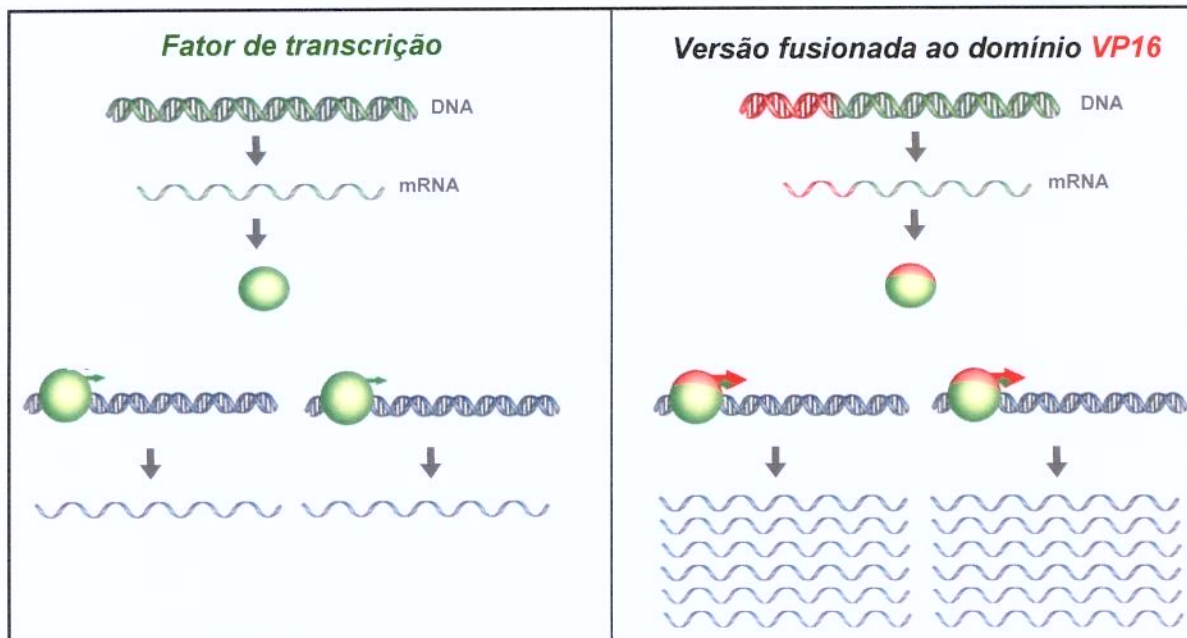


Figura 10. Representação esquemática de um fator de transcrição selvagem (esquerda) e de uma versão modificada deste fator de transcrição fusionada com o domínio heterólogo de transativação da transcrição VP16 do vírus *Herpes simplex* (direita). Ambos são teoricamente transcritos e traduzidos em taxas semelhantes. No entanto, a proteína quimérica fusionada ao domínio VP16, ao se ligar as seqüências promotoras de genes alvos é capaz de promover a superexpressão destes genes, uma vez que o domínio VP16 interage com fatores da maquinaria basal de transcrição, tornando dispensável a presença de cofatores para que a transcrição seja iniciada. Esta abordagem atua independentemente da existência de redundância funcional, podendo ser utilizada para caracterização de fatores de transcrição pertencentes a famílias multigênicas redundantes, assim como para a confirmação de genes alvos candidatos a serem regulados por fatores de transcrição.

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Análise funcional do fator de transcrição do tipo bZIP de Arabidopsis *AtbZIP9*.

2. Objetivos Específicos

2.1 Construções de genes quiméricos para versões modificadas de *AtbZIP9* que codifiquem para ativadores constitutivos fortes da transcrição, capazes de superexpressar os genes alvos de *AtbZIP9*.

2.2 Obtenção de linhagens transgênicas expressando versões ativadoras constitutivas fortes de *AtbZIP9* e análise detalhada do impacto destas variantes sobre o crescimento e desenvolvimento de Arabidopsis.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material vegetal e condições de crescimento

Arabidopsis thaliana (Ecótipo Col-0) foi crescida em vasos contendo terra e vermiculita (2/1) ou *in vitro* em meio de cultura MS sólido (Murashige & Skoog, 1962) modificado (MS ½ pH 5.7 - 2,1g/l de sais MS [Murashige & Skoog Basal Salt Mixture, SIGMA], sacarose 0.3% ou 0.5% [Synth], Agar 0.55% [Agar TypeE, SIGMA], tampão MÊS 3mM pH 5.7). Para cultivo em meio de cultura, sementes foram previamente esterilizadas (etanol 70% por 2 minutos, hipoclorito de sódio 1% por 20 minutos, seguido de 4 lavagens com água destilada estéril) e incubadas no escuro por três dias a 4° para quebra de dormência. O fotoperíodo utilizado foi de 16 horas de luz artificial diárias (lâmpada fluorescente luz do dia e grolux, Silvania) e a temperatura de 22°C.

Sementes mutante *knockout atbzip9-1* (inserção de T-DNA no éxon 5 da sequência codificante de *AtbZIP9*, At5g24800; Figura 9 A) foram obtidas da Syngenta (*Arabidopsis Insertion Library*, Número de acesso 569C12, Sessions *et al.*, 2002). Sementes do mutante *abi5-1* expressando a fusão traducional entre o TAG da hemaglutinina e ABI5 (HA-ABI5) foram obtidas de F. Parcy (Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale UMR5168 17, Grenoble, France; Besmihen *et al.*, 2004). As linhagens transgênicas homozigóticas para um locus de uma fusão entre a sequência promotora de *AtbZIP9* e o gene repórter *GusA* (ProAtbZIP9-Gus) estão descritas em Gauer, 2004 e no artigo em anexo.

2. Manipulação de ácidos nucleicos

Procedimentos básicos foram usados para digestões enzimáticas e clonagens de DNA, transformação de *Escherichia coli* (DH5a) e minipreparações de plasmídeos (Sambrook *et al.*, 1989). As purificações de fragmentos de DNA foram realizadas em gel de agarose 1.2-2.0% utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System

(Promega) seguindo protocolo do fabricante. O seqüenciamento do DNA foi realizado segundo a metodologia Dye Terminator (Big Dye Kit, Perkin Elmer, USA) e analisado com os programas DNASIS (Amershan Pharmacia Biotec, Inglaterra), BioEdit Sequence Alignment Editor e BLAST no servidor NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Os oligonucleotídeos SP6 e T7 utilizados nas reações de seqüenciamento estão apresentados na Tabela I.

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 50µl contendo o tampão de reação 1X (Tris HCl 10 mM pH 9,0, KCl 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM, 200 µM de cada um dos dNTPs, 0,4 µM de cada um dos oligonucleotídeos, 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e cerca de 50 ng de DNA plasmidial. As reações de amplificação foram realizadas conforme os seguintes passos: 94°C por 3 minutos, seguido por ciclos de 94°C por 45 segundos, 58°C por 30 segundos (anelamento dos primers), 72°C por 90 segundos, finalizando a reação com uma fase de extensão final a 72°C por 5 minutos. Os primers utilizados nas amplificações estão descritos na Tabela I.

Tabela I. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados nas amplificações por PCR para as clonagens e nas reações de seqüenciamento.

Oligonucleotídeos	Seqüência 5' - 3'	Posição *
ABS1	CGAAATATTTAGGATCCTTTTATG <i>BamHI</i>	-484 a -460 de <i>AtbZIP9</i>
ABS2	TTCTTTGAATGTCTAGACACAAGA <i>XbaI</i>	-24 a -1 de <i>AtbZIP9</i>
ABS3	CCCCCCCCTCTAGAAAAAATGGCATACCCATACGA <i>XbaI</i>	Vetor PFP101HAVP16
ABS4	GACTTGATGAGCTCTAGTGATATCCC <i>SstI</i>	Vetor PFP101HAVP16
ABS5	GCCAGTGCCGAGCTCCAAAGAAAATGG <i>SstI</i>	-23 a +4 de <i>AtbZIP9</i>
ABS6	CCATGATTACGGATCCGAGTCATGGC <i>BamHI</i>	+828 a +853 do cDNA de <i>AtbZIP9</i>
ABS7	AAATGACTAGAGCTCCCAATGAT <i>SstI</i>	+338 a +361 do cDNA de <i>AtbZIP9</i>
ABS8	GCTAGTGAGGATCCCTCTCGCT <i>BamHI</i>	+603 a + 625 do cDNA de <i>AtbZIP9</i>
ABS9	GACTAATGATCTAGATGATCTGA <i>XbaI</i>	+342 + 364 do cDNA de <i>AtbZIP9</i>
ABS10	GCTGCTAGTGCTCGACCCTCTCGCTA <i>SalI</i>	+602 a +628 do cDNA de <i>AtbZIP9</i>
SP6	CATACGATTTAGGTGACACTATAG	Vetor pGEM-TEasy (Promega)
T7	AATACGACTCACTATAGGGC	Vetor pGEM-TEasy (Promega)

* As posições dos oligonucleotídeos são indicadas em relação ao nucleotídeo "A" do códon ATG de iniciação da tradução, o qual corresponde a posição +1. *AtbZIP9* (Nº de acesso MatDB - At5g24800). Vetor PFP101HAVP16 (Besmihen *et al.*, 2004).

2.1 Construções gênicas

As construções gênicas para versões ativadoras constitutivas fortes de *AtbZIP9* estão descritas na Figura 11. As três construções possuem o domínio de ativação forte da transcrição VP16 do vírus *Herpes simplex* e uma etiqueta da hemaglutinina (HA TAG, Bensmihen *et al.*, 2004), que permite a detecção da proteína recombinante. A primeira construção integra apenas o domínio bZIP de ligação ao DNA e de localização nuclear de *AtbZIP9* (éxons 4 e 5 da sequência codificante de *AtbZIP9*, Figura 9 A), permitindo assim, contornar as regulações da atividade (ativação/repressão da transcrição, estabilidade da proteína) de *AtbZIP9* que poderia ser mediada por motivos protéicos de *AtbZIP9* não presentes nesta construção. A expressão deste ativador está sob o controle do próprio promotor de *AtbZIP9*, conferindo assim, o padrão de expressão do alelo selvagem. A segunda construção mantém as regulações da atividade de *AtbZIP9*, diferindo da primeira apenas pela presença da sequência codificante completa de *AtbZIP9*. A terceira construção expressa de maneira ectópica o ativador da primeira construção usando o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor.

A etiqueta da hemaglutinina (HA TAG) e o domínio de ativação da transcrição da proteína VP16 do vírus *Herpes simplex* foram obtidos a partir do vetor de transformação de planta PFP101-HA-VP16 (François Parcy, <http://www.isv.cnrs-gif.fr/jg/alligator/vectors.html>; Besmihen *et al.*, 2004). A clonagem do promotor do gene *AtbZIP9*, que inclui 14 aminoácidos da sequência codificante de *AtbZIP9* e do cDNA completo deste gene (Nº de acesso AF310223) em pGEM-T e pUC18, respectivamente estão descritas em Gauer, 2004. Os PolyA para as construções ProbZIP9-VP16-bZIP e ProbZIP9-VP16-cDNA foram obtidos do vetor PRT100 (Topfer *et al.* 1987), enquanto 35S-VP16-bZIP utilizou o PolyA incluído no vetor PFP101-HA-VP16.

Para as construções ProbZIP9-VP16-bZIP e ProbZIP9-VP16-cDNA a extremidade 3' do promotor de *AtbZIP9* foi amplificada com os primers ABS1 e ABS2 (Tabela I) de forma a retirar os 14 aminoácidos da sequência codificante deste gene, restando apenas a sequência promotora. O produto de amplificação de 484 pb foi clonado em pGEM-TEasy (Figura 12 A), sequenciado e digerido com as enzimas *BamHI* e *XbaI*. O fragmento resultante desta digestão, de 456 pb, foi purificado e clonado entre os mesmos sítios do vetor PBKS, juntamente com a extremidade 5' do promotor de 1516 pb clonada entre os

sítios *Pst*I e *Bam*HI, obtendo-se, assim, ProAtbZIP9-pBKS (Figura 12 B). Em seguida, ProAtbZIP9-pBKS foi digerido com as enzimas *Xho*I e *Xba*I e o fragmento resultante de 2010 pb, que incluía 38 pb do vetor pBKS em sua extremidade 5' foi clonado entre os mesmos sítios do vetor PRT100, obtendo-se ProAtbZIP9-PolyA-PRT100 (Figura 12 C).

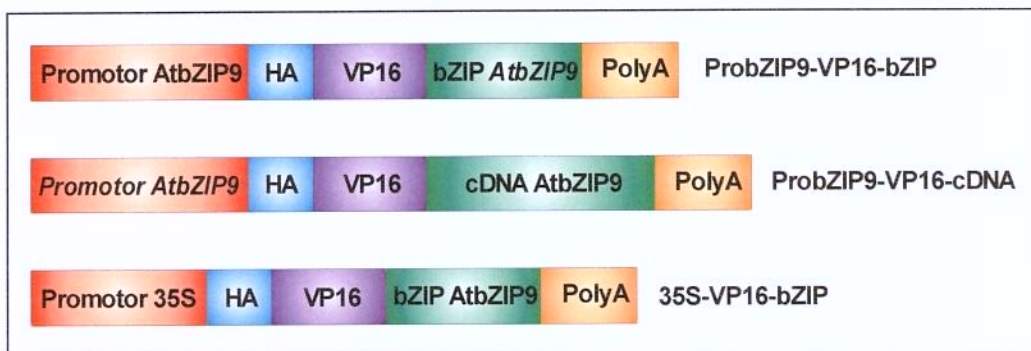


Figura 11. Esquema das construções gênicas para expressão de versões de *AtbZIP9* que codificam para ativadores constitutivos fortes da transcrição. HA, etiqueta da hemaglutinina (HA TAG); VP16, domínio de ativação da transcrição da proteína VP16 do vírus *Herpes simplex*; PolyA, sinal de terminação da transcrição do gene da nopaline sintase de *Agrobacterium*; bZIP *AtbZIP9*, domínio de ligação ao DNA e localização nuclear de *AtbZIP9* (aminoácidos 118 a 205 do N.º Ac AAG25728, correspondendo aos éxons 4 e 5 da sequência codificante de *AtbZIP9*; Figura 9 A), cDNA *AtbZIP9*, sequência codificante completa do gene *AtbZIP9* e 35S CaMV, promotor do vírus do mosaico da couve-flor.

O motivo bZIP (aminoácidos 118 a 205 do n.º de acesso AAG25728, correspondendo aos éxons 4 e 5 da sequência codificante de *AtbZIP9*; Figura 9 A) para ProbZIP9-VP16-bZIP e o cDNA completo de *AtbZIP9* para ProbZIP9-VP16-cDNA foram obtidos a partir de amplificação com os pares de primers ABS7/ABS8 e ABS5/ABS6, respectivamente (Tabela I). Os produtos de amplificação de 287pb para o motivo bZIP e 876 pb para o cDNA foram clonados em pGEM-TEasy para seqüenciamento (Figura 12 D). Após digestão com as enzimas *Sst*I e *Bam*HI os fragmentos de 260 pb para o bZIP e de 847 pb para o cDNA de *AtbZIP9* foram clonados entre os mesmos sítios do vetor PRT100, gerando, assim, bZIP-PRT100 e cDNA-PRT100, respectivamente (Figura 12 E).

As seqüências que codificam para a etiqueta da hemaglutinina (HA TAG) e para o domínio de ativação do vírus da herpes (VP16) foram amplificadas a partir do vetor pFP101-HA-VP16 com os primers ABS3 e ABS4 (Tabela I) e o produto de amplificação de

448 pb foi clonado em pGEM-TEasy para seqüenciamento (Figura 12 F), sendo posteriormente inserido entre os sítios *XbaI* e *EcoRI* do vetor pUC18 (Figura 12 G), afim de simplificar uma digestão parcial com as enzimas *XbaI* e *SstI*. Após digestão parcial *XbaI* / *SstI* do fragmento relativo a etiqueta da hemaglutinina e ao domínio VP16 (HA-VP16) em pUC18, o fragmento de interesse de 429 pb foi purificado e clonado entre os mesmos sítios do vetor PBKS (Figura 12 H). Após nova digestão parcial de HA-VP16 clonado em PBKS com as enzimas *XhoI* e *SstI*, o fragmento de interesse de 492 pb foi clonado entre os mesmos sítios de bZIP-PRT100 e cDNA-PRT100, gerando HA-VP16-bZIP-PRT100 e HA-VP16-cDNA-PRT100, respectivamente (Figura 12 I). Estas duas últimas construções foram, então, submetidas a digestão com a enzima *XbaI* e os fragmentos de interesse de 696 pb e 1283 pb (resultante de digestão parcial), foram clonados entre o sítio *XbaI* de ProAtbZIP9-PolyA-pRT100, gerando ProAtbZIP9-HA-VP16-bZIP-PolyA-PRT100 e ProAtbZIP9-HA-VP16-cDNAPolyA-PRT100 (Figura 12 J). Através de digestão *PstI*, os cassetes de expressão ProAtbZIP9-HA-VP16-bZIP-PolyA (denominado ProAtbZIP9-VP16-bZIP) de 2881 pb e ProAtbZIP9-HA-VP16-cDNA-PolyA (designado ProAtbZIP9-VP16-cDNA) de 3468 pb foram clonados no vetor binário de transformação de plantas pCAMBIA 2300 (<http://www.cambia.org/index.htm>) (Figura 12 K).

A construção 35S-VP16-bZIP foi realizada diretamente no vetor PFP101-HA-VP16, que oferece um novo método de seleção de plantas transgênicas baseado na fluorescência da semente. Este último vetor contém como marcador de seleção o gene que codifica para “Green Fluorescent Protein” (GFP) sob o controle do promotor At2S3, de uma proteína de reserva específica da semente. O motivo bZIP para esta construção (aminoácidos 118 a 205 do N.º Ac AAG25728) foi amplificado com os primers ABS9 e ABS10 (Tabela I) e o fragmento de 286 pb, após clonagem em pGEM-TEasy e seqüenciamento, foi digerido com *XbaI* e *Sall* e clonado entre esses mesmos sítios do vetor PFP101-HA-VP16. Todas as construções foram verificadas por seus mapas de restrição. A integridade do motivo VP16 gerado por digestão parcial foi verificada tanto pelo tamanho do fragmento em gel de agarose quanto por reação de PCR utilizando os primers ABS3 e ABS4 (Tabela I) e uma temperatura de anelamento de 56°C.

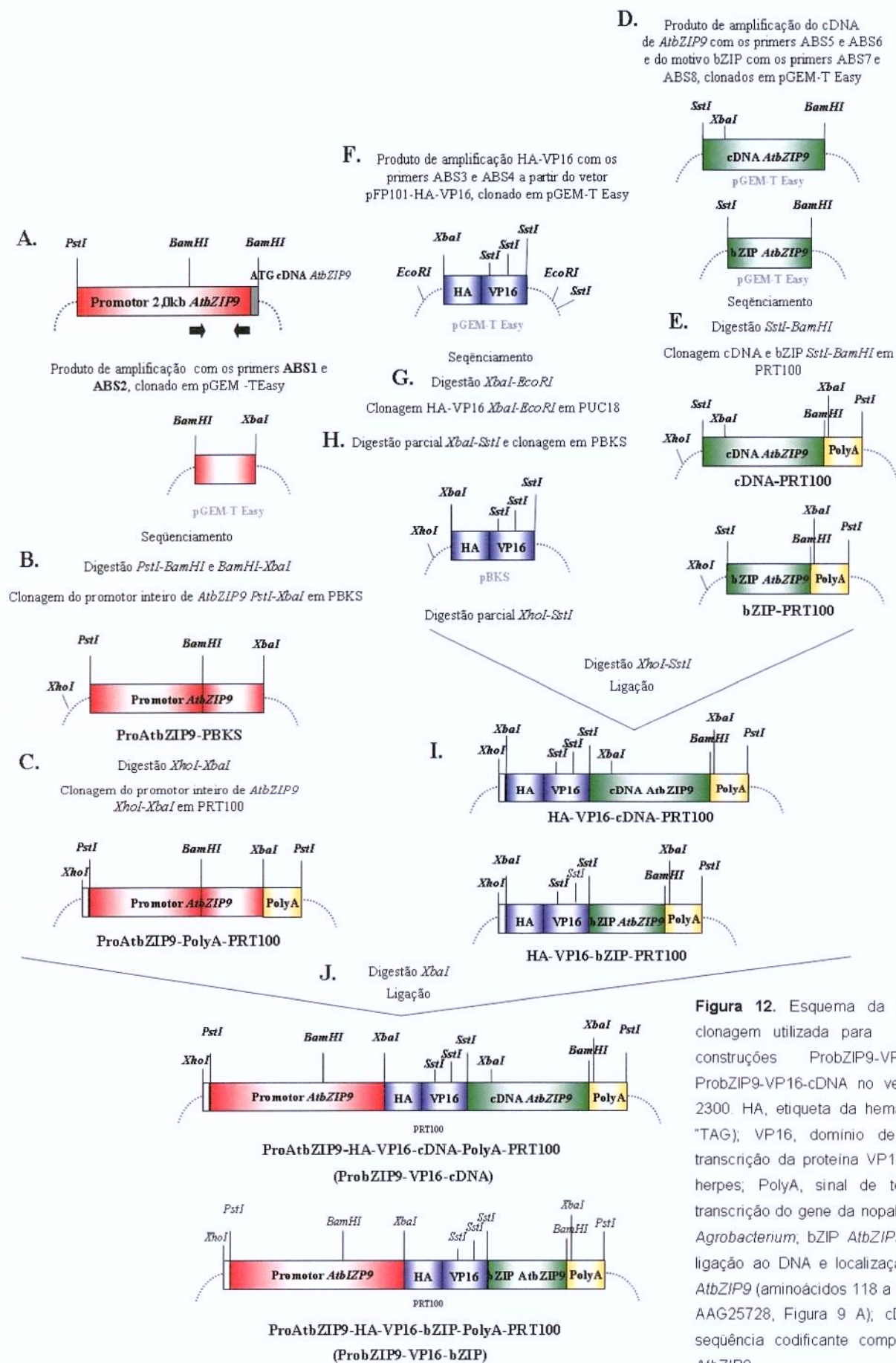


Figura 12. Esquema da estratégia de clonagem utilizada para obtenção das construções ProbZIP9-VP16-bZIP e ProbZIP9-VP16-cDNA no vetor pCAMBIA 2300. HA, etiqueta da hemaglutinina (HA "TAG"); VP16, domínio de ativação da transcrição da proteína VP16 do vírus da herpes; PolyA, sinal de terminação da transcrição do gene da nopaline sintase de *Agrobacterium*; bZIP *AtbZIP9*, domínio de ligação ao DNA e localização nuclear de *AtbZIP9* (aminoácidos 118 a 205 do N.º AC AAG25728, Figura 9 A); cDNA *AtbZIP9*, sequência codificante completa do gene *AtbZIP9*.

3. Transformação genética de *Arabidopsis* e seleção de plantas transgênicas

Os vetores binários carregando as três construções descritas na Figura 11 e o vetor de transformação de plantas PFP101HAVP16 foram introduzidos em *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90 (Koncz & Schell, 1986) para transformação genética de *A. thaliana*. O cultivo, conservação e transformação de *A. tumefaciens* foram realizados conforme descrito no Manual de Transformação Genética de Plantas – EMBRAPA (Brasileiro, 1998). Após a transformação, minipreparações para extração de DNA plasmidial foram realizadas segundo protocolo retirado do TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*; http://www.arabidopsis.org/Protocols_Mundy2.html) e clones positivos foram identificados através do padrão de restrição dos vetores binários transferidos para *A. tumefaciens*. Reações de PCR com os mesmos primers utilizados nas amplificações do cDNA, motivo bZIP e HA-VP16 (Tabela I) também foram realizadas para verificação de clones positivos em *Agrobacterium*.

A metodologia utilizada na transformação de *Arabidopsis* foi a de transformação *in planta* descrita por Bechtold *et al* (1993) modificada, na qual uma solução contendo *A. tumefaciens* carregando o vetor de interesse foi borrifada sobre plantas mutante *knockout atbzip9-1* em estágios iniciais do florescimento. Este procedimento foi realizado por duas vezes com um intervalo de uma semana entre uma aplicação e outra. Esta metodologia apresenta uma grande vantagem sobre os métodos de transformação tradicionais pelo fato de não requerer regeneração de transformantes a partir de cultura de tecidos.

Sementes (T0) provenientes de plantas submetidas aos diferentes eventos de transformação foram coletadas separadamente por planta e armazenadas a 4°C. Para identificação de transformantes primários, sementes resultantes da transformação com ProbZIP9-VP16-bZIP e ProbZIP9-VP16-cDNA, que envolvem o vetor de transformação de plantas pCAMBIA 2300, foram semeadas em meio MS/2 suplementado com 0,5 % de sacarose, contendo o marcador de seleção kanamicina a uma concentração de 100µg/ml (Figura 13). Já para 35S-VP16-bZIP, que envolve o vetor PFP101HA-VP16, a identificação de transformantes primários baseou-se na fluorescência de GFP na semente, utilizando-se um estereomicroscópio Leica MZFLIII equipado com filtro GFP2 (Figura 13). Plantas selecionadas com idades variando de 3-5 semanas foram transferidas para vasos com terra e vermiculita para autofecundação. As sementes F1

resultantes de autofecundação foram coletadas individualmente por planta, semeadas em meio seletivo ou selecionadas na base da fluorescência e autofecundadas para gerar plantas F2. A identificação das linhagens F1 homozigóticas para um locus do transgene foi realizada pela análise do padrão de segregação da resistência à kanamicina em populações F2. Todas as plantas foram analisadas em lupa Carl Zeiss e fotografadas com câmera digital Canon Power Shot A95.

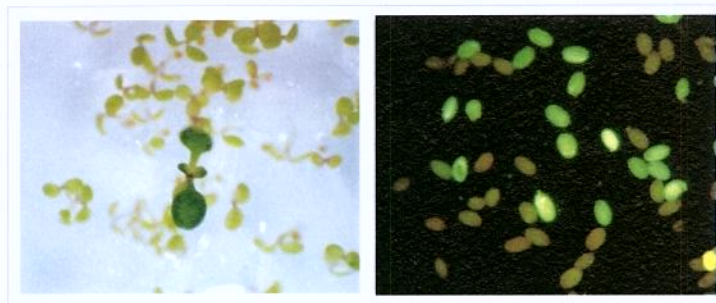


Figura 13. Seleção de transformantes primários (T0) de *A. thaliana*. À esquerda seleção de plantas T0 em meio MS/2, suplementado com 0.5% de sacarose, contendo o marcador de seleção kanamicina a uma concentração de 100µg/ml. Ao centro da figura aparece um transformante primário resistente ao antibiótico. À direita, seleção de sementes transformadas através de fluorescência de GFP.

4. Coloração específica para o polímero lignina

Hastes florais de plantas expressando ProAtbZIP9-VP16-bZIP foram seccionados a mão a uma altura de aproximadamente 1-2 cm acima da roseta e coradas por 30 minutos em uma solução de 82% etanol, 14% ácido clorídrico e 0.09% (massa:volume) floroglucinol, um corante específico para lignina (Prigge *et al.*, 2005). Após a coloração, as hastes florais foram analisadas em lupa Carl Zeiss e fotografadas com câmera digital Canon Power Shot A95.

5. Localização *in situ* da atividade de GUS

Os ensaios histoquímicos da atividade de Gus em plantas transgênicas com 8 dias de idade, expressando uma fusão entre a sequência promotora de *AtbZIP9* e o gene

repórter *GusA* (ProAtbZIP9-Gus), foram realizados conforme descrito por Jefferson (1987). As amostras foram primeiramente fixadas em acetona 80 % por 1h a - 20°C e então incubadas por 2 horas no escuro a 37°C em tampão de reação (5 mg de X-gluc dissolvido em 200 µl de DMSO e diluído em 10 ml de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7, contendo 10 mM de Na₂EDTA, 0,1 % de Triton X-100 e 0,5 mM de ferrocianeto de potássio) em volume suficiente para cobrir a amostra. Após a coloração as amostras foram submetidas aos procedimentos histológicos descritos abaixo no item 6.

6. Técnicas histológicas e microscopia

Para os estudos de anatomia, tecidos frescos ou previamente corados para Gus foram fixados por 24 horas em FAA (formalina - ácido acético - etanol 50% = 5:5:90 v/v/v; Johansen, 1940), sendo 20 min em vácuo. Após a fixação e respectivas desidratações (álcool etílico 50% por 12 horas, 70% por 24 horas e 100% por 2 horas), o material foi pré-infiltrado, infiltrado e polimerizado em historesina plástica (glicol metacrilato - Historesin Leica), seguindo-se a técnica descrita por Gerrits & Smid (1983) e as recomendações do fabricante. Após a inclusão, o material foi montado em blocos de madeira e seccionado transversal e longitudinalmente numa espessura de 8-10µm em micrótomo Leica RM2245. Os cortes foram montados em lâminas, secos em estufa a 37°C e se necessário, corados com azul de toluidina pH 4.7 (Johansen, 1940). Compostos fenólicos foram detectados utilizando-se cloreto férrico 10% (w/v) por 30 minutos. Lâminas foram analisadas utilizando-se microscópio Leica DMI4000B e as imagens foram adquiridas com o sistema de câmera digital Leica DFC300 FX. Imagens foram processadas utilizando-se Adobe Photoshop 6.0.

7. Extração de RNA e RT-PCR semi-quantitativa

Para extração de RNA total de plantas de *Arabidopsis*, aproximadamente 500mg de tecido vegetal foi triturado em cadinho com nitrogênio líquido e homogenizado em 1ml de tampão de extração (Tris HCl pH 8.0 0.465 M, LiCl 0.23M, EDTA pH 8.0 0.0215M, SDS 2.33% e β-mercaptoetanol 4.7%). Cerca de 600µl deste homogeneizado foi transferido para eppendorf de 2ml e vortexado por 2 minutos. Em seguida, foram

realizadas duas extrações com 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v; PIC), sendo as amostras centrifugadas por 15 minutos a 4°C e 13000rpm em cada uma das extrações. Cerca de 400µl do sobrenadante proveniente das extrações com PIC foi transferido para eppendorf de 1.5ml contendo 200 µl ($1/2$ volume) de LiCL 12M. A amostra foi vortexada e mantida a -80°C por um período de 30 minutos a 2 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 4°C e 13000rpm, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500µl de LiCl 6M. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4°C a 13000rpm e após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 300µl de água DEPC utilizando-se vórtex. Foram adicionados 100µl de acetato de sódio 3M pH 5.2 e 800µl de etanol absoluto gelado e as amostras foram mantidas a -80°C *overnight*. O material foi então centrifugado 30 minutos a 4°C e 13000rpm, o sobrenadante descartado, e o *pellet* lavado com 500µl de etanol 70% gelado, seguido de 5 minutos de centrifugação a 4°C a 13000rpm. O *pellet* foi seco a temperatura ambiente (cerca de 10 minutos) e o RNA (de 60 a 100µg total) foi ressuspensionado em 30-50µl de água DEPC. Todo o procedimento foi realizado no gelo.

O RNA isolado foi desnaturado e submetido a eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) contendo 5% de formaldeído, de acordo com Logemann *et al.*, 1987. A síntese de cDNA foi realizada em reações de 25µl utilizando-se ImPromII Reverse Transcriptase II (M314A, Promega). Em um primeiro passo, 3µg de RNA total foi misturado a 1.5µl de oligoT18 (Invitrogen) 10mM, sendo o volume final completado para 13.5µl. A amostra foi aquecida a 70°C por 10 minutos e em seguida foi acrescentado 10.5µl do *mix* (2µl de água DEPC, 3µl de ImPromII 5X buffer, 3µl de ImProm II MgCl₂ (25mM), 1.25µl de uma mistura de dNTPs 10mM cada e 1.25µl de RNA Guard RNase Inhibitor (Amersham Biosciences, 27.2 U/µl). A amostra foi mantida por 2 minutos a 42°C. Acrescentou-se 1µl de ImProm II Reverse transcriptase e a amostra foi incubada 40 minutos a 42°C para transcrição reversa. Em seguida a enzima foi inativada a 70°C por 15 minutos. Durante a manipulação, entre as incubações a 70°C e a 42°C, as amostras foram mantidas em gelo.

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 50µl contendo o tampão de reação 1X (Tris HCl 10 mM pH 9,0, KCl 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM, 200 µM de cada um dos dNTPs, 0,4 µM de cada um dos oligonucleotídeos, 1.8 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 5µl de cDNA. Amplificações foram realizadas conforme os seguinte passos: 94°C por 3 minutos seguido por ciclos de 94°C por 45 segundos,

temperatura ideal de anelamento por 30 segundos, 72°C por 90 segundos, finalizando a reação com uma fase de extensão final a 72°C por 5 minutos. A fase linear da reação exponencial de PCR foi previamente verificada para cada gene amplificado utilizando-se RNA selvagem. Os genes *Actin2* (At3g18780) e adenosina fosforibosil transferase *Apt1* (At1g27450) foram utilizados como controles endógenos de padronização da quantidade de cDNA utilizado nas reações. Os primers utilizados nas amplificações, assim como o número de ciclos escolhido para amplificação de cada gene (correspondente a fase exponencial da reação de PCR previamente determinada) e as respectivas temperaturas de anelamento utilizadas estão descritos na Tabela II. Com exceção de *AtbZIP9*, At1g07640 e At3g43430, para todos os outros genes foram desenhados primers na junção éxon-éxon, de forma a evitar tratamento de RNA com DNase e assim, eliminar amplificação de DNA genômico durante as reações de RT-PCR. Para avaliação da expressão de *AtbZIP9*, At1g07640 e At3g43430, previamente a síntese de cDNA, o RNA isolado foi submetido a tratamento com *DNase I Amplification Grade* (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante.

Tabela II. Sequência de oligonucleotídeos, temperatura de anelamento e número de ciclos utilizados nas amplificações por PCR. Ta, temperatura de anelamento do primer.

Gene	Par de oligonucleotídeos utilizado (5' - 3')	Posição*	Ciclos**	Ta
<i>Actin2</i> (At3g18780)	CGTACAACCGGTATTGTGCTGG AACGATTCTGGACCTGCCTCATC	+445 a +466 +1093 a +1116	15	60°C
<i>Apt1</i> (At1g27450)	TCCCAGAATCGCTAAGATTGC CCTTTCCCTTAAGCTCTG	+403 a +423 +665 a +682	20	56°C
<i>AtbZIP9</i> (At5g24800)	CAAGCCCTCTAGACCCTTG GATGTCTGAGACGCAGCTAAC	+77 a +95 +805 a +825	25	58°C
<i>Api</i> (At1g79430)	GAAGGTTCAAGAGCTTCTGCCATG GGTTTGCGGAAAGATCGTGATC	+307 a +330 +829 a +850	23	56°C
<i>Suc2</i> (At1g22710)	CTCTACTGCGCAAACCTCAAAACG CAGATATTACCATCTGAGGGACG	+649 a +672 +1355 a + 1368	20	60°C
<i>ProDH</i> (At3g30775)	CAACATCTCACTTTAGCTCAG CTCTTTCTCAGCATTTTGTAC	+275 a +295 +709 a +729	18	58°C
<i>LKR/SDH</i> (Atg4g33150)	CTGGAATCGATCACATGATG GCATCCTTATTTAGAATGTTAC	+2192 a +2211 +2675 a +2696	21	58°C
Dof At2g28810	GGCCACAGTCTGCGAATCC GCTGGACATTACTAGTATTAG	+47 a +65 +524 a +544	24	58°C
Dof At3g43430	GACATTCTTCATCGAAGACAC GAAGAGGTAAAGAAGTCGTTT	+3 a +23 +463 a +483	24	60°C
Dof At1g07640	GCAAGGCAGGCCAACATTC GGATCGAAGAGAGCAAAGG	+25 a +43 +585 a +603	22	58°C

* As posições dos oligonucleotídeos são indicadas em relação ao nucleotídeo "A" do códon ATG de iniciação da tradução, o qual corresponde a posição +1 e todas referentes a sequência codificante dos genes. **O número de ciclos escolhido para as análises corresponde a fase exponencial da reação de PCR (condições não saturantes), previamente determinada.

8. Extração de proteínas totais, SDS-PAGE e Western blot

Para extração de proteínas totais, 600-800mg de tecido vegetal fresco foi macerado em nitrogênio líquido e homogenizado em 1ml de tampão de extração Tris HCL pH 8.5 50mM, EDTA pH 8.0 2mM, dithiothreitol 5mM, NaCl 50mM, Triton X-100 0.1%, PMSF 100µM, Leupeptina 100µM e Pepstatina 2µM. O homogeneizado foi submetido a agitação leve por 30 minutos em gelo e centrifugado por 20 minutos a 4°C e 13000rpm. O sobrenadante foi recuperado e armazenado a -20°C. A quantificação de proteína no extrato foi determinada pelo método de Bradford (1976) modificado para ensaio em placas de ELISA, onde 200µl de reagente de Bradford (BioRAD) 1X foi adicionado a 10µl de extrato diluído 1:10 em água milli-Q. A concentração protéica foi determinada em leitor de ELISA após 30 minutos de incubação, utilizando-se comprimento de onda de 590nm e tomando-se como base a regressão linear de uma curva padrão de soro de albumina bovina (BSA), com concentrações de proteína variando de 50 a 500µg/ml. Os extratos (25-100µg) diluídos 1:1 em tampão de amostra 2X (Tris HCl 125mM pH 6.8, SDS 4%, β-mercaptoetanol 10%, glicerol 20% e azul de bromofenol 0.04%) foram fervidos por 5 minutos e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% em tampão Tris-glicina pH 8.6 sob uma corrente constante de 10mA. Os géis foram equilibrados em tampão de transferência Tris-Glicina 1X, metanol 20% e SDS 0.02% por 10 minutos e transferidos para membrana de nitrocelulose Hybond ECL 0,45µm (Amersham) por 1 hora e 30 minutos em sistema semi-seco a uma corrente constante de 0.5A. Após saturação da membrana overnight a 4°C em TBS-Tween 0.1% (TBS-T), acrescido de 5% de leite em pó Molico desnatado (m/v), as membranas foram incubadas por 10 horas com o anticorpo primário Rat Anti-HA *High Affinity* clone 3F10 (Roche Applied Science) e por 2 horas com anticorpo secundário ECL anti-rat IgG *Horseradish Peroxidase-linked* (Amersham Biosciences) diluídos 1:1000 e 1:10000, respectivamente em TBS-T, 5% leite em pó Molico desnatado. As membranas foram reveladas com kit ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences), conforme recomendação do fabricante, utilizando-se filme Kodak MXG/Plus.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO I

Obtenção e análise fenotípica de plantas transgênicas expressando ativadores constitutivos fortes de *AtbZIP9*

1. Obtenção de transformantes primários

Com o objetivo de obter informações sobre o papel desempenhado pelo fator de regulação de transcrição *AtbZIP9* no ciclo de vida de *Arabidopsis*, variantes deste gene que codificam para ativadores constitutivos fortes de transcrição foram geradas, através de fusões com o domínio de transativação da transcrição VP16 do vírus *Herpes simplex*. Estas variantes, teoricamente, são capazes de ativar de maneira constitutiva a expressão dos genes alvos de *AtbZIP9*, permitindo assim, contornar as dificuldades decorrentes da análise de famílias gênicas que apresentam redundância funcional (Zhang, 2003).

Três versões ativadoras diferentes de *AtbZIP9* foram construídas a fim de aumentar a probabilidade de obtenção de mudanças informativas sobre o papel deste gene no desenvolvimento de *Arabidopsis* (Figura 11). O primeiro ativador integra apenas o domínio de ligação ao DNA e de localização nuclear de *AtbZIP9*, permitindo assim, contornar as regulações da atividade (ativação/repressão da transcrição, estabilidade da proteína) de *AtbZIP9* que podem ser mediadas por outros motivos protéicos não presentes nesta construção. A expressão deste ativador está controlada pelo próprio promotor de *AtbZIP9*, conferindo assim, o padrão de expressão do alelo selvagem (Figura 11; ProbZIP9-VP16-bZIP). O segundo ativador gerado mantém as regulações da atividade de *AtbZIP9*. Portanto, esta construção difere da primeira apenas pela presença da sequência codificante completa de *AtbZIP9* (Figura 11; ProbZIP9-VP16-cDNA). O terceiro e último ativador obtido expressa de maneira ectópica o ativador da primeira

construção a partir do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (Figura 11; 35S-VP16-bZIP). Os três tipos de ativadores construídos foram inseridos no mutante *knockout atbzip9-1*, a fim de evitar interferências do gene endógeno em nossas análises, como por exemplo, a competição por parceiros de interação ou sítios de ligação nas seqüências de DNA alvo.

Transformantes primários (T0) para ProbZIP9-VP16-bZIP e ProbZIP9-VP16-cDNA foram selecionados em meio seletivo contendo kanamicina, enquanto transformantes T0 para 35S-VP16-bZIP foram selecionados com base na fluorescência de GFP na semente. A eficiência de transformação para ProbZIP9-VP16-bZIP e ProbZIP9-VP16-cDNA foi de 4% e 3.2%, respectivamente, porcentagem mais elevada do que a relatada por Clough & Bent (1998) que gira em torno de 1%. A eficiência de transformação para a variante 35S-VP16-bZIP não foi definida devido a dificuldade de contagem das sementes transformadas em estereomicroscópio. Foram selecionados e analisados fenotipicamente 310 transformantes primários para ProbZIP9-VP16-bZIP, 400 para ProbZIP9-VP16-cDNA e 780 para 35S-VP16-bZIP.

2. Versões ativadoras constitutivas de *AtbZIP9* induzem alterações de morfologia foliar e/ou fisiologia em transformantes primários

Quando comparados a plantas selvagens, transformantes primários (T0) para as três variantes ativadoras de *AtbZIP9* apresentaram diversas alterações fenotípicas, principalmente relacionadas a modificações de morfologia foliar e mudanças metabólicas e fisiológicas como, por exemplo, acúmulo de compostos fenólicos em folhas, sintomas de morte celular e senescência. A capacidade do domínio VP16 fusionado a *AtbZIP9* induzir alterações do desenvolvimento sugere que a abordagem escolhida possa ser eficiente (ver também, Santos Mendoza *et al.*, 2005) e conseqüentemente, promissora para o estudo funcional de *AtbZIP9*.

2.1 Alterações fenotípicas apresentadas por plantas T0 para ProbZIP9-VP16-cDNA

Mudanças fenotípicas apresentadas por plantas T0 para ProbZIP9-VP16-cDNA, transgene mais relacionado ao alelo selvagem, podem ser divididas em duas classes

gerais, ambas aparecendo em torno do 10º dia após a germinação (DAG), caracterizando-se, portanto, como alterações de desenvolvimento tardio. Juntas, estas modificações abrigam 70% (280/400) dos transformantes analisados, enquanto os 30% (120/400) restantes caracterizam-se como plantas aparentemente normais, semelhantes ao controle selvagem. Na tabela III está apresentado um resumo das características de cada uma destas duas classes de alterações fenotípicas, assim como a frequência com que foram encontradas em transformantes primários.

Tabela III. Classes de alterações fenotípicas apresentadas por plantas T0 provenientes de transformação com ProbZIP9-VP16-cDNA.

Classe	Tipo de alteração	Características específicas	Frequência (%) (n=400)	Início
I	Desenvolvimento foliar e fisiologia	➤ Folhas alongadas e involutas, recortadas ou não ➤ Sintomas de senescência e clorose ➤ Esterelidade	20% (80)	10-15 DAG
II	Desenvolvimento foliar e fisiologia	➤ Folhas alongadas, recortadas, aformes ou semelhantes a primórdios foliares, involutas, epinásticas e retorcidas ➤ Permanência em estado vegetativo ➤ Sintomas de senescência e necrose ➤ Acúmulo generalizado de compostos fenólicos em folhas	50% (200)	10-20 DAG

A primeira classe (classe I) de alterações fenotípicas presente em 20% (80/400) dos indivíduos T0 selecionados engloba plantas com folhas alongadas e involutas, recortadas ou não e que, na maioria das vezes, apresentam sintomas de clorose, evidenciado por um aspecto amarelo-transparente de folhas (Figuras 14 A e 14 B). Uma gama de intensidade para este fenótipo de classe I pode ser observada (Figuras 14 C a 14 G). O transplante destas plantas da cultura *in vitro* sobre meio sintético rico para vasos com terra é letal devido ao rápido surgimento (intervalo de 24 a 48 horas) de drásticos sintomas de ressecamento e necrose de folhas e inflorescências (Figura 14 H). Aparentemente, a presença destes sintomas é independente da idade com que as plantas são transplantadas. A manutenção destas plantas em cultivo *in vitro* está associada a lesões necróticas e senescência precoce (Figuras 14 I a 14 L). A inflorescência primária

surge em todos os transformantes com coloração esbranquiçada e aspecto vítreo (Figura 14 M e 14 N). As inflorescências laterais, apesar de aparentarem um início de desenvolvimento fenotipicamente normal (Figura 14 O), acabam posteriormente adquirindo esta aparência esbranquiçada semelhante às inflorescências primárias ou ressecam e necrosam (Figura 14 P). Desta maneira, transformantes primários para esta classe de alterações fenotípicas são letais e não puderam ser propagados.

A segunda classe de modificações de fenótipo induzidas por esta construção (classe II) representa 50% (200/400) dos T0, também sendo caracterizada por alterações do desenvolvimento foliar e fisiologia. Esta classe II abriga plantas anãs e atrofiadas, que em cultivo *in vitro* atingem no máximo 1cm de diâmetro da roseta, enquanto plantas selvagens nas mesmas condições de crescimento podem chegar a medir de 3 a 4 cm (Figura 15 A). Quando comparados ao controle selvagem em um mesmo estágio de desenvolvimento, um número mais elevado de folhas pode ser encontrado nestes transformantes de classe II (Figura 15 B). Folhas apresentam-se pequenas, epinásticas e alteradas morfológicamente (alongadas, recortadas, serradas, triangulares, cordiformes, redondas ou aiformes), muitas vezes com padrão semelhante a primórdio foliar (Figura 15 B). A maioria destas plantas de classe II permanece por tempo indefinido em crescimento vegetativo (1 a 3 meses) e os raros exemplares que mostram transição para o estágio reprodutivo são estéreis. Cerca de 85% destes transformantes apresentam sintomas de senescência, lesões necróticas e acúmulo de compostos amarronzados em folhas. Cortes histológicos de folhas destes transformantes corados com azul de toluidina sugerem que estes compostos representam metabólitos fenólicos (Figura 15 C), o que foi confirmado com coloração com cloreto férrico, específica para este tipo de composto (Fenóis aparecem esverdeados quando submetidos a coloração com azul de toluidina e azul escuro em coloração com cloreto férrico; Ling-Lee *et al.*, 1987). Este tipo de alteração fenotípica, assim como às de classe I, inicia-se em torno dos 10 DAG, tornando-se mais grave ao longo de desenvolvimento da planta (Figura 16 A-D). Para esta classe II de modificações fenotípicas também pode ser observado um gradiente de intensidade da alteração entre os diferentes transformantes T0 (Figura 16 E a G). Finalmente, assim como descrito para a classe I de alterações, o transplante para terra é letal.

CONTROLE SELVAGEM

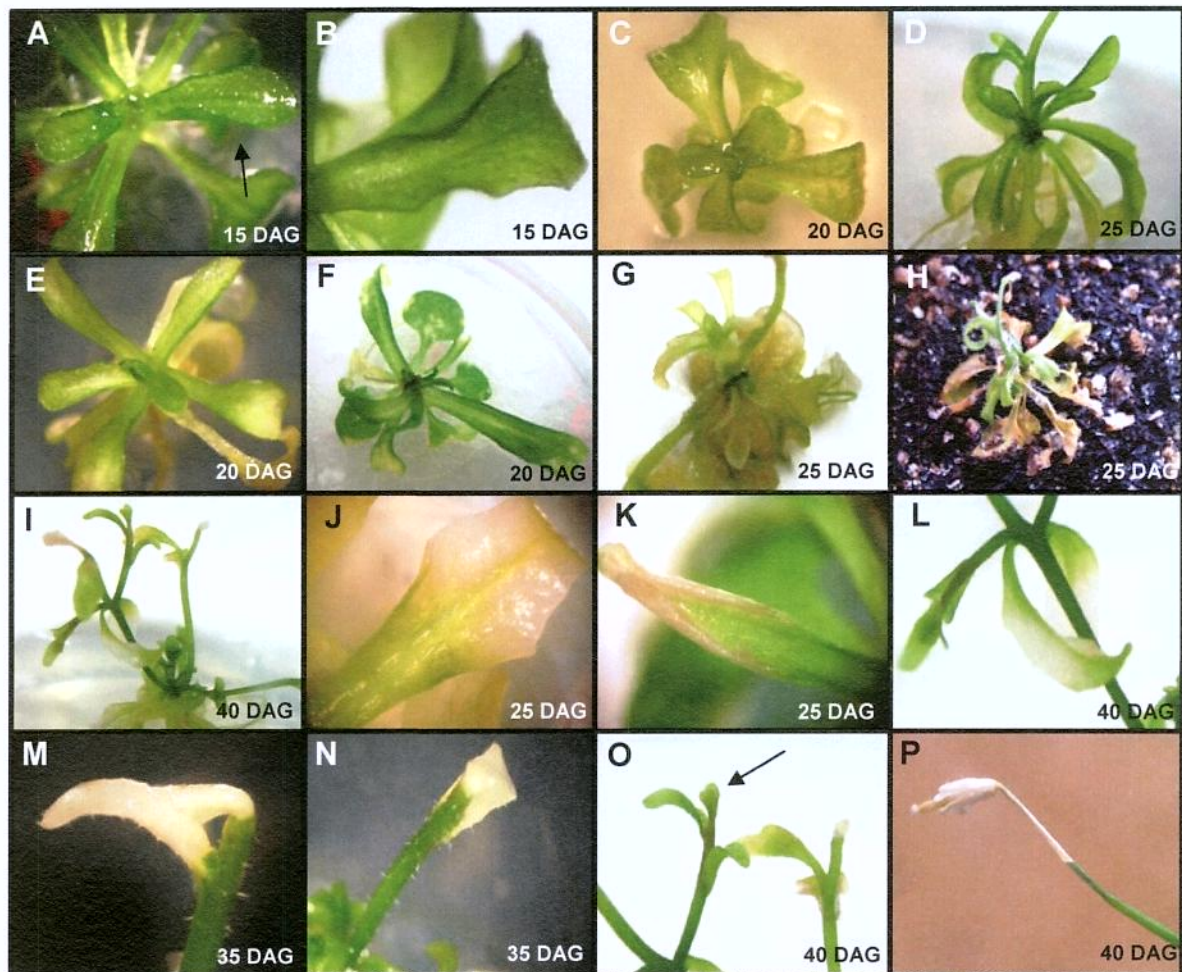


Figura 14. Alterações fenotípicas apresentadas por transformantes primários (T0) para ProbZIP9-VP16-cDNA pertencentes a classe I (Tabela III). **A.** Planta com folhas alongadas e involutas. **B.** Planta com folhas alongadas, involutas e recortadas **C-G.** Um gradiente de intensidade pode ser observado para esta classe I de alterações fenotípicas **C.** Alteração fenotípica mais sutil. **D, E e F.** Alterações fenotípicas de nível intermediário **G.** Alteração fenotípica drástica. **H.** Ressecamento e necrose em terra. **I.** Cultivo *in vitro* associado a senescência em folhas e inflorescências **J-P.** Ampliações de folhas e inflorescências da planta representada em **I** **J.** Senescência em folhas mais velhas **K.** Senescência em folhas mais jovens **L.** Senescência em folhas caulinares. **M-N.** Inflorescência primária com aspecto esbranquiçado e vítreo **O.** Seta indica uma inflorescência secundária em início de desenvolvimento, aparentemente fenotipicamente normal **P.** Inflorescência secundária em estágio mais tardio de desenvolvimento apresentando sintomas de senescência e necrose.

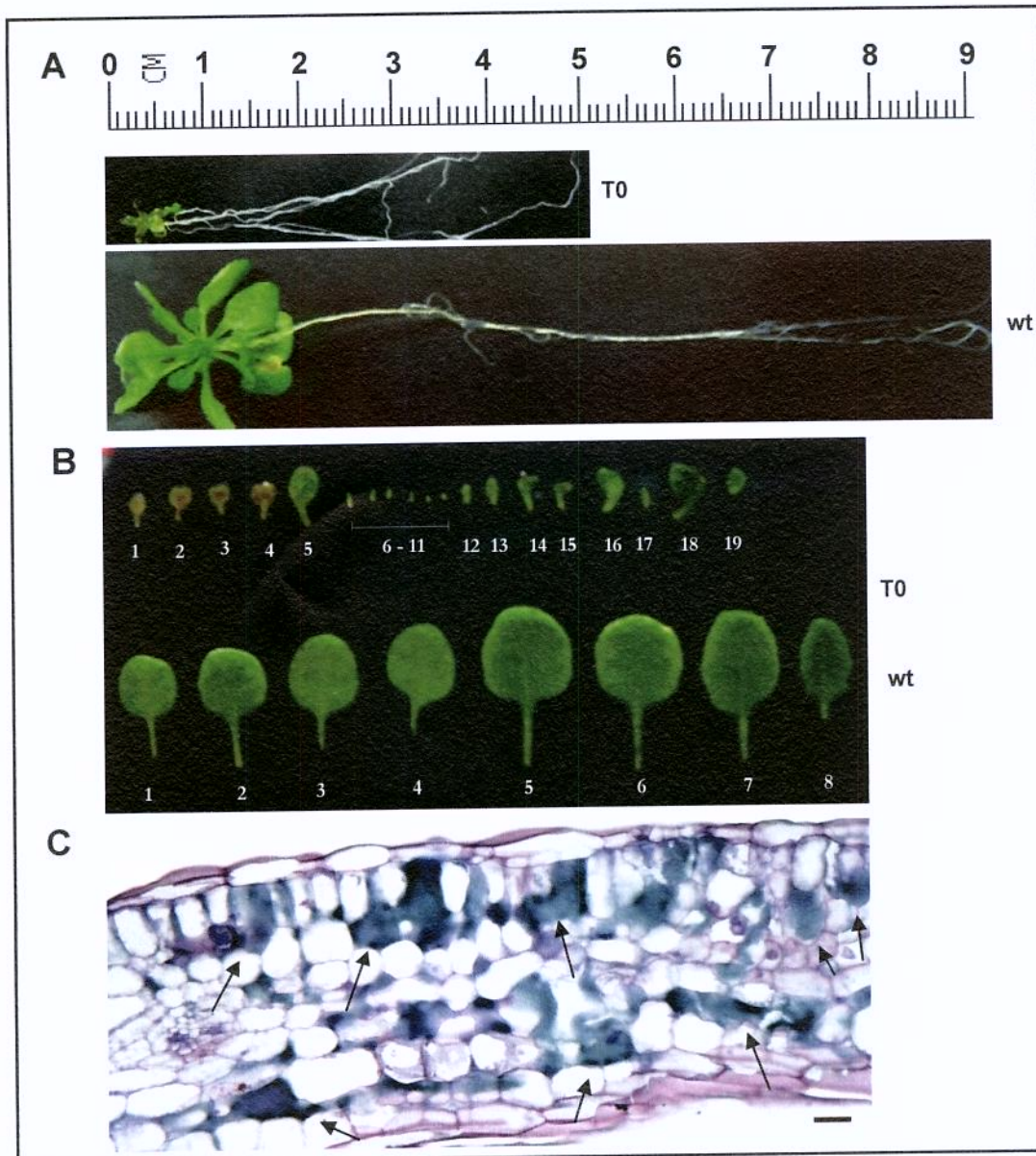


Figura 15. Modificações fenotípicas apresentadas por transformantes primários (T0) para ProbZIP9-VP16-cDNA, pertencentes a classe II (Tabela III). **A-B.** Análise comparativa 20 dias após a germinação da morfologia de folhas entre planta selvagem (wt) e planta T0. **A.** Plantas transgênicas são anãs e atrofiadas (diâmetro máximo variando de 3mm a 1.0cm) **B.** Plantas transgênicas apresentam maior número de folhas do que plantas selvagens em um mesmo estágio de desenvolvimento. As folhas são pequenas, epinásticas e alteradas morfologicamente, muitas vezes apresentando um aspecto de primórdio foliar. Estas plantas permanecem por tempo indefinido em estado vegetativo. A maioria apresenta sintomas de senescência, necrose e acúmulo de compostos fenólicos em folhas (ver item C). Folhas estão apresentadas de acordo com o tempo de emergência para facilitar a comparação. Ambas as plantas foram seccionadas 20 dias após terem germinado. **C.** Corte histológico de folha de planta T0 para ProbZIP9-VP16-cDNA, corado com azul de toluidina. Compostos fenólicos aparecem corados em verde e estão indicado pelas setas.

CONTROLE SELVAGEM

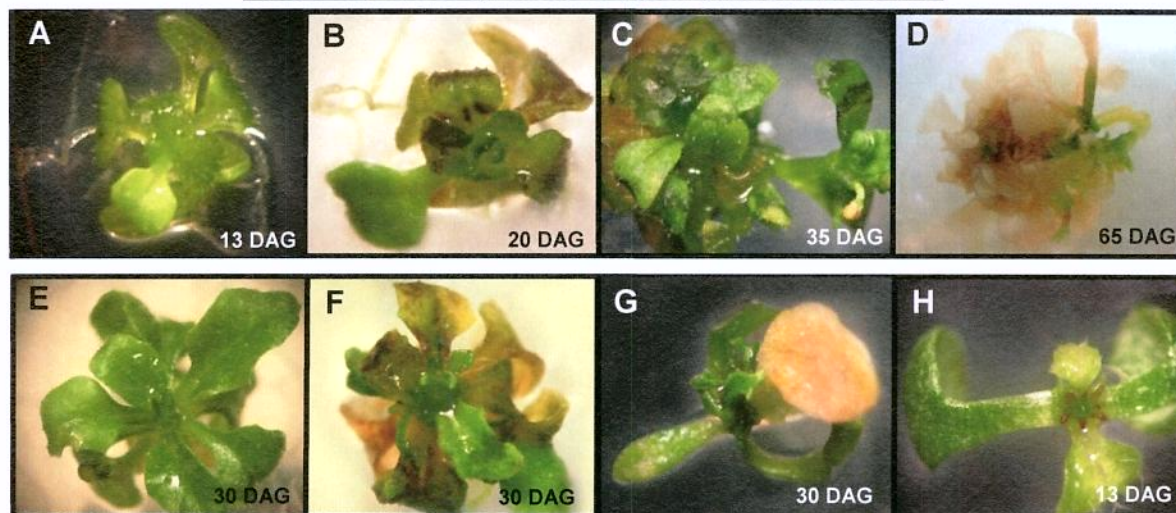


Figura 16. Mudanças fenotípicas apresentadas por transformantes primários (T0) para ProbZIP9-VP16-cDNA pertencentes a classe II (Tabela I). **A-D.** Aumento de gravidade da alteração fenotípica ao longo do desenvolvimento. **A.** Planta aos 13DAG apresentando alguns sinais de atraso de desenvolvimento e epinastia **B.** Planta aos 20DAG apresentando epinastia, alterações da morfologia da folha, senescência em folhas mais velhas e acúmulo de compostos fenólicos em folhas mais jovens **C.** Planta aos 35DAG apresentando drásticas alterações de desenvolvimento foliar e esterilidade **D.** Planta aos 65DAG, senescente e necrótica. **E-H.** Gradiente de intensidade para esta alteração fenotípica. **E.** Alteração fenotípica mais sutil. **F.** Alteração fenotípica intermediária **G e H.** Alterações fenotípicas graves.

Possivelmente, as três classes fenotípicas encontradas em plantas T0 para ProbZIP9-VP16-cDNA, fenótipo normal, fenótipo folhas alongadas e involutas (classe I, Tabela III) e fenótipo permanência em estado vegetativo (classe II, Tabela III), correspondam a diferentes níveis de expressão do transgene, relacionados ao sítio de inserção no genoma. Sugerimos que a alteração permanência em estado vegetativo (classe II), por representar a alteração mais freqüente, apresente um nível de expressão intermediário do transgene, entre o apresentado por plantas sem fenótipo (nível baixo de

expressão) e o de plantas com fenótipo de folhas alongadas e involutas (nível mais elevado de expressão; Figura 17).

Baseado nesta última hipótese inferimos também que as duas classes de alterações fenotípicas possam resultar tanto de diferenças no grau de ativação de um mesmo conjunto de genes alvo quanto a uma possível ampliação da gama de genes a serem regulados. No entanto, o grau de correspondência entre o conjunto de genes efetivamente regulados por ProbZIP9-VP16-cDNA nestas plantas T0 e o conjunto de genes alvos legítimos de *AtbZIP9* é incerto e requereria um estudo mais detalhado.

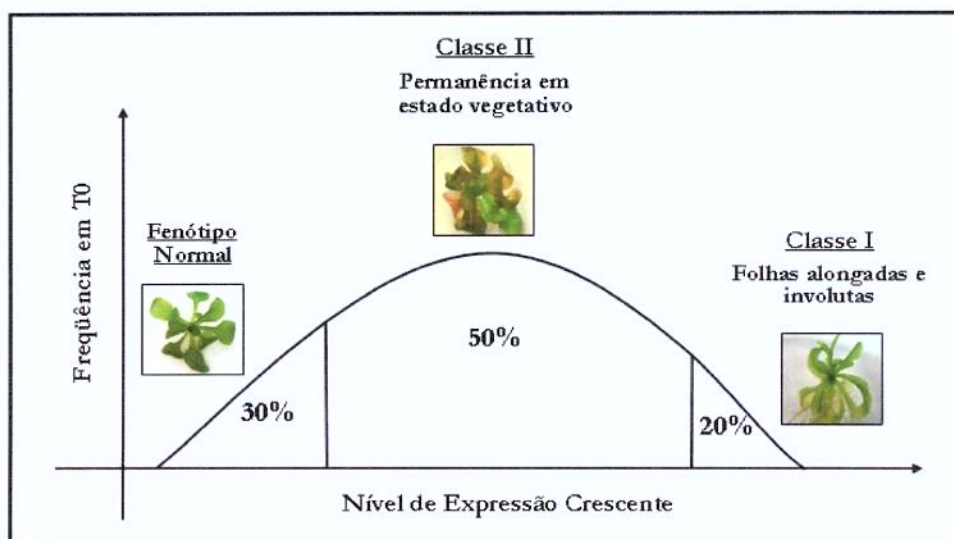


Figura 17. Representação gráfica da possível correlação entre frequência de aparecimento das três classes fenotípicas apresentadas por transformantes primários para ProbZIP9-VP16-cDNA e nível de expressão do transgene.

2.2 Alterações fenotípicas apresentadas por plantas T0 para ProbZIP9-VP16-bZIP

Dos transformantes T0 para ProbZIP9-VP16-bZIP analisados, 20% (62/310) desenvolveram de maneira semelhante a plantas do tipo selvagem, enquanto nos 80% (248/310) restantes alterações fenotípicas foram observadas. As classes de mudanças fenotípicas apresentadas por plantas T0, assim como suas respectivas frequências estão representadas na Tabela IV.

Tabela IV. Classes de alterações fenotípicas apresentadas por plantas T0 provenientes de transformação com ProbZIP9-VP16-bZIP.

Classe	Tipo de alteração	Características específicas	Frequência (%) (n=310)	Início
I	Desenvolvimento foliar e fisiologia	➤ Folhas alongadas e involutas, recortadas ou não ➤ Sintomas de senescência e clorose ➤ Esterelidade	50% (155)	10-15DAG
II	Desenvolvimento foliar e fisiologia	➤ Folhas alongadas, recortadas, aformes ou semelhantes a primórdios foliares, involutas, epinásticas e retorcidas ➤ Permanência em estado vegetativo ➤ Sintomas de senescência e necrose ➤ Acúmulo generalizado de compostos fenólicos em folhas	~7%(22)	10-20 DAG
III	Desenvolvimento foliar e/ou fisiologia	<u>Subclasse A</u> ➤ Folhas recortadas (*) <u>Subclasse B</u> ➤ Folhas com protusão na ponta próximo-distal (*) <u>Subclasse C</u> ➤ Folhas com pequena invaginação (*) <u>Subclasse D</u> ➤ Folhas retorcidas (*)	~8% (25) ~2% (6) ~13% (40) 10% (31)	10-15DAG
IV	Desenvolvimento da haste floral	➤ Hastes florais sem sustentação	~3% (10) em plantas com fenótipo normal e ~15% (46) em plantas de classe III	20-30 DAG

Em cinza aparecem as classes fenotípicas que não estão presentes em ProbZIP9-VP16-cDNA. Plantas apresentando mais de uma classe de alterações fenotípicas foram computadas no cálculo da frequência das diversas classes. (*) Alguns exemplares também apresentaram sintomas de senescência e/ou necrose e/ou presença de compostos fenólicos.

As alterações fenotípicas induzidas por esta versão ativadora de AtbZIP9 podem ser agrupadas em quatro grandes classes, que podem ser diferenciadas a partir de 10 ou 20 DAG de cultivo. As duas primeiras classes (I e II, Tabela IV) são as mesmas descritas para ProbZIP9-VP16-cDNA, no entanto, a frequência de indivíduos T0 que apresentam

estas modificações fenotípicas varia entre estas duas versões ativadoras. Enquanto a primeira classe de alterações, que abriga plantas com folhas alongadas e involutas, representa 20% (80/400) dos T0 de ProbZIP9-VP16-cDNA, em ProbZIP9-VP16-bZIP esta classe corresponde a 50% (155/310) dos transformantes. De maneira oposta, as mudanças fenotípicas de classe II são mais abundantes em transformantes para ProbZIP9-VP16-cDNA representando 50% (200/400) dos indivíduos analisados contra aproximadamente 7% (22/310) presente em transformantes para ProbZIP9-VP16-bZIP. Este dado sugere que o conjunto de genes alvos destas duas fusões são aparentemente similares.

Em transformantes T0 para ProbZIP9-VP16-bZIP, novos tipos de alterações fenotípicas, não presentes em ProbZIP9-VP16-cDNA, também são observadas, sendo classificadas como alterações de classe III e IV na Tabela IV. Na classe III foram agrupadas modificações de desenvolvimento foliar como folhas recortadas (frequência: ~8% (25/310); Figura 18 A), folhas que apresentam uma protusão em sua margem próximo-distal (frequência: ~2% (6/310); Figura 18 B), folhas com pequena invaginação (frequência: ~13% (40/310); Figura 18 C) e por último, folhas retorcidas (frequência: 10% (31/310); Figura 18 D) (Tabela IV). Alguns transformantes apresentam duas, três ou até mesmo às 4 alterações foliares citadas acima simultaneamente. Finalmente, na classe IV de alterações induzidas por ProbZIP9-VP16-bZIP foram englobadas plantas que apresentam hastes florais frágeis e sem sustentação (frequência: ~18% (56/310); Figura 18 E). Em *Arabidopsis*, a maioria das fibras lignificadas que auxiliam no sustento da haste floral estão depositadas em regiões interfasciculares (entre feixes vasculares), próximas à endoderme e posicionadas paralelamente aos feixes de floema (Zhong & Hua Ye, 1999). Seções transversais de hastes florais de plantas pertencentes a esta classe IV coradas com coloração lignina-específica mostram uma redução na quantidade deste polímero depositada na região das fibras interfasciculares (Figura 19 A a D), o que concorda com o fenótipo apresentado de hastes frágeis e sem sustento.

As diferenças entre transformantes para as construções ProbZIP9-VP16-bZIP e ProbZIP9-VP16-cDNA, tanto com relação as frequências das classes fenotípicas em comum, quanto ao surgimento de novos tipos de alterações em plantas T0 para ProbZIP9-VP16-bZIP, devem estar relacionadas a seqüências N- e C- terminais cercado o domínio bZIP que estão ausentes na construção ProbZIP9-VP16-bZIP. É possível que

CONTROLE SELVAGEM

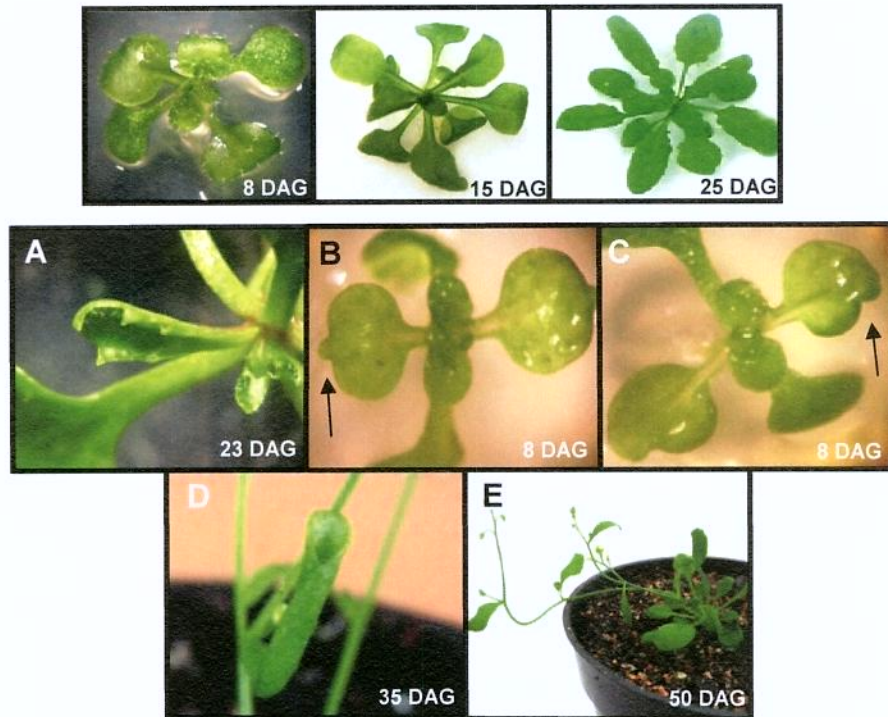


Figura 18. Alterações fenotípicas apresentadas por transformantes primários (T0) para ProbZIP9-VP16-bZIP pertencentes as classes III e IV (Tabela IV). **A.** Folhas recortadas (classe III, subclasse A, Tabela IV); **B.** Folhas com protusão em sua margem próximo-distal (classe III, subclasse B, Tabela IV); **C.** Folhas com invaginação (classe III, subclasse C, Tabela IV); **D.** Folhas retorcidas (classe III, subclasse D, Tabela IV), **E.** Planta com haste floral frágil e sem sustentação (classe IV, Tabela IV).

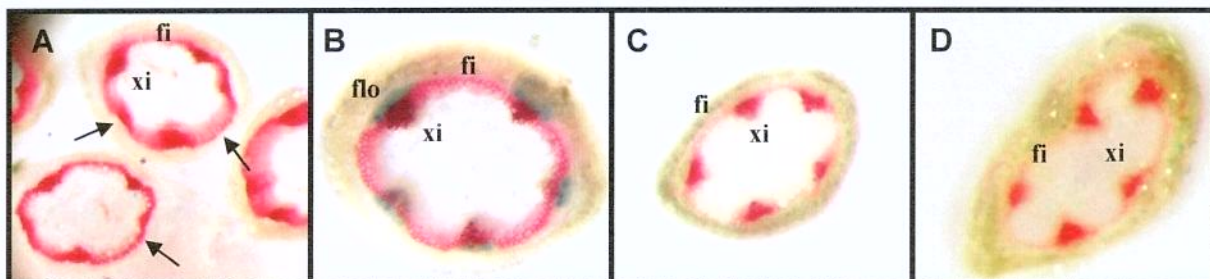


Figura 19. Secções transversais de hastes florais coradas com floroglucinol, que marca em vermelho tecidos lignificados. Hastes foram cortadas a mão 1-2 cm acima da roseta. **A.** Plantas selvagens. Setas indicam a presença de lignina na região das fibras interfasciculares **B.** Plantas transgênicas expressando o gene repórter *GusA* sob controle da sequência promotora de *AtbZIP9* (ProbZIP9-Gus). Expressão de *Gus* (azul) representa os feixes de floema, posicionados paralelamente as fibras interfasciculares lignificadas e acima dos feixes de xilema. **C e D.** Hastes florais sem sustentação de plantas transgênicas expressando ProbZIP9-VP16-bZIP, onde pode ser notada um significativa redução na quantidade de lignina depositada na região das fibras interfasciculares. xi, feixes de xilema lignificados; flo, feixes de floema; fi, região de fibras interfasciculares.

estas seqüências sejam alvo de regulações pós-transcricionais (estabilidade da proteína, regulação da atividade e/ou localização subcelular da proteína por fosforilação ou interação com parceiros) que não atuariam sobre o alelo ProbZIP9-VP16-bZIP.

2.3 Alterações fenotípicas apresentadas por plantas T0 para 35S-VP16-bZIP

A expressão da construção 35S-VP16-bZIP induziu uma ampla gama de mudanças fenotípicas em transformantes primários. Estas alterações de fenótipo foram agrupadas em dez classes distintas, representando cerca de 90% (225/250) dos transformantes analisados, sendo os 10% (25/250) restantes relativos a plantas normais. As primeiras sete classes englobam mudanças que aparecem após a fase germinativa, entre 10 e 15 DAG. As três últimas classes correspondem a plantas com alterações que começam a aparecer entre 20-30 DAG, correspondendo, portanto, a alterações de desenvolvimento tardio. A descrição das mudanças fenotípicas apresentadas por esta construção, assim como as frequências com que são observadas em transformantes T0, estão apresentadas na Tabela V.

A primeira classe de modificações fenotípicas (classe I, Tabela V) inclui 10% dos transformantes (25/250) e está relacionada a alterações que geram letalidade. A seleção baseada na fluorescência de GFP na semente permite recuperar diversas mudanças fenotípicas que são perdidas durante a seleção com kanamicina, entre elas, alterações letais. Dentro desta classe estão agrupadas sementes que não germinam, plantas com profundos problemas de desenvolvimento, que geralmente apresentam cotilédones aiformes, não chegando a desenvolver o primeiro par de folhas (Figuras 20 A e 20 B) ou que apresentam sintomas de senescência precoce antes mesmo que o desenvolvimento do primeiro ou segundo par de folhas seja iniciado (Figura 20 C).

A segunda classe (classe II, Tabela V, frequência: 4% - 10/250) relaciona-se a transformantes para os quais um grave atraso de crescimento e desenvolvimento pode ser observado. Estas plantas são atrofiadas e a grande maioria não chega a florescer. Há exemplares que parecem apresentar um bloqueio na atividade meristemática, pois não chegam a desenvolver o terceiro par de folhas, permanecendo estagnados nesta fase do desenvolvimento até 50-60 DAG (Figura 20 D).

Tabela V. Classes de alterações fenotípicas apresentadas por plantas T0 provenientes de transformação com 35S-VP16-bZIP.

Classe	Tipo de alteração	Características específicas	Frequência (%) (n=250)	Início
I	Letalidade	–	10% (25)	1-10DAG
II	Atraso de desenvolvimento	–	4% (10)	5-10 DAG
III	Desenvolvimento de cotilédones	<u>Subclasse A</u> ➤ Cotilédones com invaginação <u>Subclasse B</u> ➤ Cotilédones com protusão na ponta distal <u>Subclasse C</u> ➤ Cotilédones alongados e epinásticos <u>Subclasse D</u> ➤ Cotilédones aformes	16% (40)	3-7DAG
IV	Desenvolvimento foliar e/ou fisiologia	<u>Subclasse A</u> ➤ Folhas recortadas (*) <u>Subclasse B</u> ➤ Folhas alongadas (*) <u>Subclasse C</u> ➤ Folhas retorcidas (*) <u>Subclasse D</u> ➤ Folhas radializadas (*)	33% (83)	7-10 DAG
V	Desenvolvimento	Dois ou mais meristemas apicais	~1% (3)	5-7 DAG
VI	Desenvolvimento da raiz	Plantas sem raiz	~1.5% (4)	1-3 DAG
VII	Desenvolvimento foliar e fisiologia	➤ Folhas alongadas, recortadas, aformes ou semelhantes a primórdios foliares, involutas, epinásticas e retorcidas ➤ Permanência em estado vegetativo ➤ Sintomas de senescência e necrose ➤ Acúmulo generalizado de compostos fenólicos em folhas	~2.5% (6)	10-20DAG
VIII	Desenvolvimento	➤ Folhas e cotilédones epinásticos ➤ Transição incompleta para estágio reprodutivo, senescência e esterilidade	34% (85)	20-30 DAG
IX	Desenvolvimento da haste floral	Hastes florais sem sustentação	26% (65)	20-30DAG
X	Desenvolvimento	Dominância apical reduzida	14% (35)	20-30 DAG

Em cinza claro aparecem as alterações fenotípicas presentes somente para transformantes de 35S-VP16-bZIP. Em cinza escuro estão representadas as classes de modificações fenotípicas presentes tanto em transformantes expressando 35S-VP16-bZIP quanto ProbZIP9-VP16-bZIP. A classe de mudanças fenotípicas hachurada representa modificações presentes em transformantes para as três versões ativadoras constitutivas de *AtbZIP9*. As porcentagens das várias classes envolvem plantas que podem apresentar alterações correspondentes a mais de uma classe. (*) Alguns exemplares também apresentaram sintomas de senescência e/ou necrose e/ou presença de compostos fenólicos.

A terceira classe (classe III, Tabela V, frequência: 16% - 40/250) refere-se a indivíduos que apresentam cotilédones alterados morfológicamente, sendo observados transformantes com cotilédones em formato de rim, com uma invaginação (Figura 20 E), com uma pequena protusão em sua ponta distal (Figura 20 F), alongados e curvados para baixo (Figura 20 G) ou aiformes (Figura 20 H).

A quarta classe (classe IV, Tabela V, frequência: 33% - 83/310) engloba plantas com folhas alteradas morfológicamente, sendo identificadas folhas recortadas alongadas ou não, folhas alongadas e parcialmente deformadas (Figura 20 I), podendo em alguns casos serem involutas ou revolutas (Figura 20 J), epinásticas e retorcidas (Figura 20 K), folhas retorcidas e folhas radializadas (Figura 20 L). Muitos indivíduos apresentam folhas pertencentes aos vários tipos de alterações de morfologia foliar descritos para esta classe IV de alterações. Cerca de 80% dos indivíduos com alterações de morfologia do cotilédone também apresentam folhas anormais.

Associados a estas alterações de morfologia foliar da classe IV outras mudanças importantes no desenvolvimento podem ocorrer, como plantas com mais de um meristema apical do caule (um, dois ou três meristemas apicais; classe V, Tabela V, frequência: ~1% (3/259); Figura 20 M), plantas sem raiz (classe VI, Tabela V, frequência: ~1.5%, 4/250; dado não mostrado) e plantas que permanecem por tempo indefinido em estado vegetativo (classe VII, Tabela V, frequência: ~2.5%, 6/250), semelhantes as encontradas em plantas T0 para ProbZIP9-VP16-cDNA e ProbZIP9-VP16-bZIP, representando a quinta, sexta e sétima classes de alterações fenotípicas, respectivamente. A oitava classe (classe VIII, Tabela V, frequência: 34%, 85/250) corresponde a plantas pequenas, de desenvolvimento lento, com folhas e cotilédones epinásticos, mas não alterados morfológicamente, transição incompleta para o estágio

reprodutivo (estéreis) e sintomas de senescência precoce (Figura 20 N). Eventualmente, algumas destas plantas conseguem florescer, mas o número de sementes gerado é pequeno, em torno de 10-15 sementes por planta (Figura 20 O). Por último, as classes IX e X (Tabela V), relacionadas a fenótipos de desenvolvimento tardio, englobam plantas com hastes florais sem sustentação (frequência: 26%, 65/250) como as da classe IV das plantas T0 para ProbZIP9-VP16-bZIP (Tabela IV) e plantas com dominância apical reduzida (frequência: 14%, 35/250; Figura 20 P), respectivamente.

Possivelmente, a grande diversidade de alterações fenotípicas apresentadas por transformantes T0 para 35S-VP16-bZIP esteja principalmente relacionada a combinação da atividade ubiquitária do promotor 35S do CaMV, pois este promotor está ativo em vários tecidos e estágios de desenvolvimento (Benfey *et al.*, 1989) com a diversidade de níveis de expressão decorrente do sítio de inserção no genoma. Provavelmente, o conjunto de genes alvos desregulados pela expressão deste ativador seja maior do que o apresentado pelas duas outras versões ativadoras de *AtbZIP9*. Além disso, para esta construção não deve ser descartada a possibilidade de certos fenótipos serem resultantes de efeitos não específicos consequentes de “seqüestro” pelo domínio VP16 de proteínas da maquinaria basal de transcrição presentes em concentrações limitantes na célula (*transcriptional squelching*; Ptashne, 1988).

Em transformantes (T0) para as três versões ativadoras nenhuma alteração fenotípica visível do sistema radicular foi notada, com exceção das plantas sem raiz para a construção 35S-VP16-bZIP. Um resumo destas alterações de fenótipo induzidas por cada uma das 3 variantes ativadoras de *AtbZIP9*, assim como a sobreposição destas modificações entre as construções estão apresentados na Tabela VI e na Figura 21.

CONTROLE SELVAGEM

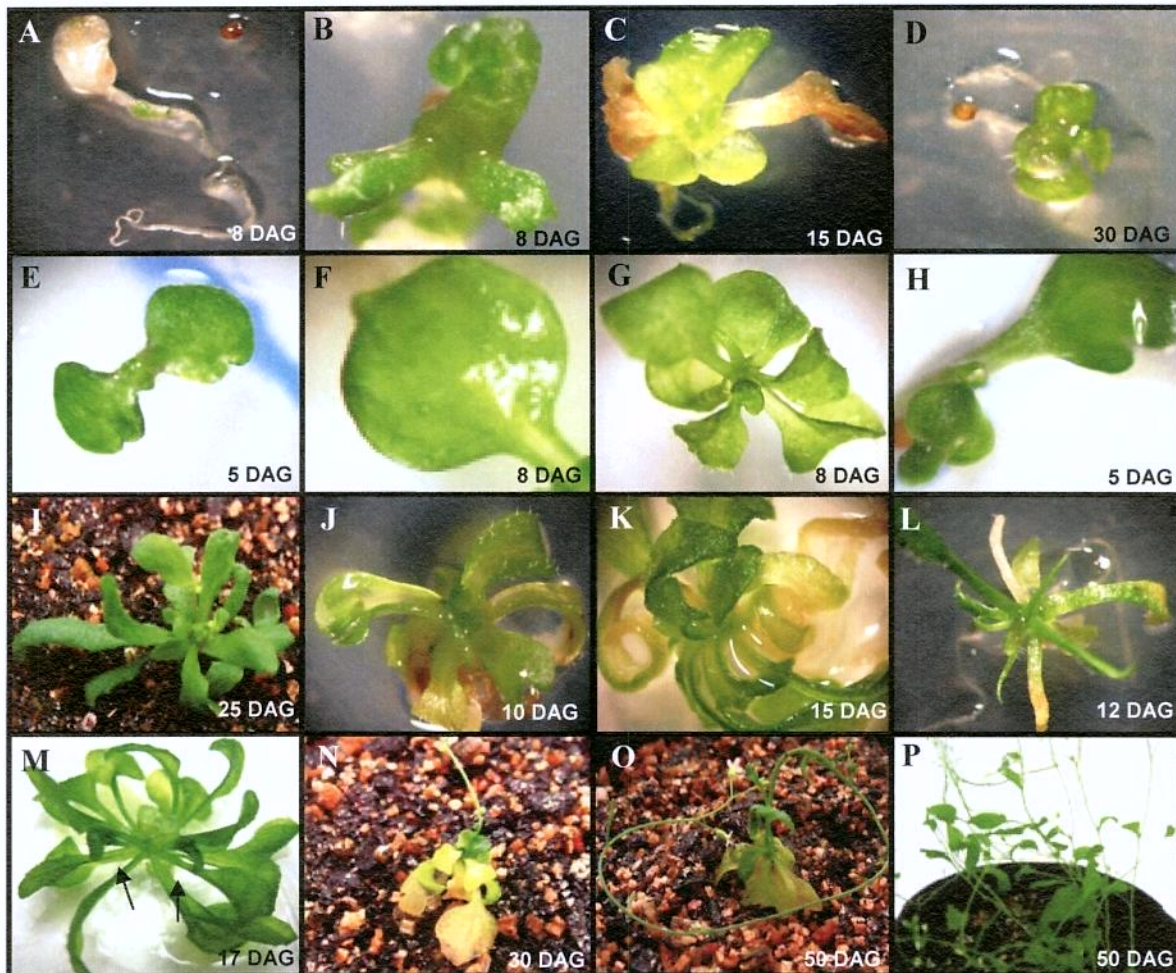


Figura 20. Alterações fenotípicas apresentadas por transformantes primários para 35S-VP16-bZIP. **A-C.** Plantas com profundos problemas de desenvolvimento e letalidade **B.** Cotilédones aformes **C.** Planta com sintomas de senescência precoce antes mesmo que o desenvolvimento do primeiro ou segundo par de folhas seja iniciado **D.** Plantas atrofiadas com grave atraso de desenvolvimento **E-G.** Alteração da morfologia do cotilédone **E.** Invaginação **F.** Protusão na ponta distal **G.** Alongado e epinástico **H.** Aforme **I-L.** Alterações da morfologia da folha **I.** Alongadas e parcialmente deformadas **J.** Alongadas, involutas ou revolutas **K.** Epinásticas e retorcidas **L.** Radializadas **M.** Dois meristemas apicais **N.** Plantas pequenas com cotilédones e folhas epinásticos, transição incompleta para o estágio reprodutivo (estéreis), crescimento lento e senescência precoce. Em alguns casos estas plantas podem chegar a florescer (**O**) **P.** Dominância apical reduzida.

Tabela VI. Resumo das alterações fenotípicas apresentados por transformantes primários (T0) expressando ProbZIP9-VP16-bZIP (1), ProbZIP9-VP16-cDNA (2) e 35S-VP16-bZIP (3).

Alterações fenotípicas	(1)	(2)	(3)	E (1)	E (2)	E (3)	E (1) (2)	E (1) (3)	E (2) (3)	(1) (2) (3)
Fenótipo letal										
Atraso de crescimento e desenvolvimento										
Alterações gerais da morfologia do cotilédono										
Alterações gerais da morfologia foliar e/ou fisiologia										
Alterações da morfologia foliar e fisiologia (Folhas alongadas e involutas)										
Alterações da morfologia foliar e fisiologia (Permanência em estado vegetativo)										
Dois ou mais meristemas apicais										
Ausência de raiz										
Folhas e cotilédones epinásticos, senescência e esterelidade										
Hastes florais sem sustentação										
Dominância apical reduzida										

E(1), E(2), E(3), alterações fenotípicas exclusivas para (1), (2) e (3), respectivamente. E(1)(2), alterações presentes somente em transformantes para (1) e (2); E(1)(3), modificações particulares de transformantes para (1) e (3); E(2)(3), mudanças encontradas somente em transformantes para (2) e (3).

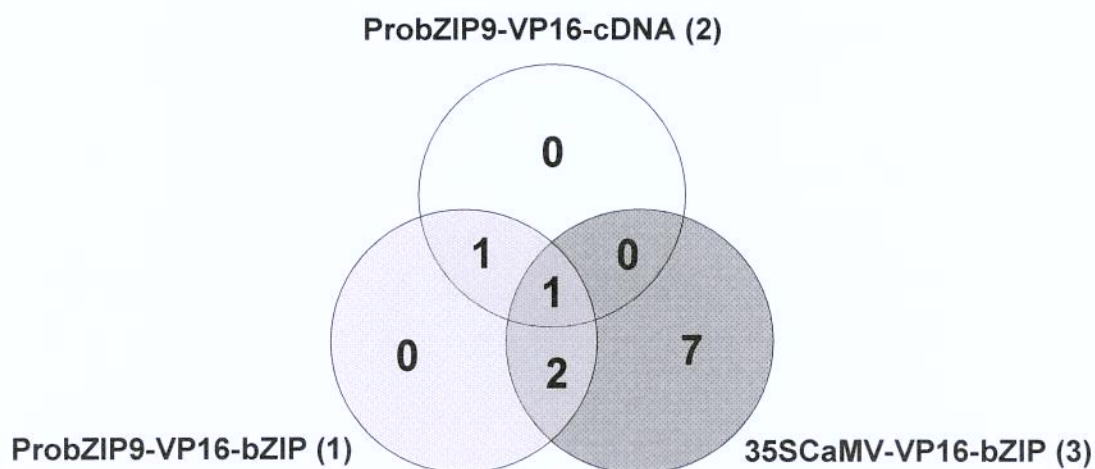


Figura 21. Diagrama de Venn representando a distribuição e sobreposição das alterações fenotípicas apresentadas por plantas T0 transgênicas para ProbZIP9-VP16-cDNA, ProbZIP9-VP16-bZIP e 35S-VP16-bZIP. Este diagrama foi baseado no número de alterações fenotípicas para cada construção representada na Tabela VI. Os números das construções presentes na tabela VI estão indicados entre parênteses.

Dentre as três construções analisadas, ProbZIP9-VP16-cDNA representa a variante de *AtbZIP9* mais aparentada ao alelo selvagem, por incluir tanto a sequência promotora nativa deste gene quanto sua sequência codificante completa, sendo, portanto, provavelmente responsivo ao mesmo conjunto de regulações que atuam sobre o alelo selvagem. Plantas transgênicas para esta construção apresentam um menor número de alterações fenotípicas quando comparadas a plantas transgênicas para ProbZIP9-VP16-bZIP e 35S-VP16-bZIP (2 tipos de alterações para ProbZIP9-VP16-cDNA contra 4 para ProbZIP9-VP16-bZIP e 10 para 35S-VP16-bZIP, Figura 21). Além disso, todas as modificações relacionadas ao gene quimérico desta construção foram também detectadas em plantas transgênicas para uma ou para as outras duas construções, não existindo, portanto, alterações exclusivamente induzidas por esta variante ativadora (Figura 21).

Diante destes resultados e considerações, resolvemos selecionar para uma análise mais detalhada as duas classes de alterações de morfologia foliar e fisiologia presentes em transformantes para ProbZIP9-VP16-cDNA, ou seja, plantas que possuem como principal característica o fenótipo de folhas alongadas e involutas e permanência em estado vegetativo, designadas como alterações de classe I e II, respectivamente (Tabela III). Uma vez que a classe II de alterações está presente em transformantes T0 para as três versões ativadoras de *AtbZIP9* e em frequência mais elevada em ProbZIP9-VP16-cDNA (50% em ProbZIP9-VP16-cDNA contra ~7% em ProbZIP9-VP16-bZIP e ~2.5% em 35S-VP16-bZIP) inferimos que esta classe de alterações possivelmente represente o material genético mais relevante para o estudo funcional de *AtbZIP9*.

3. As alterações fenotípicas induzidas pelas versões ativadoras de *AtbZIP9* são específicas

Para descartar a possibilidade das classes fenotípicas observados estarem relacionadas a efeitos não específicos consequentes de “seqüestro” pelo domínio VP16 de proteínas da maquinaria basal de transcrição presentes em concentrações limitantes na célula (*transcriptional squelching*; Ptashne, 1988) analisamos plantas expressando apenas o domínio VP16 do vírus da herpes. Plantas mutante *knockout atbZIP9-1* foram, portanto, transformadas com o vetor de transformação de plantas PFP101HAVP16, que expressa de maneira ectópica e constitutiva, através do promotor 35S do CaMV, a fusão

HA-VP16. Aproximadamente 100 transformantes primários para esta fusão foram analisados, sendo que nenhuma das alterações fenotípicas presentes em transformantes primários para as versões ativadoras de transcrição de *AtbZIP9* foram observadas, eliminando assim, a possibilidade de qualquer efeito não específico do domínio VP16, principalmente relacionado a *schelching* transcricional. Estes dados estão de acordo com os apresentados por Heinekamp *et al.*, 2004. Diante destas observações, concluímos que as mudanças fenotípicas observadas em transformantes primários estão relacionadas à expressão das variantes ativadoras de transcrição de *AtbZIP9*.

4. Estabelecimento e análise de linhagens transgênicas F2 homozigóticas

Transformantes primários (T0) para as três variantes ativadoras de *AtbZIP9*, apresentando alterações fenotípicas ou não, foram transferidos para vasos contendo terra e autofecundados para obtenção de sementes F1. No entanto, a grande maioria das plantas transgênicas com alteração de fenótipo para ProbZIP9-VP16-bZIP e ProbZIP9-VP16-cDNA, como mencionado acima, são letais. Desta maneira, todas as populações F1 obtidas para estas duas construções foram provenientes de autofecundação de plantas T0 sem alteração fenotípica ou com modificações fenotípicas atenuadas ou sutis. Apesar de terem sido obtidas descendência F1 de 102 plantas T0 para ProbZIP9-VP16-bZIP e 320 plantas T0 para 35S-VP16-bZIP, priorizamos a análise de transformantes para ProbZIP9-VP16-cDNA, construção mais apropriada para a análise dos reais efeitos da superexpressão dos alvos de *AtbZIP9*. Populações F1 em que se verificou a ocorrência de um locus do transgene (segregação 3/1 de resistência a kanamicina versus sensibilidade, respectivamente), foram transferidas para terra para obtenção da geração F2 resultante de autofecundação. Plantas F1 homozigóticas foram identificadas a partir do padrão de segregação de populações F2 segregantes. A tabela VII apresenta um resumo das etapas de seleção desenvolvidas para transformantes das três construções. A análise de linhagens F2 estabelecidas e homozigóticas para um locus do transgene será descrita em detalhe no Capítulo II.

Tabela VII. Etapas de seleção e análise de transformantes para (1) ProbZIP9-VP16-bZIP, (2) ProbZIP9-VP16-cDNA e (3) 35S-VP16-bZIP

	1	2	3
Transformantes primários (T0) analisados	310	380	780
Total de populações F1 obtidas	102	59	320
Total de populações F1 analisadas	56	59	-
Populações F1 com um <i>locus</i> do transgene	39	40	-
Populações F1 com um <i>locus</i> do transgene e alteração fenotípica	0	1	-
Total de populações F2 obtidas	35	37	-
Total de populações F2 analisadas	-	37	-
Populações F2 homozigóticas para um <i>locus</i> do transgene	-	16	-
Populações F2 homozigóticas para um <i>locus</i> e que apresentam alteração fenotípica	-	0	-
Populações F2 com um <i>locus</i> do transgene e alteração fenotípica	-	0	-

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo II

Análise detalhada de transformantes para ProbZIP9-VP16-cDNA

Para dar continuidade a análise funcional de *AtbZIP9* analisamos de maneira mais detalhada as plantas transgênicas para a construção ProbZIP9-VP16-cDNA (mRNA *VP16-AtbZIP9* e proteína de fusão VP16-AtbZIP9). Por representar a construção a mais aparentada ao alelo selvagem é provável que ela reflita melhor as consequências da superexpressão dos genes alvos de *AtbZIP9*.

Em seguida apresentamos, primeiramente, uma descrição e interpretação minuciosa dos transformantes T0 representativos das duas classes de alterações fenotípicas (Tabela III) induzidas pela fusão VP16-AtbZIP9 e, em segundo lugar, descrevemos uma análise detalhada de linhagens homozigóticas F2 para um locus de ProbZIP9-VP16-cDNA.

Os dados referentes a caracterização fenotípica de transformantes para ProbZIP9-VP16-cDNA, assim como a análise detalhada das alterações fenotípicas induzidas por esta versão ativadora de *AtbZIP9* (descritas neste capítulo) foram recentemente aceitos para publicação na Revista *Plant Science* (ver artigo em anexo – ANEXO I)

1. Análise detalhada de transformantes primários T0

1.1 Ensaios de expressão gênica revelaram a presença do transgene em transformantes primários

Para verificar a expressão do transgene nas plantas T0, amostras de RNA total extraído de 20 plantas T0 com 30 dias de idade e representativas das classes I (folhas alongadas e involutas, Tabela III) e II (permanência em estado vegetativo, Tabela III) foram submetidas a RT-PCR semi-quantitativa. Os resultados mostram que o RNA referente a fusão *VP16-AtbZIP9* está expresso em plantas T0 (Figura 22). Entretanto, não foi possível estabelecer uma correlação entre estas classes fenotípicas observadas e o nível de expressão do transgene, uma vez que encontramos dificuldades em analisar a expressão de genes *housekeeping* como *Actina* e *Adenosina fosforibosil transferase* (*Apt1*) que servem de controle de padronização interna da quantidade de cDNA utilizado nas reações de PCR (Figura 22). Mais ciclos de amplificação do que os normalmente necessários para plantas selvagens foram imprescindíveis para detecção destes transcritos controle em plantas T0. Esta falha na detecção destes transcritos dos genes controles é intrigante e possivelmente seja reflexo de mudanças fisiológicas drásticas ocorridas nestes mutantes.

Como uma forma de complementar as análises de expressão desenvolvidas em transformantes T0, comparamos também o nível de expressão do mRNA da fusão *VP16-AtbZIP9* em 5 populações F1 provenientes de autofecundação de transformantes T0 que não apresentavam alteração fenotípica. Destas 5 populações, 4 não apresentavam modificações de fenótipo (F1 - 1, 2, 3 e 4), enquanto uma (F1 - 5) segregava para plantas com fenótipo normal e plantas com fenótipo de classe I (folhas alongadas e involutas; Tabela III). Esta população F1-5 era composta de plantas estéreis que conseqüentemente não puderam ser propagadas. O nível de expressão do mRNA *VP16-AtbZIP9* em plantas F1-5 com ou sem alteração fenotípica e nas 4 outras populações F1 foi avaliado por RT-PCR semi-quantitativa, sendo comparado ao nível de mRNA de *AtbZIP9* no tipo selvagem (Figura 23). Os resultados indicam um alto nível de expressão do mRNA da fusão *VP16-AtbZIP9* nas duas amostras de plantas F1-5 (com e sem alteração de fenótipo) com relação ao apresentado pelas outras populações F1 e ao tipo selvagem (Figura 23 A).

Adicionalmente, para esta população F1-5 verificamos que existe uma correlação positiva entre o nível de expressão e a presença de alterações fenotípicas (Figura 23 B). Baseado nestas informações, podemos inferir que a indução de alterações fenotípicas em transformantes está associada a um elevado nível de expressão do transgene. Desta maneira, sugerimos que nesta população F1-5 segregante (padrão de segregação 3:1 de resistência/sensibilidade a kanamicina, respectivamente), indivíduos com alteração fenotípica provavelmente representam a fração 1/3 homozigota para o transgene, enquanto os indivíduos sem alteração fenotípica representam a fração 2/3 heterozigota. Paralelamente, para esta população com elevado nível de expressão do mRNA *VP16-AtbZIP9* foi possível detectar a proteína recombinante correspondente *VP16-AtbZIP9* (Figura 23 C) indicando que a construção está funcional *in vivo*.

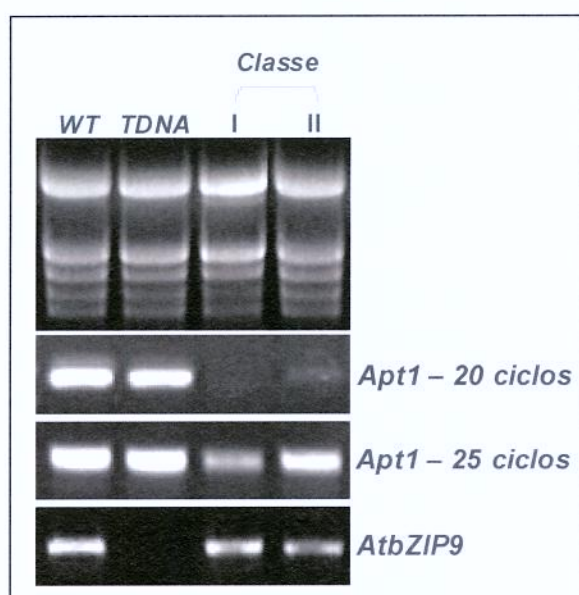


Figura 22. Análises de expressão por RT-PCR semi-quantitativa de RNA de 20 plantas T0 transgênicas para ProbZIP9-VP16-cDNA apresentando alterações representativas das classes I e II (Tabela III). Amostras foram coletadas 30 dias após a germinação. *Apt1*, controle interno de padronização da quantidade de cDNA na reação. WT, controle selvagem; TDNA, alelo nulo *atbzip9-1*. O mRNA de *AtbZIP9* assim como o mRNA da fusão *VP16-AtbZIP9* foram detectados utilizando-se primers que amplificam a sequência codificante completa deste gene. O número de ciclos de amplificação utilizado nas reações de PCR para *Apt 1* está indicado na figura.

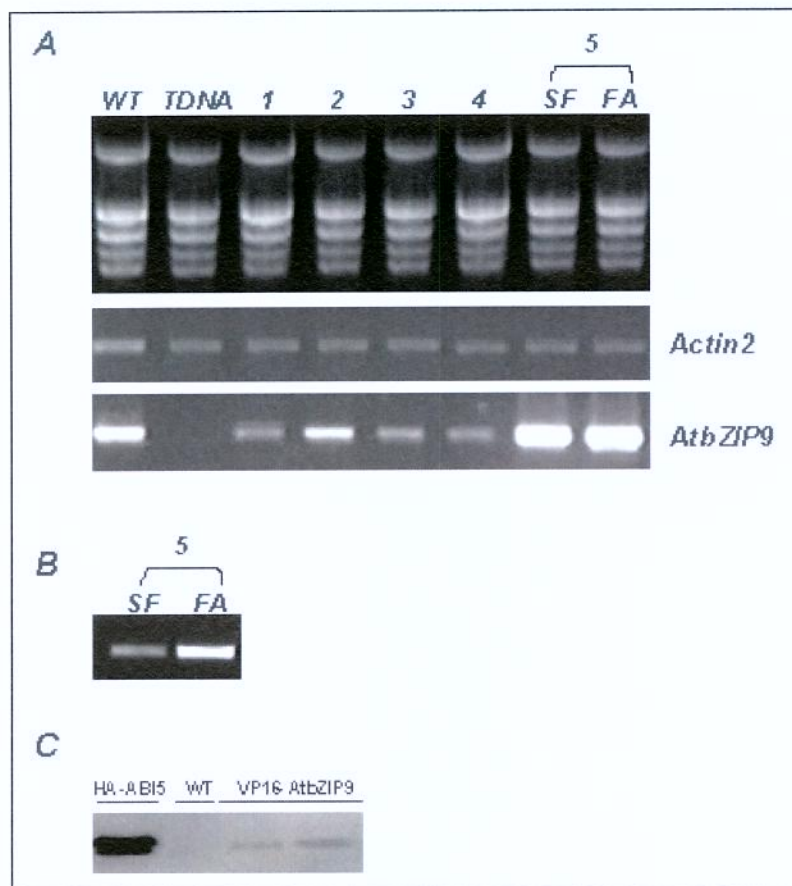


Figura 23. Análise de expressão gênica de populações F1 transgênicas para ProbZIP9-VP16-cDNA, provenientes de autofecundação de transformantes T0 que não apresentam alterações fenotípicas. **A e B.** RT-PCR semi-quantitativa. WT, controle selvagem; TDNA, alelo nulo *atbzip9-1*; 1, 2, 3 e 4, populações F1 com fenótipo semelhante ao selvagem; 5, população F1 que segrega para plantas normais (SF) e plantas com alteração fenotípica de classe I (FA, Tabela III). Para todas as populações analisadas indivíduos não transformados foram previamente eliminados através de seleção com kanamicina e as amostras coletadas após 22 dias de cultivo. *Actin2*, gene controle de padronização interna da quantidade de cDNA utilizado nas reações. A figura **A** mostra o nível de expressão do mRNA de *AtbZIP9* em plantas WT e da fusão *VP16-AtbZIP9* (*AtbZIP9*) em populações F1 utilizando-se 25 ciclos de amplificação. A figura **B** apresenta o nível de expressão do mRNA da fusão *VP16-AtbZIP9* na população 5 utilizando-se 20 ciclos de amplificação. **C.** Detecção da proteína recombinante VP16-AtbZIP9 através da técnica de Western blot. Uma linhagem transgênica expressando uma fusão entre o TAG da hemaglutinina (HA) e a sequência codificante de ABI5 (HA-ABI5; Besmihen *et al.*, 2004) foi usada como controle positivo da reação. Amostras selvagem (WT) e referentes a população 5 foram coletadas com 15 dias de idade, enquanto amostras HA-ABI5 foram coletadas com 2 dias de idade. Proteínas de fusão foram detectadas utilizando-se anticorpo contra o TAG HA a partir de 20µg de extrato protéico total no caso de amostras HA-ABI5, 25µg (esquerda) e 30µg (direita), no caso de VP16-AtbZIP9. Os tamanhos esperados são de 51kDa para HA-ABI5 e 46kDa para VP16-AtbZIP9.

1.2 A proteína ativadora constitutiva da transcrição VP16-AtbZIP9 promove alterações da estrutura do sistema vascular

As alterações fenotípicas apresentadas por transformantes primários para a versão ativadora de transcrição de *AtbZIP9* ProbZIP9-VP16-cDNA indicam um possível papel deste gene no controle do desenvolvimento das folhas e/ou fisiologia da planta e possivelmente na regulação da atividade meristemática (Tabela III).

Em uma primeira hipótese para explicar estes dados sugerimos que o ativador constitutivo ProbZIP9-VP16-cDNA seria capaz de interagir com genes chaves reguladores da atividade do meristema apical do caule relacionados, diretamente ou não, ao desenvolvimento foliar como, por exemplo, KNAT-1 (Chuck *et al.*, 1996), CLV (CLAVATA) e WUS (WUSCHELL) (Schoof *et al.*, 2000), STM (SHOOTMERISTEMLESS) (Long *et al.*, 1996), DRN (DORN RÖSCHEN)/ESR1 (ENHANCER OF SHOOT REGENERATION) (Kirch *et al.*, 2003), PNH (PINHEAD) (Newman *et al.*, 2002), PHAB (PHABULOSA)/PHAV (PHAVOLUTA) (McConnell *et al.*, 2001), AS1 (ASYMETRIC LEAVES 1) (Byrne *et al.*, 2000) entre outros. Presumimos que, se esta hipótese fosse correta, *AtbZIP9* também deveria estar expresso no meristema apical do caule e primórdios foliares. Conseqüentemente, cortes histológicos de meristemas de plantas pertencentes a uma linhagem homozigótica para um locus de uma fusão entre a seqüência promotora de *AtbZIP9* e o gene repórter *GusA* (ProbZIP9-*Gus*) foram realizados após detecção *in situ* da atividade de *Gus*. A atividade *Gus* não foi detectada no meristema apical do caule, estando presente somente no sistema vascular de primórdios foliares em diversos estágios de diferenciação (Figura 24), indicando que este gene não atua diretamente no meristema apical. Entretanto, não podemos excluir a possibilidade de que seu mRNA ou sua proteína sejam transportados para a zona meristemática.

Alternativamente, considerando a expressão específica de *AtbZIP9* no floema e procâmbio do floema de todos os órgãos e em todos os estágios de desenvolvimento, sugerimos que a expressão da proteína de fusão VP16-*AtbZIP9* pudesse alterar a estrutura e/ou a funcionalidade do floema, resultando de maneira indireta em mudanças do desenvolvimento foliar. Dentro deste contexto, o transporte polar de auxina que é essencial na determinação da forma da folha e na diferenciação do sistema vascular (Dengler & Kang, 2001; Avsian-Kretchmer *et al.*, 2002; Aloni *et al.*, 2003), poderia ter sido

alterado em consequência de modificações do sistema vascular. Da mesma maneira, alterações do transporte de nutrientes necessários ao crescimento e desenvolvimento da planta poderiam induzir as alterações foliares observadas (Lalonde *et al.*, 2003).

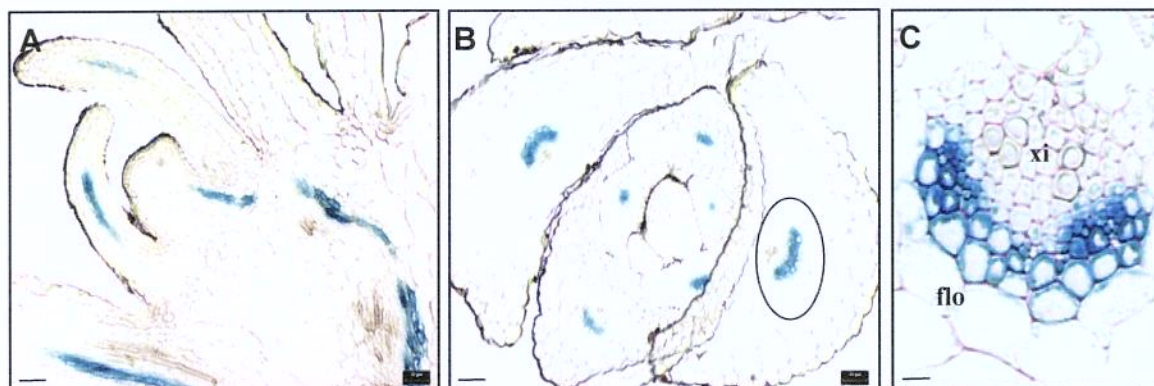


Figura 24. Cortes histológicos de meristemas de plantas expressando o gene repórter *GusA* sob controle da sequência promotora do gene *AtbZIP9*, após detecção *in situ* da atividade de *Gus*. **A.** Corte longitudinal do meristema evidenciando a expressão do gene no sistema vascular **B.** Corte transversal mostrando expressão do gene marcador no sistema vascular de primórdios foliares em diversos estágios de desenvolvimento. **C.** Ampliação da área circulada em B, indicando a expressão de *AtbZIP9* nos feixes de floema. flo, floema xi, xilema. Barras de escala (canto inferior esquerdo): A e B, 35 μ M; C, 15 μ M.

Para avaliar a eventualidade de uma alteração do desenvolvimento do floema por VP16-AtbZIP9, realizamos uma análise comparativa da anatomia do sistema vascular de raízes e folhas das plantas T0 das duas classes fenotípicas I e II (Tabela III) e do controle selvagem. Os cortes histológicos revelam que nas duas classes de plantas T0, o posicionamento relativo do xilema e floema não foi alterado, sendo encontrada uma organização diarca e abaxial-adaxial em raízes e folhas, respectivamente (Figuras 25 e 26). Os feixes de xilema foram facilmente visualizados, entretanto, encontramos dificuldades em identificar as células do floema em raízes e folhas de plantas T0 pertencentes as duas classes de modificações (Figuras 25 e 26), possivelmente refletindo uma alteração da formação e/ou diferenciação deste tecido. No cilindro vascular da raiz, a morfologia celular foi alterada e a disposição das células, desarranjada, indicando possíveis mudanças no padrão de divisão celular e na formação da parede (Figura 25). As alterações de morfologia das células vasculares da raiz aparecem de uma maneira

mais acentuada em transformantes de classe II. Células vasculares da raiz destes transformantes apresentam-se visivelmente deformadas e com núcleos periféricos, principalmente na região do floema (Figura 25 C). Aparentemente todo tecido derivado do procâmbio parece ter sido afetado durante o desenvolvimento.

Estes dados sugerem fortemente que a ativação dos genes alvos de *AtbZIP9* pela fusão VP16-AtbZIP9 é capaz de induzir defeitos no desenvolvimento e/ou diferenciação do sistema vascular, principalmente das células do floema, afetando, conseqüentemente, sua funcionalidade. Nossa inabilidade em cultivar transformantes primários das classes I e II em terra, sendo somente possível a manutenção destas plantas *in vitro* em meio de cultura rico suplementado com sacarose, pode ser explicada por esta possível disfunção em células do floema.

Em conclusão, suspeitamos que as alterações de desenvolvimento foliar observadas nas plantas T0 possam representar uma conseqüência de modificações nas propriedades funcionais do sistema vascular da planta, uma vez que o transporte de longa distancia através dos feixes condutores, tanto de nutrientes, quanto de hormônios, proteínas, peptídeos sinalizadores, lipídeos, mRNAs e si/miRNAs desempenha um papel importantíssimo na regulação do desenvolvimento da planta (Lough & Lucas, 2006).

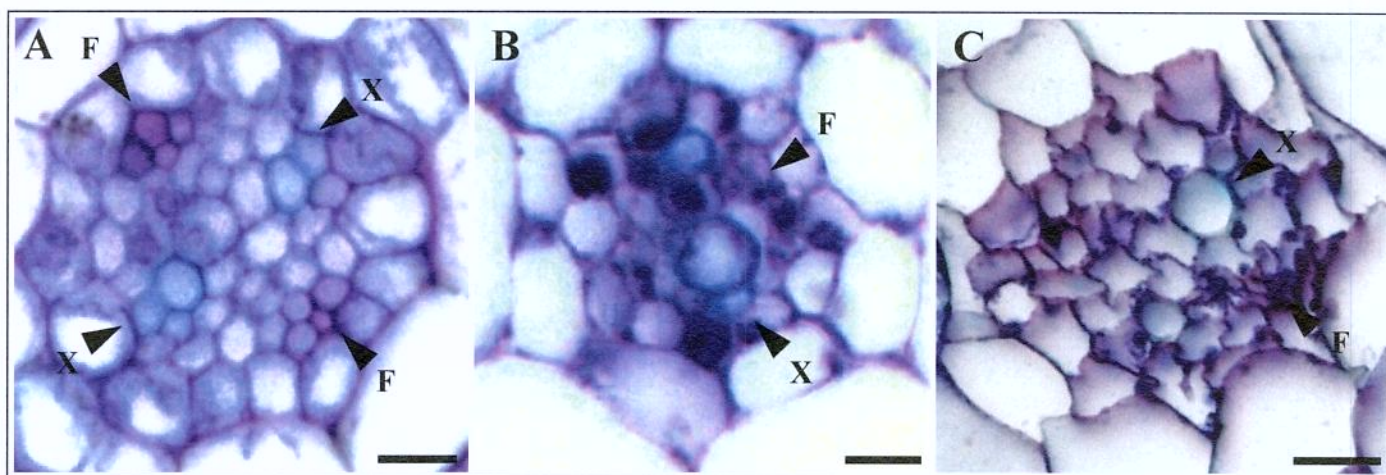


Figura 25. Análise comparativa da anatomia do cilindro vascular de raízes de plantas selvagens e de transformantes primários para ProbZIP9-VP16-cDNA apresentando alterações fenotípicas de classe I e II (Tabela III) **A.** Planta selvagem **B.** Transformante de classe I **C.** Transformante de classe II. Células do floema são dificilmente visualizadas e sua possível localização está indicada. X, xilema; F, floema. Barras de escala: A e B, 10 μ M; C, 30 μ M.

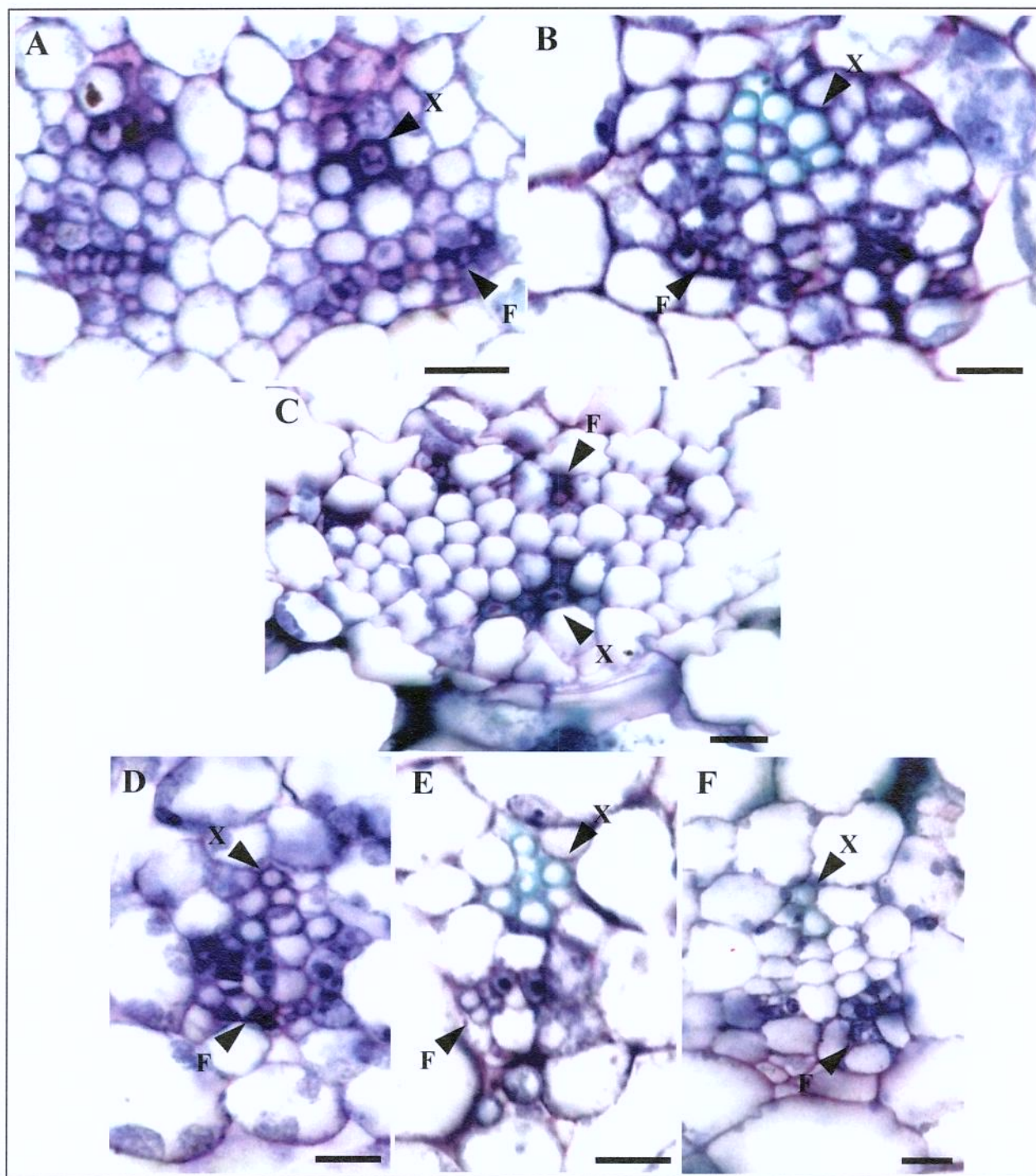


Figura 26. Análise comparativa da anatomia de folhas de plantas selvagens e de transformantes primários para ProbZIP9-VP16-cDNA apresentando alterações fenotípicas de classe I e II (Tabela III). **A - C.** Detalhe do feixe vascular principal. **D-F.** Detalhe de feixe vascular secundário do mesofilo. **A e D.** Planta selvagem; **B e E.** Transformante T0 de classe I; **C e F.** Transformante T0 de classe II. X, xilema; F, floema. Barras de escala: 30μM.

Adicionalmente, cortes do feixe vascular principal e feixe vascular secundário do mesofilo indicam um aumento do número de células parenquimáticas entre o xilema e o floema de transformantes de classe II (Figura 26 A e C; D e F), sugerindo problemas na programação da diferenciação do sistema vascular. Exclusivamente para esta classe de transformantes também foi observado constante acúmulo intra e intercelular de compostos fenólicos, na forma de grânulos densos, principalmente nas células do mesofilo foliar (Figura 27 C e D). Permanece ainda para ser investigada a possível relação existente entre este acúmulo de compostos fenólicos em folhas, o processo de desenvolvimento do floema e a morfologia foliar. Sabe-se que a produção de compostos fenólicos está associada à resistência a estresses bióticos e abióticos (Siranidou *et al.*, 2002), a modulação da atividade de auxinas (Volpert *et al.*, 1995), além de servirem como moléculas sinalizadoras (Dixon *et al.*, 1995).

Finalizando, exclusivamente para transformantes de classe I, além das alterações de anatomia do sistema vascular citadas acima, foi observado um aumento nos espaços intercelulares do mesofilo foliar, acompanhado de hiperplasia de células parenquimáticas. Células parenquimáticas nestes transformantes apresentaram, aparentemente, paredes mais finas e frágeis do que o controle selvagem. Adicionalmente uma redução significativa na quantidade e no tamanho de cloroplastos foi observada, o que está de acordo com os sintomas de clorose e senescência observado em transformantes primários característicos desta classe I de alterações (Figura 27 A e B).

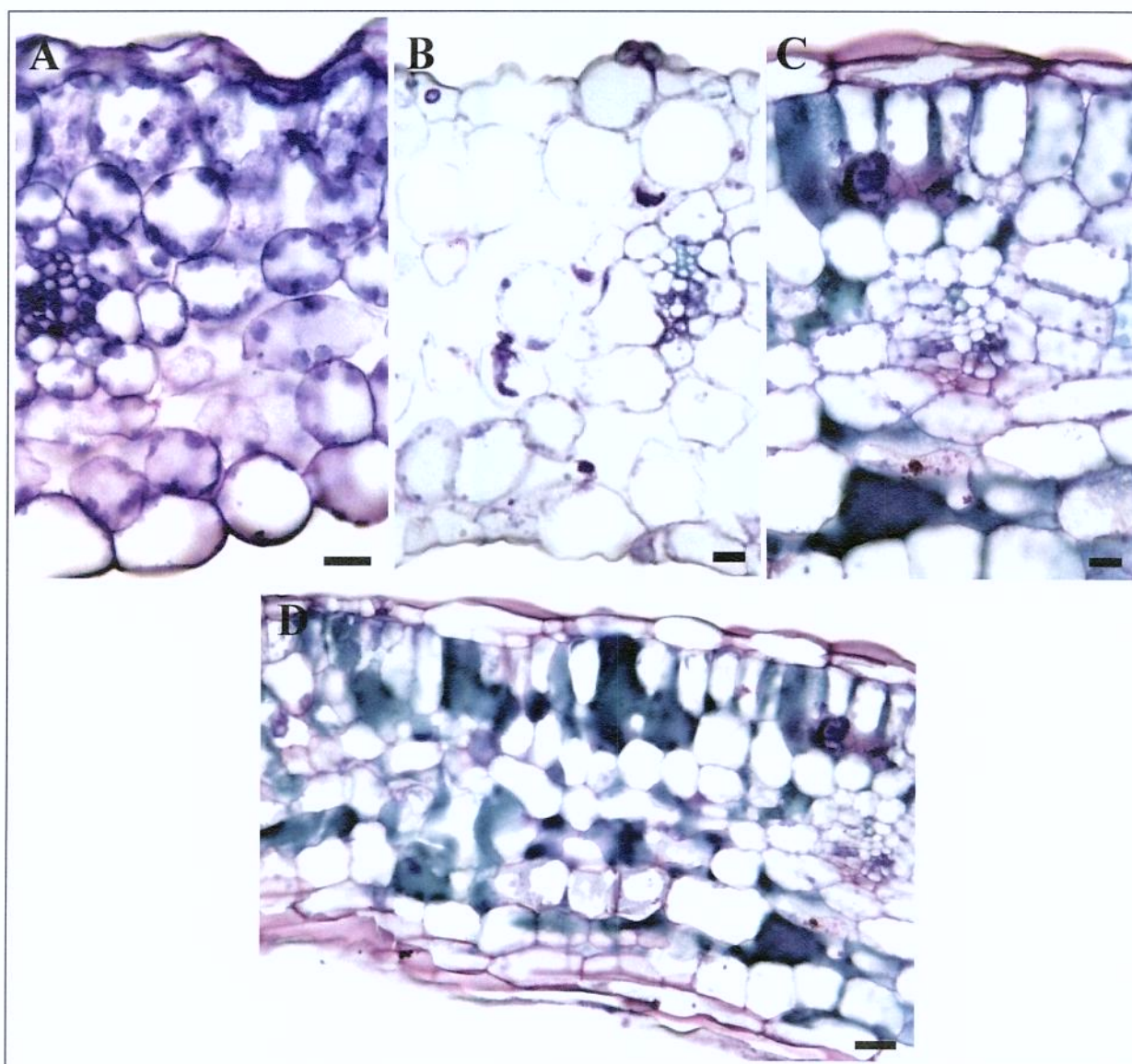


Figura 27. Análise comparativa da anatomia do mesofilo de folhas de plantas selvagens e de transformantes primários para ProbZIP9-VP16-cDNA apresentando alterações fenotípicas de classe I e II (Tabela III). **A.** Planta selvagem. **B.** Transformante de classe I apresentando redução na quantidade e tamanho de cloroplastos e aumento de espaços intercelulares, acompanhado de hiperplasia de células parenquimáticas. Células parenquimáticas apresentam paredes finas e frágeis. **C-D.** Transformante de classe II. **D.** Detalhe do acúmulo intracelular de compostos fenólicos, corados em verde com azul de toluidina. Barras de escala: A-C, 30 μ M; D, 80 μ M.

2. Obtenção e análise de linhagens homozigóticas F2 para um locus do transgene

Linhagens apresentando níveis variáveis de expressão do transgene ProbZIP9-VP16-cDNA representam um material genético importante para ampliar a avaliação funcional de *AtbZIP9*. Podemos, por exemplo, citar a possibilidade de utilização destas linhagens para validação dos genes alvos de *AtbZIP9* que serão identificados por micro-arranjos de DNA, além da oportunidade de iniciar estudos detalhados do desenvolvimento do floema e da fisiologia destes transformantes. Desta forma, estabelecemos e analisamos várias linhagens transgênicas homozigóticas para um locus do transgene ProbZIP9-VP16-cDNA.

2.1 Obtenção de linhagens expressando o ativador VP16-AtbZIP9

Transformantes primários (T0) para ProbZIP9-VP16-cDNA sem alterações fenotípicas e férteis foram propagados por autofecundação gerando populações F1 que também não apresentam alterações fenotípicas. De 59 T0 propagados, 40 originaram populações F1 que apresentam uma segregação 3/1 de resistência versus sensibilidade a kanamicina, respectivamente, sugerindo a existência de um locus do transgene. Das 40 populações F1 com um locus do transgene, 16 geraram linhagens F2 homozigóticas para um locus, através de autofecundação.

A expressão do transgene foi avaliada nestas 16 linhagens por RT-PCR semi-quantitativa. Os resultados mostram uma gama de expressão do mRNA *VP16-AtbZIP9* em linhagens homozigóticas, sendo o limite máximo de expressão equivalente ao nível do alelo selvagem (Figura 28). Nas 4 linhagens homozigóticas que apresentaram a maior quantidade de mRNA da fusão *VP16-AtbZIP9* (linhagens 2, 18, 28 e 50, Figura 28) também foi detectada a presença da proteína recombinante de 46kDa correspondente a fusão *VP16-AtbZIP9* (Figura 29). Estas 4 linhagens homozigotas, apesar de não apresentarem alterações fenotípicas, são linhagens estáveis que representam um excelente material genético para experimentos futuros.

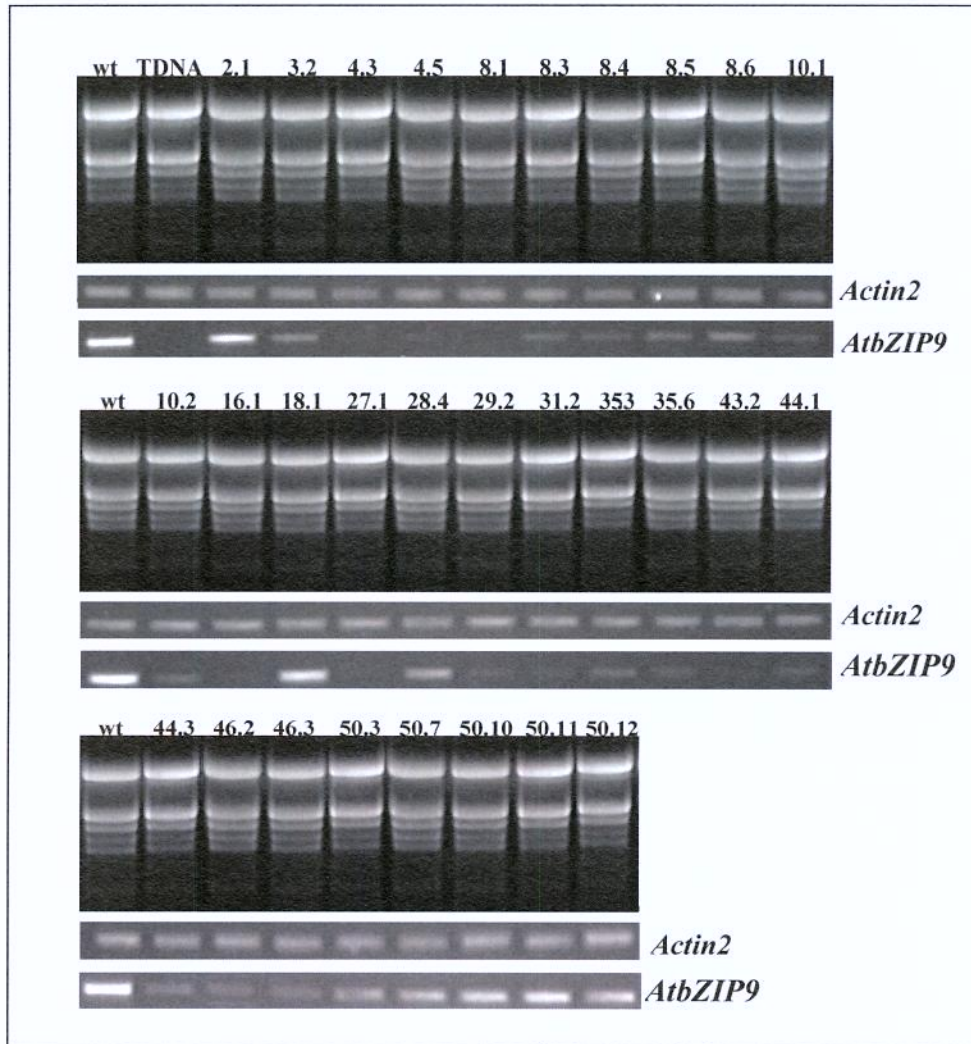


Figura 28. Análise de expressão por RT-PCR semi-quantitativa de linhagens F2 homozigotas para um locus do transgene de ProbZIP9-VP16-cDNA (linhagens 2, 3, 4, 8, 10, 16, 18, 27, 28, 29, 31, 35, 43, 44, 46, e 50) coletadas com 15 dias de idade. Números indicados após o ponto indicam diversas linhagens homozigóticas obtidas por autofecundação de diferentes plantas homozigotas de uma mesma população F1. *Actin2*, gene controle de padronização interna da quantidade de cDNA utilizada nas reações. WT, controle selvagem; TDNA, alelo *knockout* de *AtbZIP9* (*atbzip9-1*) por inserção de T-DNA.

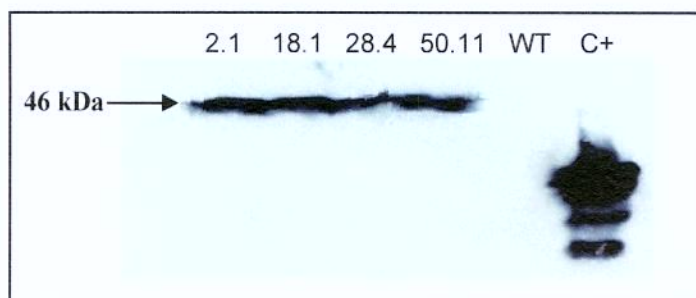


Figura 29. Detecção da proteína recombinante VP16-AtbZIP9 em linhagens transgênicas homozigotas para um locus do transgene ProbZIP9-VP16-cDNA (2.1, 18.1, 28.4 e 50.11) através da técnica de Western blot. Plantas foram coletadas com 15 dias de idade. WT, controle negativo, correspondente a plantas selvagens; C+, controle positivo da reação referente a expressão do TAG de hemaglutinina (HA) em células de *E.coli*. Proteínas de fusão foram detectadas utilizando-se anticorpo primário contra o TAG HA a partir de 80µg de extrato protéico total para as populações homozigóticas e 50ng de extrato bacteriano.

2.2 VP16-AtbZIP9 altera a expressão floema específica do regulador da transcrição do tipo DOF At2g28810

A fim de investigar mais detalhadamente as possíveis causas das alterações do floema observadas em transformantes T0, iniciamos análises comparativas de expressão gênica de genes marcadores do floema, em plantas selvagem, em 4 linhagens F2 homozigotas expressando de maneira significativa o mRNA *VP16-AtbZIP9* e a proteína VP16-AtbZIP9 (2, 18, 28, 50, Figuras 28 e 29) e em mais 4 linhagens F2 homozigóticas com níveis baixos de expressão do mRNA *VP16-AtbZIP9* (3, 4, 8, 46, Figura 28). Análises por RT-PCR semi-quantitativa de genes floema específicos como *Apl*, marcador de diferenciação de elementos de tubo crivado e de *Suc2*, transportador de sacarose expresso em células companheiras do floema não revelaram diferenças de expressão nas linhagens homozigóticas em relação a plantas selvagens (Figura 30).

Considerando a possibilidade de AtbZIP9 heterodimerizar com AtbZIP53 (Ehlert *et al.*, 2006), um regulador positivo da expressão da enzima *prolina desidrogenase* (ProDH), envolvida na degradação do aminoácido prolina em resposta a condições de hipoosmolaridade (Weltmeier *et al.*, 2006), avaliamos a possível participação de AtbZIP9 neste processo. Nenhuma diferença significativa de expressão nos vários genótipos

(selvagem, mutante nulo e ativador constitutivo) foi observada (Figura 30). Finalmente, lembrando que *AtbZIP9* é um homólogo de *O2*, avaliamos também o possível envolvimento de *AtbZIP9* no controle da expressão da enzima bifuncional *lisina cetoglutarase redutase-saccaropina dehidrogenase* (LKR-SDH), que sob o controle positivo de *O2* promove a degradação de lisina no endosperma de milho (Kemper *et al.*, 1999). As análises de expressão também não revelaram alterações significativas de expressão dentro dos diferentes genótipos apresentados (Figura 30).

Avaliamos também a expressão de três fatores de transcrição do tipo Dof (*DNA binding with one finger*; At1g07640, At2g28810 e At3g43430) identificados por seu padrão de expressão semelhante ao apresentado por *AtbZIP9*, ou seja, restrito a células do floema e periciclo (Lee *et al.*, 2006). Fatores de transcrição Dof representam uma família multigênica específica de plantas (Riechmann & Ratcliffe *et al.*, 2000), bem representada no procambio. Estes fatores apresentam-se como reguladores potenciais de diferenciação e desenvolvimento do sistema vascular (Lee *et al.*, 2006). Adicionalmente, interações Dof-bZIP já foram descritas (Yamamoto *et al.*, 2006). As análises comparativas de expressão revelaram que um dos três fatores analisados aqui, At2g28810, é reprimido em linhagens transgênicas F2 homozigóticas para *ProbZIP9-VP16-cDNA* (Figura 30), o que possivelmente reflete efeitos indiretos induzidos pela superexpressão dos alvos de *AtbZIP9*. Desta maneira, podemos sugerir que At2g28810 possivelmente esteja inserido na rede regulatória floema específica da qual *AtbZIP9* faz parte. Embora estes dados sejam preliminares, eles sugerem que *VP16-AtbZIP9* atua sobre os programas de expressão gênica do floema validando assim a eficácia destes genótipos para desvendar a função de *AtbZIP9*.

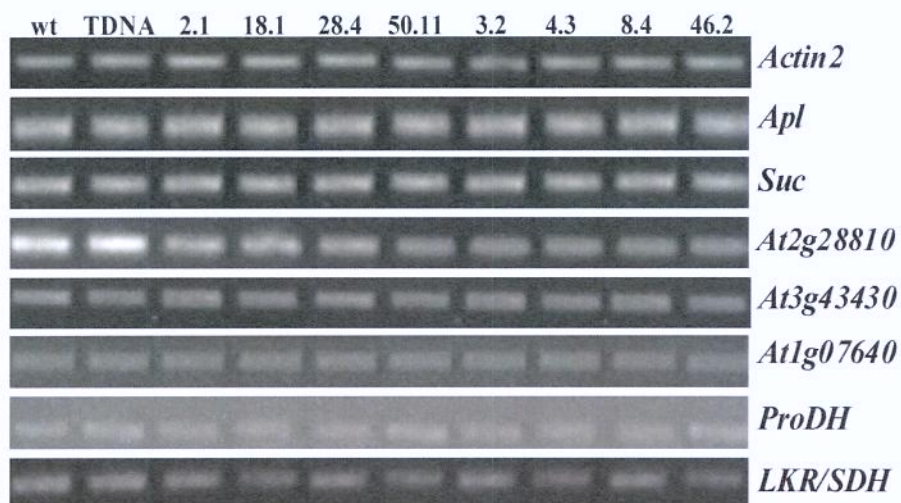


Figura 30. Análises de expressão por RT-PCR semi-quantitativa de genes marcadores do floema e de possíveis genes alvos de *AtbZIP9* em linhagens homozigotas F2 para um locus do transgene de ProbZIP9-VP16-cDNA (2.1; 18.1; 28.4; 50.11; 3.2; 4.3; 8.4 e 46.2; Figura 26), coletadas com 15 dias de idade. *Actin2*, gene utilizado como controle interno de padronização da quantidade de cDNA utilizada nas reações. WT, controle selvagem; TDNA, alelo *knockout* de *AtbZIP9* (*atbzip9-1*) por inserção de T-DNA. A fase linear da reação exponencial de PCR foi verificada para cada gene. *Apl* (*Altered phloem development*; At1g79430), *Suc* (At1g22710), *ProDH* (*Proline dehydrogenase*; At3g30775), *LKR/SDH* (*Lisine ketoglutarase reductase-saccaropine dehydrogenase*, Atg4g33150).

CONCLUSÃO FINAL E PERSPECTIVAS

As alterações fenotípicas apresentadas por linhagens transgênicas expressando versões de *AtbZIP9* que codificam para ativadores constitutivos fortes da transcrição indicam uma possível participação de *AtbZIP9* no controle do desenvolvimento do sistema vascular de raízes e folhas. Suspeitamos que as alterações de morfologia e fisiologia foliar apresentadas por transformantes primários possivelmente representem conseqüências de mudanças nas propriedades funcionais de transporte do floema, causadas por defeitos no processo de diferenciação e organização de células do cilindro vascular. Sabe-se que o transporte de longa distância via floema, tanto de nutrientes, quanto de hormônios, macromoléculas sinalizadoras, até mesmo mRNA ou si/miRNAs desempenha um papel essencial no crescimento e desenvolvimento de plantas (Lough & Lucas, 2006). O correto transporte polar de auxina pelo floema, por exemplo, é essencial na determinação da forma da folha e na diferenciação do sistema vascular (Dengler *et al.*, 2001; Aloni *et al.*, 2003; Scarpella *et al.*, 2006). Problemas com o transporte de sacarose das células fotossintetizantes do mesófilo para o floema levam a um acúmulo de carboidratos em folhas maduras. Este acúmulo tem como conseqüências diretas e indiretas a diminuição da taxa de crescimento, alterações da morfologia foliar, necrose e acúmulo de antocianinas (Gottwald *et al.*, 2000). mRNA do fator de transcrição FT de *Arabidopsis*, via transporte pelo floema, pode se mover das folhas maduras para o meristema apical do caule, onde terá um papel na transição de um meristema vegetativo para um meristema reprodutivo (Huang *et al.*, 2005). Outro exemplo é o transporte de mRNA de fator de transcrição do tipo GRAS, envolvido no controle do desenvolvimento foliar, até o meristema apical (Haywood *et al.*, 2005).

Este trabalho mostrou que as versões ativadoras constitutivas de transcrição de *AtbZIP9* são funcionais e resultou na obtenção de linhagens que representam genótipos de interesse para análises mais detalhadas como, por exemplo, confirmação dos genes alvos de *AtbZIP9*, avaliação fina do desenvolvimento do floema e metaboloma. Como principal perspectiva deste trabalho está a identificação dos alvos regulados por *AtbZIP9* por microarranjos de DNA utilizando versões ativadoras fortes e indutíveis deste gene.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T (2005) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309: 1052-1056.
- Agre P, Johnson PF, McKnight SL (1989) Cognate DNA Binding Specificity Retained after Leucine Zipper Exchange between GCN4 and C/EBP. *Science* 246: 922-926.
- Albani D, Hammond-Kosack MCU, Smith C, Conlan S, Colot V, Holdsworth M, Bevan MW (1997) The wheat transcriptional activator SPA: a seed-specific bZIP protein that recognizes the GCN4-like motif in the bifactorial endosperm box of prolamin genes. *Plant Cell* 9: 171-184.
- Aloni R, Schwalm K, Langhans M, Ullrich CI (2003) Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta* 216: 841-853.
- Avsian-Kretchmer O, Cheng JC, Chen L, Moctezuma E, Sung ZR (2002) Indole acetic acid distribution coincides with vascular differentiation pattern during *Arabidopsis* leaf ontogeny. *Plant Physiol.* 130, 199- 209.
- Bechtold N, Ellis J, Pelletier G (1993) *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C.R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences.* 316:1194-1199.
- Beckett D (2001) Regulated assembly of transcription factors and control of transcription initiation. *J Mol Biol* 314: 335-352.
- Benfey PN, Ren L, Chua NH. (1989) The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *EMBO Journal* 8: 2195-2202.
- Bensmihen S, To A, Lambert G, Kroj T, Giraudat J, Parcy F (2004) Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic *Arabidopsis* seeds. *FEBS Lett.* 561,127-31
- Blackwood EM & Kadonaga JT (1998) Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* 281: 61-63.
- Blanc G, Barakat A, Guyot R, Cooke R, Delseny M (2000) Extensive duplication and reshuffling in the *Arabidopsis* genome. *Plant Cell* 12: 1093-1101.
- Bonke M, Thitamadee S, Mähönen AP, Hauser MT, Helariutta Y (2003) APL regulates tissue identity in *Arabidopsis*. *Nature* 426: 181-186.
- Bouche and Bouchez (2001) *Arabidopsis* gene knockout: phenotypes wanted. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 111-117.
- Brasileiro ACM (1998) Manual de transformação genética de plantas. Brasileiro ACM, Carneiro VT de C. 309p. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Busch MA, Bomblies K, Weigel D (1999) Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science* 1999, 285:585-587.
- Byrne M, Barley R, Curtis M, Arroyo J, Duham M, Hudson A, Martienssen R. (2000). Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature.* 408:967-971.
- Caicedo AL, Stinchcombe JR, Olsen KM, Schmitt J, Purugganan MD (2004) Epistatic interaction between *Arabidopsis* FRI and FLC flowering time genes generates a latitudinal cline in a life history trait. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:15670-15675
- Chen THH, Murata N (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr Opin Plant Biol* 5: 250-257.
- Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem* 275: 1723-1730.
- Clough SL, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-743.
- Chuang CF, Running MP, Williams RW, Meyerowitz EM (1999) The PERIANTHIA gene encodes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 13: 334-344.
- Chuck G, Lincol C, Hake S (1996) *KNAT1* Induces Lobed Leaves with Ectopic Meristems When Overexpressed in *Arabidopsis*. *The Plant Cell.* 8:1277-1289

- Ciceri P, Gianazza E, Lazzari B, Lippoli G, Genga A, Hoscheck G, Schmidt RJ, Viotti A. (1997) Phosphorylation of Opaque2 changes diurnally and impacts its DNA binding activity. *Plant Cell*. 9:97-108.
- Ciceri P, Locatelli F, Genga A, Viotti A, Schmidt RJ (1999) The activity of the maize Opaque-2 transcriptional activator is regulated diurnally. *Plant Physiol*. 121: 1321-1327
- Cord Neto G, Yunes JA, Vettore AL, da Silva MJ, Arruda P, Leite A (1995) The involvement of Opaque2 in b-prolamine gene regulation in maize and Coix suggests a more general role for this transcriptional activator. *Plant Mol Biol* 27:1015–1029.
- Corrêa L.G.G, *Análise Filogenética de Fatores de Transcrição bZIP em Angiospermas*. Campinas: UNICAMP, 2004, 65p. Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Capinas, 2004.
- Courey AJ & Tijan R (1988) Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcription domains including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* 59: 827.
- Damerval C & Le Guilloux M (1998) Characterization of novel proteins affected by the o2 mutation and expressed during maize endosperm development. *Mol Gen Genet* 257:354–361.
- Damiani RD Jr & Wessler SR (1993) An upstream open reading frame represses expression of Lc, a member of the R/B family of maize transcriptional activators. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:8244-8248.
- Day DA & Tuite MF (1998) Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *Journal of Endocrinology* 157: 361-371
- Dengler N & Kang J (2001) Vascular patterning and leaf shape. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 50-56.
- Deppmann CD, Acharya A, Rishi V, Wobbes B, Smeekens S, Taparowsky EJ, Vinson C (2004) Dimerization specificity of all 67 B-ZIP motifs in *Arabidopsis thaliana*: a comparison to *Homo sapiens* B-ZIP motifs. *Nucleic Acids Res* 32:3435-3445.
- Despres C, DeLong C, Glaze S, Liu E, Fobert PR (2000) The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* 12: 179-81.
- Deuschle K, Funck D, Forlani G, Stransky H, Biehl A, Leister D, van der Graaff E, Kunze R, Frommer WB (2004) The role of [Delta]1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. *Plant Cell* 16: 3413-3425.
- Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *Plant Cell* 7: 1085–1097.
- Dröge-Laser W, Kaiser A, Lindsay WP, Halkier BA, Loake GJ, Doerner P, Dixon RA, Lamb C (1997) Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses. *EMBO J* 16: 726-738.
- Ehler A, Weltmeier F, Wang X, Mayer CS, Smeekens S, Vicente-Carbajosa J, Droge-Laser W (2006) Two-hybrid protein-protein interaction analysis in *Arabidopsis* protoplasts: establishment of a heterodimerization map of group C and group S bZIP transcription factors. *Plant J*. 46: 890-900.
- Ellenberg TE, Brandl CJ, Stuhl K, Harrison SC (1992) The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted α -helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* 71: 1223-1237.
- Fabro G, Kovacs I, Pavet V, Szabados L, Alvarez ME (2004) Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. *Mol Plant-Microbe Interact* 17: 343-350.
- Fedoroff N (2006) Redox regulatory mechanisms in cellular stress responses. *Annals of Botany* 98: 289-300.
- Feltkamp D, Masterson R, Starke J, Rosahl S (1994) Analysis of the Involvement of ocs-Like bZip-Binding Elements in the Differential Strength of the bi-directional mas 1'2' promoter. *Plant Physiology* 1005: 259-268.
- Ferrandiz C, Gu Q, Martienssen R, Yanofsky MF (2000) Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development* 127: 725-734.
- Finkelstein RR, Lynch TJ (2000) The *Arabidopsis* Absciscic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *The Plant Cell* 12: 599-609.
- Fitch WM (2000) Homology: a personal view on some of the problems. *TIG* 16: 227-231.
- Fukazawa J, Sakai T, Ishida S, Yamaguchi I, Kamiya Y, Takahashi Y (2000) Repression of shoot growth, a bZIP transcriptional activator, regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins. *Plant Cell* 12: 901–915.
- Gauer L. (2004) *Caracterização funcional do gene Bzo2h2 de Arabidopsis thaliana: um regulador da transcrição homólogo ao locus Opaco2 de milho*. Campinas: UNICAMP, 2004. 99p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- Gerrids PO & Smid L (1983) A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissue in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscopy*. 132: 81–5.
- Goff, SA., Ricke, D., Lan, T.H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varna, H., Hadley, D., Hutchison, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B.M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J.,

- Miguel, T., Paszkowski, U., Zhang, S., Colbert, M., Sun, W., Chen, L., Cooper, B., Park, S., Wood, T.C., Mao, L., Quail, P., Wing, R., Dean, R., Yu, Y., Zharkikh, A., Shen, R., Sahasrabudhe, S., Thomas, A., Cannings, R., Gutin, A., Prus, D., Reid, J., Tavtigian, S., Mitchell, J., Eldredge, G., Scholl, T., Miller, R.M., Bhatnagar, S., Adey, N., Rubano, T., Tusneem, N., Robinson, R., Felhaus, J., Malcama, T., Oliphant, A. & Briggs, S. (2002). A draft of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296: 92-100.
- Gottwald J, Krysan P J, Young J C, Evert R F, Sussman M R. (2000) Genetic Evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *PNAS*. 97(25): 13979-13984.
 - Guo A, He K, Liu D, Bai S, Gu X, Wei L, Luo J (2005) DATF: a database of Arabidopsis transcription factors. *Bioinformatics* 21: 2568-2569.
 - Habben JE, Kirleis AW, Larkins BA (2003) The origin of lysine-containing proteins in opaque-2 maize endosperm. *Plant Mol Biol*. 23: 825-38.
 - Hall DB, Struhl K (2002) The VP16 activation domain interacts with multiple transcriptional components as determined by protein-protein cross-linking in vivo. *J Biol Chem*. 277:46043-46050.
 - Haywood V, Yu T S, Huang NC, Lucas W J. (2005) Phloem long-distance trafficking of GIBBERELLIC ACID_INSENSITIVE RNA regulates leaf development. *The Plant Journal*. 42:49-68.
 - Heinekamp T, Strathmann A, Kuhlmann M, Froissard M, Muller A, Perrot-Rechenmann C, Droge-Laser W (2004) The tobacco bZIP transcription factor BZI-1 binds the GH3 promoter in vivo and modulates auxin-induced transcription. *Plant J*. 38: 298-309.
 - Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z, Verma DPS (2000) Removal of feedback inhibition of delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol* 122: 1129-1136.
 - Huang T, Bohlén H, Eriksson S, Parcy F, Nilsson O (2005) The mRNA of the Arabidopsis gene FT moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Science* 309:1694-1696.
 - Hunter T & Karin M (1992) The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 70: 375-387.
 - Hunter BG, Beatty MK, Singletary GW, Hamaker BR, Dilkes BP, Larkins BA, Jung R (2002) Maize opaque endosperm mutations create extensive changes in patterns of gene expression. *Plant Cell*. 14: 2591-612.
 - Hurst H (1995) Transcription factor 1: bZIP proteins. *Protein Profile* 2: 105-168.
 - Izawa T, Foster R, Chua NH (1993) Plant bZIP protein DNA binding specificity. *J Mol Biol* 230: 1131-1144.
 - Iwata Y, Koizumi N (2005) An Arabidopsis transcription factor, AtbZIP60, regulates the endoplasmic reticulum stress response in a manner unique to plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 5280-5285
 - Jakoby M, Weisshaar B, Droge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* 7: 106-111.
 - Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS fusion system. *Plant Mol. Bio. Rep.* 5: 387-405.
 - Johansen DA (1940) *Plant Microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Co., Inc.
 - Kaminaka H, Nake C, Eppe P, Dittgen J, Schutze K, Chaban C, Holt BF3rd, Merkle T, Schafer E, Harter K, Dangel JL (2006) bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in Arabidopsis following infection. *EMBO J*. 25: 4400-4411.
 - Kemper EL, Cord Neto G, Papes F, Martinez Moraes KC, Leite A, Arruda P (1999) The role of Opaque2 in the control of lysine-degrading activities in developing endosperm. *Plant Cell* 11:1981-1993.
 - Kempin SA, Savidge B, Yanofsky MF (1995) Molecular basis of the cauliflower phenotype in Arabidopsis. *Science* 267: 522-525.
 - Kirch T, Simon R, Grünewald M, Werr W. (2003). The *DORNROSCHEN/ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1* Gene of Arabidopsis Acts in the Control of Meristem Cell Fate and Lateral Organ Development. *The Plant Cell*. 15: 694-705.
 - Klimczak LJ, Schindler U, Cashmore AR. (1992) DNA binding activity of the Arabidopsis G-box binding factor GBF1 is stimulated by phosphorylation by casein kinase II from broccoli. *Plant Cell* 4:87-98.
 - Koncz C, Shell J (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* 204:383-396.
 - Kouzarides T, Ziff E (1989) Leucine zippers of fos, jun and GCN4 dictate dimerization specificity and thereby control DNA binding. *Nature* 340: 568-571.
 - Kornberg RD (1999) Eukaryotic transcriptional control. *Trends in Genetics* 15: 46-49.
 - Kuhlmeier C (1992) Transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression in plants. *Plant Mol Biol* 19: 1-14.

- Kuhlmann M, Horvay K, Strathmann A, Heinekamp T, Fischer U, Bottner S, Droge-Laser W (2003) The alpha-helical D1 domain of the tobacco bZIP transcription factor BZI-1 interacts with the ankyrin-repeat protein ANK1 and is important for BZI-1 function, both in auxin signaling and pathogen response J Biol Chem. 278: 8786-94.
- Lalonde S, Tegegeder M, Throne-Holst, Frommer WB, Patrick JW. (2003) mPhloem loading and unloading of sugars and aminoacids. Plant, Cell and Environment 26: 37-57.
- Lara P, Onate-Sanchez L, Abraham Z, Ferrandiz C, Diaz I, Carbonero P, Vicente-Carbajosa J (2003) Synergistic activation of seed storage protein gene expression in Arabidopsis by ABI3 and two bZIPs related to OPAQUE2. J Biol Chem. 278: 21003-11
- Lee JY, Colinas J, Wang JY, Mace D, Ohler U, Benfey PN (2006) Transcriptional and posttranscriptional regulation of transcription factor expression in Arabidopsis roots. Proc Natl Acad Sci U S A. 103: 6055-60.
- Lee TI & Young RA (2000) Transcription of eukaryotic protein-coding genes. Annu. Rev. Genet. 34: 77-137.
- Liljgren SJ, Ditta GS, Eshed Y, Savidge B, Bowman JL, Yanofsky MF (2000) SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. Nature 404: 766-770.
- Lin Q, Ha I, Maldonado E, Reinber D, Green M (1991) Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activation region. Nature 263: 569-571.
- Ling-Lee M, Chilvers GA, Ashford A.E (1977) A histochemical study of phenolic materials in mycorrhizal and uninfected roots of eucalyptus fastigata Deane and Maiden. New Phytologist 78: 313-328.
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. Anal Biochem. 163: 16-20.
- Lohmer S, Maddaloni M, Motto M, Di Fonzo, Hartings H, Salamini F, Thompson RD (1991) The maize regulatory locus Opaque-2 encodes a DNA-binding protein which activates the transcription of the b-32 gene. EMBO J 10: 617-624.
- Lohmer S, Maddaloni M, Motto M, Salamini F, Thompson RD (1993) Translation of the mRNA of the maize transcriptional activator Opaque-2 is inhibited by upstream open reading frames present in the leader sequence. Plant Cell 5: 65-73.
- Long JA, Moan EI, Medford JI, Barton MK. (1996) A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis. Nature. 379: 66-69.
- Lough T J & Lucas WJ (2006) Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. Annual Review Plant Biology. 57:203-232.
- Luscombe NM, Austin SE, Berman HM, Thornton JM (2000) An overview of the structures of protein-DNA complexes. Genome Biol 1(1): REVIEWS001.
- Ma J & Ptashne M (1987) Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. Cell 48: 847-853.
- Maldonado E, Reinberg D (1995) News on initiation and elongation of transcription by RNA polymerase II. Curr Opin Cell Biol. 7: 352-61.
- Markel, H., Chandler, J., Werr, W. (2002) Translational fusions with the engrailed repressor domain efficiently convert plant transcription factors into dominant-negative functions. Nucleic Acids Research 30: 4709-4719.
- Mata J, Marguerat S, Bähler J (2005) Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. TRENDS Biochem Sci 30: 506-514.
- McConnell JR, Emery J, Eshed Y, Bao N, Bowman J, Barton M. (2001). Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots. Nature 411: 709-713.
- McGonigle B, Bouhidel K, Irish VF (1996) Nuclear localization of the Arabidopsis APETALA3 and PISTILLATA homeotic gene products depends on their simultaneous expression. Genes Dev 10: 1812-1821.
- Meng XB, Zhao W, Lin R, Wang M, Peng Y (2005) Identification of a Novel Rice bZIP-Type Transcription Factor Gene, OsbZIP1, Involved in Response to Infection of Magnaporthe grisea. Plant Molecular Biology Reporter 23: 301a-301m.
- Mermod N, O'Neill EA, Kelly TJ, Tijan R (1989) The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-1 is distinct from the replication and DNA binding domain. Cell 58: 741-753.
- Meshi T & Iwabuchi M (1995) Plant transcription factors. Plant Cell Physiology 36: 405-1420.
- Meyerowitz EM (2002) Plants compared to animals: The broadest comparative study of development. Science 295: 1482-1485.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Myers LC, Kornberg RD (2000) Mediator of transcriptional regulation. Annu Rev Biochem 69: 729-749.
- Naar AM, Lemon BD, Tijan R (2001) Transcriptional coactivator complexes. Annu Rev Biochem 70: 475-501.

- Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108: 475-487.
- Newman K, Fernandez A, Barton M (2002) Regulation of axis determinacy by the Arabidopsis PINHEAD gene. *The Plant Cell*. 14:3029-3042.
- Niggeweg R, Thurow C, Kegler C, Gatz C (2000) Tobacco transcription factor TGA2.2 is the main component of as-1-binding factor ASF-1 and is involved in salicylic acid- and auxin-inducible expression of as-1-containing target promoters. *J Biol Chem* 275: 19897-19905.
- O'Shea EK, Rutkowski R, Stafford WF 3rd, Kim PS (1989) Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun. *Science* 245:646-8.
- Onate L, Vicente-Carbajosa J, Lara P, Diaz I, Carbonero P (1999) Barley BLZ2, a seed-specific bZIP protein that interacts with BLZ1 in vivo and activates transcription from the GCN4-like motif of B-hordein promoters in barley endosperm. *J Biol Chem* 274: 9175-9182.
- Onodera Y, Suzuki A, Wu CY, Washida H, Takaiwa F (2000) A rice functional transcriptional activator, RISBZ1, responsible for endosperm-specific expression of storage protein genes through GCN4 motif. *J Biol Chem* 276:14139-14152.
- Ouyang S, Zhu W, Hamilton J, Lin H, Campbell M, Childs K, Thibaud-Nissen , Malek RL, Lee Y, Zheng L, Orvis J, Haas B, Wortman J, Buell CR (2007) The TIGR Rice Genome Annotation Resource: improvements and new features. *Nucleic Acids Res.* 35 (Database issue):D883-7.
- Osterlund MT, Wei N & Deng XW (2000) The roles of photoreceptor system and the COP-1 targeted distabilization of HY5 in the light control of Arabidopsis seedling development. *Plant Physiol.*, 124: 1520-1524.
- Parcy F, Nilsson O, Busch MA, Lee I, Weigel D (1998) A genetic framework for floral patterning. *Nature* 395: 561-566.
- Parcy F, Bomblies K, Weigel D (2002) Interaction of LEAFY, AGAMOUS and TERMINAL FLOWER1 in maintaining floral meristem identity in Arabidopsis. *Development* 129: 2519-2527.
- Parvanova D, Ivanov S, Konstantinova T, Karanov E, Atanassov A, Tsvetkov T, Alexieva V, Djilianov D.(2004) Transgenic tobacco plants accumulating osmolytes show reduced oxidative damage under freezing stress. *Plant Physiol Biochem.* 42:57-63.
- Parenicova L, Folter S de, Kieffer M, Horner DS, Favalli C, Busscher J, Cook HE, Ingram RM, Kater MM, Davies B, Angenent GC, Colombo L (2003) Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS world. *Plant Cell* 15: 1538–1551.
- Pirovano L, Lanzini S, Hartings H, Lazzaroni N, Rossi V, Joshi R, Thompson RD, Salamini F, Motto M (1994) Structural and functional analysis of an Opaque-2-related gene from sorghum. *Plant Mol Biol* 24: 515-523.
- Pontier, D, Miao, Z-H, Lam E (2001) Trans-dominant suppression of plant TGA factors reveals their negative and positive roles in plant defense responses. *The Plant Journal* 27: 529-538.
- Pontier D, Privat I, Trifa Y, Zhou JM, Klessig DF, Lam E (2002) Differential regulation of TGA transcription factors by post-transcriptional control. *Plant J* 32: 641-653.
- Prigge M, Otsuga D, Alonso JM, Ecker J, Drews GN, Clark SE (2005) Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in Arabidopsis development. *The Plant Cell*. 17: 61-76
- Ptashne M (1988) How transcriptional activators work. *Nature* 335: 683-689.
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddle J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK, Yu G (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110.
- Riechmann JL, Ratcliffe OJ (2000) A genomic perspective on plant transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* 3: 423-434.
- Riechmann JL (2002) Transcriptional Regulation: a Genomic Overview. *The Arabidopsis Book*. Somerville CR and Meyerowitz EM (eds), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp. 1-46.
- Rook F, Gerrits N, Kortstee A, van Kampen M, Borrias M, Weisbeek P, Smeekens S (1998) Sucrose-specific signalling represses translation of the Arabidopsis ATB2 bZIP transcription factor gene. *The Plant Journal* 15: 253-263.
- Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cazares B, Lucas WJ (2001) The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Curr Opin Plant Biol* 4: 202-209.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos Mendoza M, Dubreucq B, Miquel M, Caboche M, Lepiniec L (2005) LEAFY COTYLEDON 2 activation is sufficient to trigger the accumulation of oil and seed specific mRNAs in Arabidopsis leaves. *FEBS Lett.* 579:4666-70.

- Sasaki T & Burr B (2000) International Rice Genome Sequencing Project: the effort to completely sequence the rice genome. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 138-141.
- Satoh R, Fujita Y, Nakashima K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) A Novel Subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity- responsive expression of the ProDH gene in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 45:309-317
- Scarpella E, Marcos D, Friml J, Berleth T (2006) Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. *Genes & Development* 20:1015-1027.
- Schindler U, Terzaghi W, Beckmann H, Kadesch T, Cashmore AR (1992) DNA binding site preferences and transcriptional activation properties of the Arabidopsis transcription factor GBF 1. *EMBO J* 11: 1275–1289.
- Schmidt RJ, Ketudat M, Aukerman MJ, Hoschek G (1992) Opaque-2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kDa zein genes. *Plant Cell* 4: 689–700.
- Schmidt RJ (1993) Opaque-2 and zein genes expression. In: Verna DPS (ed) *Control of plant gene expression*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 337–355
- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KF, Jurgens G, Laux T (2000) The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell.* 100: 635-644.
- Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G, McElver J, Patton D, Dietrich B, Ho P, Bacwaden J, Ko J, Clarke JD, Cotton D, Bullis D, Snell J, Miguel T, Hutchison D, Kimmerly B, Mittel T, Katagiri F, Glazebrook J, Law M, Goff SA (2002) A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system. *Plant Cell* 14: 2985-2994.
- Shen F, Triezenberg SJ, Hensley P, Porter D, Knutson JR (1996) Transcriptional activation domain of the herpesvirus protein VP16 becomes conformationally constrained upon interaction with basal transcription factors. *J Biol Chem.* 27: 4827-4837.
- Singh KB (1998) Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control. *Plant Physiol.* 118: 1111-1120.
- Siranidou E, Kang Z, Buchnauer K (2002) Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defense responses in wheat cultivars differing in resistance to Fusarium Head blight, *J. Phytopathol.* 150: 200–208.
- Smale ST, Kadonaga JT (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem.* 72: 449-479.
- Sterck L, Rombauts S, Vandepoele K, Rouze P, Van de Peer Y (2007) How many genes are there in plants (... and why are they there)? *Curr Opin Plant Biol* 10: 199-203.
- Stone SL, Williams LA, Farmer LM, Vierstra RD, Callis J (2006) Keep on going, a ring E3 ligase essential for Arabidopsis growth and development, is involved in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 18: 3415-3428.
- Struhl K (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* 12: 599-606.
- Tatusov RL, Koonin EV, Lipman DJ (1997) A genomic perspective on protein families. *Science* 278: 631-637.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Tijan R & Maniatis T (1994) Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 77: 5-8.
- Topfer R, Matzeit V, Gronenborn B, Schell J, Steinbiss HH (1987) A set of plant expression vector for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Research* 15: 5890.
- Tucker ML, Whitelaw CA, Lyssenko NN, Nath P (2002) Functional analysis of regulatory elements in the gene promoter for an abscission-specific cellulase from bean and isolation, expression, and binding affinity of three TGA-type basic leucine zipper transcription factors. *Plant Physiology* 130: 1487-1496.
- Ulm R, Baumann A, Oravec A, Mate Z, Adam E, Oakeley EJ, Schafer E, Nagy F (2004) Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1397-402.
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11632-11637.
- Varagona MJ, Raikhel NV (1994) The basic domain in the bZip regulatory protein Opaque-2 serves two independent functions: DNA binding and nuclear localization. *Plant Journal* 26: 437-441.
- Vettore AL, Yunes JA, Cord Neto G, da Silva MJ, Arruda P, Leite A (1998) The molecular and functional characterization of an Opaque2 homologue gene from Coix and a new classification of plant bZIP proteins. *Plant Mol Biol* 36: 249-263.
- Vicente-Carbajosa J, Moose SP, Parsons RL, Schmidt RJ (1997) A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:7685-7690.

- Vincentz M, Bandeira-Kobarg C, Gauer L, Schlogl P, Leite A (2003). Evolutionary pattern of angiosperm bZIP factors homologous to the maize Opaque2 regulatory protein. *Journal of Molecular Evolution*. 56: 105-116.
- Voetberg GS, Sharp RE (1991) Growth of the maize primary root at low water potentials. III, Role of increased proline deposition in osmotic adjustment. *Plant Physiol* 96: 1125-1130.
- Volpert R, Osswald W, Elstner EF. (1995) Effects of cinnamic acid derivatives on indole acetic acid oxidation by peroxidase. *Phytochemistry* 38:19–22.
- Walsh J, Waters CA and Freeling M (1997) The maize gene *liguleless2* encodes a basic leucine zipper protein involved in the establishment of the leaf blade-sheath boundary. *Genes and Development* 11: 208-218.
- Warren AL (2002) Eukaryotic transcription factors. *Curr Opin In Struct Biol* 12: 107-114.
- Wellmer F, Kircher, S., Rügner, A., Frohnmeier, H., Schäfer, E. & Harter, K. (1999). Phosphorylation of the parsley bZIP transcription factor CPRF-2 is regulated by light. *J. Biol. Chem.* 274: 29476-29489
- Weltmeier F, Ehler A, Mayer CS, Dietrich K, Wang X, Schutze K, Alonso R, Harter K, Vicente-Carbajosa J, Droge-Laser W (2006) Combinatorial control of Arabidopsis proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. *EMBO J.* 25: 3133-3143.
- Wiese A, Elzinga N, Wobbes B, Smeekens S. A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translation. *The Plant Cell*. 16:1717-1729.
- Wingender E, Chen X, Hehl R, Karas H, Liebich I, Matys V (2000) TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res.* 28: 316-319.
- Wolberger C (1999) Multiprotein-DNA complexes in transcriptional regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 28: 29-56.
- Wray GA, Hahn MW, Abouheif E, Balhoff JP, Pizer M, Rockman MV, Romano A (2003) The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Mol Biol Evol* 20: 1377-1419.
- Wu CQ, Hu HH, Zeng Y, Liang DC, Xie KB, Zhang JW, Chu ZH, Xiong LZ (2006) Identification of a novel stress-responsive transcription factor genes in rice by cDNA array analysis. *Journal of Integrative Plant Biology* 48: 1216-1224.
- Yamamoto MP, Onodera Y, Touno SM, Takaiwa F (2006) Synergism between RPB1 Dof and RISBZ1 bZIP activators in the regulation of rice seed expression genes. *Plant Physiol.* 141: 1694-1707.
- Yanazisawa S (1998) Transcription Factors in Plants: Physiological Functions and Regulation. *J Plant Research* 111: 363-371.
- Yang L, Liu Z, Lu F, Dong A, Huang H (2006) Serrate is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis. *Plant J* 47: 841-850.
- Yin Y, Zhu Q, Da S, Lamb C, Beachy R (1997) RF2a, a bZIP transcriptional activator of the phloem-specific rice tungro bacilliform virus promoter, function in vascular development. *EMBO J.* 16: 5247-5259.
- Yoshida Y, Nanjo T, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999) Stress-responsive and developmental regulation of Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase 1 (P5CS1) gene expression in Arabidopsis thaliana. *Biochem Biophys Res Commun* 261: 766-772.
- Yunes JA, Cord Neto G, da Silva MJ, Leite A, Ottoboni LM, Arruda P (1994) The transcriptional activator Opaque2 recognizes two different target sequences in the 22-kD-like alpha-prolamin genes. *Plant Cell* 1994 6: 237-49.
- Zhao C, Craig JC, Petzold HE, Dickerman AW, and Beers EP (2005) The Xylem and Phloem Transcriptomes from Secondary Tissues of the Arabidopsis Root-Hypocotyl. *Plant Physiology* 138: 803–818.
- Zhang Y, Fan W, Kinkeman M, Li X, Dong X (1999) Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factor that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 6523-6528.
- Zhang JZ (2003) Overexpression analysis of plant transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 430-440.
- Zhang Y, Tessier MJ, Lassner M, Li X (2003) Knockout analysis of Arabidopsis transcription factors TGA2, TGA5 and TGA6 reveals redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 15: 2647-2653.
- Zhong R & Hua Ye Z (1999) *IFL1*, a Gene Regulating Interfascicular Fiber Differentiation in Arabidopsis, Encodes a Homeodomain–Leucine Zipper Protein. *The Plant Cell*. 11: 2139-2152



The Arabidopsis AtbZIP9 protein fused to the VP16 transcriptional activation domain alters leaf and vascular development

Amanda Bortolini Silveira^{a,1}, Luciane Gauer^{a,1}, Juarez Pires Tomaz^a,
Poliana Ramos Cardoso^b, Sandra Carmello-Guerreiro^b, Michel Vincentz^{a,c,*}

^a Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”,
Distrito de Barão Geraldo 13083875, CP6010, Campinas, SP, Brazil

^b Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, Distrito de Barão Geraldo 13083970, CP6009, SP, Brazil

^c Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”,
Distrito de Barão Geraldo 13083970, CP6109, SP, Brazil

Received 8 December 2006; received in revised form 28 February 2007; accepted 5 March 2007

Abstract

The Arabidopsis group C bZIP transcriptional regulatory factors includes four members that are homologous to the maize *Opaque2* regulatory locus. These four Arabidopsis bZIP were organized into three groups of orthologues each of which possibly representing an ancestral angiosperm function. To better define the evolution of group C functions we initiated the characterization of *AtbZIP9*, a single Arabidopsis gene corresponding to one of the three group C ancestral functions and for which little functional information is available. Promoter fusion with GUS revealed that *AtbZIP9* expression is restricted to the phloem of all organs analyzed and *in situ* hybridization confirmed this conclusion. *AtbZIP9* mRNA accumulation was also shown to be repressed by glucose and induced by abscissic acid and cytokinin. *Knockout* T-DNA mutant or transgenic lines overexpressing *AtbZIP9* mRNA were undistinguishable from the wild type indicating that post-transcriptional regulation and/or genetic redundancy act on *AtbZIP9*. To overcome the redundancy aspect, we produced transgenic plants expressing a fusion between *AtbZIP9* cDNA and the VP16 transcriptional activator domain. These plants displayed leaf developmental defects and accumulation of phenolic compounds in the mesophyll. These alterations may be the consequence of changes in the phloem developmental process.

© 2007 Published by Elsevier Ireland Ltd.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*; *AtbZIP9* transcription factor; VP16; Vascular cylinder development; Phloem

1. Introduction

The *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) genome codes for 75 bZIPs transcriptional regulatory factors which are organized into 10 groups of homologues [1]. Group C includes four genes (*AtBZIP10/Bzo2h1*; *AtbZIP9/Bzo2h2*; *AtbZIP63/Bzo2h3* and *AtbZIP25/Bzo2h4*) that are homologous to the maize *Opaque-2* (*O2*) locus [1,2]. *O2* expression is restricted to the developing endosperm where it controls storage protein gene expression and the carbon to nitrogen balance [3,4]. To which extent

O2-related function is conserved among eudicotyledonous species is still unclear. Detailed phylogenetic analysis indicate that the four group C genes possibly represent three groups of orthologues (i.e., ancestral angiosperm functions). *AtbZIP63*, which is likely the *O2* orthologue [2], is poorly expressed in seeds [5] and little is known about its function [5,6]. However, BZI-1, the probable tobacco orthologue of *O2* and *AtbZIP63*, was found to regulate and interact with an auxin-responsive promoter indicating a role in auxin signaling [7]. Moreover, tobacco plants expressing a dominant negative form of BZI-1 which lacks the N-terminal sequence were shown to be more susceptible to tobacco mosaic virus infection, suggesting an involvement of BZI-1 in pathogen response [8].

The second group of orthologues within group C is represented by the two paralogous genes *AtbZIP10* and *AtbZIP25*. The corresponding bZIP factors were shown to interact with the regulatory factor ABI3 to control the activity

* Corresponding author at: Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, Distrito de Barão Geraldo 13083970, CP6010, Campinas, SP, Brazil. Tel.: +55 19 35211140; fax: +55 19 35211089.

E-mail address: mgavince@unicamp.br (M. Vincentz).

¹ These two authors contributed equally to this work.

of the *At2S1* albumin gene promoter [5]. AtbZIP10 and AtbZIP25 may therefore be functionally more related to O2 than AtbZIP63. Surprisingly, AtbZIP10 was found to act as a positive regulator of hypersensitive response and basal defense processes, and LSD1 inhibits its activity by a cytoplasmic retention regulatory step [6]. In addition, AtbZIP10 is involved in the control of proline metabolism. Indeed, it was shown that AtbZIP10 can form heterodimers with AtbZIP53 (a member of the group S of homologues [1]) to activate the transcription of the proline dehydrogenase gene [9]. This later finding is quite relevant since a network of specific heterodimerisation between group C and group S bZIP factors has been described and this pattern of interaction may play an important role in the modulation of the activity of the C/S bZIPs [10].

The third group of orthologues which is more distantly related to O2 [2], includes *AtbZIP9* and functional data are still lacking for this gene. To gain more insight into the functional evolution of group C bZIP proteins, we initiated a detailed characterization of *AtbZIP9*. Here, we present evidence that the expression of a fusion between the VP16 and AtbZIP9 induces significant changes in leaf development and in the structure of the vascular bundle.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and growth conditions

Arabidopsis thaliana Columbia-0 (Col-0) or Wassilewskija (Ws) ecotypes, were grown on a mixture of soil and vermiculite (2/1) or *in vitro* on solid half-strength Murashige and Skoog medium (MS/2; SIGMA) [11] containing 0.5% sucrose under a 16-h light:8-h dark cycle at 22 °C. For *in vitro* growth, seeds were surface sterilized and incubated for 3 days at 4 °C in the dark to break dormancy. Seeds of *atbzip9-1* T-DNA knockout (insertion in exon 5 of *At5g24800*; Fig. 4A) null mutant were obtained from Syngenta (Arabidopsis Insertion Library, Access number 569C12 [12]). Seedlings of the *abi5-1* (Ws) mutant expressing a HA-ABI5 fusion protein were described earlier [13]. Seedlings were selected *in vitro* with 100 µg kanamycin/ml and transgenic individuals were transplanted on kanamycin-free medium 4 days after germination. For the ProAtbZIP9-GUS and 35S-AtbZIP9 constructs (described hereafter), homozygotic lines for one locus were selected by analysis of kanamycin resistance segregation. For expression analysis, surface sterilized seeds were sown in liquid MS/2 medium without carbon source for 5 days under constant dim light and under slow agitation (67 rpm). Seedlings were then exposed to 2% glucose (w/v) or 100 µM ABA or 50 µM cytokinin for 4 and 24 h.

2.2. DNA constructs

Translational fusion between the *AtbZIP9* promoter and the reporter gene *gusA* was obtained as follows. The *gusA* coding sequence followed by the *Nos* gene poly(A) signal was obtained from pBI121 [14] as a *HindIII/EcoRI* fragment which was cloned into pUC18 [15] to form *gusA*-poly(A)-pUC18 plasmid.

The *AtbZIP9* (*At5g24800*) promoter sequence (2000 bp upstream of the start codon) and 52 bp of N-terminal coding sequence were amplified with the two primers CTTTAACCTG-CAGCTTCAATCTCGTTCACG and CCAGCTCGGATC-CACTTCT CTCCATGGCAATGTC and the resulting fragment was cloned into pGEMT Easy (Promega). Subsequently, the promoter sequence was inserted in frame with *gusA* by ligation into the *PstI* and *BamHI* sites of *gusA*-poly(A)-pUC18 to generate ProAtbZIP9-GUS. ProAtbZIP9-GUS was introduced into the binary vector pCambia 2300 (www.cambia.org) using the *PstI-EcoRI* sites. *AtbZIP9* superexpressor allele was assembled starting with the *AtbZIP9* complete cDNA (AF310223). A 851 bp *Hind-EcoRI* fragment corresponding to the full-length cDNA cloned in pUC18 was treated with DNA polymerase I large (Klenow) fragment (Invitrogen) and cloned in pRT-Ω vector, digested with *BamHI* and blunt ended with Klenow, between the CaMV 35S promoter and its poly(A) signals [16]. The resulting construct was designated 35S-AtbZIP9 and was introduced into the *PstI* site of the binary vector pCambia 3300 (www.cambia.org). An *AtbZIP9* dominant activator allele was constructed by obtaining in a first step a promoter sequence which excludes any coding sequence. To this end, 484 bp upstream of the start codon of the promoter 3' end sequence was amplified with the two primers CGAAATATTTAGGATCCTTTTATG and TTCTTTGAATGTCTAGACACAAGA. This amplification product was ligated to the remaining promoter 5' end to reconstitute a full-length 1972 bp *AtbZIP9* promoter that was cloned in *PstI* and *XbaI* sites of pBKS [17]. The CaMV 35S promoter in pRT100 [16] was replaced by the *AtbZIP9* promoter using *XhoI-XbaI* digestion producing the plasmid PatbZIP9. The *AtbZIP9* coding sequence was amplified from the cDNA (AF310223) with the two primers GCCAGTGCC-GAGCTCCAAAGAAAATGG and CCATGATTACGGATCC-GAGTC ATGGC and the resulting product was inserted into the *SstI-BamHI* sites of PRT100 to obtain the cDNAAtbZIP9 plasmid. A triple hemagglutinin (HA) tag and the *Herpes simplex* virus VP16 activation domain were amplified from the PFPI01-HA-VP16 vector [13] with the two primers CCCCCCTCTAGAAAAAATGGCATAACCCATACGAC and GACTTGGATGAGCTCTAGTGATATCCC and cloned into *XbaI-SstI* sites of pBKS. After digestion with *XhoI-SstI* the HA-VP16 fragment was fused in frame to the 5' end of cDNAAtbZIP9, generating HA-VP16::cDNAAtbZIP9. This latest construct was then digested with *XbaI* to release the HA::VP16::cDNAAtbZIP9 fusion which was cloned downstream of the *AtbZIP9* promoter in the PatbZIP9 plasmid. The expression cassette *AtbZIP9* promoter::HA-VP16::cDNAAtbZIP9::poly(A), designated VP16-AtbZIP9 was excised with *PstI* and introduced into the binary vector pCambia2300. All amplification fragments were verified by sequencing.

2.3. Plant transformation

Agrobacterium-mediated plant transformation was realized basically according to the *in planta* transformation protocol described by Bechtold [18]. *Agrobacterium tumefaciens*

(GV3101::pMP90 [19]) carrying the binary vector with the constructs of interest was sprayed over plants just before bolting. The chimeric genes 35S-AtbZIP9 and ProAtbZIP9-GUS were transferred into wild type (Col-0 ecotype), while the VP16-AtbZIP9 construct and the VP16 transcriptional activator domain under the control of the CaMV 35S promoter in the pFP100 vector [13] were transferred into *atbzip9-1* T-DNA insertion line.

2.4. RNA isolation, reverse transcription and PCR

Total RNA was extracted in Guanidine HCl 8 M (Invitrogen), Tris HCl pH 8.0 50 mM (Invitrogen), EDTA pH 8.0 20 mM (Invitrogen) and 50 mM β -mercaptoethanol as described by Logemann et al. [20]. Total RNA were denatured and subsequently fractionated by electrophoresis in denaturing 5% formaldehyde, 1% (w/v) agarose gel according to Logemann et al. [20]. Six micrograms of total RNA were reverse transcribed in a 50 μ L reaction volume using ImProm II Reverse Transcriptase (Promega) and oligodT18 oligonucleotide (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. PCR was carried out using 5 μ L of the cDNA with 1.5 U of Taq polymerase (Invitrogen) in a 50 μ L reaction. Amplifications were performed with the following steps: 94 °C for 3 min; cycles of 94 °C for 45 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 90 s; ending with a final extension of 72 °C for 5 min. *Actin2* (At3g18780) and adenosina fosforibosil transferase *Apt1* (At1g27450) genes were used as endogenous controls for

standartization of the cDNA amount. *Actin2* was amplified with CGTACAACCGGTATTGTGCTGG and AACGATTCCTG-GACCTGCCTCATC primers and *Apt1* with TCCCA-GAATCGCTAAGATTGC and CCTTCCCTTAAGCTCTG primers. *AtbZIP9* mRNA (At5g24800) was amplified using CAAGCCCTCTAGACCCTTG and GATGTCTGAGACG-CAGCTAAC primers. β -Amilase (At4g17090), *ABI5* (At5g52310) and putative cytokinin response regulator (*Arr15*; At1g74890) were used as control genes for induction by glucose, ABA and cytokinin treatment, respectively. *β*-Amilase was amplified with GCTACGACAAGTATAT-GAAATCG and CCACATTCTCAGCGATCTTGCC primers; *ABI5* with CTTGAGGATTTCTTGGTGAAG and CACTGTATATGCTTGTTC and *Arr15* with CGTATAGAACAATG-TATGATAG and CCCCTAGACTCTAATTTGATC primers.

2.5. Western blot analysis

For total protein extraction, 600–800 mg of fresh plant material was ground to a fine powder in liquid nitrogen and homogenized in 1 ml of extraction buffer (Tris HCl pH 8.5 50 mM, EDTA pH 8.0 2 mM, dithiothreitol 5 mM, NaCl 50 mM, triton X-100 0.1%, Leupeptin 100 μ M and PepstatinA 2 μ M). After 20 min centrifugation at 13000 rpm and 4 °C, the supernatant was saved and protein concentration was determined using BioRAD Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Protein extracts diluted 1:1 in loading buffer (Tris HCl 125 mM pH

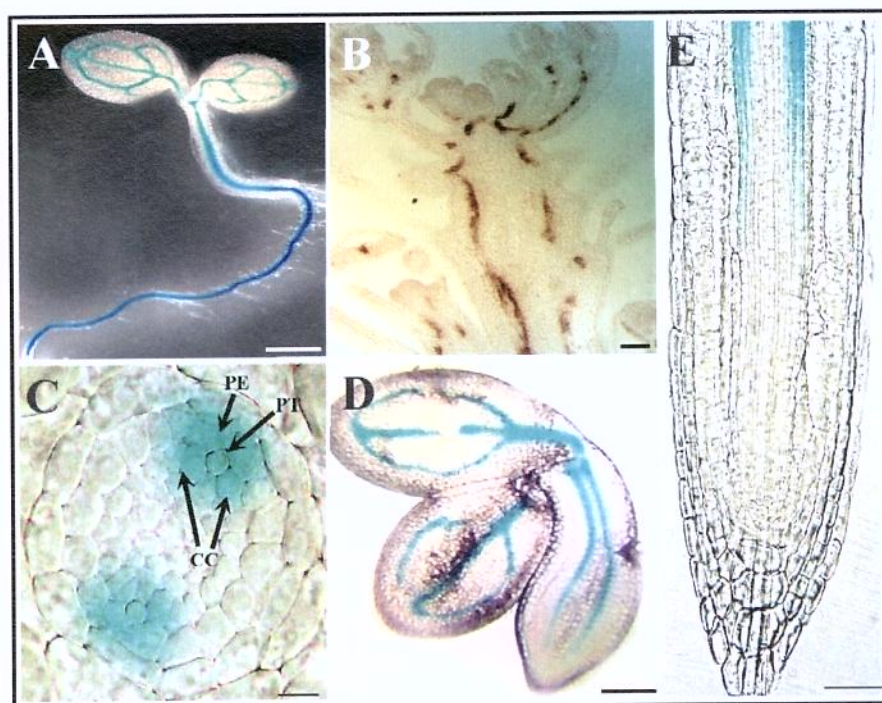


Fig. 1. Expression of *AtbZIP9*. (A, C, D, E) *In situ* localization of ProAtbZIP9-GUS expression. GUS activity was located in vascular tissue. (A) Early stages of vegetative growth, 3 days after germination. (B) *In situ* localization of *AtbZIP9* mRNA, cross-section through a wild-type floral meristem indicated mRNA accumulation in vascular bundle. (C) Transverse section through primary root showed GUS specific expression in phloem and pericycle cells at the phloem pole. (D) Mature embryo, GUS activity was found in undifferentiated procambium cells. (E) Longitudinal section through primary root showed GUS expression in root vascular cylinder differentiation and elongation meristematic zone. PE, pericycle; PT, protophloem; CC, companion cells. Scale bars: (A) 700 μ M; (B) 65 μ M; (C) 10 μ M; (D) 80 μ M; (E) 50 μ M.

6.8, dodecil sodium sulfate 4%, β -mercaptoethanol 10%, glycerol 20% and bromophenol blue 0.04%) were denatured, resolved by electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gel (PAGE) and subsequently blotted onto Hybond ECL 0.45 μ m nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). The primary antibody (Rat anti-HA High Affinity 3F10, Roche Applied Science) diluted 1/1000 and the secunary antibody (ECL anti-rat IgG Horseradish peroxidase-Linked, NA935, Amersham Biosciences) diluted 1/10000 in Tris-buffered saline (TBS), 0.1% Tween 20, 5% skimmed milk, were sucessively incubated with the membranes at room temperature for 10 and 2 h, respectively. Amersham ECL PlusTM Western Blotting Detection Reagents were used for revelation following manufacturer's recomendation.

2.6. Histochemical assay of β -glucuronidase activity

GUS activity was detected *in situ* according to Jefferson [14]. Samples were fixed in 80% acetone for 1 h at -20°C and subsequently incubated in GUS reaction buffer (sodium phosphate buffer 100 mM pH 7, 10 mM EDTA, 0.1% triton X-100 and 0.5 mM potassium ferrocyanide) containing 0.5 mg X-gluc (5 mg 3-indolyl-b-D-glucuronic acid; USB)/ml. Incuba-

tion was performed at 37°C in the dark, for different time periods according to the intensity of blue staining. Samples were chlorophyll depleted in 70% ethanol and stored at 4°C . The material was viewed using a Zeiss Stemi SV6 stereomicroscope. Images were acquired using digital Camera Canon Power Shot A95 and processed using Adobe Photoshop 6.0.

2.7. Cytological techniques and microscopy

For anatomical studies fresh tissues or GUS-stained samples were fixed for 24 h in FAA (formalin:acetic acid:50% ethyl alcohol = 5:5:90 v/v/v), dehydrated in a gradual ethanol series (50%; 70% and 100%), embedded in Historesin (glycol methacrylate, Leica, Heidelberg, Germany) according to manufacture's instructions and sectioned with a Leica RM2245 microtome. Sections (8–10 μ m) were dried onto slides at 37°C and, if required, stained with toluidine blue. Phenolic compounds were detected using 10% (w/v) ferric chloride for 30 min. Samples were viewed using Leica DMI4000B microscopy. Images were acquired with Leica DFC300 FX Digital Camera System and processed using Adobe Photoshop 6.0.

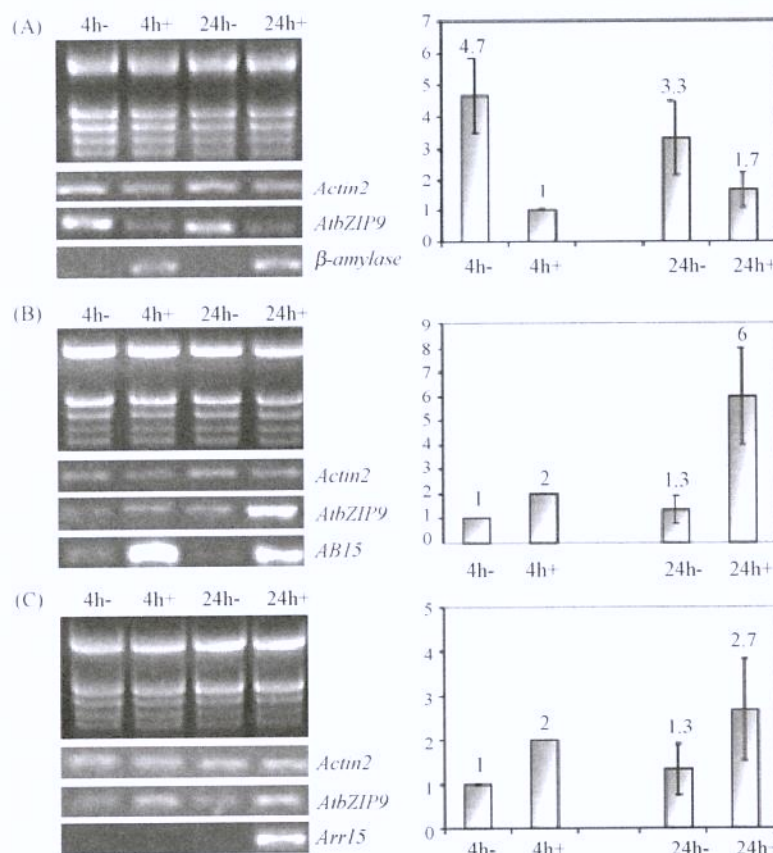


Fig. 2. Regulation of *AtbZIP9* expression. Five days old seedlings grown on liquid half-strength Murashine and Skoog medium were exposed to 2% glucose (A); 100 μ M ABA (B) and 50 μ M cytokinin (C) for 4 (4 h+) and 24 h (24 h+). For each treatment, untreated controls were obtained (4 h-; 24 h-). Integrity of total RNA (3 μ g) was verified by denaturing agarose gel analysis (left raw upper part in A, B and C). RT-PCR products of *AtbZIP9*, *Actin2*, and treatment-control genes, β -*amilase* for glucose treatment, *ABI5* for ABA treatment and *Arr15* for cytokinin treatment are shown. *Actin2* was used as control for normalization of cDNA amount. The linear phase of the exponential PCR reaction was corroborated for each gene (data not shown). For each treatment, a relative quantification was realized by serial dilutions of the PCR products and the means of three experiments are shown in the graphics on the right (bars represent standard deviation of the mean).

2.8. *In situ* mRNA localization

Influorescences were fixed in 4% *p*-formaldehyde, 10 mM dithiothreitol, 1× PBS buffer for 16 h. The material was dehydrated, infiltrated and paraffin-embedded. T7 polymerase and DIG were used to synthesise digoxigenin-labelled antisense and sense riboprobes according to manufacturer's instructions (Boehringer Mannheim). Sections (8–10 μm) were hybridized with antisense and sense RNA probes. Sense and antisense RNA probes were made using the entire 855 bp cDNA (Access number AF310223) cloned into *Hind*III-*Eco*RI sites of pUC18 and pBKS.

3. Results and discussion

3.1. Expression of *AtbZIP9*

Six independent transgenic lines homozygous for the Pro*AtbZIP9*-GUS constructs inserted at one locus showed a consistent expression pattern of GUS restricted to the vascular system of all organs: roots, hypocotyl, cotyledon, leaf, flowers and siliques (Fig. 1A and results not shown). *In situ* mRNA hybridization showed that the *AtbZIP9* mRNA accumulated in the central vasculature region (Fig. 1B) indicating that the promoter sequence was sufficient to reproduce the *in vivo* *AtbZIP9* mRNA expression profile. In roots, GUS activity was detected in phloem and pericycle cells at the phloem pole, defining a bilateral symmetry (Fig. 1C). In addition, GUS expression was also evident in the differentiation and elongation meristematic zone of the root vascular cylinder (Fig. 1E), suggesting that *AtbZIP9* possibly has a role in phloem development. This observation is consistent with the presence of β-glucuronidase activity in undifferentiated procambium cells of maturing embryos (Fig. 1D). GUS activity was also detected in the phloem of leaves and inflorescence stem (data not shown). Phloem expression of *AtbZIP9* described here is in agreement with recent *Arabidopsis* phloem transcriptome data [21] and *in situ* detection of *AtbZIP9*-GFP fusions [22]. The regulation of *AtbZIP9* expression in response to different hormones was investigated. Auxin, ethylene, gibberellic acid and jasmonic acid did not alter *AtbZIP9* mRNA abundance. However, we showed that during a 4-h interval, *AtbZIP9* expression was repressed by glucose and induced by abscisic acid (ABA) and cytokinin (Fig. 2). Based on these data, we suggest that *AtbZIP9* could possibly participate in glucose, ABA and cytokinin signaling to control some aspect of development and/or physiology of the phloem.

3.2. Changing the expression level of *AtbZIP9* does not affect plant development

To further investigate the function of *AtbZIP9*, we analyzed a T-DNA insertion knockout null mutant (*atbzip9-1*, Fig. 3A) and a transgenic line overexpressing the *AtbZIP9* mRNA from the CaMV 35S promoter (35S-*AtbZIP9*) (Fig. 3B). Comparative analysis of growth and development under standard conditions did not reveal any detectable phenotypic difference

between the *Atbzip9-1* null mutant, 35S-*AtbZIP9* and wild-type plants (Fig. 3C). Alterations of the nitrogen or carbon supply, dark/light regime and temperature stresses also failed to reveal any clear effect of *AtbZIP9* on *Arabidopsis* life cycle. Based on its expression pattern we suggest that *AtbZIP9* could be involved in phloem development. This prompted us to perform a comparative analysis of root vascular system anatomy between *atbzip9-1* knockout mutant, 35S-*AtbZIP9* and wild-type plants. Root vascular cylinder structure was found to be quite similar in the three genotypes (Fig. 3D), suggesting that *AtbZIP9* is apparently not essential for phloem development. The lack of any clear effect of overexpressing *AtbZIP9* mRNA on plant development may be interpreted as reflecting post-transcriptional regulation of *AtbZIP9* gene expression. Moreover, the lack of impact of *AtbZIP9* null allele on plant development may be a consequence of functional redundancy among members of group C bZIPs. The presence of GUS activity in the vascular cylinder of *AtbZIP10* and *AtbZIP63* promoter Gus reporter lines (data not shown) is consistent with this hypothesis.

3.3. The VP16-*AtbZIP9* fusion protein promotes alteration of leaf and vascular strand development

In order to overcome the possible redundancy existing among group C bZIPs [23], and to obtain functional cues for

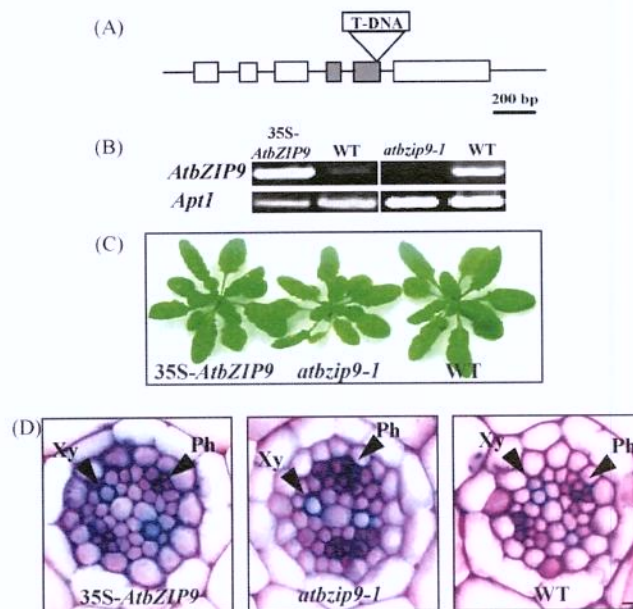


Fig. 3. Characterization of transgenic plants expressing different levels of *AtbZIP9*. (A) Schematic representation of the exon-intron structure of the *AtbZIP9* gene. Boxes represent exons, lines introns and gray boxes indicate the exons encoding the bZIP DNA-binding domain of *AtbZIP9*. The T-DNA is inserted at the end of *AtbZIP9* exon 5 (Syngenta line 569C12). The T-DNA insert is not drawn to scale. (B) Semi-quantitative RT-PCR analysis of *AtbZIP9* gene expression in transgenic plants homozygous for one locus of the *AtbZIP9* cDNA under the control of CaMV 35S promoter (35S-*AtbZIP9*), in a T-DNA knockout null mutant (*atbzip9-1*) and in the wild type (WT). (C) Growth and development and (D) vascular cylinder anatomy were compared in the different genotypes and no detectable phenotypic differences were observed between them. Ph: phloem; Xy: xylem. Scale bar represents 4 μm.

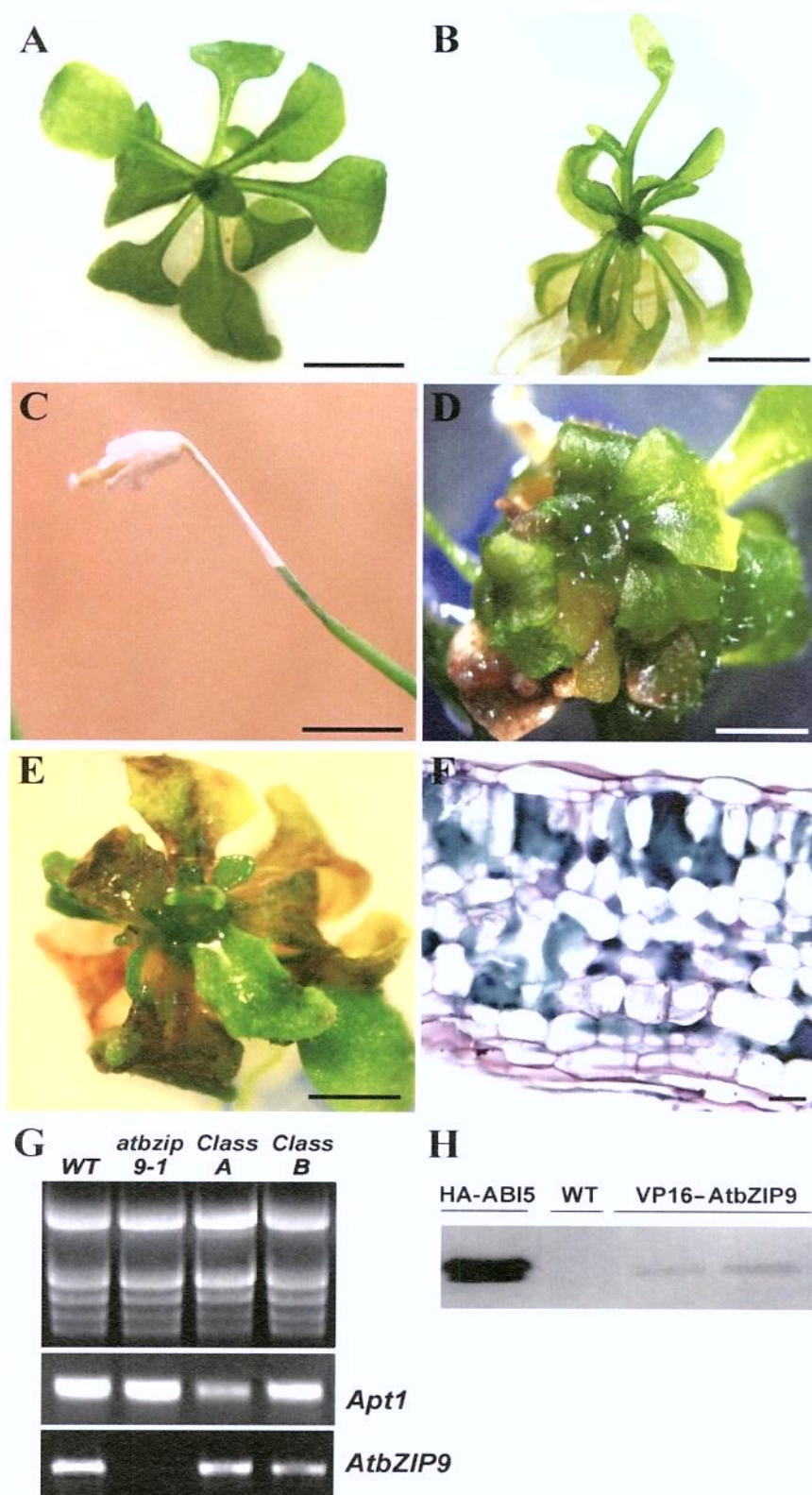


Fig. 4. Characterization of a constitutive activator allele of *AtbZIP9* (VP16-*AtbZIP9*). (A–F) Phenotypic alterations of VP16-*AtbZIP9* transgenic plants. (A) Wild-type plant 15 days after germination. (B) Representative plant of Class A primary transformants which has been grown for 25 days after germination. (C) Dried inflorescence of a class A transformant. (D and E) Representative plants of Class B primary transformants which have been grown for 25 days after germination. (F) Transversal section of Class B leaf stained with toluidine blue, showing increased phenolic compound (green colour) deposition within and between cells. Scale bars: A and B: 0.6 cm; C and D: 2 mm; F: 80 μm. G. Semi-quantitative RT-PCR analysis of VP16-*AtbZIP9* expression in plants grown for 30 days after germination. These plants were cultivated on solid half-strength Murashine and Skoog medium (MS/2) with 0.5% (w/v) sucrose. (H) Detection of HA-VP16-ATBZIP9 fusion protein by Western blot. A transgenic line expressing a fusion between the hemagglutinin tag and the cDNA sequence of *ABI5* gene (HA-*ABI5*) was used as a positive control.

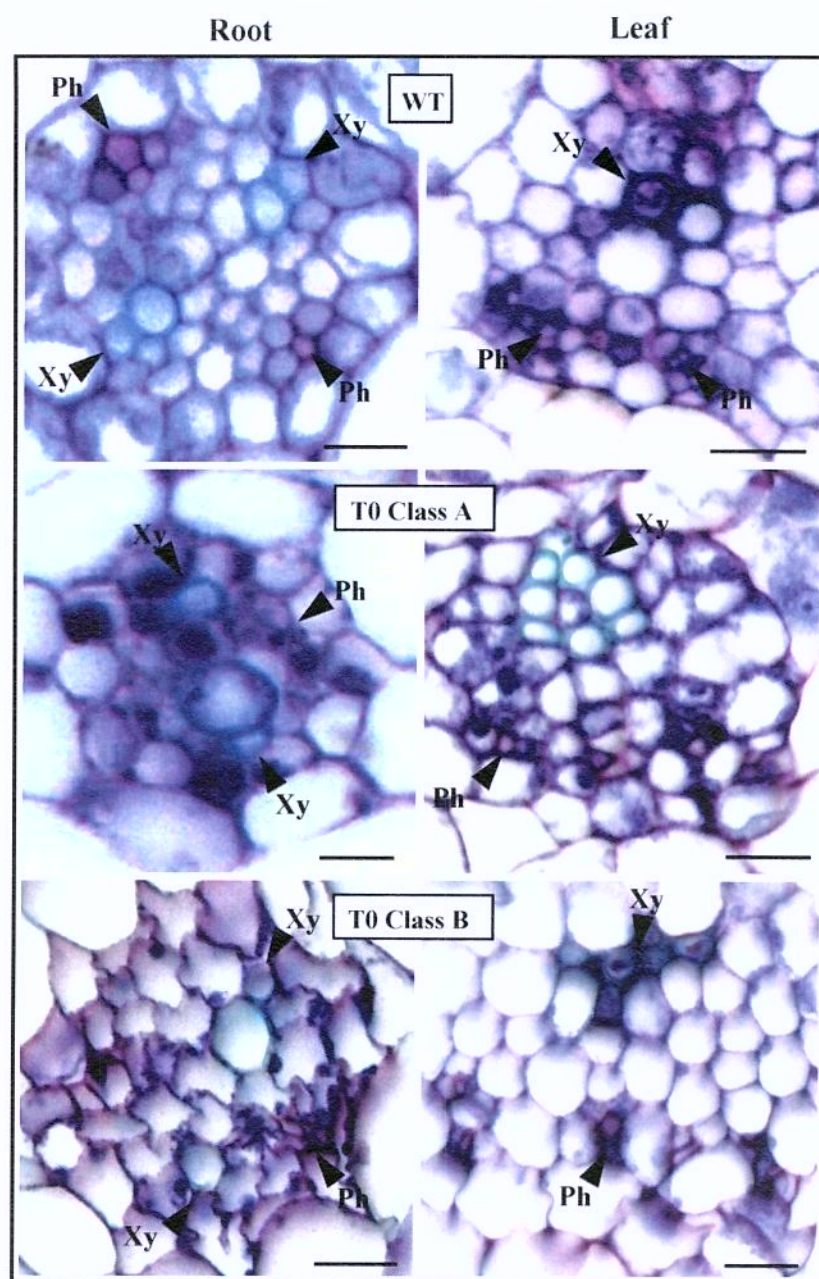


Fig. 5. Comparative analyze of root and leaf vascular anatomy in transformed (T0) VP16-AtbZIP9 and wild-type plants. Roots and leaves of both T0 classes show vascular cylinder disorganization. Phloem cells can hardly be visualized and their possible localizations are indicated. Ph: phloem; Xy: xylem. Scale bars: 30 μ M.

AtbZIP9, we generated Arabidopsis transgenic plants for a fusion between AtbZIP9 cDNA and the strong activation domain from the Herpes simplex virus VP16 protein, which is expressed from the native AtbZIP9 promoter sequence. Potentially, this new allele, named VP16-AtbZIP9, could constitutively activate AtbZIP9 target genes and possibly induce developmental and/or physiological changes which may be relevant to uncover some aspect of AtbZIP9 function. To

avoid any interference with the wild-type allele we transformed the *atbzip9-1* T-DNA insertion null mutant. From 400 *in vitro* grown VP16-AtbZIP9 primary transformants (T0), 280 (70%) displayed clear phenotypic modifications late in development, approximately after 8/10 leaves had emerged. We were unable to propagate these phenotypically altered T0 plants since they did not grow further after transplantation on to soil. Phenotypic modifications essentially concerned leaf development and

Wild type (WT) and VP16-AtbZIP9 plants were grown on solid MS/2 with 0.5% (w/v) sucrose for 15 days while HA-ABI5 were grown on liquid MS-2 with 0.5% (w/v) sucrose for 2 days after gremination. Fusion proteins were detected with an antibody against the HA tag from 20 μ g of total protein in the case of HA-ABI5, 25 μ g (left) and 30 μ g (right) for VP16-AtbZIP9. Expected sizes are 51 kDa for HA-ABI5 and 46 kDa for HA-VP16-ATBZIP9.

could be divided in two main classes. The first class (Class A, 20% (80) of the T0 plants), typically showed elongated and slightly chlorotic leaves with upward curling margins as compared to the wild type (Fig. 4A and B). Under *in vitro* sterile conditions, this class of T0 plants also produced inflorescences whose tips dried out before silique formation (Fig. 4C). The second class of phenotypic modifications (Class B, 50% (200) of the T0 plants) was characterized by atrophied plants that produced small and morphologically altered leaves when compared to the wild type (Fig. 4A, D and E). Leaf shape alterations ranged from deviations of wild-type morphology (elongated, heart-shaped, serrated and recorted) to highly deformed (Fig. 4D and E and data not shown). Most of these plants remained in the vegetative stage and did not produced inflorescences. In the leaves of this class of T0 plants, accumulation of brownish compounds and necrotic lesions were frequently observed (Fig. 4E). Leaf section treated with toluidine blue resulted in green staining (Fig. 4F) which suggest that the brownish compounds are phenolic metabolites [24]. This was further confirmed by black staining induced by ferric chloride treatment (data not shown [24]). These phenolic compounds accumulate within the cells as well as in the intracellular space (Fig. 4F). This accumulation may represent profound alterations in phenolic compound production and targeting in response to some physiological stress condition. Phenolic compounds have been shown to play an important role in resistance to biotic and abiotic stresses [25], to serve as signaling molecules [26], and to modulate the action of auxins [27]. None of the plants showed obvious root growth modifications. Analysis of RNA extracted from a representative sample of about 20 T0 plants of each of these two classes showed that the VP16-AtbZIP9 construct was expressed (Fig. 4G). Although we were able to detect the expression of the adenosine phosphoribosyl transferase control gene (*Apt1*) in the two classes of T0 plants, considering the drastic developmental alterations of these plants, further detailed analysis should be performed to establish any precise correlation between phenotypic changes observed and the level of VP16-AtbZIP9 expression. We also verified that the VP16-AtbZIP9 construct was functional since the HA::VP16::AtbZIP9 fusion protein was detected in a total protein extract obtained from a F1 population resulting from selfing of a T0 transformant which did not present any clear phenotypic alterations (Fig. 4H). The fact that control T0 plants for the VP16 activator domain expressed under the control of the strong CaMV 35S promoter did not cause any of the changes observed in the T0 VP16-AtbZIP9 plants ruled out the possibility of non-specific VP16 effects such as squelching. We therefore conclude that the observed changes on leaf development are related to the expression of the VP16-AtbZIP9 construct.

Since the *AtbZIP9* promoter regulatory sequences were found to dictate expression in the phloem, we anticipated that some alteration of phloem development might have occurred in T0 plants of both A and B classes. A comparative analysis of leaf and root cross sections was therefore carried out. The relative position of xylem and phloem within the vascular

tissues was found to be similar between the T0 plants of the two classes and the wild type, with a diarch and abaxial/adaxial pattern in root and leaf vasculature, respectively (Fig. 5). However, in class A and B plants, phloem cells were difficult to identify in leaf bundles and could hardly be detected at all in roots of these two classes of T0 plants when compared to the wild type (Fig. 5) possibly reflecting some alteration of phloem formation and phloem differentiation. Besides, we noticed that in Class B plants, the parenchyma layer in leaf vasculature was significantly more developed than in class A and wild-type genotypes (Fig. 5). Finally, in root vascular cylinder, cell shape was irregular and the cell arrangement was disordered indicating a possible alteration of the cell division pattern and cell wall formation (Fig. 5). It appears therefore, that the VP16-AtbZIP9 construct caused defects in the vascular development which was most clearly detected in the root. Despite of this problem, the apparent lack of a root growth defect *in vitro* may simply be explained by the nutrient-rich medium (MS/2 including sucrose) used to cultivate the T0 individuals and could help explain our inability to grow the T0 plants in soil. We suspect that the developmental modifications observed in the T0 plants may be a consequence of changes in vascular tissue's functional properties. Long distance transport through the xylem and phloem of nutritional resources, hormones, or macromolecular regulatory signals (RNAs and proteins) play an important role in the regulation of plant development [28]. The identification of *AtbZIP9* target genes will be essential to integrate *AtbZIP9* in the regulatory network of phloem development.

Acknowledgements

We thank V. Pautot and H. Morin (Cellular Biology Lab, INRA-Versailles, France) for assistance during the development of *in situ* mRNA localization, F. Parcy (Laboratoire de physiologie cellulaire végétale UMR5168 17, Grenoble, France) for providing PFP100, PFP101HAVP16 vectors and Arabidopsis transgenic lines expressing the 35S::HA::ABI5 and J.L. Argueso for English corrections (Departamento de Genética e Evolução-IB, Unicamp). This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

- [1] M. Jakoby, B. Weisshaar, W. Droge-Laser, J. Vicente-Carbajosa, J. Tiedemann, T. Kroj, F. Parcy, bZIP transcription factors in Arabidopsis, *Trends Plant Sci.* 7 (2002) 106–111.
- [2] M. Vincentz, C. Bandeira-Kobarg, L. Gauer, P. Schlogl, A. Leite, Evolutionary pattern of angiosperm bZIP factors homologous to the maize Opaque2 regulatory protein, *J. Mol. Evol.* 56 (2003) 105–116.
- [3] P. Ciceri, F. Locatelli, A. Genga, A. Viotti, R.J. Schmidt, The activity of the maize Opaque2 transcriptional activator is regulated diurnally, *Plant Physiol.* 121 (1999) 1321–1328.
- [4] B.G. Hunter, M.K. Beatty, G.W. Singletary, B.R. Hamaker, B.P. Dilkes, B.A. Larkins, R. Jung, Maize opaque endosperm mutations create extensive changes in patterns of gene expression, *Plant Cell* 14 (2002) 2591–2612.

- [5] P. Lara, L. Ònate-Sánchez, Z. Abraham, C. Ferrándiz, I. Díaz, P. Carbonero, J. Vicente-Carbajosa, Synergistic activation of seed storage protein gene expression in Arabidopsis by ABI3 and two bZIPs related to Opaque2, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 21003–21011.
- [6] H. Kaminaka, C. Näke, P. Eppe, J. Dittgen, K. Schütze, C. Chaban, B.F. Holt III, T. Merkle, E. Schäfer, K. Harter, J.L. Dangl, bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in Arabidopsis following infection, *EMBO J.* 25 (2006) 4400–4411.
- [7] T. Heinekamp, A. Strathmann, M. Kuhlmann, M. Froissard, A. Muller, C. Perrot-Rechenmann, W. Droge-Laser, The tobacco bZIP transcription factor BZI-1 binds the GH3 promoter in vivo and modulates auxin-induced transcription, *Plant J.* 38 (2004) 298–309.
- [8] M. Kuhlmann, K. Horvay, A. Strathmann, T. Heinekamp, U. Fischer, S. Bottner, W. Droge-Laser, The alpha-helical D1 domain of the tobacco bZIP transcription factor BZI-1 interacts with the ankyrin-repeat protein ANK1 and is important for BZI-1 function, both in auxin signaling and pathogen response, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 8786–8794.
- [9] F. Weltmeier, A. Ehlert, C.S. Mayer, K. Dietrich, X. Wang, K. Schütze, R. Alonso, K. Harter, J. Vicente-Carbajosa, W. Droge-Laser, Combinatorial control of Arabidopsis proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors, *EMBO J.* 25 (2006) 3133–3143.
- [10] A. Ehlert, F. Weltmeier, X. Wang, C.S. Mayer, S. Smekens, J. Vicente-Carbajosa, W. Droge-Laser, Two-hybrid protein–protein interaction analysis in Arabidopsis protoplasts: establishment of a heterodimerization map of group C and group S bZIP transcription factors, *Plant J.* 46 (2006) 890–900.
- [11] T. Murashige, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant* 15 (1962) 473–497.
- [12] A. Sessions, E. Burke, G. Presting, G. Aux, J. McElver, D. Patton, B. Dietrich, P. Ho, J. Bacwaden, C. Ko, J.D. Clarke, D. Cotton, D. Bullis, J. Snell, T. Miguel, D. Hutchison, B. Kimmerly, T. Mitzel, F. Katagiri, J. Glazebrook, M. Law, S.A. Goff, A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system, *Plant Cell* 14 (2002) 2985–2994.
- [13] S. Bensmihen, A. To, G. Lambert, T. Kroj, J. Giraudat, F. Parcy, Analysis of an activated *ABI5* allele using a new selection method for transgenic *Arabidopsis* seeds, *FEBS Lett.* 561 (2004) 127–131.
- [14] R.A. Jefferson, Assaying chimeric genes in plants: the GUS fusion system, *Plant Mol. Biol. Rep.* 5 (1987) 387–405.
- [15] C. Yanisch-Perron, J. Vieira, J. Messing, Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors, *Gene* 33 (1985) 103–119.
- [16] R. Topfer, V. Matzeit, B. Gronenborn, J. Schell, H.H. Steinbiss, A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions, *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 5890.
- [17] J.M. Short, J.M. Fernandez, J.A. Sorge, W.D. Huse, Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 7583–7600.
- [18] N. Bechtold, J. Ellis, G. Pelletier, In planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants, *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sci.* 316 (1993) 1194–1199.
- [19] C. Koncz, J. Schell, The promoter TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium vector, *Mol. Gen. Genet.* 204 (1986) 383–396.
- [20] J. Logemann, J. Schell, L. Willmitzer, Improved method for the isolation of RNA from plant tissues, *Anal. Biochem.* 163 (1987) 16–20.
- [21] C. Zhao, J.C. Craig, H.E. Petzold, A.W. Dickerman, E.P. Beers, The Xylem and Phloem transcriptomes from secondary tissues of the Arabidopsis root-hypocotyl, *Plant Physiol.* 138 (2005) 803–818.
- [22] J.Y. Lee, J. Colinas, J.Y. Wang, D. Mace, U. Ohler, P.N. Benfey, Transcriptional and posttranscriptional regulation of transcription factor expression in Arabidopsis roots, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 6055–6060.
- [23] J.Z. Zhang, Overexpression analysis of plant transcription factors, *Curr. Opin. Plant Biol.* 6 (2003) 430–440.
- [24] M. Ling-Lee, G.A. Chilvers, A.E. Ashford, A histochemical study of phenolic materials in mycorrhizal and uninfected roots of eucalyptus fastigata Deane and Maiden, *New Phytologist* 78 (1977) 313–328.
- [25] E. Siranidou, Z. Kang, H. Buchnauer, Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defense responses in wheat cultivars differing in resistance to Fusarium Head blight, *J. Phytopathol.* 150 (2002) 200–208.
- [26] R.A. Dixon, N.L. Paiva, Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *Plant Cell* 7 (1995) 1085–1097.
- [27] R. Volpert, W. Osswald, E.F. Elstner, Effects of cinnamic acid derivatives on indole acetic acid oxidation by peroxidase, *Phytochemistry* 38 (1995) 19–22.
- [28] T.J. Lough, W.J. Lucas, Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking, *Annu. Rev. Plant Biol.* 57 (2006) 203–232.

DECLARAÇÃO

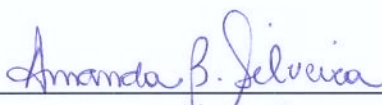
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de mestrado intitulada *Análise funcional do regulador de transcrição do tipo bZIP AtbZIP9 de Arabidopsis thaliana* através da superexpressão de seus genes alvos:

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

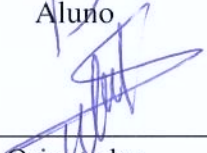
(X) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº 2003/01), intitulado “Análise funcional de fatores de regulação da transcrição do tipo bZIP de angiospermas”

() tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº _____).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).



Aluno



Orientador

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Nome:

Função: