

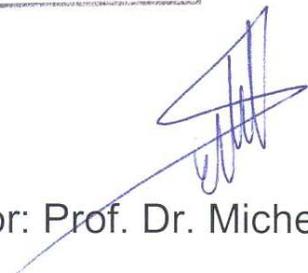
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Juarez Pires Tomaz

“ENVOLVIMENTO DOS QUATRO GENES bZIP<sub>s</sub> DO GRUPO C DE *Arabidopsis thaliana* NA SINALIZACAO POR GLICOSE, MANOSE E ABA”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) JUAREZ PIRES TOMAZ e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

  
Orientador: Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz

Campinas  
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

<b>T591a</b>	Tomaz, Juarez Pires Análise funcional detalhada dos quatro genes bZIPs do Grupo C de Arabidopsis thaliana homólogos ao regulador Opaco-2 do milho / Juarez Pires Tomaz. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.
	Orientador: Michel Georges Albert Vincentz. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	1. Glicose. 2. Manose. 3. ABA. 4. bZIP. 5. Sinalização em planta. I. Vincentz, Michel Georges Albert. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
	(scs/ib)

**Título em inglês:** Fuctional analysis of the Arabidopsis Group C bZIPs homologous to the maize Opaque-2 regulator.

**Palavras-chave em inglês:** Glucose; Mannose; ABA; bZIP; Plant signaling.

**Área de concentração:** Genética Vegetal e Melhoramento.

**Titulação:** Doutor em Genética e Biologia Molecular.

**Banca examinadora:** Michel Georges Albert Vincentz, Jose Andrés Yunes, Alessandra Alves de Souza, Marcio Alves-Ferreira, Marie Anne Van Sluys.

**Data da defesa:** 15/02/2008.

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 15 de fevereiro de 2008.

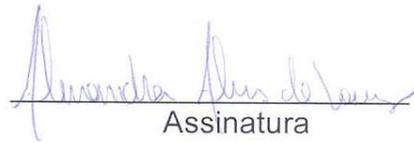
Banca Examinadora

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz (Orientador)



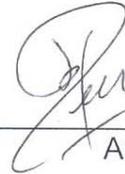
Assinatura

Profa. Dra. Alessandra Alves de Souza



Assinatura

Prof. Dr. José Andrés Yunes



Assinatura

Profa. Dra. Marie Anne van Sluys



Assinatura

Prof. Dr. Marcio Alves-Ferreira



Assinatura

Prof. Dr. Marcio de Castro Silva Filho

---

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira

---

Assinatura

Prof (a). Dr (a). Anete Pereira de Souza

---

Assinatura

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por tudo que tem feito por mim e especialmente pela oportunidade ímpar de cursar uma pós-graduação.

À minha família, especialmente aos meus pais, que me apoiou em todos os sentidos possíveis e foram a base para eu chegar até aqui. Muitíssimo obrigado.

Ao meu orientador, Dr. Michel Vincentz. A bagagem científica que eu trouxe quando cheguei a anos atrás certamente é bem inferior à que eu tenho hoje, graças a você. Você me ajudou a desenvolver senso crítico e me deu noções básicas de ciência, sendo assim, adicionou muito mesmo à minha formação profissional. Muito obrigado.

Aos membros da banca, Dr. Márcio Alves-Ferreira, Dra. Marie Anne van Sluys, Dr. José Andrés Yunes e Dra. Alessandra Alves de Souza, pela prontidão em responder ao convite e pelas contribuições, que certamente serão de grande valia para a elaboração do texto fina da tese.

Aos meus amigos Paulo, Débora e Paulinha, que tiveram que me “aturar” nos momentos difíceis. Considero vocês uma família – a família de Campinas. Muito obrigado.

Aos meus colegas de laboratório do CBMEG – Diana (especialmente você), Dudu, Amanda, Zé Pedro, Daniela, Aline, Luana – e do laboratório do Hemocentro - Melissa, Daiane, Rosana e Andressa – por tornarem o dia-a-dia mais divertido e pelo apoio (de toda natureza possível) que me deram.

Aos alunos que foram meus estagiários: Denise, Maria, Paulo Navas, Paulo César e Talita, por me ajudarem e por serem minhas “cobaias”. Aprendi muito com vocês.

À Sandra Martins por toda ajuda com o cultivo das plantas e com a confecção de material para a rotina do laboratório.

À Tânia, Sandra e Andressa da secretaria do CBMEG por todos os galhos quebrados.

Aos meus amigos do CBMEG: *cluster* Humanas: Fernanda; *cluster* Anete: Prianda, Letícia, Tatiana, Adna, Tiago, Melissa; *cluster* Laura: Daniele, Fernanda, Daniela, Leandro, Camila; *cluster* Mano: Sandra, Michele, Edna. Se acaso esqueci alguém me perdoe, mas saiba que sou grato a todos vocês pela amizade.

Ao Dr. Celso Eduardo Benedetti e à Dra. Mirian Maluf Perez pela colaboração na pré-banca.

A Unicamp e ao CNPq, pelo apoio estrutural, científico e financeiro.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIACÕES .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	xi
RESUMO .....	12
ABSTRACT .....	13
INTRODUÇÃO	
Regulação da expressão gênica em eucariotos .....	14
Os elementos <i>cis</i> de DNA e os elementos <i>trans</i> .....	15
Os fatores de transcrição do tipo <i>basic leucine zipper</i> (bZIP) .....	19
<i>Opaco-2</i> , um fator de transcrição do tipo bZIP do milho .....	22
Os bZIPs do Grupo C de <i>A. thaliana</i> homólogos a <i>O2</i> do milho .....	22
Regulação da expressão gênica por glicose e sua relação com ABA e etileno .....	26
ABI4, um elemento da via de sinalização do ABA e da reposta a glicose .....	32
ABI5, elemento da via de sinalização de ABA .....	34
OBJETIVOS	
Objetivo geral .....	36
Objetivos específicos .....	36
MATERIAL E MÉTODOS	
Material vegetal e condições de cultivo .....	37
Isolamento e análise do RNA total por RT-PCR semiquantitativa .....	39
PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR) .....	43
Análise estatística .....	45
Fusão traducional da seqüência promotora de <i>AtbZIP63</i> e da região 5'-UTR ao gene marcador <i>gusA</i> .....	45
Extração e análise do DNA genômico .....	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO	
A expressão dos genes do Grupo C é regulada por açúcares e ABA .....	49
A repressão de <i>AtbZIP63</i> por manose sugere o envolvimento de HKX1 como sensor na repressão de <i>AtbZIP63</i> por glicose. Manose aparentemente atua independentemente de glicose na repressão de <i>AtbZIP25</i> .....	59
As repressões de <i>AtbZIP9</i> por glicose e de <i>AtbZIP63</i> por glicose e manose não envolvem HXK1 .....	60
As respostas de <i>AtbZIP25</i> a manose e de <i>AtbZIP63</i> a glicose requerem uma via de síntese de ABA funcional .....	65
ABI4 atua na repressão de <i>AtbZIP63</i> por ABA e glicose e de <i>AtbZIP25</i> por manose .....	68
ABI5 está envolvido na repressão de <i>AtbZIP63</i> por ABA e por glicose e na indução de <i>AtbZIP25</i> por glicose .....	71
Os modelos das vias de regulação por ABA, glicose e manose dos genes bZIPs do Grupo C de <i>Arabidopsis</i> .....	74
ABA e glicose apresentam efeito sinérgico sobre a repressão de <i>AtbZIP63</i> ..	76

CONCLUSÕES .....	83
PERSPECTIVAS .....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	87

## LISTA DE ABREVIÇÕES

2,4D	ácido 2,4 diclorofenoxiacético
3-M-G	3-O-metilgliucose
AAO3	gene <i>AAO3</i>
ABA	ácido abscísico
<i>ABA1</i>	gene <i>ABA1</i>
<i>aba1-1</i>	mutante <i>aba1-1</i>
<i>ABA2</i>	gene <i>ABA2</i>
<i>ABA2</i>	proteína <i>ABA2</i>
<i>aba2-1</i>	mutante <i>aba2-1</i>
<i>ABA3</i>	gene <i>ABA3</i>
<i>ABF</i>	<i>ABRE binding factor</i>
<i>ABI1</i>	gene <i>ABA-insensitive 1</i>
<i>ABI2</i>	gene <i>ABA-insensitive 2</i>
<i>ABI3</i>	gene <i>ABA-insensitive 3</i>
<i>ABI4</i>	gene <i>ABA-insensitive 4</i>
<i>ABI4</i>	proteína <i>ABI4</i>
<i>abi4-1</i>	mutante <i>abi4-1</i>
<i>ABI5</i>	gene <i>ABA-insensitive 5</i>
<i>ABI5</i>	proteína <i>ABI5</i>
<i>abi5-1</i>	mutante <i>abi5-1</i>
<i>ABI8</i>	proteína <i>ABI8</i>
<i>ACPC</i>	<i>1-aminocyclopropano-1-carboxylic acid</i>
<i>Actin2</i>	gene <i>Actin2</i>
<i>AP2</i>	<i>Apetala2</i>
<i>ApL3</i>	gene <i>ApL3</i>
<i>Apt1</i>	gene <i>Apt1</i>
<i>AREB</i>	<i>ABA responsive element-binding</i>
<i>ARF</i>	<i>auxin response factors</i>
<i>Arr15</i>	gene <i>Arr15</i>
<i>AtbZIP9</i>	gene <i>AtbZIP9</i>
<i>atbzip9-1</i>	alelo nulo do gene <i>AtbZIP9</i>
<i>AtbZIP1</i>	gene <i>AtbZIP1</i>
<i>AtbZIP2</i>	gene <i>AtbZIP2</i>
<i>AtbZIP3</i>	gene <i>AtbZIP3</i>
<i>AtbZIP8</i>	gene <i>AtbZIP8</i>
<i>AtbZIP10</i>	gene <i>AtbZIP10</i>
<i>AtbZIP11</i>	gene <i>AtbZIP11</i>
<i>AtbZIP25</i>	gene <i>AtbZIP25</i>
<i>AtbZIP39</i>	gene <i>AtbZIP39</i>
<i>AtbZIP41</i>	gene <i>AtbZIP41</i>
<i>AtbZIP44</i>	gene <i>AtbZIP44</i>
<i>AtbZIP53</i>	gene <i>AtbZIP53</i>
<i>AtbZIP63</i>	gene <i>AtbZIP63</i>
<i>AtGA2ox</i>	gene <i>AtGA2ox</i>
<i>ATRGs1</i>	proteína G <i>ATRGs1</i>

bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
BZI-1	gene <i>BZI-1</i> do tabaco
BZI-1	proteína BZI-1 do tabaco
bZIP	<i>basic-leucine zipper</i>
Bzo2h	<i>basic leucine zipper O2 homologous</i>
CAA	gene <i>CAA</i>
CAB2	gene <i>CAB2</i>
CBF	<i>CCAAT-binding factor</i>
cDNA	DNA complementar
Col-0	<i>A. thaliana</i> ecótipo Columbia-0
CTR	<i>constitutive triple response</i>
<i>ctr1-1</i>	mutante <i>ctr1-1</i>
DAE	dias após a estratificação
DNA	DNA, ou ácido desoxirribonucléico
DOF	<i>DNA binding with one finger</i>
<i>DREB1</i>	gene <i>Dehydration Responsive Elements Binding1</i>
<i>DREB2</i>	gene <i>Dehydration Responsive Elements Binding1</i>
<i>ein</i>	<i>ethylene insensitive</i>
<i>ein3-1</i>	mutante <i>ein3-1</i>
<i>ERD1</i>	gene <i>early responsiveto dehydration stress 1</i>
EREBP	<i>ethylene responsive element binding protein</i>
<i>Erf1</i>	gene <i>Erf1</i>
<i>etr1-1</i>	mutante <i>etr1-1</i>
GA3	ácido giberélico
<i>GBF1</i>	gene <i>GBF1</i> , correspondente a <i>AtbZIP41</i>
<i>gcr</i>	<i>G protein coupled receptor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
<i>ghs</i>	<i>glucose hypersensitive</i>
<i>gin</i>	<i>glucose-insensitive</i>
<i>gin2-1</i>	mutante <i>gin2-1</i>
GUS	enzima $\beta$ -glucoronidase de <i>Escherichia coli</i>
<i>gusA</i>	gene $\beta$ -glucoronidase de <i>Escherichia coli</i>
HDZF	<i>homeodomain zinc finger</i>
<i>hys</i>	<i>hypersenescence</i>
<i>laa19</i>	gene <i>laa19</i>
KIN10	quinase KIN10
HXK	hexoquinase
<i>isi</i>	<i>impaired sucrose induction</i>
KEG	ligase E3 KEEP ON GOING
LEA	<i>late embryogenesis abundant</i>
Ler	<i>A. thaliana</i> ecótipo Landsberg erecta
LSD1	<i>lesions simulating disease resistance1</i>
M-6-P	manose-6-fosfato
MeJa	metil jasmonato
miRNA	micro RNA
mRNA	RNA mensageiro
<i>NCED3</i>	gene <i>NCED3</i>

ncRNA	<i>non-coding RNA</i> ou RNA não codificante
O2	gene <i>Opaco-2</i>
O2	proteína OPACO-2
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDF1.2	gene <i>PDF1.2</i>
PoGO	possível grupo de ortólogos
<i>ProDH</i>	gene da <i>prolina desidrogenase</i>
<i>RD29A</i>	gene <i>RD29A</i>
<i>RD29B</i>	gene <i>RD29B</i>
RPT5B	partícula 19S da subunidade proteossômica
RT-PCR	<i>reverse transcriptase PCR</i> ou PCR semiquantitativa
RT-qPCR	PCR em Tempo Real
siRNA	RNA de interferência
<i>sis</i>	<i>sugar-insensitive</i>
SnRK1	<i>Snf1-related kinase</i>
<i>sun6</i>	<i>sucrose uncoupled 6</i>
T-DNA	DNA de transferência de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
TFIIA	fator de transcrição basal tipo TFIIA
TFIIB	fator de transcrição basal tipo TFIIB
TFIID	fator de transcrição basal tipo TFIID
TFIIE	fator de transcrição basal tipo TFIIE
TFIIF	fator de transcrição basal tipo TFIIF
TFIIH	fator de transcrição basal tipo TFIIH
VHA-B1	<i>vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase B1</i>
Ws	<i>A. thaliana</i> ecótipo Wassilewskija
<i>Xtr-7</i>	gene <i>Xtr-7</i>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema geral dos elementos <i>cis</i> de DNA e <i>trans</i> envolvidos na iniciação da transcrição. ....	17
<b>Figura 2.</b> Participação de fatores de transcrição de diversas famílias e suas interações na regulação de genes responsivos a estresses em <i>A. thaliana</i> . ...	19
<b>Figura 3.</b> Representação do domínio bZIP de um fator de transcrição, formado de duas $\alpha$ -hélices, representando o domínio bZIP de um homodímero. ....	20
<b>Figura 4.</b> Modelo das interações genéticas entre a via de sinalização de glicose e de hormônios. ....	29
<b>Figura 5.</b> Regulação da expressão dos genes bZIPs do Grupo C de <i>A. thaliana</i> . ....	50
<b>Figura 6.</b> Sensibilidade da resposta de <i>AtbZIP9</i> e <i>AtbZIP63</i> a glicose. ....	51
<b>Figura 7.</b> Efeito de ABA e glicose sobre a expressão dos genes dos reguladores bZIPs do Grupo C de <i>A. thaliana</i> . ....	53
<b>Figura 8.</b> Padrão de expressão dos bZIPs do Grupo C de <i>A. thaliana</i> nos mutantes <i>ctr1-1</i> , <i>ein3-1</i> e <i>etr1-1</i> . ....	55
<b>Figura 9.</b> Modelo idealizado do metabolismo dos análogos de açúcar. ....	57
<b>Figura 10.</b> Regulação de <i>AtbZIP9</i> , <i>AtbZIP25</i> e <i>AtbZIP63</i> em resposta a análogos de glicose. ....	57
<b>Figura 11.</b> Fenótipo <i>glucose-insensitive (gin)</i> dos mutantes <i>gin2-1</i> , <i>aba2-1</i> , <i>abi4-1</i> e <i>abi5-1</i> em comparação aos respectivos genótipos selvagens. ....	61
<b>Figura 12.</b> A resposta a glicose e a manose dos genes bZIPs pertencentes ao Grupo C de Arabidopsis é independente de <i>hexokinase1</i> (HXK1). ....	63
<b>Figura 13.</b> As respostas a glicose e a manose dos genes bZIPs pertencentes ao Grupo C de Arabidopsis é independente de <i>hexokinase1</i> (HXK1). ....	64
<b>Figura 14.</b> A resposta de <i>AtbZIP25</i> a manose e de <i>AtbZIP63</i> a glicose envolvem uma via de sinalização dependente de ABA. ....	67
<b>Figura 15.</b> ABI4 antagoniza a resposta de <i>AtbZIP63</i> a ABA e a glicose e está envolvido na repressão de <i>AtbZIP25</i> por manose. ....	70
<b>Figura 16.</b> Expressão de <i>ABI4</i> e <i>ABI5</i> no mutante <i>aba2-1</i> . ....	71

<b>Figura 17.</b> ABI5 está envolvido na resposta de <i>AtbZIP63</i> a ABA e a glicose e na indução de <i>AtbZIP25</i> por glicose no ecótipo <i>Ws</i> . .....	73
<b>Figura 18.</b> A expressão de <i>AtbZIP9</i> é reprimida por glicose por uma via independente de HXK1, ABA2 e ABI4. ....	75
<b>Figura 19.</b> <i>AtbZIP25</i> é induzido por glicose e reprimido por manose. ....	75
<b>Figura 20.</b> <i>AtbZIP63</i> é reprimido tanto por ABA, glicose e manose. ....	76
<b>Figura 21.</b> Regulação dos bZIPs do Grupo C de <i>Arabidopsis</i> pela combinação de ABA, glicose e manose. ....	78
<b>Figura 22.</b> Modelo para a interação das vias de sinalização de ABA, glicose e manose sobre a expressão dos bZIPs do Grupo C. ....	82

## RESUMO

Na planta modelo eudicotiledónea *A. thaliana* quatro genes para fatores de transcrição do tipo bZIP que são homólogos a *Opaco-2* (*O2*) do milho, uma monocotiledónea, foram identificados. *O2* é um regulador chave do metabolismo coordenado de carbono e nitrogênio e da síntese de prolaminas de reserva durante o desenvolvimento da semente. Estes quatro genes, *AtbZIP9*, o par de parálogos *AtbZIP10* e *AtbZIP25*, e *AtbZIP63*, o provável ortólogo de *O2*, formam o Grupo C de genes bZIP de Arabidopsis. Sabe-se que *AtbZIP9* provavelmente desempenhe um papel no processo de desenvolvimento do floema, *AtbZIP10* está associado com a resposta à estresses, além de, junto com *AtbZIP25*, participar na regulação de genes de proteínas de reserva na semente e que *AtbZIP63* pode estar envolvido com o balanço energético da planta. Para acrescentar novas informações relevantes sobre a função dos bZIPs do Grupo C e, a longo prazo, entender como a função de *O2* evoluiu em angiospermas, iniciou-se neste trabalho uma caracterização detalhada da regulação dos membros do Grupo C em resposta a diversos sinais hormonais e a açúcares. Mostramos que apenas as hexoses glicose e manose e o ácido abscísico (ABA) regulam de maneira transiente a expressão dos genes bZIP do Grupo C, sugerindo que eles representam intermediários mediando as respostas a estes sinais. A glicose reprime a expressão de *AtbZIP9* e de *AtbZIP63* e induz a expressão de *AtbZIP25*, ABA reprime a expressão de *AtbZIP63* e manose reprime a expressão de *AtbZIP25* e de *AtbZIP63*. Em Arabidopsis, a hexoquinase1 (HXK1) é um sensor da glicose que ativa a síntese e sensibilidade ao ABA para inibir o desenvolvimento da plântula em resposta a glicose. Reportamos aqui que as repressões em curto prazo de *AtbZIP9* e *AtbZIP63* por glicose e de *AtbZIP25* e *AtbZIP63* por manose estão mediadas por vias de sinalização independentes de HXK1 e envolvem elementos relacionados a ABA. *AtbZIP25* apresenta uma indução por glicose dependente de *ABI5* e repressão por manose dependente de *ABA2* e *ABI4*. A repressão de *AtbZIP63* por glicose envolve uma via dependente de *ABA2* e de *ABI5* que é reprimida por *ABI4*. Já a repressão de *AtbZIP63* por manose e de *AtbZIP9* por glicose estão inseridas em vias independentes de *ABA2*, *ABI4* e *ABI5*. A dependência diferencial de *ABI5* e de *ABI4* na regulação por glicose e manose de *AtbZIP25* e de *AtbZIP63*, permite inferir que ambas hexoses atuam através de vias de transdução distintas e enfatiza a importância de manose como sinal metabólico de regulação. Observou-se ainda que ação conjunta de ABA e glicose apresenta um efeito sinérgico na repressão de *AtbZIP63*, provavelmente refletindo regulações pós-transcricionais da expressão deste gene. Os dados sugerem que *AtbZIP63* representa um importante nó da comunicação entre a sinalização por ABA (estresse abiótico) e por glicose (nível energético) permitindo adequar eficientemente a resposta a estresse abiótico que seja compatível com o estado energético da organismo.

## ABSTRACT

In the model eudicot organism *A. thaliana* (Arabidopsis), four genes encoding bZIP transcription regulatory factors that are homologous to the maize *Opaque-2* (*O2*) locus were identified. *O2* is a key regulator of the carbon to nitrogen balance and of the prolamine type storage proteins synthesis during seed development. The Arabidopsis genes, *AtbZIP9*, the two paralogues *AtbZIP10* and *AtbZIP25* and *AtbZIP63*, the most probable *O2*-orthologue, together form group C bZIP genes. *AtbZIP9* is likely to be involved in phloem development while *AtbZIP10* is related to stress responses but is also required for the regulation of seed storage protein genes very much like *AtbZIP25*. Finally, *AtbZIP63* seems to be involved in the control of the energetic balance. In order to get new and relevant information about the role of the group C bZIP genes and consequently obtain new insight into the evolution of the *O2*-related functions in angiosperms, we initiated a detailed characterization of the regulation of group C members in response to hormonal signals and sugars. We show here that two hexoses, glucose and mannose as well as abscisic acid (ABA) are the only signals that transiently modulated the expression of group C bZIP genes, suggesting they are players in the response induced by these signals. While glucose is shown to repress the expression of *AtbZIP9* and *AtbZIP63* and to induce *AtbZIP25* expression ABA is able to repress the expression of *AtbZIP63* and mannose represses the expression of *AtbZIP25* and *AtbZIP63*. In Arabidopsis, hexokinase1 (HXK1) is a glucose sensor that may trigger abscisic acid (ABA) synthesis and sensitivity to mediate glucose-induced inhibition of seedling development. We report that the short term regulation of the expression of *AtbZIP9*, *AtbZIP63* by glucose and the repression of *AtbZIP25* and *AtbZIP63* by mannose are HXK1-independent and for *AtbZIP25* and *AtbZIP63*, these regulations partly rely on ABA synthesis. It also shown that the activation of *AtbZIP25* expression by glucose relies on *ABI5* while its repression by mannose appears to be *ABA2*- and *ABI4*-dependent. Glucose repression of *AtbZIP63* expression seems to involve an *ABA2*- and *ABI5*-dependent pathway which is repressed by *ABI4*. We also reveal that the regulations of *AtbZIP63* by mannose and of *AtbZIP9* by glucose do not require *ABA*, *ABI4* or *ABI5*. The differential dependence of glucose and manose-induced regulation of *AtbZIP63* and *AtbZIP25* expression for *ABI5* and *ABI4* indicates that both hexoses act through distinct transduction pathways and highlights the importance of mannose as a regulatory metabolite. A synergetic repression of *AtbZIP63* by ABA and glucose, which possibly reflects a post-transcriptional regulatory scheme of *AtbZIP63* expression, was uncovered. Together, the data suggests that *AtbZIP63* is a key nod of the ABA (abiotic stress) and glucose (energetic balance) crosstalk network allowing to efficiently adjust the response to abiotic stresses according to the energetic status of the organism.

## INTRODUÇÃO

### Regulação da expressão gênica em eucariotos

As diferenças que distinguem os vários tipos de células nos eucariotos são devidas principalmente à expressão diferencial de genes que codificam para proteínas, micro RNA (miRNA), RNA de interferência (siRNA) e RNA não codificante (ncRNA). Os processos de divisão celular e diferenciação são controlados por programas de expressão gênica regulados, atuando desde a formação do zigoto. Estes programas devem ser modulados por uma variedade de estímulos endógenos e exógenos para otimizar o crescimento e o desenvolvimento. A regulação da expressão gênica também é um passo crucial que permite a homeostasia do organismo. O termo “expressão gênica” refere-se ao processo em que um determinado gene é transcrito em um mRNA que codificará uma proteína, um miRNA ou um siRNA. A expressão gênica pode ser regulada em qualquer desses sete passos de controle potenciais: (1) estrutura da cromatina; (2) iniciação da transcrição; (3) processamento do transcrito primário; (4) transporte do mRNA para o citoplasma; (5) tradução do mRNA; (6) estabilidade do mRNA; (7) estabilidade da proteína ou modulação de sua atividade (Sauer and Tjian, 1997; Day and Tuite, 1998; Beckett, 2001; Pontier *et al.*, 2002; Warren, 2002; Wray *et al.*, 2003; Caicedo *et al.*, 2004; Mata *et al.*, 2005; Kaminaka *et al.*, 2006; Stone *et al.*, 2006).

A principal etapa de controle da regulação gênica ocorre na fase da iniciação da transcrição (Riechmann *et al.*, 2000; Beckett, 2001; Warren, 2002; Wray *et al.*, 2003). Os genomas de organismos eucarióticos estão compactados

na cromatina, através de complexos formados com proteínas específicas denominadas histonas. Esta compactação, além de sua função estrutural – manter o DNA organizado e limitado ao núcleo celular – impede processos que requerem o acesso ao DNA, entre eles o início da transcrição gênica, o reparo do DNA, a recombinação e a replicação (Lee and Young, 2000; Riechmann, 2002; Horn and Peterson, 2006). A heterocromatina é uma forma de cromatina tão compactada que os genes empacotados são transcricionalmente inertes e uma de suas funções reside na formação de estruturas cromossômicas, como por exemplo o centrômero e os corpúsculos de Barr. Por outro lado, a porção do genoma que potencialmente pode ser transcrita encontra-se na eucromatina, que são regiões nas quais a cromatina encontra-se desespiralada na interfase. A transcrição da eucromatina requer modificações da cromatina para que o aparato transcricional (RNA polimerase e fatores reguladores da transcrição) se ligue ao DNA (Kornberg, 1999). Dentre as modificações, há a acetilação das histonas e o estado de metilação da seqüência do gene, que são duas marcas epigenéticas relacionadas à mudança da estrutura da cromatina que pode tornar um gene ativo ou não (Struhl, 1998; Myers and Kornberg, 2000; Emerson, 2002; Narlikar *et al.*, 2002).

### **Os elementos *cis* de DNA e os elementos *trans***

Elementos *cis* são seqüências de DNA envolvidas no controle da expressão gênica. As três principais classes de elementos *cis* são:

1) promotores mínimos (Figura1), formados por uma seqüência de DNA conservada chamada *TATA-box*, situada 20 a 30 nucleotídeos *upstream* ao sítio de iniciação da transcrição. A ligação da maquinaria basal de transcrição ao promotor

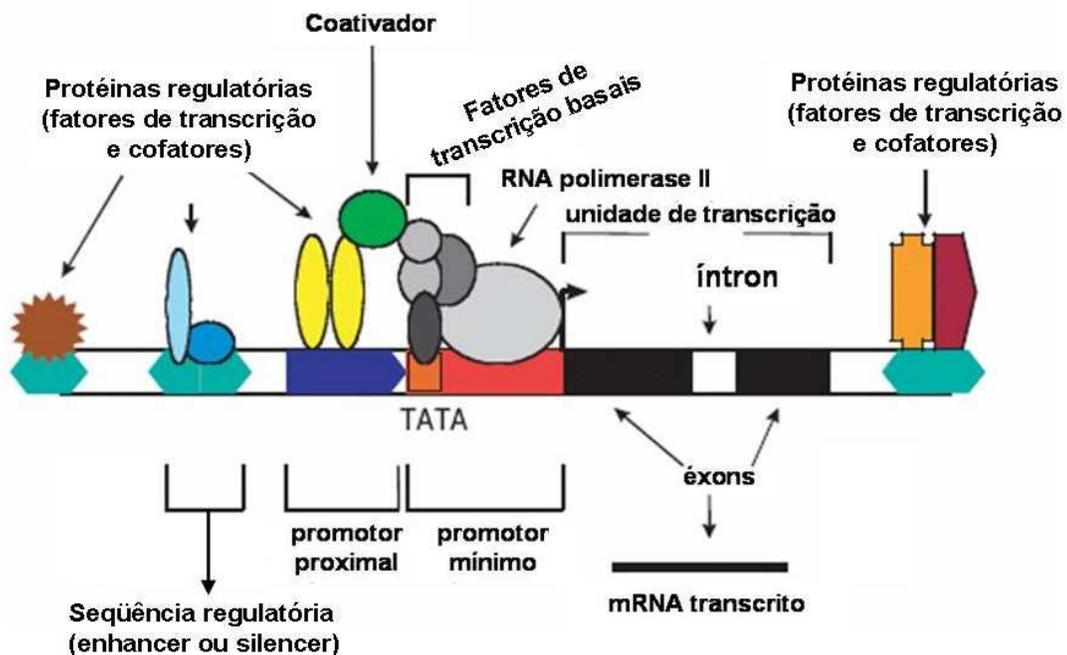
mínimo é suficiente para iniciar a transcrição, mas a regulação da taxa de iniciação da transcrição é mediada por outros elementos *cis* envolvidos no controle da expressão gênica, descritos a seguir;

2) elementos proximais a promotores (Figura1), seqüências próximas ao promotor que maximizam a taxa de iniciação da transcrição dos promotores; e

3) *enhancers* e *silencers* (Figura1), que ativam ou reprimem a taxa de iniciação da transcrição, respectivamente, e podem estar dispostos dentro de centenas ou milhares de pares de bases de DNA situados 5' ou 3' do sítio de iniciação ou até em íntrons, ao contrário do promotor ou de elementos próximos ao promotor, que atuam próximos ao sítio de iniciação da transcrição (Blackwood and Kadonaga, 1998; Lee and Young, 2000; Smale and Kadonaga, 2003).

Os elementos *trans* são fatores reguladores da transcrição que afetam a taxa de transcrição pela interação específica com seqüências de DNA regulatórias e pelas interações com outras proteínas (Blackwood and Kadonaga, 1998; Holstege and Young, 1999; Lee and Young, 2000; Beckett, 2001) e podem ser agrupados em duas classes: a primeira corresponde a fatores de transcrição basais (Figura1), TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF e TFIIH, que se ligam direta ou indiretamente ao promotor mínimo dos genes e auxiliam a RNA polimerase II a iniciar a transcrição, formando o aparato transcricional basal, mas não são capazes de aumentar ou diminuir a taxa de transcrição. Estes fatores estão presentes em todas as células e são ativos nas mais diversas condições (Riechmann, 2002). A segunda classe corresponde a fatores de transcrição sítio-específicos (Figura1) que podem se ligar a elementos de regulação *cis*, ativando ou reprimindo a taxa de iniciação da transcrição através da modulação da atividade

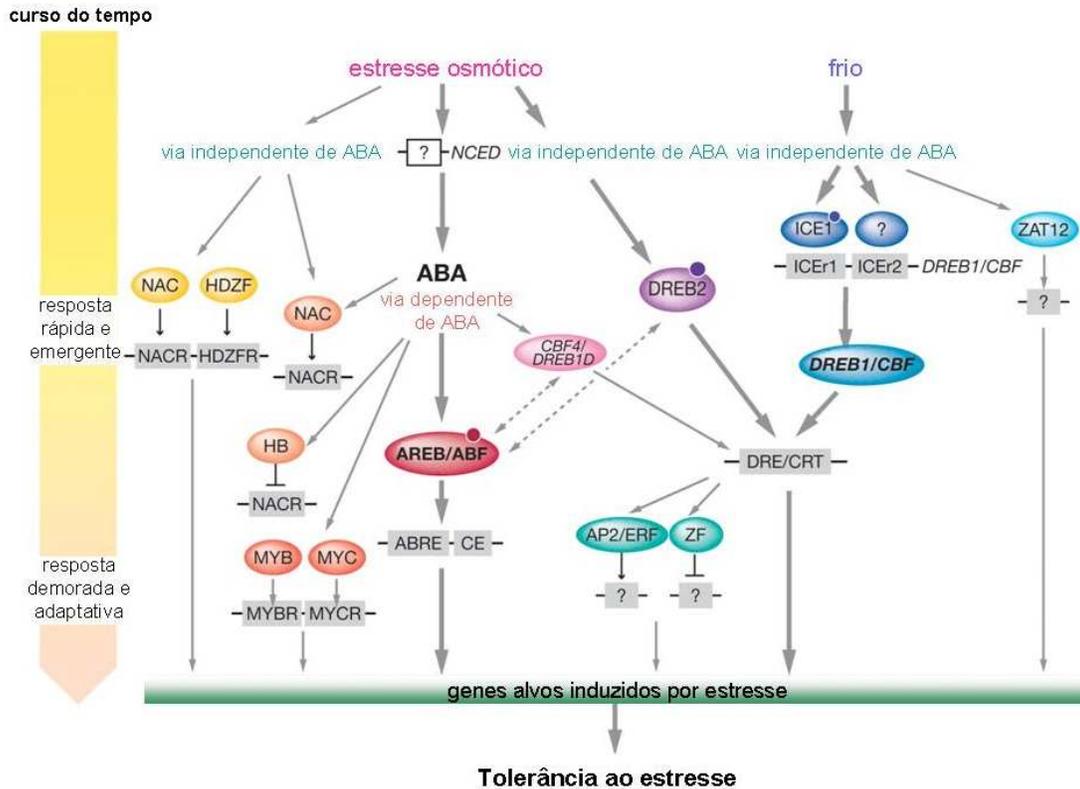
da maquinaria basal de transcrição. Os fatores de transcrição sítio específicos podem se ligar a complexos protéicos de classes heterogêneas, denominadas cofatores e coativadores, para intermediar a sua atuação sobre a maquinaria basal e modular sua ligação com o DNA (Figura1). Fatores de transcrição sítio-específicos podem ser expressos especificamente em determinados tecidos, tipos celulares, estágios de desenvolvimento ou em resposta a diferentes estímulos (Kornberg, 1999; Lee and Young, 2000; Riechmann, 2002).



**Figura 1.** Esquema geral dos elementos *cis* de DNA e *trans* envolvidos na iniciação da transcrição. O aparato basal (RNA polimerase II e fatores de transcrição basais) reconhece o *TATA-box* do promotor mínimo ligando-se a ele para o início da transcrição. O promotor proximal e seqüências regulatórias, que podem ser *enhancers* ou *silencers*, maximizam ou diminuem a taxa de transcrição do promotor mínimo. Fatores de transcrição sítio-específicos se ligam a elementos *cis* (seqüências regulatórias, que podem estar quilobases distantes tanto *up* quanto *downstream* ao promotor), e a cofatores ou coativadores que intermedeiam sua afinidade às seqüências regulatórias e à maquinaria basal, para maximizar ou reprimir a transcrição (adaptado de Villard, 2004).

Fatores de transcrição sítio específicos são proteínas modulares formadas por motivos distintos que são: 1) motivo de ativação ou repressão; 2) domínio de

ligação ao DNA; e 3) motivo de multimerização (Sigh, 1998; Lee and Young, 2000; Riechmann *et al.*, 2000; Wingender *et al.*, 2000; Warren, 2002). A maioria dos fatores de transcrição sítio-específicos pode ser agrupada em famílias multigênicas de acordo com similaridades entre seqüências de aminoácidos ou com a estrutura de seus domínios conservados de ligação ao DNA e de multimerização. Algumas dessas famílias podem ser encontradas em todos os eucariotos, como no caso dos *basic helix-loop-helix* (bHLH) e *basic leucine zipper* (bZIP), mas existem famílias especificamente encontradas em plantas, por exemplo: *DNA binding with one finger* (DOF), *Apeta2/Ethylene responsive element binding protein* (AP2/EREBP) e *auxin response factors* (ARF) (Riechemann *et al.*, 2000; Riechemann, 2002). Além de poder interagir com cofatores e coativadores, os fatores de transcrição sítio-específicos podem interagir entre si e com outros elementos da maquinaria transcricional. Tais interações podem ser importantes para o controle fino da transcrição e podem dar indícios da ligação entre a atividade em cascata dos fatores de transcrição e vias de sinalização na regulação da expressão de genes. Um exemplo pode ser a participação de fatores de transcrição de diversas classes na regulação dependente ou independente de ABA da expressão de genes envolvidos com resposta a estresses abióticos (ver em Figura 2).

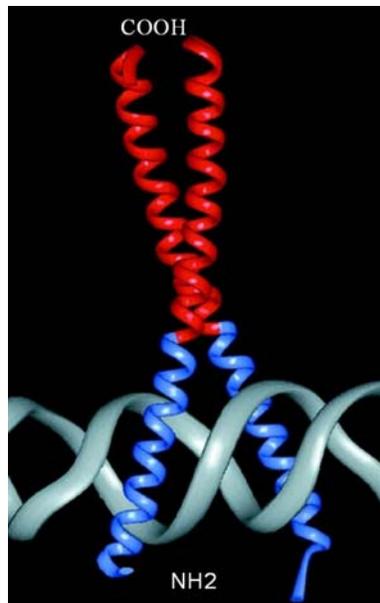


**Figura 2.** Participação de fatores de transcrição de diversas famílias e suas interações na regulação de genes responsivos a estresses em *A. thaliana*. Fatores de transcrição controlando genes induzidos por estresses estão apresentados em círculos coloridos. Elementos *cis* envolvidos na transcrição em resposta a estresse estão apresentados em caixas cinzas. Pequenos círculos coloridos revelam modificações dos fatores de transcrição em resposta a sinais de estresses para que ocorra sua ativação. AREB/ABFs são fatores de transcrição AP2 envolvidos com a resposta a estresse osmótico dependente de ABA. Estas classes de fatores de transcrição estão envolvidos com a regulação da expressão dos genes *RD29A* e *RD29B*, responsivos a estresses. Os fatores de transcrição DREB1/CBF estão envolvidos no controle da expressão de genes responsivos ao frio. DREB2 é um fator de transcrição importante na regulação da expressão de genes responsivos a desidratação e alta salinidade. Os fatores de transcrição MYB e MYC regulam a expressão do gene responsivo a estresse *RD22*. Os fatores de transcrição NAC e HDZF estão envolvidos na regulação do gene responsivo ao estresse osmótico *ERD1*, através de uma via independente de ABA (adaptado de Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

### Os fatores de transcrição do tipo *basic leucine zipper* (bZIP)

As proteínas do tipo *basic leucine zipper* (bZIP) são uma classe de fatores de transcrição encontrada em todos os eucariotos e se caracterizam por apresentarem um domínio conservado de 60 a 80 aminoácidos conhecido como domínio bZIP. Este domínio é formado por dois motivos: 1) a região básica,

composta por cerca de 30 resíduos, principalmente aminoácidos básicos, responsável pela ligação à seqüência DNA específica; e 2) o zíper de leucinas, responsável pela formação de homo ou heterodímeros (Figura 3). O motivo zíper de leucina que caracteriza essas proteínas é definido como tendo resíduos de leucina espaçados em sete aminoácidos, sendo repetidos ao menos três vezes (LxxxxxxLxxxxxxL) (Landschulz *et al.*, 1988). Por dimerização, motivos de zíper de leucinas paralelos interagem através de uma interface hidrofóbica “coiled-coil” que justapõe duas regiões básicas adjacentes (Luscombe *et al.*, 2000). Coletivamente, essas regiões básicas constituem um motivo que interage com seqüências *cis*-específicas o que geralmente são palindrômicas ou pseudo-palindrômicas (Sigh, 1998; Wray *et al.*, 2003).



**Figura 3.** Representação do domínio bZIP de um fator de transcrição, formado de duas  $\alpha$ -hélices, representando o domínio bZIP de um homodímero. A região em vermelho representa o zíper de leucinas, responsável pela formação de dímeros. A região em azul representa o domínio básico, responsável pela interação com o DNA (em cinza), através do encaixe no sulco maior da dupla fita de DNA.

Através das espécies, os fatores bZIP estão envolvidos em muitos processos que são críticos para a função de um organismo. Em animais foram encontrados bZIPs relacionados à formação de órgãos e tecidos, metabolismo, ritmo circadiano e resposta a estresses (Darlington *et al.*, 1998; Efert *et al.*, 1999; Kwong *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2001; Sanyal *et al.*, 2002; Kondo *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2006). Em fungos, os fatores bZIP estão envolvidos na diferenciação sexual, na entrada da fase estacionária, na resposta a estresse oxidativo, na via de biossíntese de metionina, entre outros processos (Patton *et al.*, 2000; Moye-Rowley, 2003; Ikner and Shiozaki, 2005). Em plantas, os fatores bZIP são importantes para o desenvolvimento da semente, florescimento, maturação e desenvolvimento dos órgãos florais, fotomorfogênese, alongação e crescimento celular, controle do balanço carbono nitrogênio durante o desenvolvimento da semente, mecanismos de defesa, via de sinalização de sacarose e de hormônios, controle osmótico e resposta a luz (Walsh *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1997; Rook *et al.*, 1998; Chuang *et al.*, 1999; Ciceri *et al.*, 1999; Wellmer *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2000; Despres *et al.*, 2000; Finkelstein and Linch, 2000; Fukazawa *et al.*, 2000; Niggeweg *et al.*, 2000; Osterlund *et al.*, 2000; Uno *et al.*, 2000; Pontier *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2002; Satoh *et al.*, 2004; Ulm *et al.*, 2004; Abe *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; Kaminaka *et al.*, 2006; Weltmeier *et al.*, 2006). A presença conservada dos fatores bZIP através dos eucariotos, junto com seu papel importante para diversas funções celulares, enfatiza a importância dessa classe de fatores de transcrição (para detalhes ver revisão em Deppmann *et al.*, 2006).

## **Opaco-2, um fator de transcrição do tipo bZIP do milho**

Um dos primeiros fatores de transcrição do tipo bZIP de plantas a ser clonado é a proteína bZIP do milho OPACO-2 (O2), que é um locus de regulação da fase de maturação do endosperma do milho, onde pode ativar a transcrição de genes de proteínas de estocagem, bem como uma *pyruvate orthophosphate dikinase-1* (Yunes *et al.*, 1998; Ciceri *et al.*, 1999; Hunter *et al.*, 2002). O2 também está envolvido no controle do metabolismo de lisina em sementes, bem como no metabolismo de carbono e nitrogênio durante o desenvolvimento da semente do milho e no controle do metabolismo de treonina (Cord Neto, 1998; Damerval and Le Guilloux, 1998; Gaziola *et al.*, 1999). Genes homólogos ao O2 foram encontrados em outras gramíneas (Albani *et al.*, 1997; Vettore *et al.*, 1998; Vicente-Carbajosa *et al.*, 1998; Oñate *et al.*, 1999; Onodera *et al.*, 2000) nas quais detêm o padrão endosperma específico de expressão. Baseado em análises filogenéticas, foi sugerido que O2 corresponde a uma especialização funcional de monocotiledôneas (Vincentz *et al.*, 2003). O regulador bZIP BZI-1 de tabaco, possivelmente um ortólogo ao O2, está envolvido na via de sinalização de auxina e na resposta a patógenos (Kuhlmann *et al.*, 2003; Heinekamp *et al.*, 2004). A aparente ausência de funções similares entre *BZI-1* de tabaco e o O2 de milho corroboram a hipótese de que a função do O2 é uma novidade restrita a monocotiledôneas.

## **Os bZIPs do Grupo C de *A. thaliana* homólogos a O2 do milho**

Foram identificados quatro genes homólogos ao O2 em *A. thaliana*, que são denominados *basic leucine zipper O2 homologous (Bzo2h)*, também conhecidos

como bZIPs do Grupo C. Há evidências preliminares da função biológica desses genes e é possível que eles correspondam a três funções ancestrais em angiospermas, representadas por *AtbZIP63*, o provável ortólogo ao *O2*, *AtbZIP9* e o par de parálogos *AtbZIP10* e *AtbZIP25* (Vincentz *et al.*, 2003).

*AtbZIP63* é fracamente expresso em sementes e existem poucas informações sobre suas funções (Lara *et al.*, 2003; Kaminaka *et al.*, 2006). Estudos recentes indicam que *AtbZIP63* pode estar envolvido com a regulação gênica relacionada a respostas a escuridão, açúcar e a sinais que regulam o metabolismo da planta, como balanço energético e condições de estresses, pois foi descrito um sinergismo moderado de *AtbZIP63* com KIN10 através do *G-box*, um motivo GACGTG encontrado nos promotores de diversos genes que está ligada em respostas a diversas vias estimulatórias (Menkens *et al.*, 1995). KIN10 é uma quinase do grupo SnRK1 (*Snf1-related kinase*) envolvida no controle convergente da reprogramação da transcrição em resposta a carência nutricional e hipoxia (Baena-González *et al.*, 2007). Um ortólogo de *O2* e *AtbZIP63* em tabaco, o gene *BZI-1*, parece estar envolvido na via de sinalização de auxina (Heinekamp *et al.*, 2004) e análises de plantas transgênicas superexpressando um alelo dominante negativo de *BZI-1* demonstraram susceptibilidade à infecção das plantas pelo vírus do mosaico do tabaco, indicando um provável papel desse gene, e possivelmente de *AtbZIP63*, na resposta a patógenos (Kuhlmann *et al.*, 2003).

Sabe-se que os dois genes parálogos *AtbZIP10* e *AtbZIP25* estão expressos na semente e podem interagir com o *ABI3*, um regulador chave na via de sinalização do ABA que controla a fase de maturação da semente (Bies-Etheve

*et al.*, 1999; Lara *et al.*, 2003). O fato de *AtbZIP10* e *AtbZIP25* serem expressos na semente pode sugerir que estes dois genes desempenham um papel conservado ao de O<sub>2</sub> de milho em *Arabidopsis*. Recentemente, foi demonstrado geneticamente que *AtbZIP10* é um regulador positivo da resposta hipersensitiva, ou seja, morte celular induzida por patógenos, de respostas de defesa basais e morte celular induzida por espécies reativas de oxigênio. Essas atividades são antagonizadas pelo fator *Lesions simulating disease resistance1* (LSD1), que é um regulador negativo da morte celular, protegendo as células das plantas de estresse induzido por espécies reativas de oxigênio (Kaminaka *et al.*, 2006). Estes autores relatam que, por meio de um mecanismo de retenção citoplasmática, LSD1 inibe os efeitos regulatórios de *AtbZIP10* quando não há sinais ambientais, como o ataque de patógenos e, conseqüentemente, a liberação de espécies reativas de oxigênio. Na presença desses sinais, *AtbZIP10* é dissociado a LSD1 e dirigido ao núcleo, onde induz a expressão de genes relacionados à resposta hipersensitiva e à defesa basal da planta. Existem também evidências que, em resposta a hipoosmolaridade, *AtbZIP10* forma heterodímeros funcionais com *AtbZIP53*, um membro dos bZIPs do Grupo S de *Arabidopsis* (Jakoby *et al.*, 2002; Correa *et al.*, 2004) para ativar a transcrição do gene da prolina desidrogenase (*ProDH*), responsável pela degradação de prolina (Weltmeier *et al.*, 2006), o que associa *AtbZIP10* à respostas a estresses abióticos, como seca, salinidade ou frio.

Gauer (2004) relatou que *AtbZIP9* encontra-se expresso no floema de todos os órgãos da planta através da análise da atividade de GUS em plantas transgênicas contendo a região promotora de *AtbZIP9* em fusão ao gene repórter *gusA*. A hibridação *in situ* do mRNA de *AtbZIP9* confirmou esses resultados. A

autora também relata que a expressão de *AtbZIP9* já se encontra presente no procâmbio na fase de maturação do embrião, indicando que este fator de transcrição encontra-se expresso mesmo antes da diferenciação do floema e do xilema, o que permite caracterizá-lo como um marcador da diferenciação do floema. De fato, a expressão específica no floema observada por Gauer (2004) está de acordo com dados recentes do transcriptoma do floema de *Arabidopsis* (Zhao *et al.*, 2005) e por detecção *in vivo* de fusões traducionais com o gene marcador *green fluorescent protein* (GFP) (Lee *et al.*, 2006). Análises histológicas da anatomia do feixe vascular de plantas superexpressando *AtbZIP9* e do mutante nulo de inserção de T-DNA *atbzip9-1* não mostraram diferenças na organização nem na estrutura do tecido vascular em relação a plantas selvagens (Silveira *et al.*, 2007, ver artigo em anexo), fato que pode dar pistas de uma possível redundância funcional entre os membros do Grupo C ou até mesmo entre os bZIPs membros do Grupo S, visto que Ehlert *et al.* (2006) e Weltmeier *et al.* (2006), analisando duplos híbridos em protoplastos de *Arabidopsis*, mostraram que os bZIPs do Grupo C formam heterodímeros com os bZIPs do Grupo S, preferencialmente com *AtbZIP1*, *AtbZIP2*, *AtbZIP11*, *AtbZIP44* e *AtbZIP53*, o que pode proporcionar uma ampla flexibilidade combinatória aos sistemas regulatórios da expressão. Recentemente, através da análise de alelos de *AtbZIP9* que codificam para ativadores constitutivos fortes da transcrição, ativando assim a expressão de seus genes alvos, Silveira *et al.* (2007) constataram diversas alterações de morfologia foliar, mudanças metabólicas e fisiológicas, como o acúmulo de compostos fenólicos nas folhas, sintomas de morte celular e senescência. Estes efeitos podem sugerir mudanças nas propriedades funcionais

do transporte no floema, decorrentes de defeitos no processo de diferenciação e organização das células no cilindro vascular, embora isto não tenha sido observado por Gauer (2004).

### **Regulação da expressão gênica por glicose e sua relação com ABA e etileno**

Glicose é um importante nutriente para as células eucarióticas, servindo como fonte de carbono e de energia tanto em leveduras, plantas e mamíferos. Na presença de glicose, uma variedade de vias metabólicas são afetadas, resultando em inúmeras mudanças nos intermediários metabólicos, em cofatores e em produtos finais (revisado por Rolland *et al.*, 2001). Em virtude de a glicose afetar a expressão de diversos genes envolvidos em diferentes processos celulares (Rook *et al.*, 2006; Osuna *et al.*, 2007), foi proposto que diferentes vias de sinalização são recrutadas para o controle desses genes (Xiao *et al.*, 2000). Em leveduras, *hexokinase2* (HXK2) foi identificada como um dos primeiros genes envolvidos na repressão gênica mediada por glicose e tem sido proposto que, das três quinases de açúcar em leveduras, HXK2 apresenta uma atividade bifuncional, com domínios catalíticos e regulatórios para a repressão por glicose, além de agir como um sensor intracelular desta hexose (Rolland *et al.*, 2002a). Dados envolvendo duplo mutantes para HXK1 e HXK2 e a superexpressão de HXK1 mostraram que HXK1 também é capaz de mediar a repressão gênica por glicose em leveduras (Rose *et al.*, 1991; revisado por Rolland *et al.*, 2002a).

Diferentes evidências também apontam para o envolvimento da HXK como um componente crucial de percepção e de vias de sinalização da glicose em plantas (Smeekens, 2000; Rolland *et al.*, 2002b; Moore *et al.*, 2003; Rolland and

Sheen, 2005). Há, pelo menos, três tipos de mecanismos de sinalização por glicose encontrados em plantas: uma via dependente de HXK1 (Xiao *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2003), uma independente de HXK1 (Xiao *et al.*, 2000; Ciereszko *et al.*, 2001), e vias de sinalização que dependem da atividade catalítica da HXK1 (Xiao *et al.*, 2000).

Em *Arabidopsis* existem dois genes de *HXK* e quatro genes *HXK-like*, que interagem não apenas entre eles para a formação de dímeros, mas também com outras proteínas e com várias membranas celulares (Frommer *et al.*, 2003). As isoformas de HXK têm sido encontradas no citoplasma celular, em associação com o retículo endoplasmático e com a membrana plasmática, mas também podem ser localizadas na membrana externa e no estroma do cloroplasto, no núcleo e em mitocôndrias (Travis *et al.*, 1999; Giese *et al.*, 2005). Nesta última organela, recentemente HXK foi relacionada com a regulação de morte celular programada, dando indícios da ligação entre o metabolismo da glicose e apoptose (Kim *et al.*, 2006). Cho *et al.* (2006) apresentaram evidências que HXK1 forma complexos apenas no núcleo com VHA-B1 (vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase B1) e com RPT5B (uma partícula 19S da subunidade proteossômica), para interagir com o promotor do gene *CAB2*, reprimindo sua expressão em resposta a glicose.

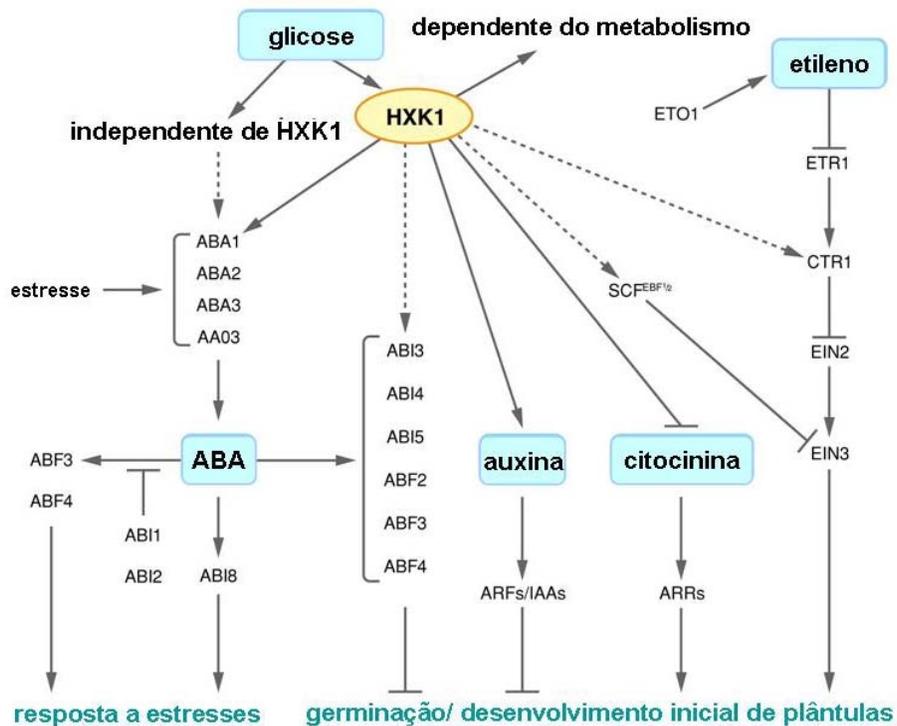
O mutante *gin2* é deficiente na codificação do gene *Hxk1* (Moore *et al.*, 2003). Plântulas do mutante *gin2* apresentaram desenvolvimento normal em meios contendo altas concentrações de glicose, condições de crescimento que normalmente resultariam em um desenvolvimento atrasado. Além disso, o mutante *gin2* mostrou inibição reduzida da expressão de genes fotossintéticos por glicose. Versões mutadas específicas da proteína HXK1 com pouca ou nenhuma atividade

enzimática retiveram suas funções sinalizadoras em protoplastos e complementaram os fenótipos mutantes de *gin2*. Esta é a melhor evidência para a função sinalizadora de HXK1, separado de sua função metabólica (Rook *et al.*, 2006).

Diversas ferramentas genéticas têm sido utilizadas para identificar as vias regulatórias que controlam as respostas a açúcares em plantas, a maioria usando a espécie modelo *Arabidopsis* (revisado em Rook and Bevan, 2003). As análises genéticas estão baseadas em detectar mudanças do crescimento, do desenvolvimento ou alterações na expressão de genes em meios contendo açúcares. Por exemplo, sementes germinadas em meios contendo altos níveis de glicose ou sacarose têm o estabelecimento das plântulas atrasado. Este efeito dos altos níveis de açúcar no desenvolvimento da planta tem sido utilizado para identificar mutantes que são insensíveis a essas condições, como por exemplo, os mutantes *glucose-insensitive (gin)* que toleram 6% de glicose no meio, os mutantes *sugar-insensitive (sis)*, que sobrevivem em meios com 300mM de sacarose, e os mutantes *isi (impaired sucrose induction)* isolados através da análise de plantas contendo o promotor do gene *ApL3*, que é altamente induzido por sacarose, em fusão com marcadores de seleção negativos (Zhou *et al.*, 1998; Laby *et al.*, 2000; Rook *et al.*, 2001; para revisão ver Rook and Bevan, 2003).

Surpreendentemente, estes mutantes identificaram genes envolvidos tanto na biossíntese quanto na sinalização por ABA (Figura 4). Os mutantes *gin6*, *sis5*, *sun6 (sucrose uncoupled 6)* e *isi3* são alélos a *abi4 (ABA insensitive4)*, e defeituosos em um gene que codifica um fator de transcrição do tipo AP2, enquanto que os alelos do mutante *aba2* da biossíntese de ABA, defeituoso em

um gene de cadeia curta da redutase/desidrogenase, foram identificados como *gin1*, *sis4*, e *isi4* (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Huijser *et al.*, 2000; Laby *et al.*, 2000, Rook *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002). Não apenas *abi4* e *aba2*, mas também os mutantes da biossíntese de ABA *aba1* e *aba3* são mutantes fortes *gin* (Huijser *et al.*, 2000; Laby *et al.*, 2000; Arroyo *et al.*, 2003). Outros mutantes *abi*, em particular *abi5*, têm mostrado um fenótipo *gin* pouco pronunciado, mas significativa (Huijser *et al.*, 2000; Laby *et al.*, 2000).



**Figura 4.** Modelo das interações genéticas entre a via de sinalização de glicose e de hormônios. A sinalização de glicose dependente de HXK1, que controla o desenvolvimento de plântulas e induz a biossíntese e a sinalização de ABA. As sinalizações de glicose e etileno convergem em CTR1, alelo a *gin4* e *sis1*, e no fato de glicose promover a instabilidade da proteína fator de transcrição EIN3 (*ethylene insensitive3*). Finalmente, a via de sinalização de glicose mediada por Hxk1 interage positiva e negativamente com auxina e citocinina, respectivamente (adaptado de Rolland *et al.*, 2006).

A identificação de mutantes relacionados ao ABA nessas diversas análises estabeleceu um relacionamento entre a sinalização por ABA e as respostas a glicose, que tem sido um tópico de debate (Rook and Bevan, 2003). Vários modelos para o relacionamento preciso entre ABA e glicose têm sido propostos (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Huijser *et al.*, 2000; Laby *et al.*, 2000; Rook *et al.*, 2001; Gibson, 2004). Arenas-Huertero *et al.* (2000) propuseram um modelo no qual as respostas a glicose são mediadas através da indução da biossíntese de ABA e subsequente sinalização de ABA através de *ABI4*. Rook *et al.* (2001) favoreceram um modelo no qual ABA modula a sensibilidade de genes a sacarose, baseado na observação de que ABA sozinho é incapaz de induzir a expressão de *ApL3*, mas aumenta fortemente a sua indução por sacarose. Foi sugerido que a glicose induz o acúmulo de ABA, que é essencial para a resposta a glicose mediada por HXK. Aparentemente, glicose regula os níveis de ABA através de *ABA3* e *ABA2* e envolve a sinalização de ABA por *ABI4* (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Rolland *et al.*, 2002b; Price *et al.*, 2003). A participação dos genes *ABI* na via de sinalização da glicose é restrita a *ABI4* e *ABI5*, mas não para os outros genes de sinalização por ABA, *ABI1*, *ABI2* e *ABI3*, embora *ABI3* também apresente fenótipo *gin* (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Brocard-Gifford *et al.*, 2003; Gibson, 2005). Apesar dessas observações, mutantes de resposta a açúcares não relacionados com a biossíntese de ABA ou com sua sinalização também têm sido identificados, como por exemplo, os mutantes *isi1*, *isi2*, *ein2* (*ethylen insensitive2*), *ghs1* (*glucose hypersensitive1*) e *hys1* (*hypersenescence1*) (revisado por Gibson, 2005; Rook *et al.*, 2006). A relação genética precisa entre a sinalização de glicose

mediada por HXK1 e ABA continua sendo explorada (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Rook *et al.*, 2001).

Outros mutantes de resposta a açúcar incluem diversos mutantes na biossíntese ou sinalização do etileno, mas estes devem funcionar através dos efeitos inibitórios do etileno na biossíntese de ABA (Gibson *et al.*, 2001; Rook & Bevan, 2003). Os mutantes *sis1* e *gin4* mostraram ser alelos a CTR1 (*constitutive triple response 1*), um elemento da via de sinalização de etileno (Zhou *et al.*, 1998; Gibson *et al.*, 2001). Estas informações posicionam CTR1 como um elemento de convergência entre as vias de sinalização de glicose e etileno (Figura 4). Outra evidência para a ligação entre as vias de sinalização de glicose e etileno é a interação antagônica entre glicose e etileno na regulação da estabilidade dos níveis da proteína EIN3: glicose aumenta a degradação de EIN3, enquanto que etileno estabiliza EIN3 (Yanagisawa *et al.*, 2003). A ligação entre a via de sinalização de glicose e outros hormônios, como auxina e citocinina, também é reportada (Figura 4), mas como essas vias se relacionam ainda é um tópico de discussão (para revisão ver Gibson, 2004; Hartig and Beck, 2006; Rook *et al.*, 2006).

Adicionalmente, outros elementos como proteínas G e fatores de ligação a ABA (ABFs, uma subfamília dos fatores de transcrição da classe dos bZIPs) parecem estar envolvidos na regulação independente de HXK1 de genes mediados por ABA e glicose (Assmann, 2005; Finkelstein *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006). A proteína G ATRGS1 pode estar envolvida na regulação do desenvolvimento das sementes em resposta a sinalização por açúcar na via independente de Hxk1, pois o metabolismo de açúcar e a fosforilação por HXK1

não são requeridos para a sinalização por *AtRGS1* (Chen and Jones, 2004). A despeito de todas essas informações, o papel do ABA nas vias de sinalização por açúcar, de que maneira os açúcares atuam na sinalização, a interação com ABA e quando as vias de sinalização por açúcar independentes de ABA existem ainda precisam ser elucidados de maneira precisa.

### **ABI4, um elemento da via de sinalização do ABA e da resposta a glicose**

*ABI4*, um intermediário da sinalização de ABA em sementes, corresponde ao alelo *gin6* e carrega um domínio APETALA2 (AP2) (Finkelstein *et al.*, 1998). *ABI4*, que é regulado positivamente por glicose ao nível transcricional, possui um papel essencial na via de sinalização por glicose e controla o desenvolvimento vegetativo (Arenas-Huertero *et al.*, 2000). Recentemente, foi observado que *ABI4* medeia o efeito da trealose exógena no crescimento de *Arabidopsis*, a repressão mediada por glicose na expressão de genes da fotossíntese, a transição do crescimento heterotrófico para o fotoautotrófico e a expressão de uma série de genes envolvidos na quebra do amido (Avonce *et al.*, 2004; Ramon *et al.*, 2006; Koussevitzky *et al.*, 2007), posicionando *ABI4* como um ponto de convergência entre diferentes vias de sinalização, inclusive as vias de açúcares e ABA.

O mutante *abi4* original demonstrou sensibilidade diminuída na inibição da germinação por ABA e expressão gênica alterada semente-específica. A expressão de *ABI4* é alta em sementes, durante a germinação e no desenvolvimento inicial das plântulas, enquanto que níveis baixos também estão presentes em tecidos vegetativos, porém ainda desempenha um papel fisiológico.

van Oosten *et al.* (1997) reportam uma inibição reduzida da fotossíntese no mutante *sun6/abi4* quando tratado com 2-deoxiglicose.

Existem alguns debates sobre se a expressão de *ABI4* é por si mesma responsiva a glicose ou se sua expressão esta ligada ao atraso no desenvolvimento da plântula (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Rook *et al.*, 2001; Arroyo *et al.*, 2003). A adição de baixos níveis de ABA ao mutante deficiente em ABA *aba1-1* não apenas restaurou seu desenvolvimento em resposta a 6% de glicose, mas também seus níveis de transcrição de *ABI4* (Arroyo *et al.*, 2003). Essas observações sugerem que a indução por glicose da expressão de *ABI4* é indireta e resulta nos efeitos sob o desenvolvimento dos altos níveis de glicose sobre o estabelecimento das plântulas (Rook *et al.*, 2001).

Sítios de ligação de *ABI4* estão presentes imediatamente *downstream* a um possível *TATA-box* nos genes *ABI4* de milho, *Arabidopsis* e arroz, sugerindo a possibilidade de autoregulação. Sítios de ligação de *ABI4* também foram preditos nas regiões regulatórias de vários genes responsivos a glicose em *Arabidopsis* (Niu *et al.*, 2002). Estes incluem os genes de plastocianina e *ApL3*, cujas regulações alteradas por açúcar são a base para o isolamento dos mutantes *abi4* chamados *sun6* e *isi3*, respectivamente (Huijser *et al.*, 2000; Rook *et al.*, 2001). Isto sugere que a ação de *ABI4* nestes genes é através da ligação diretamente em seus promotores, como sugerido por Koussevitzky *et al.* (2007), que observaram a ligação de *ABI4* aos promotores de genes ligados à fotossíntese.

## **ABI5, elemento da via de sinalização de ABA**

*ABI5* codifica um fator de transcrição do tipo bZIP, necessário na expressão de genes regulados por ABA nos tecidos vegetativos e na regulação de genes *LEA* (*late embryogenesis abundant*), envolvidos na maturação do embrião e na germinação (Finkelstein and Lynch, 2000; Lopez-Molina and Chua, 2002; Carles *et al.*, 2002; Lopes-Molina *et al.*, 2002; Bensmihen *et al.*, 2005). A região bZIP do *ABI5* apresenta uma grande similaridade com fatores de transcrição capazes de ativar genes repórteres contendo elementos de DNA responsivos a ABA (ABREs) (Choi *et al.*, 2000; Uno *et al.*, 2000). Além disso, a expressão de *ABI5* parece estar regulada pela maioria dos outros genes *ABI* e, possivelmente, por ele mesmo (Finkelstein and Lynch, 2000). Recentemente, Liu *et al.* (2007) descreveu que a expressão de *ABI5* é reprimida no mutante *gcr2* (*G protein coupled receptor*), sugerindo que proteínas G podem desempenhar um papel importante na regulação de *ABI5*. Além disso, o acúmulo de proteína *ABI5*, bem como sua fosforilação, estabilidade e atividade são altamente reguladas por ABA durante a germinação e durante o crescimento inicial das sementes (Lopez-Molina *et al.*, 2001). A proteína *ABI5* é essencial para executar a interrupção no desenvolvimento dependente de ABA, que inicia-se após a quebra de dormência da semente, mas em antecipação ao crescimento autotrófico (Lopez-Molina *et al.*, 2001). O acúmulo de *ABI5* é induzido por ABA somente dentro de um intervalo de 60 horas após a estratificação, tempo no qual ABA e a atividade dependente desse hormônio são essenciais para a interrupção do crescimento de embriões em condições desfavoráveis, como por exemplo, estresses hídricos (Lopez-Molina *et al.*, 2001). A eficiência da interrupção do crescimento dependente de ABA é

diretamente dependente dos níveis de *ABI5* (Lopez-Molina *et al.*, 2001; Brocard *et al.*, 2002). Estudar as determinações da expressão de *ABI5* induzida por ABA e como *ABI5* é ativado por ABA são essenciais para a compreensão dos mecanismos envolvidos no crescimento primário e no mecanismo pelo qual a osmotolerância é desenvolvida nos embriões. Foi demonstrado que ABA tem dois efeitos sobre a proteína de *ABI5*: (1) ABA ativa *ABI5* como um repressor do crescimento, incluindo uma ocupação aumentada do promotor em seus promotores alvo (Lopez-Molina *et al.*, 2002), e (2) ABA também sinaliza a inibição da degradação da proteína de *ABI5* via o proteossoma 26S (Lopez-Molina *et al.*, 2001; Lopez-Molina *et al.*, 2003; Smalle *et al.*, 2003). Recentemente foi constatado que na ausência de ABA, uma ligase do tipo E3 denominada KEEP ON GOING (KEG), se liga a *ABI5*, promovendo sua ubiquitilação e conseqüente degradação (Stone *et al.*, 2006).

## OBJETIVOS

### **Objetivo geral:**

Contribuir para a caracterização funcional dos bZIPs do Grupo C de *Arabidopsis thaliana* homólogos a *Opaco-2* (O2) do milho, a fim de compreender a diversificação das funções relacionadas a O2 em angiospermas.

### **Objetivos específicos:**

- Identificar os sinais (hormônios e açúcares) que regulam a expressão dos genes bZIPs do Grupo C;
- analisar a integração do bZIPs do Grupo C na sinalização por açúcares – hexoses – e identificar novos aspectos da sinalização por açúcares e da homeostasia energética;
- analisar a participação da região promotora de *AtbZIP63* em sua regulação por hexoses (manose e glicose) e ABA.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal e condições de cultivo

*A. thaliana* ecótipo Columbia (Col-0) foi utilizada em todos os experimentos de PCR-semiquantitativa. Nos experimentos com PCR em Tempo Real (RT-qPCR), foram utilizadas plantas transgênicas de duas linhagens homozigóticas para o transgene promotor *AtbZIP63::gusA*, os mutantes *aba2-1* (Léon-Kloosterziel *et al.*, 1996), *abi4-1* (Finkelstein, 1994), *ctr1-1* (Kieber *et al.*, 1993), *ein3-1* (Kieber *et al.*, 1993; Roman *et al.*, 1995), *etr1-1* (Chang *et al.*, 1993) e o ecótipo selvagem correspondente Columbia; o mutante *gin2-1* (Jang *et al.*, 1997) e o ecótipo selvagem correspondente Landsberg erecta (Ler); e o mutante *abi5-1* (Laby *et al.*, 2000) e o ecótipo selvagem correspondente Wassilewskija (Ws). Todas linhagens mutantes foram obtidas pelo “The Arabidopsis Information Resource (TAIR)”.

Para multiplicação dos genótipos utilizados neste trabalho, a germinação e o desenvolvimento inicial foram realizados *in vitro* em meio de cultura MS/2 sólido (Murashige and Skoog, 1962), correspondente a 2,1g/l de sais MS (MS salt mixture, Invitrogen), acrescido de 4,4ml/l de tampão MES 3mM pH 5,7 (Invitrogen) e ajustado a 0,3% de glicose (Labsynth) e 0,55% de agar (Agar Type E, Sigma). Em seguida, plantas com 3 semanas foram transplantadas para vasos contendo terra (substrato para cultivo de hortaliças Plantmax HT) e vermiculita (vermiculita expandida Plantmax) na proporção de 2:1, respectivamente. As plantas foram cultivadas sob fotoperíodo de 16 horas de luz (lâmpadas fluorescente luz do dia e grolux, Sylvania) e temperatura de 22°C. Plantas do mutante *aba2-1* foram cultivadas em câmara úmida, nas mesmas condições acima descritas. Para cultivo

*in vitro*, tanto em meio sólido quanto em meio líquido, as sementes foram esterilizadas em etanol 70% por 5 minutos, hipoclorito de sódio 40% por 20 minutos e quatro lavagens com água MilliQ estéril. A quebra de dormência das sementes ocorreu durante 72 horas, no escuro, a 4°C. Para os experimentos de expressão gênica, 0,023g de sementes (aproximadamente 150 sementes) foram semeadas em meio MS/2 líquido: correspondente a 2,1g/l de sais MS (MS salt mixture, Invitrogen), acrescido de 4,4ml/l de tampão MES 3mM pH 5,7 (Invitrogen) e ajustado a 0,3% de glicose (Labsynth). Em alguns experimentos envolvendo o mutante *gin2-1*, as sementes foram semeadas em meio MS/10, onde foi usado 0,42g de sais MS, mantendo-se as mesmas quantidades de tampão MES e de glicose. As plântulas foram cultivadas durante 5 dias em luz contínua de baixa intensidade (lâmpadas fluorescente luz do dia e grolux, Silvania) e temperatura de 22°C, sobre agitação orbital suave. Passados 5 dias de cultivo, as plantas foram transplantadas para meio MS/2 líquido livre de açúcar, onde permaneceram durante 24 horas, nas mesmas condições de luminosidade, temperatura e agitação acima descritas. Após esse período, foram efetuados tratamentos de 4 e 24 horas com: 1) glicose, a partir de solução estoque 20% esterilizada por filtração (0,22µm; Millex); 2) ABA ( $\pm$ cis,trans-ABSCISIC ACID, Sigma, solução estoque 100mM, dissolvida em etanol absoluto); 3) auxina (2,4D, Sigma, solução estoque 50mM, dissolvida em água MilliQ autoclavada); 4) etileno (na forma do precursor 1-aminocyclopropano-1-carboxylic acid ou ACPC, Sigma, solução estoque 10mM, dissolvida em uma solução NaOH 0,3M, Sigma, preparada com água MilliQ autoclavada); 5) ácido jasmônico (metil-jasmonato, ou MeJa, Sigma, solução

estoque 4,5M, dissolvido em etanol); 6) citocinina (cinetina, Sigma, solução estoque 50mM, dissolvida em água MilliQ autoclavada); e 7) giberelina (GA<sub>3</sub>, Sigma, solução estoque 10mM, dissolvida em metanol).

Para as análises de RT-qPCR, foram efetuados tratamentos de 4 horas com 2% de glicose e de análogos estruturais de glicose: manitol (D-mannitol, Sigma), 3-O-metilglicose (Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, Sigma) e manose (D(+)-Mannose, Merck) a partir de solução estoque 20% esterilizada por filtração (0,22 $\mu$ m; Millex) e ABA ( $\pm$ cis,trans-ABSCISIC ACID, Sigma, solução estoque 100mM, dissolvida em etanol absoluto).

### **Isolamento e análise do RNA total por RT-PCR semiquantitativa**

A extração de RNA total das plântulas utilizadas nos experimentos de expressão gênica foi realizada de acordo com a técnica descrita por Logemann *et al.* (1987) com modificações. As plântulas foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. O tecido foi macerado em cadinho com nitrogênio líquido e então homogeneizado em 0,8ml de tampão de extração (Guanidina HCl 8M; Ultra Pure Guanidine Hydrochloride, Invitrogen), Tris HCl pH 8,0 50mM (Invitrogen), EDTA 20mM pH 8,0 (Ultra Pure EDTA, Invitrogen) e  $\beta$ -Mercaptoetanol 50mM (Vertec). Em seguida foram efetuadas três extrações: duas com fenol:clorofórmio:isoamil (25:24:1, USB, Merck e Merck, respectivamente) e uma com clorofórmio:isoamil (24:1). O RNA foi precipitado por 4 horas com 0,2 volume de acetato de sódio 3M pH 5,2 (Sigma) e 1 volume de etanol absoluto (Merck) gelado. Após a lavagem com etanol 70%, o precipitado foi lavado com etanol absoluto, seco à temperatura ambiente e dissolvido em 35 $\mu$ l de água

tratada com DEPC (Dietilpirofosfato, USB). A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel 1% de agarose (Invitrogen) contendo formaldeído 37% (Merck) como agente denaturante (Sambrook *et al.*, 1989) e sua concentração foi medida no GeneQuant Spectrophotometer (Amersham Pharmacia)

O cDNA foi sintetizado em reações de 50µl, a partir de 6µg do RNA total utilizando-se 2µl da enzima transcriptase reversa (ImProm II Reverse Transcriptase, Dialab), oligonucleotídeo oligodT18 concentração final 600µM (Invitrogen), tampão 1x Reaction Buffer (Dialab), MgCl<sub>2</sub> concentração final 25mM (Dialab), dNTP concentração final 200µM (Eppendorf) e 50U de RNAGuard RNase Inibitor (Amersham Biosciences).

Os cDNAs dos genes de interesse foram amplificados com oligonucleotídeos específicos (Integrated DNA Technologies, IDT), sendo que os *primers* foram desenhados de forma que a região de anelamento de um dos dois primers abrangesse dois éxons adjacentes, evitando a amplificação de DNA genômico. Quando esta condição não foi alcançada, pelo fato do gene não conter íntrons, antes da síntese do cDNA 6,4µg do RNA total foi tratado com desoxirribonuclease (DNase I, Invitrogen) + tampão 1X (200mM Tris-HCl pH 8,4, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 500mM KCl) durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguidos de 10 minutos a 65°C com solução stop de 25mM EDTA (Invitrogen). As seqüências dos genes para a construção de *primers* foram obtidas nos bancos de dados do MATDB (<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/>) e do GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>). Foram utilizados os

*primers* 5'-cctcttactcaaggttctttgatg-3' e 5'-cgttctgagggttcggtattc-3' para *AtbZIP10* (At4g02640, AF310222); 5'-caagccctctagacccttg-3' e 5'-gatgtctgagacgcagctaac-3' para *AtbZIP9* (At5g24800, AF310223); 5'-cgcgtaaaaggatgctctctaataag-3' e 5'-tctgcagatgttccaagctctc-3' para *AtbZIP63* (At5g28770, AF310224) e 5'-gctcaaggctccattgtggcac-3' e 5'-ggattctgcatgccttcacg-3' para *AtbZIP25* (At3g54620, AY054645). Os genes *adenosina fosforibosil transferase Apt1* (At1g27450, AF325045) (5'-tcccagaatcgctaagattgc-3' e 5'-cctttcccttaagctctg-3') e *Actin2* (At3g18780, AF428330) (5'-cgtacaaccggattgtgctgg-3' e 5'-aacgattcctggacctgcctcatc-3') foram utilizados como controles internos para padronização da quantidade de cDNA usada na reação de PCR. Os genes *beta-amylase* (At4g17090, AJ250341) (5'-gctacgacaagtatatgaaatcg-3' e 5'-ccacattctcagcgatcttgcc), e *xyloglucan endotransglycosylase-related protein - XTR-7* (At4g14130, U43489) (5'-cgtcactgcttactactgtcttcac e 5'-ccataagcattgagctcggttgcc-3'), foram utilizados como controles de indução ou repressão por açúcares (Price *et al.*, 2004), respectivamente; *low-temperature-induced protein 78 – RD29A* (At5g52310, L22567) (5'-ccaaagaagaaactggaggag-3' e 5'-cacatcatcacttctcgccg-3') e *bZIP transcription factor AtbZIP39, ABA insensitive 5 – ABI5* (At2g36270, AF334206) (5'-cttgaggatttcttggtgaag-3' e 5'-cactgtatatgcttgtttc-3'), foram utilizados como controles de indução por ABA (Arroyo *et al.*, 2003); *salt-tolerance zinc finger protein like – ERF1* (At1g27730, AF250336) (5'-cagtccccattctccggcttc-3' e 5'-caccaagtcccactattttc-3') e *antifungal protein-like – PDF1.2* (At5g44420, AY063779) (5'-cccttatcttcgctgctcttgttc-3' e 5'-acgtaacagatacacttgtgtgc-3'), foram utilizados como controles de indução por etileno (Lorenzo *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2004), sendo *PDF1.2* também

utilizado como controle de indução por ácido jasmônico; *putative response regulator* – *ARR15* (At1g74890, AF305720) (5'-cgtatagaacaatgtatgatag-3' e 5'-cccctagactctaatttgatc-3'), foi utilizado como controle de indução por citocinina (Franco-Zorrilla *et al.*, 2005); *early auxin-induced protein* – *IAA19* (At3g15540, U49075) (5'-gagataacggagctgagatt-3' e 5'-tttcaaggccacaccgatg-3'), foi utilizado como controle de indução por auxina (Tatematsu *et al.*, 2004); e *gibberellin 2-oxidase* – *AtGA2ox* (At1g30040, BT002987) (5'-cacagccagtcactttagat e 5'-caccgactcacggaaaatttt-3'), *gibberellin 20-oxidase* – *AtGA20ox* (At5g51810) (5'-ggcgatactatgcacaaca-3' e 5'-atacaccttcccaaactgct-3'), foram utilizados como controles de indução ou repressão por ácido giberélico, respectivamente (Thomas *et al.*, 1999). As amplificações foram efetuadas em reações de 50µl de volume, contendo 5µl de cDNA, tampão 1X (Tris HCl 10mM pH9,0, KCl 50mM, Invitrogen), de MgCl<sub>2</sub> concentração final 1,5mM (Invitrogen), dNTP concentração final 200µM (Eppendorf), *primers* direto e reverso com concentração final de 400nM e 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). As reações foram realizadas com um passo inicial de 3 minutos a 94°C; ciclos de 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C (*Apt1*), 58°C (*Bzo2h2*) ou 60°C (demais genes) e 1 minuto e 30 segundos a 72°C; seguidos de uma extensão final de 5 minutos a 72°C. A quantificação do nível de indução ou repressão requereu condições de amplificação não saturantes, verificada por cinética de ciclos de amplificação para cada gene utilizado neste trabalho, e foi realizada por análise comparativa das amostras que apresentaram menor intensidade de amplificação e várias diluições ( $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$  e  $\frac{1}{16}$ ) das demais

amostras que apresentaram padrão de expressão mais forte, através da visualização em gel 1,5% de agarose.

### **PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)**

Os *primers* para RT-qPCR foram desenhados seguindo os seguintes critérios: (1)  $T_M$ : 60°C, (2) tamanho do amplicon beirando 150pb, (3) *primers* de aproximadamente 20 nucleotídeos, (4) conteúdo de guanina-citosina entre 35% e 55%, (5) abranger a junção éxon-éxon para não haver a amplificação de DNA genômico contaminante, exceto para o gene repórter *gusA*, cujo RNA foi tratado com DNase1, como descrito anteriormente e (6) apresentar eficiência de reação aproximadamente entre 90 e 110%. A especificidade dos *primers* foi checada pela análise da performance da curva de dissociação após 40 ciclos na máquina de RT-qPCR e também através de análise de amplicons provenientes de RT-PCR semiquantitativa em gel 2% de agarose. Foram utilizados os *primers* RT-Bzo2h1-F 5'-cctcgaaacacaggttaatg-3' e RT-Bzo2h1-R 5'-gccatttcaccttagctct-3' para o gene *AtbZIP10* (eficiência 112,21%); RT-Bzo2h2-F 5'-gagagtcaaggtgaaactag-3' e RT-Bzo2h2-R 5'-cgaggtatttcccgtgtagt-3' para o gene *AtbZIP9* (eficiência 107,65%); RT-Bzo2h3-F 5'-cgcgttaataggatgctctc-3' e RT-Bzo2h3-R 5'-gtttgagttacatcagtgaga-3' para o gene *AtbZIP63* (eficiência 104,28%); RT-Bzo2h4-F 5'-gctcaaggctccattgtgg-3' e RT-Bzo2h4-R 5'-ccatcaagatcatcgtcatc-3' para o gene *AtbZIP25* (eficiência 92,34%), e os *primers* RT-Actin2-F 5'-cgtacaaccgggtattgtgctgg-3' e RT-Actin2-R 5'-ctctctctgtaaggatcttcatg-3' para o gene controle endógeno *Actin2* (eficiência 90,42%), recomendado por Czechowski *et al.* (2005). A expressão de *Gbf1* (At4g36730, X63894), um gene do tipo bZIP que apresenta repressão por glicose

(Li *et al.*, 2006), também foi medida no mutante *gin2-1* em resposta a glicose e a manose, utilizando os primers RT-GBF1-F 5'-accagtgaaggatgaacgag-3' e RT-GBF1-R 5'-gcaactcctggattgag-3' (eficiência 100,66%). Para verificação da participação do promotor dos quatro genes homólogos na regulação pelos sinais testados, foram utilizadas plantas transgênicas contendo o gene quimérico com a região promotora em fusão com o gene repórter *gusA*. Para tanto, foram utilizados para a quantificação da transcrição de *gusA* os primers Gus qRT-F 5'-gcaattgctgtgccaggca-3' e Gus qRT-R 5'-gcatcgaaacgcagcacgat-3' (eficiência 109,40%).

As reações de RT-qPCR foram realizadas em placas de 96 poços no sistema de detecção de seqüências ABI PRISM 7500 HT, utilizando SYBR Green como detector. As reações continham 12,5µl de Master Mix SYBR Green (Invitrogen), 0,25µl de ROX (referência passiva, Invitrogen), *primers* direto e reverso em concentração final de 200nM e 2µl de cDNA, totalizando 25µl de reação. As condições utilizadas nas reações foram um passo inicial de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Curvas de dissociação foram feitas após cada reação através do aquecimento de 60° para 95°C, subindo 1°C por minuto. Este procedimento serviu para comprovar a ausência de contaminação ou da formação de *primers-dimers* nas reações. A linha de base foi coletada entre os ciclos 3 e 15 e todas as amplificações foram analisadas utilizando o *threshold*  $R_n$  em 0,2 para a obtenção dos valores de  $C_T$ . O nível de expressão de cada gene foi quantificado em relação ao controle não tratado, utilizando como padronização o gene controle endógeno *Actin2*, e demonstrado da seguinte maneira:  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , onde  $\Delta C_T = C_{T(\text{gene alvo})} -$

$C_{T(Actin2)}$  e  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{tratamentos})} - \Delta C_{T(\text{tipo selvagem não tratado})}$ . A expressão gênica relativa (EGR) de cada gene dentro dos mutantes avaliados neste trabalho foi dada pela relação da expressão no genótipo tratado pela expressão no genótipo equivalente não tratado, ou seja,  $EGR = 2^{-\Delta\Delta C_{t_{\text{genótipo tratado}}}} / 2^{-\Delta\Delta C_{t_{\text{genótipo não tratado}}}}$ .

### **Análise estatística**

Os dados coletados na RT-qPCR foram tabulados no programa Excel Version XP (Microsoft Inc.). Foi necessária a transformação dos dados em  $\text{Log}_2$  para adequá-los em uma distribuição amostral normalizada e assim efetuar a análise estatística. Os dados transformados foram submetidos ao Teste T para a identificação de diferenças significativas entre os tratamentos, fixando um limite  $P \leq 0.0075$ . Além disso, para simplificar o conjunto de dados gerados pela análise estatística, foi definido um limite de 2 vezes tanto para a indução como para a repressão dos genes em estudo para considerar uma regulação significativa por determinado sinal testado.

### **Fusão traducional da seqüência promotora de *AtbZIP63* e da região 5'-UTR ao gene marcador *gusA***

A seqüência promotora de *AtbZIP63* foi definida em trabalhos prévios de nosso laboratório (Gauer, 2004) a partir da identificação da seqüência nucleotídica presente nos bancos de dados (<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/>). A região promotora de *AtbZIP63* (2,87Kb), incluindo a região 5' UTR e 12 aminoácidos N-terminais, foi obtida por amplificação do DNA genômico, utilizando *primers* adequados (5'-

ggatgattgcccaatcgacagactttaatcg-3' e 5'-gtgatggttaccggagatttcttcg-3'), que adicionam os sítios *Pst*I (extremidade 5') e *Bam*HI (extremidade 3') para clonagem em fase com o gene *gusA* no vetor binário de transformação de planta pBI 121, do qual o promotor 35S foi removido. Os vetores carregando os genes quiméricos foram introduzidos em *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMO90 para a transformação de *A. thaliana*. O cultivo, conservação e transformação de *A. tumefaciens* e a metodologia de transformação de *A. thaliana in planta* foram descritos por Gauer (2004). As sementes foram coletadas e semeadas em meio MS/2, suplementado com 0,5% de sacarose, contendo canamicina como marcador de seleção (100µg/ml). A identificação das plantas com um locus ativo do gene quimérico foi feita pela análise do padrão de segregação de resistência a canamicina na geração F<sub>1</sub>, proveniente da autofecundação das plantas F<sub>0</sub> resistentes a canamicina, e por PCR do DNA genômico de plantas F<sub>2</sub> para comprovação e conseqüente estabelecimento de linhagens homozigotas.

### **Extração e análise do DNA genômico**

A extração do DNA genômico das plantas transformadas com os transgenes da região promotora de *AtbZIP63* em fusão com o gene repórter *gusA* foi realizada segundo protocolo descrito por Doyle and Doyle (1987) com modificações. Plântulas de cada linhagem foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. O tecido foi macerado em cadinho com nitrogênio líquido e então homogeneizado em 0,8ml de tampão de extração (Tris-HCl 0,1M pH 8,0; 2% de CTAB, Sigma; EDTA 0,02M; NaCl 1,4M, Merck, e 0,2% de β-mercaptoetanol) pré aquecido a 65°C. O material foi incubado por 1 hora e

após esse período duas extrações com 1 volume de fenol:clorofórmio (24:1 v/v) foram realizadas. O DNA foi precipitado por 4 horas com 1 volume de isopropanol (Merck) gelado. Após a lavagem com etanol 70%, o precipitado foi lavado com etanol absoluto, seco à temperatura ambiente e dissolvido em 60µl de TE+RNase A (Tris-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 1mM pH8,0, Ultra Pure EDTA; 100µg/ml de RNase A, Sigma) e incubado por 30 minutos a 37°C. O DNA genômico foi quantificado em gel 1% de agarose. Foram utilizados *primer* direto específico anelando-se no promotor de *AtbZIP63* (5'- gtccaagaaaatgtgtccg -3') e o *primer* reverso específico anelando-se no gene repórter *gusA* (GUS reverso: 5'- cggatgatcgtccacca-3'). As amplificações foram efetuadas em reações de 50µl de volume, contendo 1µl de DNA, tampão 1X (Tris HCl 10mM pH9,0, KCl 50mM, Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> concentração final 1,5mM (Invitrogen), dNTP concentração final 200µM (Eppendorf), *primers* direto e reverso concentração final 400nM e 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). As reações foram realizadas com um passo inicial de 3 minutos a 94°C; ciclos de 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C; seguidos de uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Os fragmentos gerados foram observados em gel 1,5% de agarose.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em *A. thaliana* foram identificados quatro genes ortólogos ao regulador *Opaco-2* do milho, conhecidos como *bZIP O2 homologous (Bzo2h)* ou bZIPs do Grupo C (Vincentz *et al.*, 2003). *O2* codifica um fator de transcrição do tipo bZIP, cuja função está relacionada ao metabolismo coordenado de carbono e nitrogênio e à síntese de prolaminas de reserva durante o desenvolvimento da semente. Este grupo foi identificado através de análises filogenéticas entre bZIPs de *Arabidopsis* e de arroz, as quais permitiram a formação por três possíveis grupos de ortólogos de mono e eudicotiledôneas (PoGO C1, PoGo C2 e PoGO C3). Possivelmente estes três PoGOS representem três funções ancestrais de angiospermas, representados por *AtbZIP63*, o provável ortólogo de *O2* (PoGO C1), o par de parálogos *AtbZIP10* e *AtbZIP25* (PoGO C2), e *AtbZIP9* (PoGO C3) (Correa, 2004). Sabe-se que *AtbZIP63* pode estar envolvido com o balanço energético da planta, *AtbZIP10* está associado com e resposta hipersensitiva e à defesa basal da planta, *AtbZIP10* e *AtbZIP25* participam na regulação da expressão de genes na semente e que *AtbZIP9* provavelmente desempenhe um papel no processo de desenvolvimento do floema (Lara *et al.*, 2003; Kaminaka *et al.*, 2006; Weltmeier *et al.*, 2006; Baena-González *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2007). A caracterização funcional dos bZIPs do Grupo C terá um grande valor não apenas para agregar informações a esta classe de fatores de transcrição, mas também para o esclarecimento da conservação e evolução das funções relacionadas a *O2* (balanço carbono/nitrogênio) em angiospermas. Para auxiliar a caracterização funcional dos bZIPs do Grupo C, neste trabalho foi iniciada a análise sistêmica e

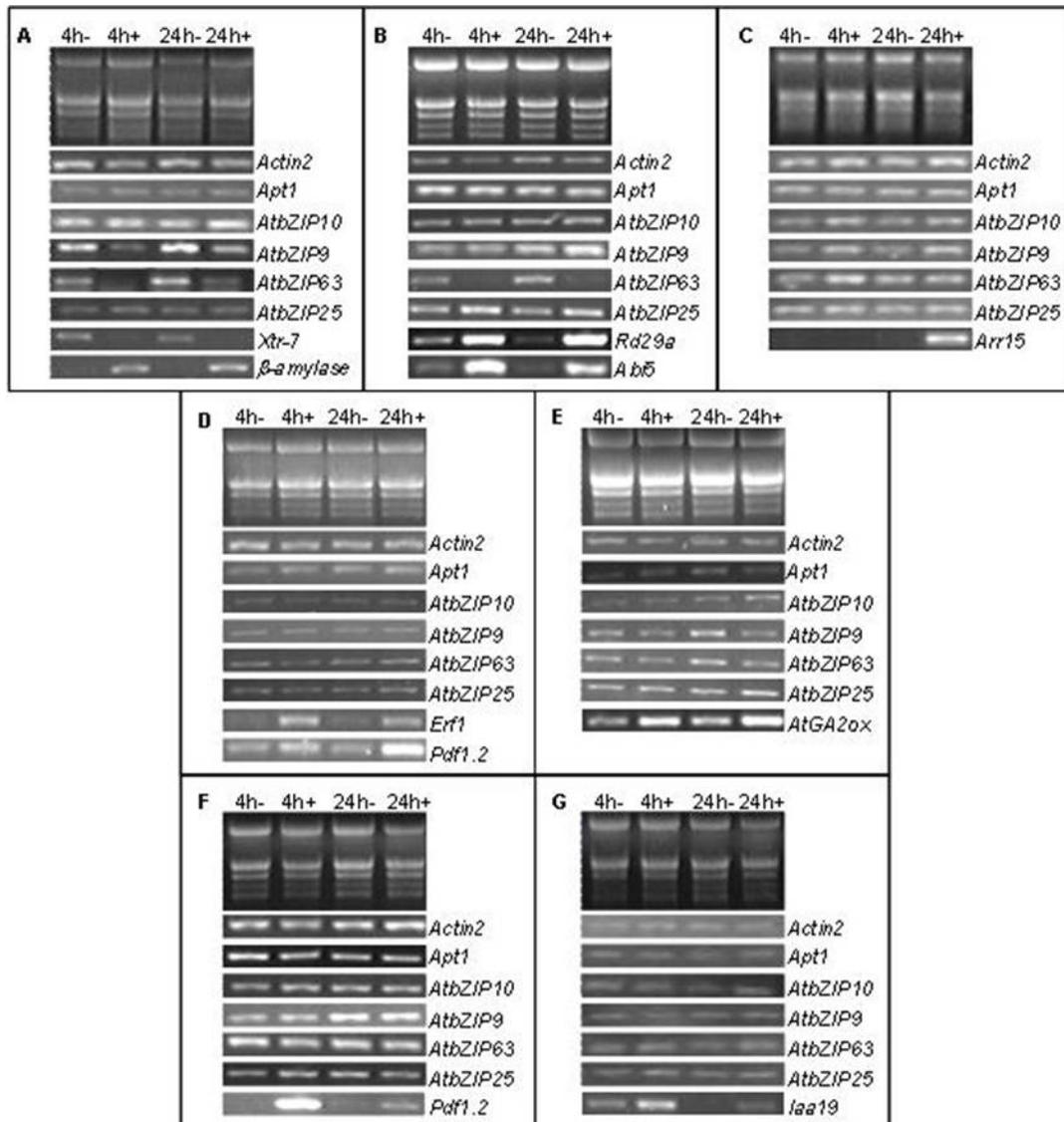
detalhada de suas regulações em resposta a diversos sinais endógenos (hormônios) e a açúcares.

### **A expressão dos genes do Grupo C é regulada por açúcares e ABA**

Neste trabalho foi constatado que a expressão dos quatro genes não é afetada pelo tratamento de plântulas com 6 dias com ACPC, precursor do etileno (Figura 5D). Também não foram detectadas diferenças nas regulações dos membros do Grupo C em repostas aos tratamentos com giberelina, ácido jasmônico e auxina (Figura 5E, F e G, respectivamente). Entretanto mostrou-se que a expressão dos bZIPs do Grupo C é fracamente induzida por citocinina (Figura 5C).

Considerando que os bZIPs do Grupo C são homólogos ao *Opaco-2* de milho (Vincentz *et al.*, 2003), cuja função está relacionada ao metabolismo coordenado do carbono e do nitrogênio, foi analisada a possível regulação dos quatro genes homólogos por açúcares (sacarose e glicose). A expressão de *AtbZIP9* e *AtbZIP63* foi reprimida tanto por glicose (Figura 5A), quanto por sacarose (dados não apresentados), enquanto que a expressão de *AtbZIP10* foi induzida por glicose e *AtbZIP25* não apresentou regulação por glicose (Figura 5A). Adicionalmente a esses resultados, a cinética de sensibilidade da repressão de *AtbZIP9* e *AtbZIP63* em resposta a glicose foi caracterizada (Figura 6). Ambos genes apresentaram resposta já na primeira dose de glicose utilizada (0,05%), tendo *AtbZIP9* uma repressão da transcrição em torno de 50% quando analisadas plantas tratadas com 0,05% e mantendo um platô de repressão nas doses 0,5% em diante (Figura 6A). *AtbZIP63* apresentou repressão de cerca de 67% na dose

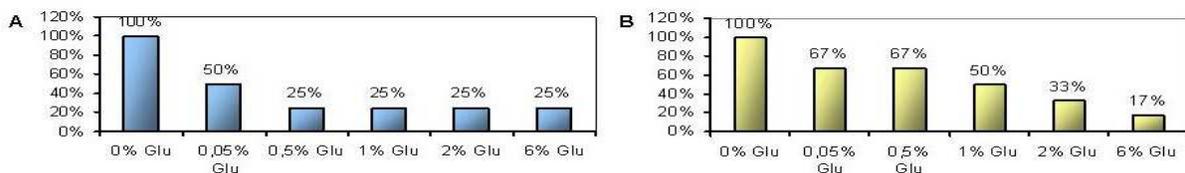
de 0,05%, porém a repressão foi mais acentuada conforme o aumento das doses de glicose utilizadas (Figura 6B).



**Figura 5.** Regulação da expressão dos genes bZIPs do Grupo C de *A. thaliana*. Para todos os experimentos, o RNA foi extraído de plântulas ecótipo Columbia-0 (Col-0) cultivadas durante 6 dias após a estratificação, em meio líquido MS/2, sob luz contínua e agitação leve. As plântulas foram tratadas durante 4 (4h) e 24 (24h) horas com os diversos sinais testados neste trabalho. “-” significa ausência de tratamento e “+” presença de tratamento. Para todos os experimentos, a integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel denaturante 1% de agarose com 0,5µg de RNA total por amostra. A RT-PCR semiquantitativa em condições não saturantes foi realizada para a avaliação da regulação de *AtbZIP9* (25 ciclos), *AtbZIP10* (24 ciclos), *AtbZIP25* (21 ciclos) e *AtbZIP63* (20 ciclos), pelos diversos sinais. *Actin2* (15 ciclos) e *Apt1* (20 ciclos) foram utilizados como controles internos de padronização da quantidade de cDNA. Genes cujas regulações pelos sinais utilizados já é estabelecida foram utilizados como controle de eficácia de tratamento. **A.** Regulação dos bZIPs do Grupo C por 2% de glicose. *AtbZIP10* é ligeiramente induzido, enquanto que *AtbZIP25* não é regulado, e *AtbZIP9* e *AtbZIP63* são reprimidos por glicose. Foram utilizados

como controles positivos os genes *Xtr-7* e  $\beta$ -*amylase*, reprimido e induzido por glicose, respectivamente. **B.** Regulação dos bZIPs do Grupo C por 100 $\mu$ M de ABA. *AtbZIP9* e *AtbZIP25* são induzidos, enquanto que *AtbZIP10* não é regulado, e *AtbZIP63* é reprimido por ABA. Foram utilizados como controles positivos os genes *Rd29a* e *Abi5*, ambos induzidos por ABA. **C.** Regulação dos bZIPs do Grupo C por 50 $\mu$ M de citocinina. Todos os membros do Grupo C apresentam indução por citocinina. Foi utilizado como controle positivo o gene *Arr15*, que é induzido por citocinina. **D.** Regulação dos bZIPs do Grupo C por 50 $\mu$ M de ACPC, precursor do etileno. Os membros do Grupo C não apresentam regulação por etileno. Foram utilizados como controles positivos os genes *Erf1* e *PDF1.2*, que são induzidos por etileno. **E.** Regulação dos bZIPs do Grupo C por 50 $\mu$ M de ácido giberélico (GA3). Os membros do Grupo C não apresentam regulação por giberelina. Foi utilizado como controle positivo o gene *AtGA2ox*, que é induzido por giberelina. **F.** Regulação dos bZIPs do Grupo C por 50 $\mu$ M de ácido jasmônico (MeJa). Os membros do Grupo C não apresentam regulação por ácido jasmônico. Foi utilizado como controle positivo o gene *Pdf1.2*, que é induzido por ácido jasmônico. **G.** Regulação dos bZIPs do Grupo C por 50 $\mu$ M de auxina (2,4D). Os membros do Grupo C não apresentam regulação por auxina. Foi utilizado como controle positivo o gene *laa19*, que é induzido por auxina.

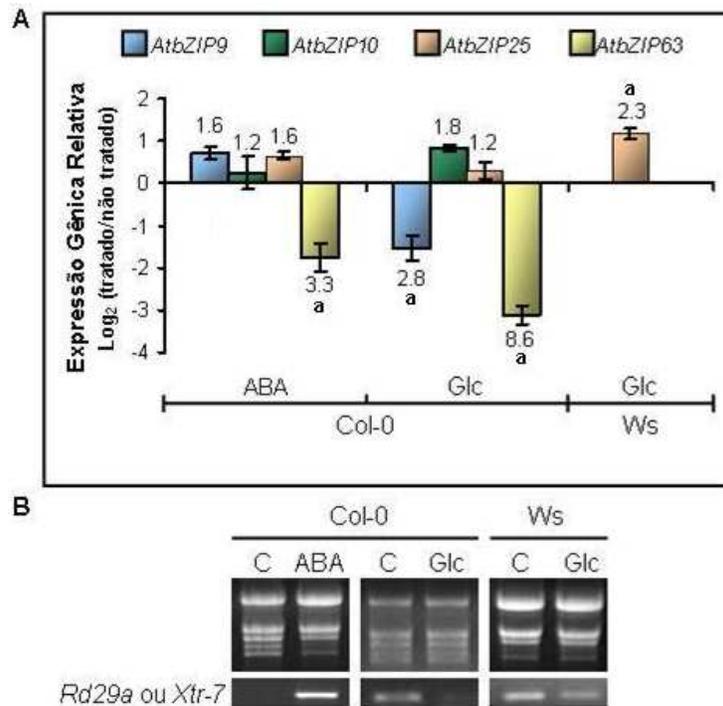
Estes dados caracterizam *AtbZIP9* e *AtbZIP63* como altamente sensíveis a glicose e podem dar evidências de que ambos são reguladores importantes das vias de regulação de resposta a este açúcar. O fato de *AtbZIP9*, *AtbZIP10* e *AtbZIP63* apresentar resposta rápida a glicose (4 horas, Figura 5), e de *AtbZIP9* e *AtbZIP63* serem sensíveis a presença deste açúcar no meio, estão dando indícios de que possivelmente estes genes são elementos primários da cascata regulatória por glicose.



**Figura 6.** Sensibilidade da resposta de *AtbZIP9* e *AtbZIP63* a glicose. Para todos os experimentos, o RNA foi extraído de plântulas ecótipo Columbia-0 (Col-0) cultivadas durante 5 dias após a estratificação, em meio sólido MS/2, sob luz contínua. Após este período, as plântulas foram transplantadas para meios sólidos contendo 0, 0,05, 0,5, 1, 2 ou 6% de glicose e incubadas por 24 horas. RT-PCR semiquantitativa em condições não saturantes foi realizada para a avaliação da regulação de *AtbZIP9* (25 ciclos) e *AtbZIP63* (20 ciclos) em função das doses utilizadas. *Actin2* (15 ciclos) foi utilizado como controle interno de padronização da quantidade de cDNA. A quantificação foi efetuada através da avaliação da intensidade do produto de PCR obtido no controle 0% glicose nas diluições  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$  e  $\frac{1}{16}$ , em relação às intensidades dos produtos de PCR dos tratamentos com diferentes doses de glicose. **A.** Sensibilidade da regulação de *AtbZIP9* em função de doses

crescentes de glicose. **B.** Sensibilidade da regulação de *AtbZIP63* em função de doses crescentes de glicose.

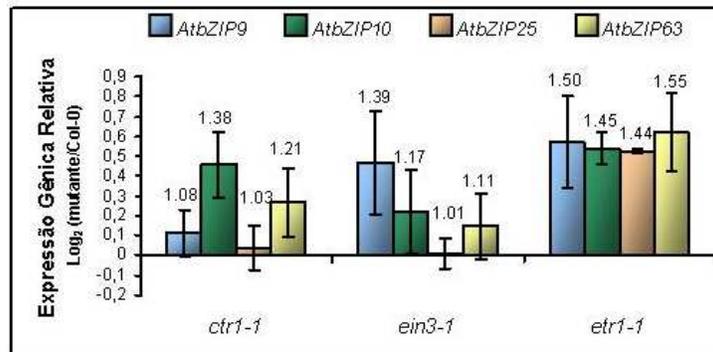
A quantificação da regulação dos bZIPs do Grupo C por glicose, utilizando RT-qPCR, confirmou uma redução de 2,8 e de 8,6 vezes dos transcritos de *AtbZIP9* e *AtbZIP63*, respectivamente, nas primeiras quatro horas de tratamento com glicose, enquanto que a indução de *AtbZIP10* observada por RT-PCR semiquantitativa mostrou ser não significativa quando quantificada por RT-qPCR (Figura 7). Interessantemente, quando avaliada a regulação dos quatro genes do Grupo C no ecótipos Ler e Ws por RT-qPCR, observou-se que a expressão de *AtbZIP25* foi induzida 2,3 vezes apenas no ecótipo Ws (Figura 7). Provavelmente esta indução de *AtbZIP25* por glicose apenas em Ws deve ser atribuída a diferenças de *background* genético entre os ecótipos Col-0, Ler e Ws. Assim, os dados demonstram que os genes bZIP do grupo C são possíveis elementos da sinalização por glicose e estão de acordo com dados de análise do transcriptoma em resposta a glicose (Price *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006). Em *Arabidopsis*, um total de 1768 genes são regulados por glicose (Li *et al.*, 2006), o que equivale a aproximadamente 6,3% de seu genoma. Dentre esses 1768 genes, 39 codificam para fatores de transcrição e 8 codificam para fatores do tipo bZIP, sendo 5 reprimidos (*AtbZIP1*, *AtbZIP3*, *AtbZIP9*, *AtbZIP41* e *AtbZIP63*) e 3 induzidos por este açúcar (*AtbZIP8*, *AtbZIP11* e *AtbZIP39*) (Price *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006). Desta maneira *AtbZIP9* e *AtbZIP63* representam dois dos oito bZIPs anteriormente descritos, enquanto que neste trabalho é descrito mais um fator de transcrição do tipo bZIP regulado por glicose: *AtbZIP25*.



**Figura 7.** Efeito de ABA e glicose sobre a expressão dos genes dos reguladores bZIPs do Grupo C de *A. thaliana*. Foram utilizadas plântulas dos ecótipos Columbia (Col-0) e Wassilewskija (Ws), com 6 dias após a estratificação, cultivadas em meio líquido MS/2, sob luz contínua e agitação leve. As plântulas foram tratadas com 2% de glicose (Glc) ou 100µM de ABA durante 4 horas. O RNA total foi extraído e analisado e o cDNA sintetizado foi utilizado nas análises de RT-qPCR. **A.** Abundância relativa dos transcritos do Grupo C em resposta a ABA e glicose. Os níveis de transcritos foram normalizados utilizando o gene *Actin2* como controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão das plântulas sem tratamento. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 5 e 11 experimentos independentes para *AtbZIP9*, utilizando o ecótipo Columbia-0 em resposta a ABA e glicose, respectivamente; 5 e 4 experimentos independentes para *AtbZIP10* em resposta a ABA e glicose, respectivamente; 5 e 7 experimentos independentes para *AtbZIP25* em resposta a ABA e glicose, respectivamente; e 8 e 11 experimentos independentes para *AtbZIP63* em resposta a ABA e glicose, respectivamente. Para o ecótipo Wassilewskija, os dados refletem a média +/- desvio padrão de 3 experimentos independentes. Os números em cada coluna representam quantas vezes a quantidade de transcritos aumentou ou diminuiu em relação ao controle correspondente não tratado. Um limite de indução ou repressão  $\geq 2$  foi fixado para considerar uma regulação relevante pelos sinais testados, além da observação de diferenças significativas pelo Teste *t* de Student ( $P \leq 0,0075$ ), indicados com "a" no gráfico. **B.** Para todos os experimentos, o RNA total foi extraído e sua integridade foi verificada através de eletroforese em gel denaturante 1% de agarose com 0,5µg de RNA total por amostra. "C" significa ausência de tratamento. Genes cujas regulações por ABA e glicose eram previamente conhecidas foram utilizados como controle de eficácia de tratamento, indução de *Rd29a* e repressão de *Xtr-7*, respectivamente, detectadas por PCR semiquantitativa.

Diversos trabalhos apontam para a existência de interações genéticas das vias de sinalização de açúcares e do ABA (Cheng *et al.*, 2002; Rolland *et al.*, 2002b; León and Sheen, 2003; Gibson, 2004) e de açúcares e de etileno (Zhou *et*

*al.*, 1998; Rolland *et al.*, 2002b; León and Sheen, 2003; Yanagisawa *et al.*, 2003; Gibson, 2004). O ácido abscísico (Rock, 2000; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Xiong and Zhu, 2001; Finkelstein *et al.*, 2002; Brocard-Gifford *et al.*, 2004) e o etileno (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Xiong and Zhu, 2001; de Paepe *et al.*, 2004) estão envolvidos na regulação de diversos processos vitais para as plantas, incluindo aspectos do desenvolvimento e respostas a estresses bióticos e abióticos. Considerando a interação entre glicose e etileno procurou-se verificar a regulação dos bZIPs do grupo C por etileno através da análise comparativa da expressão destes genes em vários mutantes de sinalização do etileno. Esta análise também foi baseada na indução de *AtbZIP63* no contexto mutante *ctr1* (ativação constitutiva da sinalização por etileno) (GENEVESTIGATOR, Zimmermann *et al.*, 2004, <https://www.genevestigator.ethz.ch/>). Embora tenha sido demonstrado anteriormente que etileno não apresenta efeitos sobre a expressão dos genes bZIP do grupo C (Figura 5), procurou-se analisar a expressão destes genes nos mutantes de sinalização do etileno (Benavente and Alonso, 2006) para certificar-se da ausência de regulação por este fitormônio, porém não detectaram diferenças nos padrões de expressão dos genes bZIPs do Grupo C quando comparados os mutantes *ein3-1*, *etr1-1* e *ctr1-1* com a linhagem selvagem Col-0 (Figura 8). Portanto, nas condições experimentais deste estudo a sinalização por etileno não regula a expressão dos bZIPs do Grupo C.



**Figura 8.** Padrão de expressão dos bZIPs do Grupo C de *A. thaliana* nos mutantes *ctr1-1*, *ein3-1* e *etr1-1*. Foram utilizadas plântulas dos ecótipos Columbia (Col-0), com 6 dias após a estratificação, cultivadas em meio líquido MS/2, sob luz contínua e agitação leve. O RNA total foi extraído e analisado e o cDNA sintetizado foi utilizado nas análises de RT-qPCR. A abundância relativa dos transcritos do Grupo C nos mutantes foi normalizada utilizando o gene *Actin2* como controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão da linhagem selvagem. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 2 experimentos independentes para todos os genes. Os números em cada coluna representam quantas vezes a quantidade de transcritos aumentou em relação à linhagem selvagem. Os genes do Grupo C não alcançaram o limite de indução  $\geq 2$  para ser considerada uma regulação relevante nos mutantes testados.

Como mencionado acima, existem amplas evidências das interações entre as vias de sinalização de açúcares e do ácido abscísico (ABA) (Zhou *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2002; Rolland *et al.*, 2002; León and Sheen, 2003; Yanagisawa *et al.*, 2003; Gibson, 2004, Rook *et al.*, 2006). Conseqüentemente, a possibilidade da expressão dos quatro genes do Grupo C serem regulados por ABA foi testada. Foi constatado por RT-PCR semiquantitativa que a expressão de *AtbZIP9* e *AtbZIP25* é induzida e a expressão de *AtbZIP63* é reprimida, enquanto que *AtbZIP10* não é regulado por ABA (Figura 5B). Quando quantificada a expressão dos quatro genes do Grupo C em resposta a ABA por RT-qPCR, verificou-se que as induções de *AtbZIP9* e *AtbZIP25* observadas por RT-PCR semiquantitativa não eram significativas, porém a expressão de *AtbZIP63* caiu 3,3 vezes (Figura 7). Estes dados sugerem que *AtbZIP63* deve estar envolvido na cascata de sinalização do

ABA e que possivelmente se trata de um gene de resposta primária a este hormônio.

Baseado no conjunto de dados descritos acima, pode-se afirmar que *AtbZIP9*, *AtbZIP25* e *AtbZIP63* são regulados por glicose e no caso de *AtbZIP63* também por ABA. Em plantas, os açúcares funcionam como fonte metabólica e também são importantes reguladores de vários processos associados com crescimento, maturação e senescência (Jang and Sheen, 1997, León and Sheen, 2003). Suas atividades regulatórias incluem tanto a repressão, quanto a ativação de vários genes, incluindo genes envolvidos na fotossíntese, metabolismo de carbono e de nitrogênio, resposta a estresses e metabolismo secundário (Rolland *et al.*, 2002b; Price *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006) e é possível que mecanismos distintos de sensibilidade e transdução estejam envolvidos (Jang and Sheen, 1997; Smeekens and Rooks, 1997; Chiou and Bush, 1998; Moore *et al.*; 2003). As respostas de *AtbZIP9* e *AtbZIP25* a glicose, repressão e indução, respectivamente, e a ausência de resposta de ambos a ABA, indicam que possivelmente as vias de sinalização de açúcar nas quais *AtbZIP9* e *AtbZIP25* estão inseridos não envolvem ABA. Por outro lado, a repressão de *AtbZIP63* tanto por glicose, quanto por ABA, sugere que a regulação desse gene envolve uma cascata de resposta à glicose envolvendo a participação de ABA. Desta maneira, pode-se propor que *AtbZIP63* representa um ponto de comunicação entre as vias de sinalização de ABA e glicose.

**A repressão de *AtbZIP63* por manose sugere o envolvimento de HKX1 como sensor na repressão de *AtbZIP63* por glicose. Manose aparentemente atua independentemente de glicose na repressão de *AtbZIP25***

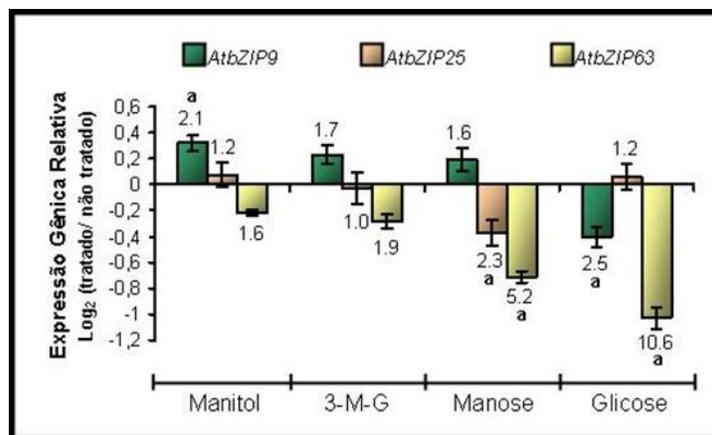
Para caracterizar as vias de sinalização de glicose, alguns trabalhos têm utilizado análogos de glicose não metabolizáveis, que têm sido usados para a identificação da participação de HKX, e mais especificamente de HKX1, como um sensor da glicose (Moore *et al.*, 2003) baseados no esquema abaixo (Figura 9). Dessa maneira, foram utilizados manitol (um análogo de glicose que não é transportado para o interior da célula), 3-O-metilglicose (3-M-G), que é transportado através da membrana plasmática, mas não é fosforilado pela HKX; e manose (é transportado para o interior da célula, fosforilado pela HKX, mas é pouco metabolizado), para definir melhor a sinalização por glicose envolvida no controle da expressão dos bZIPs do Grupo C.



**Figura 9.** Modelo idealizado do metabolismo dos análogos de açúcar. As setas indicam os diferentes passos no transporte e no metabolismo dos análogos de açúcar. Os "x" nas setas indicam que, de acordo com o modelo idealizado (apresentado em azul), os componentes indicados não prosseguem para o passo seguinte. Exceções selecionadas do modelo idealizado estão apresentadas em vermelho (adaptado de Gibson, 2000).

Os resultados permitiram deduzir que as repressões de *AtbZIP9* e de *AtbZIP63* por glicose não são relacionadas a choque osmótico, mas a uma regulação específica por glicose, visto que *AtbZIP63* não responde a manitol,

enquanto que a expressão de *AtbZIP9* é induzida por este análogo de glicose (Figura 10). Esta última observação, aliada à ligeira indução de *AtbZIP9* por ABA (1,6 vezes, Figura 7), sugere que este gene é regulado por estímulos que induzem respostas a choques osmóticos. Os bZIPs do grupo C não apresentaram resposta a 3-M-G (Figura 10), indicando que suas repostas a glicose não dependem do transporte dessa hexose para o interior da célula. *AtbZIP63* também foi reprimido por manose, o que indica que sua repressão por glicose pode ser mediada por HXK e possivelmente, mais especificamente por HXK1 que já foi identificada com um sensor da glicose em plantas (Moore *et al.*, 2003). Interessantemente, notou-se que a expressão de *AtbZIP25* é reprimida 2,3 vezes por manose (Figura 10) e não é alterada por glicose no ecótipo Col-0, enquanto que no ecótipo Ws *AtbZIP25* é induzido por glicose (Figura 8) e reprimido por manose (ver Figura 17). Estes dados trazem à luz informações de manose atuando como um sinal distinto de glicose na regulação gênica. Até então, efeitos específicos da manose sob a germinação haviam sido reportados (Pego *et al.*, 1999; Dekkers *et al.*, 2004; Yuan and Wysocka-Diller, 2006), mas poucos efeitos sobre sua relação com a regulação da expressão gênica são conhecidos (Smeekens, 1998; Ciereszko and Klecskowiński, 2002). Assim, os dados deste trabalho trazem evidências que manose e glicose envolvem vias de sinalização distintas não apenas na germinação de sementes, mas também na regulação da expressão de fatores de transcrição do tipo bZIP e enfatizam a importância de manose como um sinal na regulação da expressão gênica.



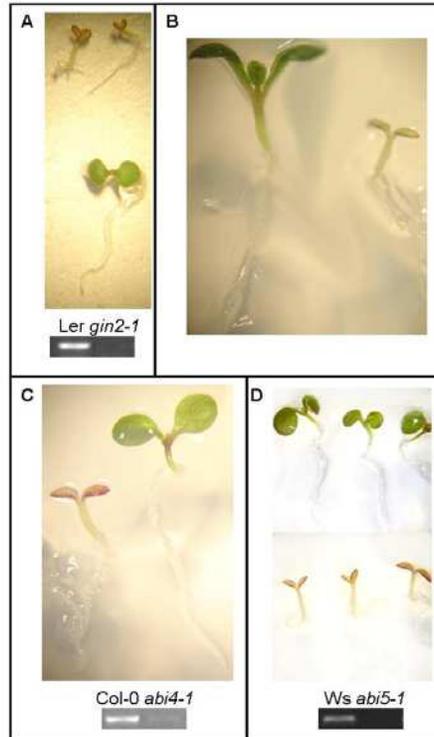
**Figura 10.** Regulação de *AtbZIP9*, *AtbZIP25* e *AtbZIP63* em resposta a análogos de glicose. Foram utilizadas plântulas do ecótipo Columbia (Col-0), com 6 dias após a estratificação, cultivadas em meio líquido MS/2, sob luz contínua e agitação leve. As plântulas foram tratadas com 2% de Manitol, 2% de 3-O-metilglicose (3-M-G), 2% de manose e 2% de glicose durante 4 horas. O RNA total foi extraído e analisado e o cDNA sintetizado foi utilizado nas análises de RT-qPCR. A abundância relativa dos transcritos de cada gene foi normalizada utilizando o gene *Actin2* como controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão das plântulas sem tratamento. Os dados no gráfico correspondem à média  $\pm$  o desvio padrão de 3 experimentos independentes para todos os tratamentos. Os números em cada coluna representam quantas vezes a quantidade de transcritos aumentou ou diminuiu em relação ao controle não tratado. Um limite de indução ou repressão  $\geq 2$  foi fixado para considerar uma regulação relevante pelos sinais testados, além da observação de diferenças significativas pelo Teste *t* de Student ( $P \leq 0,0075$ ), indicados com “a” no gráfico.

A função fisiológica da regulação gênica por manose é desconhecida. Sabe-se que manose tem sido detectada em frações de hemicelulose e está associada com o controle da quebra de lipídios na semente, metabolismo da parede celular, síntese de vitamina C e glicolização de proteínas (Lukowitz *et al.*, 2001; To *et al.*, 2002; Pastory *et al.*, 2003). A manose livre existe em plantas apenas em pequenas porções e é fosforilada imediatamente pela HKX em manose-6-fosfato (M-6-P). Em muitas espécies de plantas, M-6-P é metabolizada vagorosamente. Evidências da manose como um regulador de processos biológicos consiste na observação de que manose é um potente inibidor da germinação da semente e os dois reguladores ABI3 e ABI4, elementos da via de sinalização de ABA, estão envolvidos neste processo (Dekkers *et al.*, 2004; Yuan

and Wysocka-Diller, 2006). O fato de *AtbZIP25* e *AtbZIP63* ser regulados por manose sugere que estes dois fatores de transcrição podem estar envolvidos na sinalização por manose.

### **As repressões de *AtbZIP9* por glicose e de *AtbZIP63* por glicose e manose não envolvem HXK1**

Os componentes da malha de sinalização de açúcar ainda precisam ser melhor conhecidos. Existem três vias de sinalização distintas de resposta a glicose. A primeira é uma via dependente da função sinalizadora da HXK1. A segunda é uma via dependente da glicolise que é influenciada pela atividade catalítica da HXK1 e de outras HXK. A última é uma via independente de HXK1 (Jang and Sheen, 1997; Sheen *et al.*, 1999; Fujiki *et al.*, 2000; Smeeckens, 2000; Xiao *et al.*, 2000; Rolland *et al.*; 2002b; Moore *et al.*, 2003). Para investigar a participação de HXK1 no controle da regulação da expressão de *AtbZIP9*, *AtbZIP25* e *AtbZIP63* em resposta a glicose, e em resposta a manose, no caso de *AtbZIP25* e *AtbZIP63*, foi utilizado o mutante nulo para HXK1, denominado *gin2-1*. O desenvolvimento deste mutante é insensível a 6% de glicose (Figura 11A), e apresenta repressão deficiente por glicose de genes da fotossíntese (Moore *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2006).



**Figura 11.** Fenótipo *glucose-insensitive* (*gin*) dos mutantes *gin2-1*, *aba2-1*, *abi4-1* e *abi5-1* em comparação aos respectivos genótipos selvagens. As plântulas foram cultivadas em meio sólido MS/2 suplementado com 6% de glicose durante 10 dias. **A.** Desenvolvimento atrasado de plântulas selvagens Ler (acima) em comparação com o mutante *gin2-1* (abaixo). A PCR utilizando *primers* específicos para o gene *HXK1* mostra a ausência do mRNA de *HXK1* no mutante *gin2-1*, caracterizando-o como um mutante nulo. **B.** Desenvolvimento atrasado de plântula selvagem Col-0 (direita) em comparação com o mutante *aba2-1* (esquerda). **C.** Desenvolvimento atrasado de plântula selvagem Col-0 (direita) em comparação com o mutante *abi4-1* (direita). A PCR utilizando *primers* específicos para o gene *ABI4* detectou pequenas quantidades de mRNA deste gene no mutante *abi4-1*, este alelo consiste numa mutação na fase de leitura que causa uma terminação prematura na tradução (Finkelstein *et al.*, 1998), o que torna *abi4-1* um mutante funcionalmente inoperante. **D.** Desenvolvimento atrasado de plântulas selvagens Ws (abaixo) em comparação com plântulas mutantes *abi5-1* (acima). A PCR utilizando *primers* específicos para o gene *ABI5* mostrou ausência do mRNA de *ABI5* no mutante *abi5-1*, caracterizando-o como um mutante nulo.

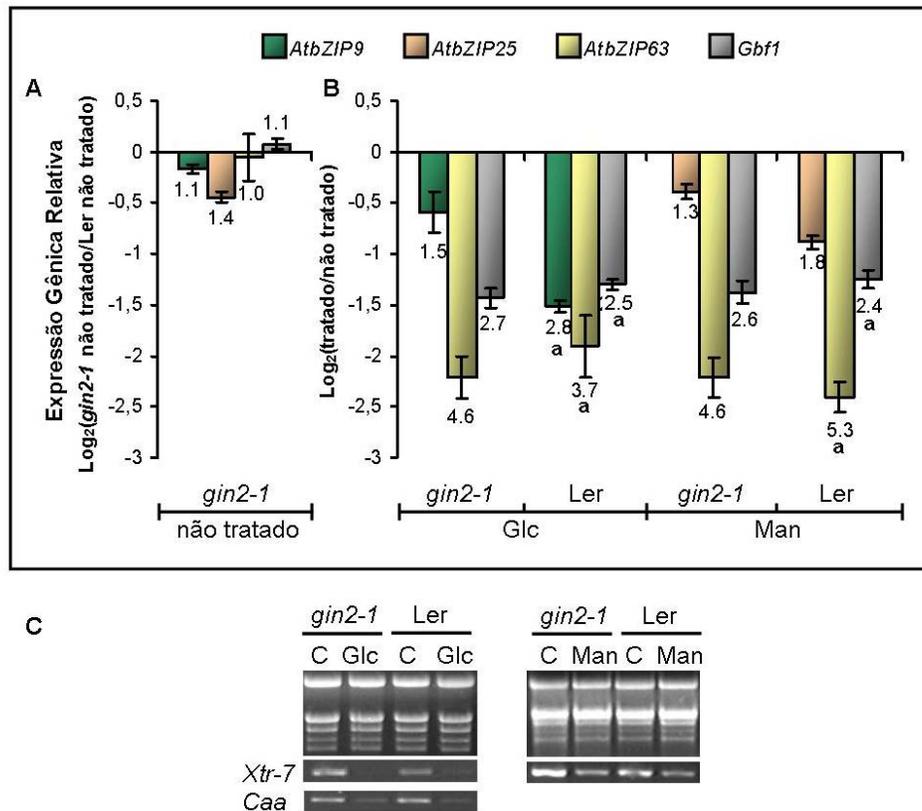
Para analisar a participação de HXK1 no controle da expressão dos bZIPs do Grupo C por glicose e manose, as respostas a essas duas hexoses foram comparadas entre o mutante *gin2-1* e o ecótipo selvagem correspondente Ler.

Inicialmente, os tratamentos com glicose e manose foram conduzidos em meio MS/2, porém não foram detectadas diferenças significativas quando comparadas as repressões dos bZIPs do grupo C por manose e por glicose no

mutante *gin2-1* em relação às repressões observadas no ecótipo selvagem Ler (Figura 12). Entretanto, o gene controle utilizado neste trabalho, *carbonic anhydrase* (*CAA*), que é conhecido por apresentar repressão por glicose dependente da atividade de HXK1 (Moore *et al.*, 2003), aparentemente também não demonstrou ter sua repressão por glicose dependente de HXK1 nas condições de cultivo em meios MS/2. Este resultado pode ser explicado pelo fato de altas concentrações de nitrato antagonizar a repressão dependente de HXK1 de genes ligados à fotossíntese (Moore *et al.*, 2003). Conseqüentemente, as análises no presente trabalho passaram a ser feitas com plântulas cultivadas em meio MS/10, o qual contém cerca de 4mM de nitrato.

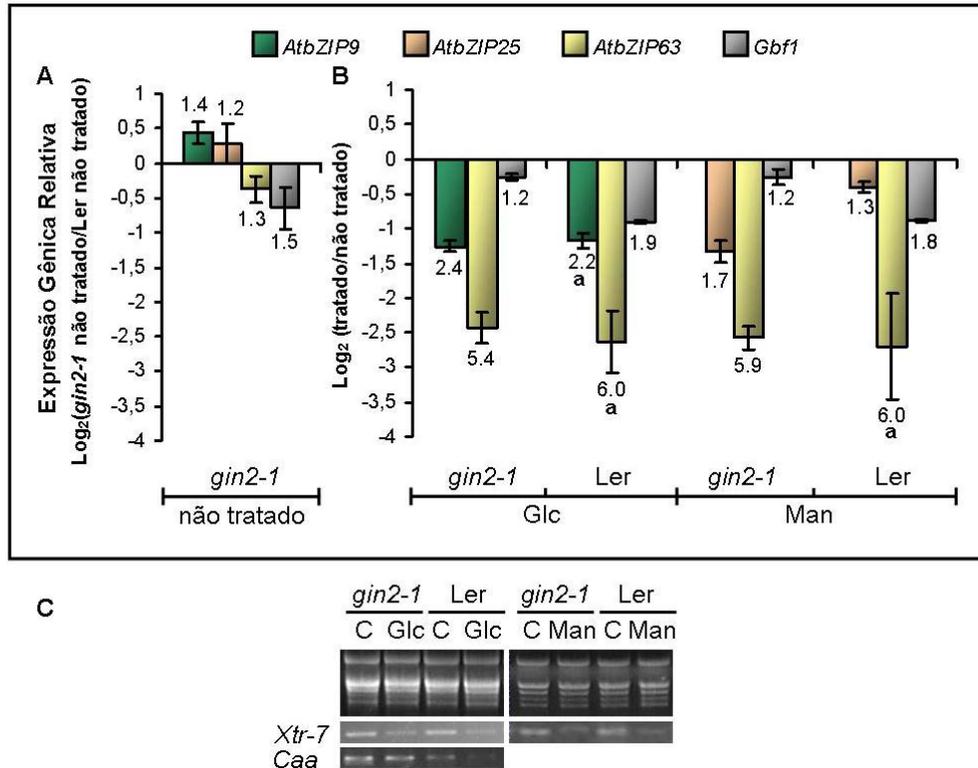
Sob essas condições, foi verificada a dependência de HXK1 na repressão do gene controle *CAA* por glicose (Figura 13). Foi utilizado também no presente trabalho o gene *GBF1*, que codifica para um fator de transcrição do tipo bZIP (*AtbZIP41*, Schindler *et al.*, 1992; Menkens *et al.*, 1995) e possivelmente está envolvido na regulação de genes responsivos a luz e é reprimido por glicose (Li *et al.*, 2006). *GBF1* foi utilizado para verificar se outros genes bZIPs reprimidos por glicose acompanhavam o padrão de repressão de *AtbZIP9* e *AtbZIP63* por glicose ou de *AtbZIP25* e *AtbZIP63* por manose. Assim como para o gene *CAA*, *GBF1* aparentemente depende da atividade de HXK1 na sua repressão por glicose apenas em condições de baixas concentrações de nitrato (compare a Figura 12 e a Figura 13). Quando comparadas as repressões de *AtbZIP9* e *AtbZIP63* por glicose, observou-se que as diferenças de expressão no mutante *gin2-1* e na linhagem selvagem não foram significativas (Figura 13). A mesma situação foi encontrada na resposta de *AtbZIP63* a manose (Figura 13). No ecótipo Ler a

repressão de *AtbZIP25* não foi eficiente tanto em plântulas cultivadas em meio MS/2 (Figura 12), quanto em plântulas cultivadas em meio MS/10 (Figura 13), provavelmente devido a efeitos ecótipo específicos.



**Figura 12.** A resposta a glicose e a manose dos genes bZIPs pertencentes ao Grupo C de *Arabidopsis* é independente de *hexokinase1* (HXK1). A regulação de *AtbZIP9* por glicose (Glc), *AtbZIP25* por manose (Man) e *AtbZIP63* por ambos os sinais foi comparada entre a linhagem *gin2-1*, um mutante nulo para HXK1, e a linhagem selvagem correspondente Landsberg erecta (Ler), em plântulas com 6 dias após a estratificação, cultivadas em meio MS/2 líquido, sob luz contínua e agitação leve. As plântulas foram tratadas com 2% de glicose ou 2% de manose durante 4 horas. O RNA total foi extraído e analisado e o cDNA sintetizado foi utilizado nas análises de RT-qPCR. Os níveis de transcritos foram normalizados utilizando o gene *Actin2* como controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão da linhagem selvagem (Ler) não tratada. **A.** Abundância relativa de *AtbZIP9*, *AtbZIP25*, *AtbZIP63* e o gene bZIP *Gbf1* (é reprimido por glicose) no mutante *gin2-1* sem tratamento. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 experimentos independentes para *AtbZIP9* e *AtbZIP25*, e 6 experimentos independentes para *AtbZIP63* e *GBF1*. Os números em cada coluna representam quantas vezes a quantidade de transcritos aumentou ou diminuiu em relação à linhagem selvagem não tratada. **B.** Abundância relativa de *AtbZIP9* em resposta a glicose, de *AtbZIP25* em resposta a manose, e de *AtbZIP63* e *Gbf1* em resposta a ambos sinais. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 experimentos independentes para todos os tratamentos. Os números em cada coluna representam quantas vezes a quantidade de transcritos diminuiu em relação à respectiva linhagem não tratada. Diferenças significativas pelo Teste *t* de Student ( $P \leq 0,0075$ ) entre Ler não tratado e Ler tratado são indicados com "a". Nenhuma diferença significativa pelo Teste *t* de Student ( $P \leq 0,0075$ ) foi detectada na regulação dos genes por glicose ou manose

no mutante *gin2-1* em relação à linhagem selvagem. **C.** Para todos os experimentos, o RNA total foi extraído e sua integridade foi verificada através de eletroforese em gel denaturante 1% de agarose com 0,5µg de RNA total por amostra. "C" significa ausência de tratamento. A repressão do gene *Xtr-7* detectada por PCR semiquantitativa foi utilizada como controle de eficácia de tratamento com glicose e com manose.



**Figura 13.** As respostas a glicose e a manose dos genes bZIPs pertencentes ao Grupo C de *Arabidopsis* é independente de *hexokinase1* (HXK1). A regulação de *AtbZIP9* por glicose (Glc), *AtbZIP25* por manose (Man) e *AtbZIP63* por ambos os sinais foi comparada entre a linhagem *gin2-1*, um mutante nulo para HXK1, e a linhagem selvagem correspondente Landsberg erecta (Ler), em plântulas com 6 dias após a estratificação, cultivadas em meio empobrecido MS/10 líquido, sob luz contínua e agitação leve. As plântulas foram tratadas com 2% de glicose ou 2% de manose durante 4 horas. O RNA total foi extraído e analisado e o cDNA sintetizado foi utilizado nas análises de RT-qPCR. Os níveis de transcritos foram normalizados utilizando o gene *Actin2* como controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão da linhagem selvagem (Ler) não tratada. **A.** Abundância relativa de *AtbZIP9*, *AtbZIP25*, *AtbZIP63* e o gene *GBF1* (é reprimido por glicose) no mutante *gin2-1* sem tratamento. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 experimentos independentes para *AtbZIP9* e *AtbZIP25*, e 6 experimentos independentes para *AtbZIP63* e *Gbf1*. Os números em cada coluna representam quantas vezes a quantidade de transcritos aumentou ou diminuiu em relação à linhagem selvagem não tratada. **B.** Abundância relativa de *AtbZIP9* em resposta a glicose, de *AtbZIP25* em resposta a manose, e de *AtbZIP63* e *Gbf1* em resposta a ambos sinais. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 experimentos independentes para todos os tratamentos. Os números em cada coluna representam quantas vezes a quantidade de transcritos diminuiu em relação à respectiva linhagem não tratada. Diferenças significativas pelo Teste *t* de Student ( $P \leq 0,0075$ ) entre Ler não tratado e Ler tratado são indicados com "a". Nenhuma diferença significativa pelo Teste *t* de Student ( $P \leq 0,0075$ ) foi detectada na regulação dos genes por glicose ou manose no mutante *gin2-1* em relação à linhagem selvagem. **C.** Para todos os experimentos, o

RNA total foi extraído e sua integridade foi verificada através de eletroforese em gel denaturante 1% de agarose com 0,5µg de RNA total por amostra. “C” significa ausência de tratamento. A repressão do gene *Xtr-7* detectada por PCR semiquantitativa foi utilizada como controle de eficácia de tratamento com glicose e com manose.

O conjunto destes dados permite concluir que as vias de regulação envolvidas nas repressões de *AtbZIP9* por glicose e de *AtbZIP63* por glicose e por manose são independentes de HXK1. A participação de outros sensores e sinalizadores de glicose e manose na expressão dos bZIPs do Grupo C ainda precisa ser investigada através da análise de possíveis candidatos, como por exemplo outras HXK (*HXK2* e *HXK-like*) e proteínas G (Chen and Jones, 2004).

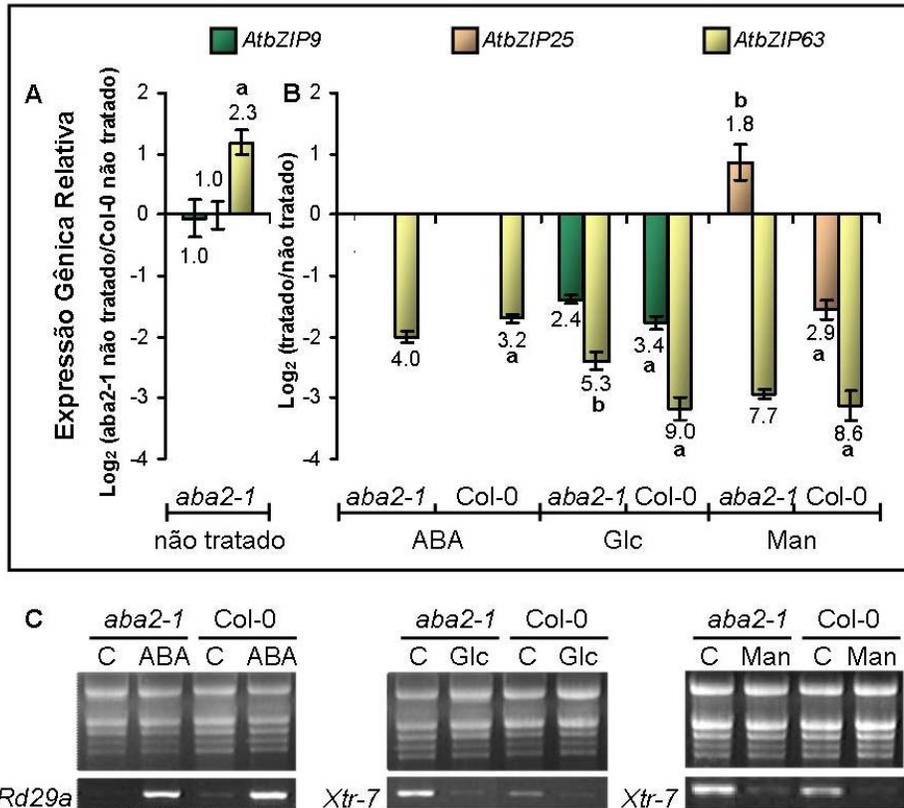
### **As respostas de *AtbZIP25* a manose e de *AtbZIP63* a glicose requerem uma via de síntese de ABA funcional**

A relação entre as vias de sinalização de ABA e glicose tem sido reportada desde a identificação de mutantes insensíveis a ABA ou envolvidos com a biossíntese deste hormônio, que apresentaram fenótipos *gin* em análises do desenvolvimento de plantas em meios com altos níveis de glicose (Zhou *et al.*, 1998; Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Huijser *et al.*, 2000; Laby *et al.*, 2000; Gibson *et al.*, 2001; Rook *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002). Alelos mutantes do gene *ABA2*, que codifica para uma cadeia pequena de desidrogenase/redutase envolvida na síntese de ABA (Cheng *et al.*, 2002), foram identificados como mutantes deficientes em ABA (Léon-Kloosterziel *et al.*, 1996) e também como mutantes *gin* em meios com 6% de glicose (mutante *gin1*, Zhou *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2002, Figura 11B). Conseqüentemente, o envolvimento de ABA na regulação de *AtbZIP9*, *AtbZIP25* e *AtbZIP63* por glicose e de *AtbZIP25* e *AtbZIP63* por manose,

foi testada através de análises em *aba2-1*, um mutante leaky da biossíntese de ABA que apresenta uma redução na biossíntese de ABA de 86% e de 97,6% em plântulas túrgidas e desidratadas, respectivamente, em comparação ao ecótipo selvagem correspondente Col-0 (Léon-Kloosterziel *et al.*, 1996).

Alterações na expressão de *AtbZIP9* em resposta a glicose não foram verificadas no mutante *aba2-1* (Figura 14B), indicando que ABA não está envolvido na repressão de *AtbZIP9* por glicose.

Contudo, uma repressão menos eficiente de *AtbZIP63* por glicose foi constatada no mutante *aba2-1* em relação ao tipo selvagem, sugerindo que ABA2, e portanto ABA, desempenha um papel parcial na repressão de *AtbZIP63* por glicose (Figura 14B). Assim, a repressão de *AtbZIP63* por glicose seria o resultado de um efeito combinatório de duas vias agindo paralelamente: uma dependente e outra independente de ABA. Situações similares foram descritas no caso da regulação dos genes *NCED3*, *AAO3* e *ABA1* em resposta a estresse salino (Barrero *et al.*, 2006). Interessantemente, não foram observadas diferenças significativas em resposta a manose na repressão de *AtbZIP63* entre o mutante *aba2-1* e o tipo selvagem (Figura 14B), indicando que ABA não interfere nesta regulação. Esta informação sugere uma distinção entre as vias de sinalização de glicose e manose na repressão de *AtbZIP63*. Outra observação relevante é que a expressão de *AtbZIP63* foi ligeiramente induzida no mutante *aba2-1* não tratado (Figura 14A), sugerindo que ABA está envolvido na regulação da expressão de *AtbZIP63*, o que está de acordo com os resultados da Figura 7, que mostram que ABA reprime *AtbZIP63*.



**Figura 14.** A resposta de *AtbZIP25* a manose e de *AtbZIP63* a glicose envolvem uma via de sinalização dependente de ABA. A regulação de *AtbZIP9* por glicose (Glc), *AtbZIP25* por manose (Man) e *AtbZIP63* por ABA, glicose e manose foi comparada entre a linhagem *aba2-1*, um mutante leaky de biossíntese de ABA, e a linhagem selvagem correspondente Columbia-0 (Col-0), em plântulas com 6 dias após a estratificação, cultivadas em meio MS/2 líquido, sob luz contínua e agitação leve. As plântulas foram tratadas com 100µM de ABA, 2% de glicose ou 2% de manose durante 4 horas. O RNA total foi extraído e analisado e o cDNA sintetizado foi utilizado nas análises de RT-qPCR. Os níveis de transcritos foram normalizados utilizando o gene *Actin2* como controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão da linhagem selvagem (Col-0) não tratada. **A.** Abundância relativa de *AtbZIP9*, *AtbZIP25*, *AtbZIP63* no mutante *aba2-1* sem tratamento. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 experimentos independentes para *AtbZIP9* e *AtbZIP25*, e 9 experimentos independentes para *AtbZIP63*. Os números em cada coluna representam quantas vezes a quantidade de transcritos aumentou ou diminuiu em relação à linhagem selvagem não tratada. **B.** Abundância relativa de *AtbZIP9* em resposta a glicose, de *AtbZIP25* em resposta a manose, e de *AtbZIP63* em resposta a ABA, glicose e manose. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 experimentos independentes para todos os tratamentos. Os números em cada coluna representam quantas vezes a quantidade de transcritos aumentou ou diminuiu em relação à respectiva linhagem não tratada. Diferenças significativas pelo Teste *t* de Student ( $P \leq 0,0075$ ) entre Col-0 tratado ou *aba2-1* não tratado e Col-0 não tratado são indicados com "a". Diferenças significativas pelo Teste *t* de Student ( $P \leq 0,0075$ ), na regulação dos genes por ABA, glicose ou manose no mutante *aba2-1* em relação à linhagem selvagem estão indicadas por "b". **C.** Para todos os experimentos, o RNA total foi extraído e sua integridade foi verificada através de eletroforese em gel denaturante 1% de agarose com 0,5µg de RNA total por amostra. "C" significa ausência de tratamento. A repressão do gene *Xtr-7* e a indução de *Rd29a* detectadas por PCR semiquantitativa foram utilizadas como controles de eficácia de tratamento com ABA, glicose e manose.

Foi verificada uma indução fraca (1,8 vezes) de *AtbZIP25* por manose no mutante *aba2-1* (Figura 14B). Esta informação sugere que ABA não apenas é requerido para a repressão de *AtbZIP25* por manose, mas também que manose pode induzir a expressão de *AtbZIP25* na ausência de ABA. Esta conclusão é interessante, pois implica que manose exerce seus efeitos regulatórios sobre *AtbZIP25* de acordo com os níveis de ABA endógeno na planta.

Juntos, esses dados indicam que ABA interage com a regulação da expressão de *AtbZIP63* por glicose e com a regulação da expressão de *AtbZIP25* por manose, contudo, a repressão de *AtbZIP9* por glicose e de *AtbZIP63* por manose aparentemente são independentes de ABA.

Após constatar o efeito de ABA2, e conseqüentemente de ABA, sob as regulações dos bZIPs do Grupo C por glicose e manose, sugeriu-se que possivelmente elementos da via de sinalização ABA/glicose poderiam estar envolvidos nestas regulações dos bZIPs do Grupo C por glicose ou por manose. Assim, resolveu-se avaliar a possibilidade de ABI4 e ABI5, dois elementos da via de sinalização de ABA que apresentam fenótipo *gin* quando mutados, estarem envolvidos na regulação dos bZIPs do Grupo C por glicose e manose.

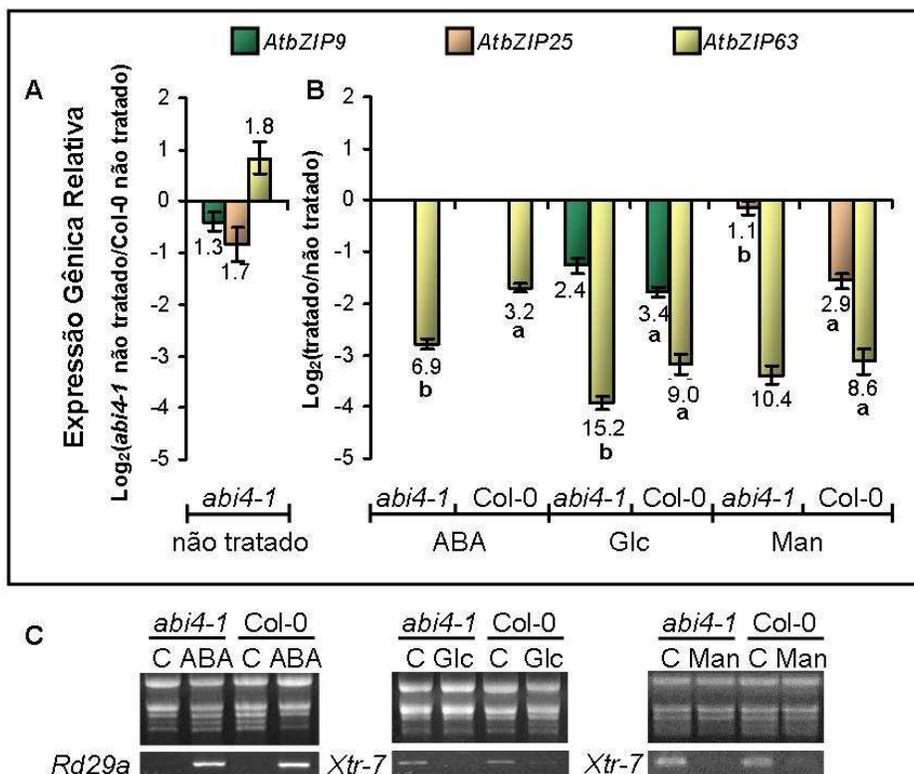
#### **ABI4 atua na repressão de *AtbZIP63* por ABA e glicose e de *AtbZIP25* por manose**

Para investigar a possibilidade de ABI4 desempenhar alguma função na regulação dos bZIPs do grupo C, foi utilizado o mutante *abi4-1* (Finkelstein *et al.*, 1998; Figura 11C). As repressões de *AtbZIP63* por ABA, de *AtbZIP9* e *AtbZIP63* por glicose e de *AtbZIP25* e *AtbZIP63* por manose foram comparadas entre o

mutante *abi4-1* e o ecótipo selvagem correspondente Col-0. O mutante *abi4-1* representa um alelo provavelmente funcionalmente inativo do gene *ABI4* (Finkelstein *et al.*, 1998).

Os níveis de repressão de *AtbZIP9* não foram significativamente diferentes entre o mutante *abi4-1* e o tipo selvagem em resposta a glicose (Figura 15), indicando que *ABI4* não está envolvido na repressão de *AtbZIP9* por glicose.

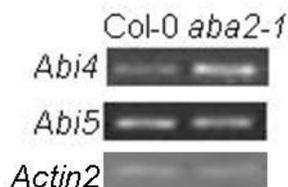
Por sua vez, a repressão de *AtbZIP63* foi mais forte no mutante *abi4-1* tanto no tratamento com ABA, quanto no tratamento com glicose, mostrando que *ABI4* tem um efeito antagônico sobre a repressão de *AtbZIP63* por ABA e glicose (Figura 15). Os resultados indicam também que a repressão de *AtbZIP63* por manose no mutante *abi4-1* não é significativamente diferente da repressão observada em plântulas selvagens, indicando que a *ABI4* não está envolvido nesta regulação. Este último resultado está de acordo com dados obtidos por Dekkers *et al.* (2004), que indicam uma via de regulação da germinação por glicose independente de *HXK1/ABA/ABI4*. O antagonismo de *ABI4* na repressão de *AtbZIP63* por glicose e a ausência de efeito de *ABI4* sobre a repressão de *AtbZIP63* por manose representa mais uma evidência da existência de vias de sinalização distintas para glicose e manose.



**Figura 15.** ABI4 antagoniza a resposta de *AtbZIP63* a ABA e a glicose e está envolvido na repressão de *AtbZIP25* por manose. A regulação de *AtbZIP9* por glicose (Glc), *AtbZIP25* por manose (Man) e *AtbZIP63* por ABA, glicose e manose foi comparada entre a linhagem *abi4-1*, um mutante da via de sinalização de ABA, e a linhagem selvagem correspondente Columbia-0 (Col-0), em plântulas com 6 dias após a estratificação, cultivadas em meio MS/2 líquido, sob luz contínua e agitação leve. As plântulas foram tratadas com 100µM de ABA, 2% de glicose ou 2% de manose durante 4 horas. O RNA total foi extraído e analisado e o cDNA sintetizado foi utilizado nas análises de RT-qPCR. Os níveis de transcritos foram normalizados utilizando o gene *Actin2* como controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão da linhagem selvagem (Col-0) não tratada. **A.** Abundância relativa de *AtbZIP9*, *AtbZIP25*, *AtbZIP63* no mutante *abi4-1* sem tratamento. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 experimentos independentes para *AtbZIP9* e *AtbZIP25*, e 9 experimentos independentes para *AtbZIP63*. Os números em cada coluna representam quantas vezes a quantidade de transcritos aumentou ou diminuiu em relação à linhagem selvagem não tratada. **B.** Abundância relativa de *AtbZIP9* em resposta a glicose, de *AtbZIP25* em resposta a manose, e de *AtbZIP63* em resposta a ABA, glicose e manose. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 experimentos independentes para todos os tratamentos. Os números em cada coluna representam quantas vezes a quantidade de transcritos diminuiu em relação à respectiva linhagem não tratada. Diferenças significativas pelo Teste *t* de Student ( $P \leq 0,0075$ ) entre Col-0 tratado e Col-0 não tratado são indicados com "a". Diferenças significativas pelo Teste *t* de Student ( $P \leq 0,0075$ ) na regulação dos genes por ABA, glicose ou manose no mutante *abi4-1* em relação à linhagem selvagem estão indicadas por "b". **C.** Para todos os experimentos, o RNA total foi extraído e sua integridade foi verificada através de eletroforese em gel denaturante 1% de agarose com 0,5µg de RNA total por amostra. "C" significa ausência de tratamento. A repressão do gene *Xtr-7* e a indução de *Rd29a* detectadas por PCR semiquantitativa foram utilizadas como controles de eficácia de tratamento com ABA, glicose e manose.

Ao contrário de *AtbZIP63*, a repressão de *AtbZIP25* por manose mostrou ser totalmente dependente de ABI4, pois não houve repressão eficiente no mutante tratado com manose (Figura 15).

Interessantemente, a expressão de *ABI4* aumenta no mutante *aba2-1* (Figura 16). Este dado, considerando que ABI4 tem um efeito antagônico sobre a repressão de *AtbZIP63* por glicose, levanta a possibilidade de que o envolvimento de ABA2 na repressão de *AtbZIP63* por glicose parcialmente resulte de um aumento de ABI4 no mutante *aba2-1*.



**Figura 16.** Expressão de *ABI4* e *ABI5* no mutante *aba2-1*. A RT-PCR semiquantitativa dos genes *ABI4* e *ABI5* foi realizada com *primers* específicos para os genes *ABI4* (40 ciclos) e *ABI5* (35 ciclos) e para o gene controle interno de quantificação do RNA *Actin2* (15 ciclos), no mutante *aba2-1* em relação ao tipo selvagem Col-0. É observada indução da expressão de *ABI4* em *aba2-1*, enquanto que os níveis de mRNA de *ABI5* não são alterados neste mutante.

### **ABI5 está envolvido na repressão de *AtbZIP63* por ABA e por glicose e na indução de *AtbZIP25* por glicose**

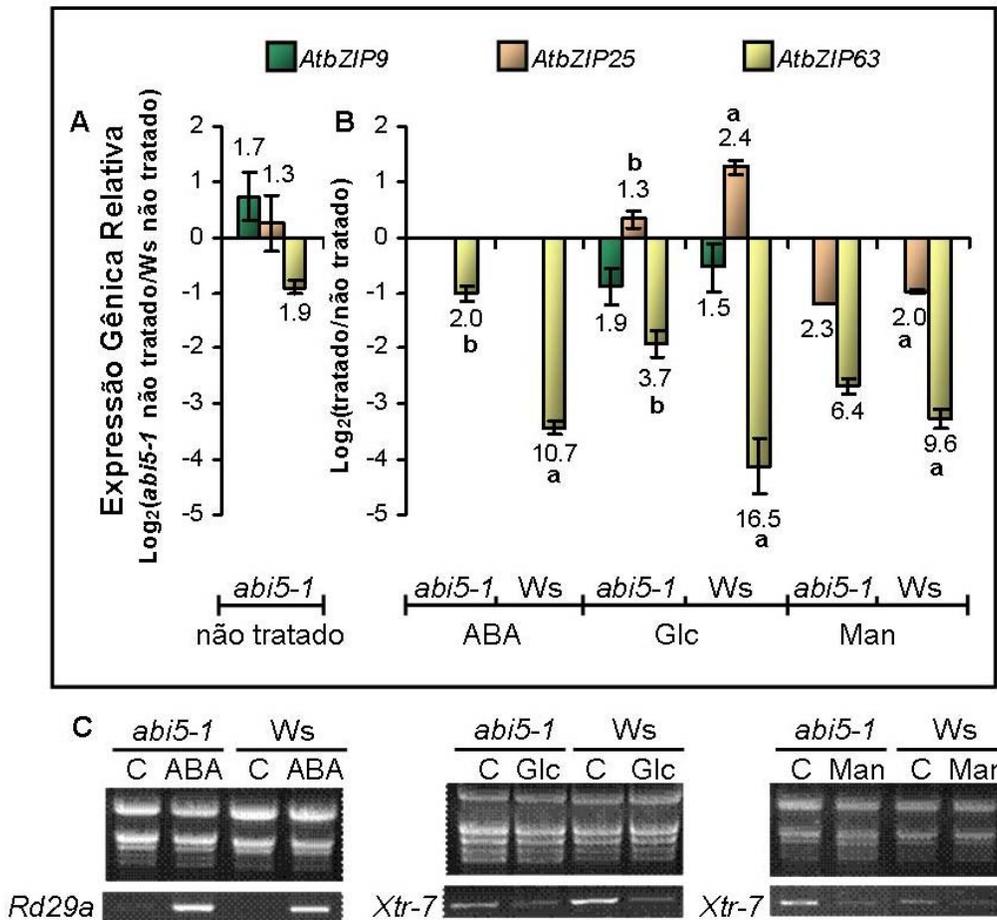
Embora não tenha sido isolado em análises de insensibilidade a glicose, *abi5-1*, um mutante nulo da via de sinalização de ABA, é moderadamente insensível a glicose e a manose durante a germinação e o desenvolvimento das plântulas, atribuindo a ele um fenótipo *gin* moderado (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Finkelstein and Linch, 2000; Laby *et al.*, 2000, Figura 11D). Assim, efetuou-se a comparação da expressão de *AtbZIP63* em resposta a ABA, glicose e manose, de *AtbZIP9* em resposta a glicose, e de *AtbZIP25* em resposta a glicose e manose,

no mutante *abi5-1* e no ecótipo selvagem correspondente *Ws* para avaliar a participação de ABI5 nas vias de regulação dos genes bZIPs do Grupo C a ABA, glicose e manose. O mutante *abi5-1* representa um alelo nulo deste gene (Laby *et al.*, 2000).

Embora *AtbZIP9* apresentou uma repressão por glicose superior a duas vezes nos ecótipos Col-0 e Ler (Figuras 7 e 12), no ecótipo *Ws* sua repressão foi menos forte (1,5 vezes; Figura 17). Não obstante, no ecótipo *Ws* uma repressão mais forte de *AtbZIP63* por glicose (16,5 vezes, Figura 17) do que nos ecótipos Col-0 e Ler (9 vezes, Figura 7; e 3,7 vezes, Figura 12; respectivamente) foram detectadas. Sugere-se que tais diferenças na eficiência de regulação entre os diferentes *background* genéticos podem refletir efeitos de compensação gênica, que podem ser reflexos de redundância funcional. Neste mesmo ecótipo *Ws*, como anteriormente citado, também constatou-se indução por glicose de *AtbZIP25* (Figura 7).

A repressão não significativa de *AtbZIP9* por glicose no ecótipo *Ws* não permitiu avaliar o requerimento de ABI5 nesta regulação. Entretanto, ABI5 está envolvido de maneira parcial na repressão de *AtbZIP63* tanto por ABA quanto por glicose (Figura 17). A repressão de *AtbZIP63* por manose é independente de ABI5, uma vez que não houve diferença significativa em sua repressão no mutante *abi5-1* em relação ao ecótipo selvagem *Ws*. A indução de *AtbZIP25* por glicose mostrou ser dependente de ABI5 e embora sua resposta seja distinta da resposta de *AtbZIP63*, o primeiro é induzido enquanto que o segundo é reprimido por glicose, os resultados indicam que provavelmente esses dois membros do Grupo

C dividam, pelo menos parcialmente, uma via de regulação por glicose dependente de ABI5.



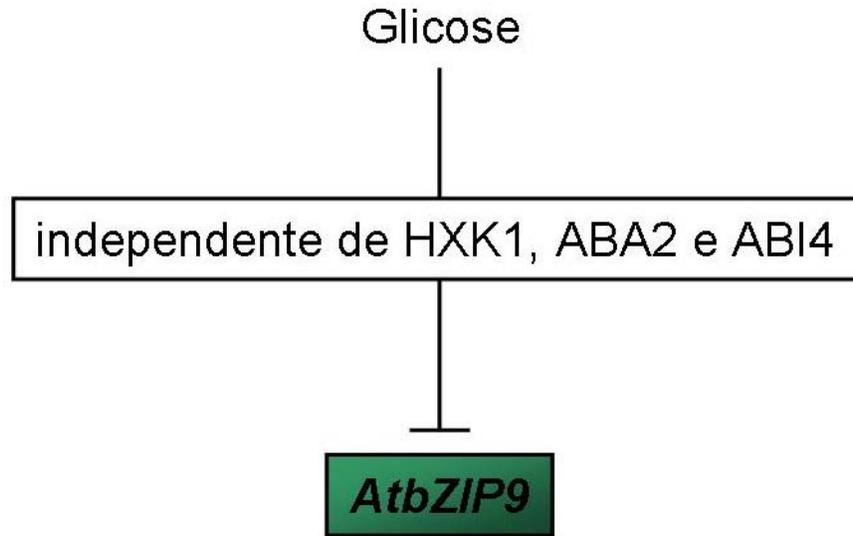
**Figura 17.** ABI5 está envolvido na resposta de *AtbZIP63* a ABA e a glicose e na indução de *AtbZIP25* por glicose no ecótipo *Ws*. A regulação de *AtbZIP9* por glicose (Glc), *AtbZIP25* por glicose e manose (Man) e *AtbZIP63* por ABA, glicose e manose foi comparada entre a linhagem *abi5-1*, um mutante nulo da via de sinalização de ABA, e a linhagem selvagem correspondente *Wassilewskija* (*Ws*), em plântulas com 6 dias após a estratificação, cultivadas em meio MS/2 líquido, sob luz contínua e agitação leve. As plântulas foram tratadas com 100µM de ABA, 2% de glicose ou 2% de manose durante 4 horas. O RNA total foi extraído e analisado e o cDNA sintetizado foi utilizado nas análises de RT-qPCR. Os níveis de transcritos foram normalizados utilizando o gene *Actin2* como controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão da linhagem selvagem (*Ws*) não tratada. **A.** Abundância relativa de *AtbZIP9*, *AtbZIP25*, *AtbZIP63* no mutante *abi5-1* sem tratamento. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 experimentos independentes para *AtbZIP9*, 6 experimentos independentes para *AtbZIP25*, e 13 experimentos independentes para *AtbZIP63*. Os números em cada coluna representam quantas vezes a quantidade de transcritos aumentou ou diminuiu em relação à linhagem selvagem não tratada. **B.** Abundância relativa de *AtbZIP9* em resposta a glicose, de *AtbZIP25* em resposta a glicose e manose, e de *AtbZIP63* em resposta a ABA, glicose e manose. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 experimentos independentes para todos os tratamentos, exceto para a quantificação de *AtbZIP63* em resposta a glicose, onde foram realizados 7 experimentos independentes. Os números em

cada coluna representam quantas vezes a quantidade de transcritos diminuiu em relação à respectiva linhagem não tratada. Diferenças significativas pelo Teste *t* de Student ( $P \leq 0,0075$ ) entre Ws tratado e Ws não tratado são indicados com "a". Diferenças significativas pelo Teste *t* de Student ( $P \leq 0,0075$ ) na regulação dos genes por ABA, glicose ou manose no mutante *abi5-1* em relação à linhagem selvagem estão indicadas por "b". **C.** Para todos os experimentos, o RNA total foi extraído e sua integridade foi verificada através de eletroforese em gel denaturante 1% de agarose com 0,5µg de RNA total por amostra. "C" significa ausência de tratamento. A repressão do gene *Xtr-7* e a indução de *Rd29a* detectadas por PCR semiquantitativa foram utilizadas como controles de eficácia de tratamento com ABA, glicose e manose.

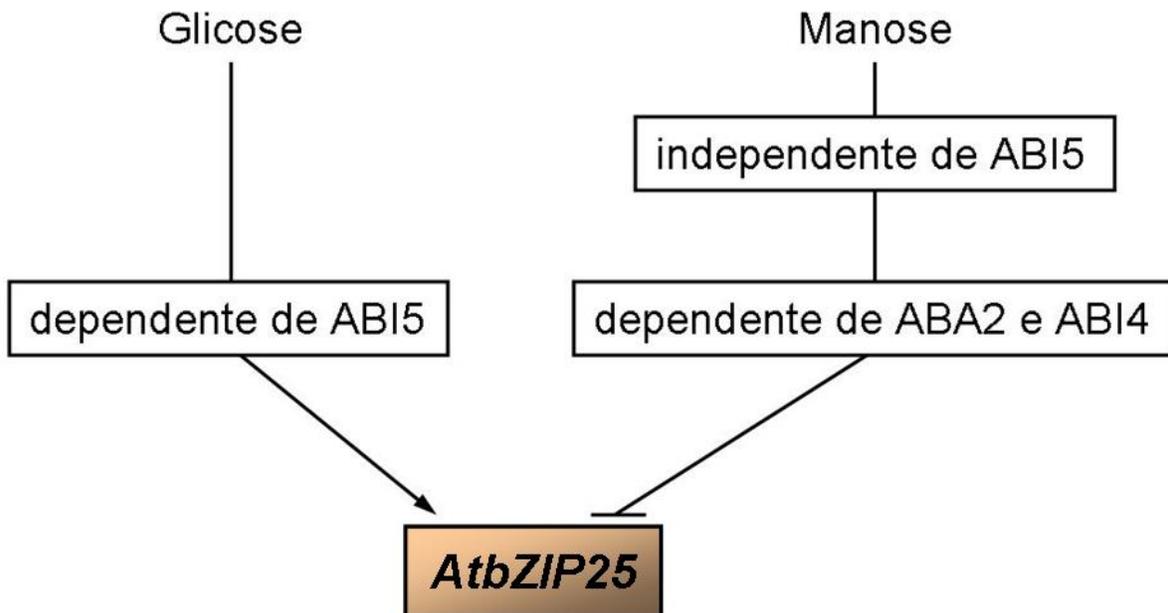
O conjunto de dados suporta à hipótese de que as regulações de *AtbZIP25* e *AtbZIP63* por glicose e de *AtbZIP25* por manose são mediados por duas vias distintas que requerem ABI5 e ABI4, respectivamente.

### **Os modelos das vias de regulação por ABA, glicose e manose dos genes bZIPs do Grupo C de Arabidopsis**

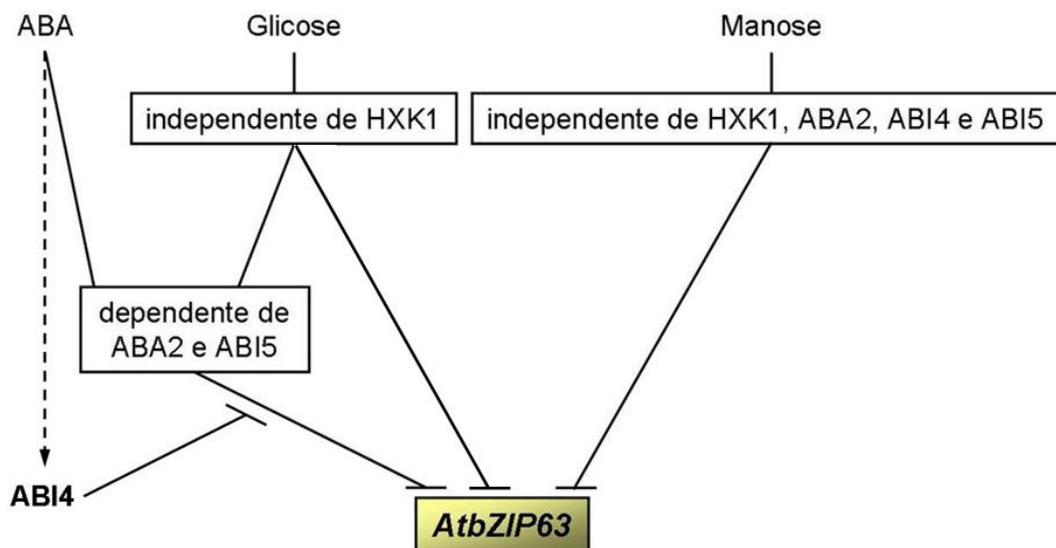
*AtbZIP10* aparentemente é um gene cuja mRNA praticamente não é regulado pelos sinais testados neste trabalho. Mostramos que *AtbZIP9* é reprimido por glicose numa via independente de HXK1, ABA2 e ABI4 (Figura 18). *AtbZIP25* é reprimido por manose por uma via dependente de ABA2 e ABI4 e independente de ABI5, e é induzido por glicose no ecótipo Ws por uma via dependente de ABI5 (Figura 19). Já a repressão de *AtbZIP63* por glicose é dependente de ABA2 e ABI5, independente de HXK1 e antagonizada por ABI4, enquanto que sua repressão por manose não envolve nenhum dos elementos de sinalização aqui testados (Figura 20).



**Figura 18.** A expressão de *AtbZIP9* é reprimida por glicose por uma via independente de HXK1, ABA2 e ABI4.



**Figura 19.** *AtbZIP25* é induzido por glicose e reprimido por manose. Sua indução por glicose envolve ABI5. A repressão de *AtbZIP25* por manose não envolve ABI5, mas é dependente de ABA2 e ABI4, mostrando que, embora *AtbZIP25* não seja regulado por ABA, sua repressão por manose provavelmente envolva a biossíntese/sinalização desse hormônio, além de indicar que glicose e manose agem em vias distintas para regular a expressão de *AtbZIP25*.



**Figura 20.** *AtbZIP63* é reprimido tanto por ABA, glicose e manose. Sua repressão por glicose é independente de *hexokinase1* (HXK1), mas parcialmente envolve elementos da biossíntese (ABA2) e da sinalização (ABI5) de ABA. Devido à esta parcialidade tem-se indícios de que a regulação de *AtbZIP63* por glicose é resultante da combinação de duas vias: uma dependente e outra independente de ABA. A repressão por ABA também envolve ABI5, o que suporta a via de repressão de *AtbZIP63* por glicose dependente de ABA. ABI4 antagoniza a repressão de *AtbZIP63* por ABA e por glicose. Já a repressão de *AtbZIP63* por manose não envolve HXK1, nem ABA2, ABI4 e ABI5, o que indica que glicose e manose atuam em vias distintas na regulação de *AtbZIP63*.

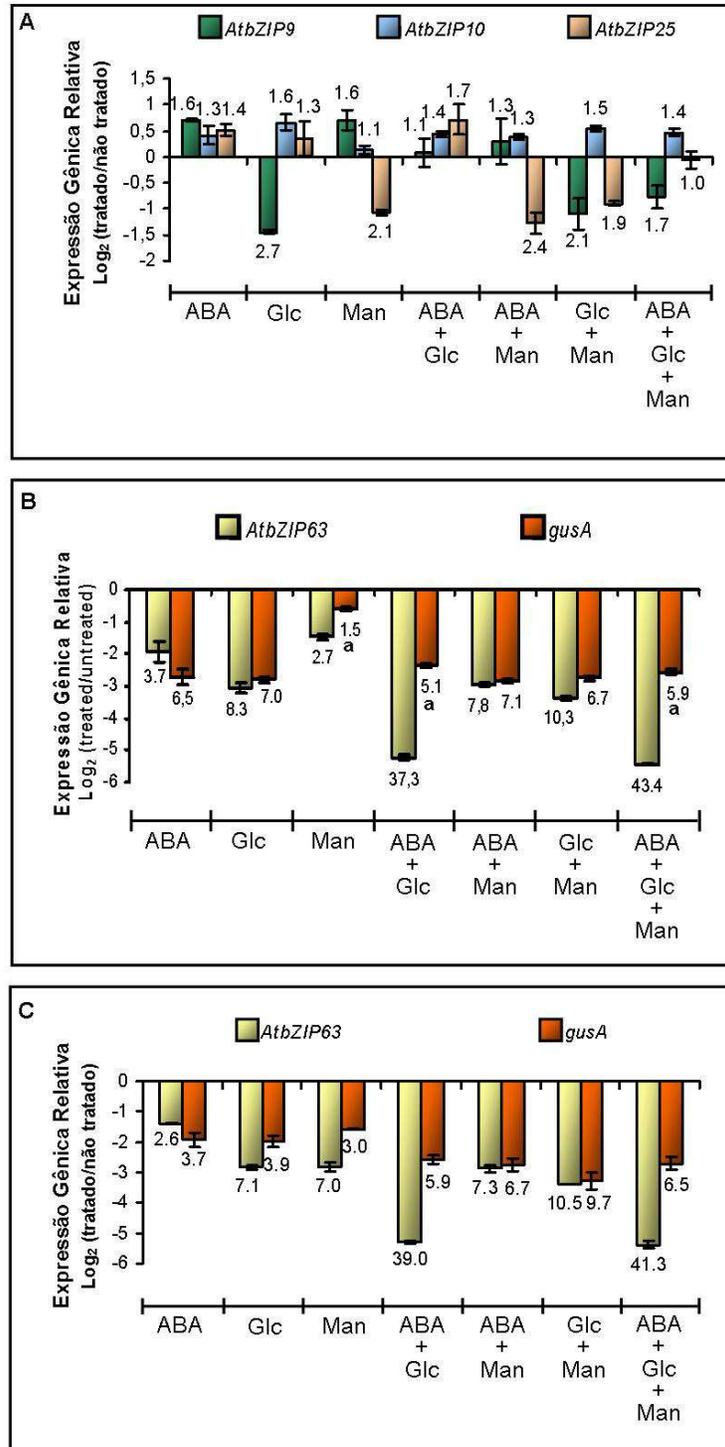
### **ABA e glicose apresentam efeito sinérgico sobre a repressão de *AtbZIP63***

Uma vez observada a relação entre as vias de sinalização de glicose e ABA e de manose e ABA na resposta de alguns membros do Grupo C de Arabidopsis, foi iniciada uma bateria de experimentos, nos quais foi avaliado o efeito combinatório desses em sinais (ABA + glicose, ABA + manose, glicose + manose e ABA + glicose + manose) sob a regulação da expressão dos bZIPs do Grupo C. Os resultados obtidos serviriam para dar indícios de como essas vias interagem na regulação dos bZIPs do Grupo C: de maneira linear (a combinação dos sinais não promovem novos padrões de regulação) ou em vias paralelas (efeito aditivo ou sinérgico dos sinais).

A combinação em pares de ABA, glicose e manose ou dos três sinais não interferiu na expressão de *AtbZIP10* (Figura 21A). Como apresentado anteriormente, *AtbZIP9* é regulado significativamente apenas por glicose (Figura 8) e apresenta indução fraca não significativa por ABA e manose (Figuras 8 e 10). A combinação dos sinais não causou diferenças drásticas na expressão de *AtbZIP9* (Figura 21A).

A regulação da expressão de *AtbZIP25* pela combinação em pares dos sinais não apresentou diferenças marcantes em relação aos tratamentos com apenas um sinal, a não ser pequenos efeitos aditivos (Figura 21A). Interessantemente, *AtbZIP25* não é regulado pelo tratamento com os três sinais juntos (ABA + glicose + manose), o que pode refletir a combinação da pequena indução observada por ABA + glicose e da repressão por manose.

A avaliação da participação da região promotora e 5'-UTR de *AtbZIP63* sobre sua repressão por ABA, glicose e manose foi realizada através do estudo da expressão do gene repórter *gusA* sob o controle do promotor + 5'-UTR de *AtbZIP63* nas duas linhagens transgênicas mencionadas acima. Assim, a participação do promotor e de 5'-UTR de *AtbZIP63* nas respostas a ABA, glicose e manose e na combinação desses sinais foi quantificada utilizando a técnica de RT-qPCR. Para evitar a amplificação de DNA do gene quimérico, os RNAs foram tratados com DNase I.



**Figura 21.** Regulação dos bZIPs do Grupo C de Arabidopsis pela combinação de ABA, glicose e manose. As plântulas foram cultivadas em meio líquido MS/2, sob luz constante e agitação leve. Seis dias após a estratificação, as plântulas foram tratadas com 100µM de ABA, 2% de glicose, 2% de manose, ou pela combinação desses sinais nas mesmas concentrações anteriormente citadas, por quatro horas. O RNA total foi extraído e analisado e o cDNA sintetizado foi utilizado nas análises de RT-qPCR. Os níveis de transcritos foram normalizados utilizando o gene *Actin2* como

controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão do controle não tratado. **A.** Abundância relativa de *AtbZIP9*, *AtbZIP10*, *AtbZIP25* em resposta à combinação de ABA, glicose e manose. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 2 experimentos independentes. Os números em cada coluna representam quantas vezes a quantidade de transcritos aumentou ou diminuiu em relação ao controle não tratado. **B.** Abundância relativa de *AtbZIP63* e de seu promotor em resposta à combinação de ABA, glicose e manose. Plântulas da linhagem transgênica PH3 13.4 contendo a o gene repórter *gusA* sob o controle do promotor de *AtbZIP63* e a região 5'-UTR foram cultivadas e tratadas como descritas anteriormente. O RNA total foi extraído, tratado com DNase I. Em seguida, o cDNA sintetizado foi utilizado nas análises de RT-qPCR. Os níveis de transcritos foram normalizados utilizando o gene *Actin2* como controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão do controle não tratado. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 4 experimentos independentes, exceto para a quantificação de *gusA* nos tratamentos "ABA + manose", "glicose + manose" e ABA + glicose + manose", onde foram realizados 2 experimentos independentes. Os números em cada coluna representam quantas vezes a quantidade de transcritos diminuiu em relação ao controle não tratado. Diferenças significativas pelo Teste *t* de Student ( $P \leq 0,0075$ ) entre a repressão de *AtbZIP63* e a repressão de *gusA* sob o controle do promotor de *AtbZIP63* e a região 5'-UTR pelos tratamentos com ABA, glicose, manose e a combinação desses sinais são indicados com "a". **C.** Abundância relativa de *AtbZIP63* e de seu promotor em resposta à combinação de ABA, glicose e manose. Plântulas da linhagem transgênica PH3 35 contendo a o gene repórter *gusA* sob o controle do promotor de *AtbZIP63* e a região 5'-UTR foram cultivadas e tratadas como descritas anteriormente. O RNA total foi extraído, tratado com DNase I e analisado e o cDNA sintetizado foi utilizado nas análises de RT-qPCR. Os níveis de transcritos foram normalizados utilizando o gene *Actin2* como controle endógeno e a expressão relativa foi normalizada utilizando os níveis de expressão do controle não tratado. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 2 experimentos independentes. Os números em cada coluna representam quantas vezes a quantidade de transcritos ou diminuiu em relação ao controle não tratado.

As repressões de *AtbZIP63* por ABA e por glicose aparentemente dependem apenas das seqüências promotoras e 5'-UTR de *AtbZIP63*, uma vez que os níveis de repressão de *gusA* e de *AtbZIP63* não foram significativamente diferentes (Figuras 21B e C). Entretanto, aproximadamente metade da repressão de *AtbZIP63* por manose é dependente das seqüências promotoras e 5'-UTR, apontando uma possível regulação pós-transcricional de *AtbZIP63* por manose. Esta possibilidade suporta a hipótese de glicose e manose estarem agindo em vias distintas na regulação de *AtbZIP63*, uma vez que a regulação por glicose envolve apenas o promotor e a região 5'-UTR. Interessantemente, apenas 20% do efeito sinérgico da repressão pela combinação de glicose e ABA passa pelo promotor e a região 5'-UTR (Figura 21B e C). Este resultado indica que ABA e

glicose convergem para atuar sobre seqüências em 3' do sitio da iniciação da transcrição do gene para promover a redução sinérgica do mRNA e levanta a possibilidade de uma regulação pós-transcricional da estabilidade do mRNA de *AtbZIP63* em resposta a glicose e a ABA. Se esta hipótese for correta, aliada ao fato da degradação do mRNA ser a maneira mais rápida para a célula reduzir os níveis de um determinado RNA, então *AtbZIP63* pode ser considerado um ponto essencial de interação entre ABA, que por parte medeia respostas a estresses abióticos (hídrico por exemplo) e glicose, que reflete o estado energético da célula.

Ehlert *et al.* (2006) relatam que os bZIPs do Grupo C de *Arabidopsis* formam heterodímeros funcionais preferencialmente com os bZIPs do Grupo S1. As heterodimerizações seguem padrões específicos (Newman and Keating, 2003) e têm conseqüências importantes sobre mudanças nos programas de expressão gênica. Dentro deste contexto, a “superrepressão” de *AtbZIP63* pela combinação de ABA + glicose pode ter conseqüências importantes sobre o padrão de heterodimerização dos bZIPs dos Grupos C e S (Ehlert *et al.*, 2006), e conseqüentemente sobre programas de expressão gênica em que esses fatores de transcrição estão inseridos.

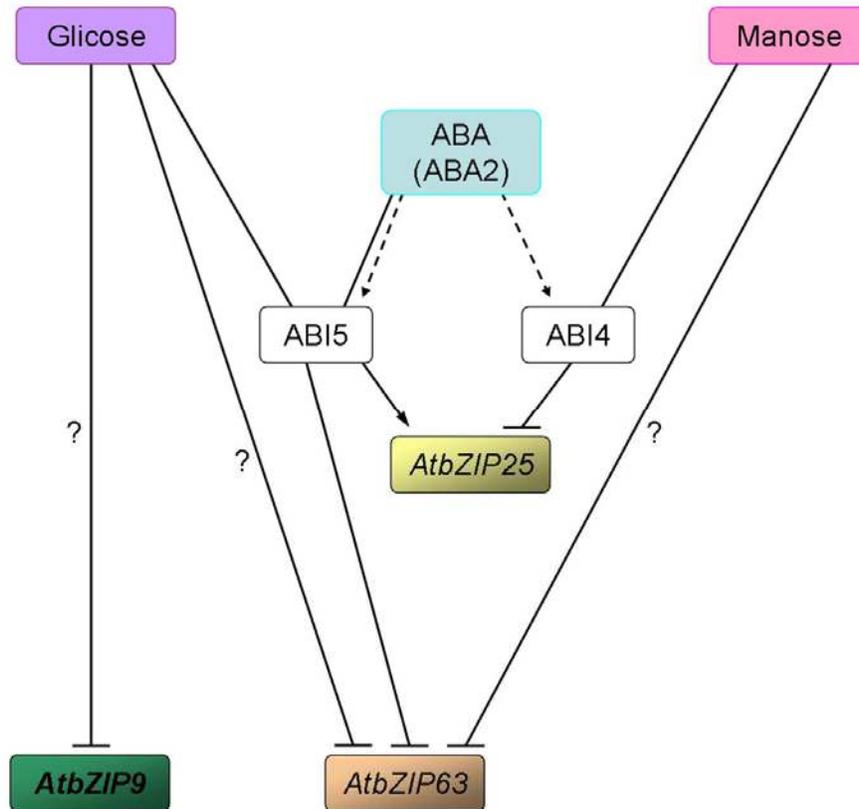
Como *AtbZIP63* forma heterodímeros preferencialmente com *AtbZIP10* e *AtbZIP53*, a repressão sinérgica da expressão de *AtbZIP63* por glicose e ABA favoreceria a formação do heterodímero *AtbZIP10/AtbZIP53*, que segundo Weltmeier *et al.* (2006) está relacionado com recuperação de plantas submetidas a estresse hipoosmolar. Além disso, a regulação fina de genes relacionados com o metabolismo energético da planta pode ser significativamente alterada pela sinergia entre ABA e glicose na repressão de *AtbZIP63*, visto que *AtbZIP63*

apresenta sinergia com a quinase KIN10, colocando este bZIP como um fator chave na manutenção do balanço energético da planta.

Em conclusão pode-se sugerir que os vários níveis de regulação do mRNA de *AtbZIP63* por ABA e glicose reflete os vários ajustes finos necessários a uma resposta adequada a estresses abióticos em fase com o nível energético do organismo. Adicionalmente notamos que a expressão de *AtbZIP63* é reprimida em condições de baixa nutrição nitrogenada (GENEVESTIGATOR, Zimmermman *et al.*, 2004, <https://www.genevestigator.ethz.ch/>) sugerindo que este regulador da transcrição também integra informações relativas a disponibilidade de nitrogênio, um aspecto ainda que precisa ser explorado

O conjunto de dados deste trabalho permitiu observar que os genes bZIPs do Grupo C são regulados por ABA, glicose e manose. Mais especificamente, ABA reprime *AtbZIP63*, glicose induz *AtbZIP25* e reprime *AtbZIP9* e *AtbZIP63* e manose reprime *AtbZIP25* e *AtbZIP63*. *AtbZIP63* mostrou ser um importante integrador das vias desses três sinais. Foi possível também comprovar uma separação entre as vias de sinalização das repostas a glicose e a manose, tendo como pontos de distinção a dependência de ABI5 e ABI4, respectivamente. Outra evidência clara para distinção das vias de sinalização de glicose e de manose é o fato de que, enquanto *AtbZIP25* é induzido de maneira dependente de ABI5 por glicose, este bZIP é reprimido por manose por uma via de sinalização dependente de ABI4 e de ABA. Nossos dados levaram à formulação de um modelo de vias de sinalização de ABA, glicose e manose para a regulação dos bZIPs do Grupo C de *Arabidopsis* (Figura 22). A repressão de *AtbZIP63* por glicose pode ser distinguida por duas vias: uma parcialmente dependente de ABA e de ABI5, e outra

independente de ABA, cujos elementos ainda não são conhecidos. A via independente de ABA também foi observada na repressão de *AtbZIP63* por manose e de *AtbZIP9* por glicose.



**Figura 22.** Modelo para a interação das vias de sinalização de ABA, glicose e manose sobre a expressão dos bZIPs do Grupo C. ABA reprime *AtbZIP63*. Glicose reprime *AtbZIP9* e *AtbZIP63*, e induz *AtbZIP25* (apenas no ecótipo WS). Manose reprime *AtbZIP25* e *AtbZIP63*. Os elementos envolvidos nas vias de sinalização da repressão de *AtbZIP9* por glicose e de *AtbZIP63* por manose ainda não são conhecidos. Glicose induz *AtbZIP25* por uma via dependente de ABI5. *AtbZIP63* é reprimido por glicose através de duas vias: uma parcialmente dependente de ABA e ABI5, onde ABA atuaria indiretamente, possivelmente influenciando a atividade de ABI5 para a repressão de *AtbZIP63* por glicose (setas descontínuas). Esta hipótese é suportada pelo fato de que ABA também reprime *AtbZIP63* via ABI5. A outra via envolvida na repressão de *AtbZIP63* por glicose envolve elementos ainda não conhecidos. Manose reprime *AtbZIP25* por uma via dependente ABI4. Esta repressão apenas é efetiva na presença de ABA e provavelmente este fitormônio regule a atividade de ABI4 durante a sinalização por manose, influenciando, portanto, a regulação por manose de maneira indireta (setas descontínuas).

## CONCLUSÕES

Nas condições testadas:

- Etileno, giberelina, ácido jasmônico e auxina não regulam a expressão dos genes bZIPs do Grupo C de *A. thaliana*.
- Citocinina induz fracamente a expressão dos quatro genes bZIPs do Grupo C.
- As regulações dos bZIPs do Grupo C por glicose e manose estão inseridas em vias de sinalização independentes de atividade de HXK1, um sensor de glicose em *Arabidopsis*.
- A repressão de *AtbZIP63* por glicose é parcialmente dependente de ABA (ABA2) e de ABI5, enquanto que os elementos envolvidos na via de repressão de *AtbZIP63* por manose ainda não são conhecidos. ABA é necessário para a repressão de *AtbZIP25* por manose e mediada por ABI4. Adicionalmente, a indução de *AtbZIP25* por glicose está inserida em uma via dependente de ABI5. O conjunto desses dados permitem inferir que glicose e manose regulam *AtbZIP63* e *AtbZIP25* através de vias distintas, que são diferenciadas pela dependência de ABI5 e ABI4, respectivamente.
- ABA e glicose desempenham um papel sinérgico na repressão de *AtbZIP63* e provavelmente esta repressão sinérgica é resultante de efeitos pós-transcricionais na expressão de *AtbZIP63*. Estes dados suportam a noção de que *AtbZIP63* representa um integrador chave das vias de glicose e ABA e evidenciam uma provável reorganização da rede de heterodimerização entre os bZIPs do Grupo C e do Grupo S1 em resposta a glicose e ABA e

consequentemente dos programas de expressão gênica em resposta a glicose e ABA.

## PERSPECTIVAS

Neste trabalho os reguladores da transcrição ABI4 e ABI5 da via de transdução do ABA foram identificados como elementos das vias regulatórias da expressão dos bZIPs do Grupo C por ABA, glicose e manose,. O envolvimento de ABI4 foi específico para a repressão de *AtbZIP25* por manose, enquanto que ABI5 está envolvido nas regulações de *AtbZIP63* e de *AtbZIP25* por glicose. Seria interessante avaliar se ABI5 e ABI4 atuam diretamente no promotor de *AtbZIP63* e *AtbZIP25* para mediar suas respostas a glicose e a manose e como ABA distingue essas hexoses através de ABI4 e ABI5 para a repressão ou indução de *AtbZIP25*. Além disso, análises de outros mutantes para elementos da via de sinalização glicose/ABA, como ABI1, ABI2, ABI3 e ABI8 e fatores de transcrição responsivos a ABA (ABFs por exemplo) poderiam refinar nosso conhecimento sobre os elementos envolvidos nas regulações dos bZIPs do Grupo C por manose e glicose. Adicionalmente, como as respostas a glicose e a manose dos bZIPs do Grupo C são independentes da atividade de HXK1, o único sensor de glicose claramente identificado em *Arabidopsis*, seria importante avaliar a participação de outros possíveis sensores como proteínas G, por exemplo AtRGS1, ou como a HXK2 ou as *HXK-like*, na sinalização mediada por essas hexoses.

Como existem evidências da interação entre as vias de sinalização de etileno e de glicose, a hipótese de elementos da via de sinalização de etileno, como por exemplo EIN3 e CTR1, estarem envolvidos nas regulações dos genes bZIPs do Grupo C por glicose ainda precisa ser avaliada mais precisamente.

Informações sobre manose como regulador da expressão gênica são muito escassas. Os dados obtidos no presente trabalho definem a manose como um sinal independente de glicose na expressão de fatores de transcrição do tipo bZIP, abrindo um série de questionamentos sobre qual a importância de manose como um sinal regulatório e quais as vias de sinalização envolvidas na regulação de genes por esta hexose.

Outra pergunta importante seria identificar detalhadamente os mecanismos da sinergia da repressão de *AtbZIP63* por ABA e avaliar o grau de diversificação evolutiva deste processo de regulação.

Desta maneira, a obtenção dessas informações, aliadas às já obtidas neste trabalho e em outros trabalhos desenvolvidos por nosso grupo daria novas pistas das funções dos bZIPs do Grupo C e da evolução dessa classe de fatores de transcrição através das espécies mono e eudicotiledôneas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, M.; KOBAYASHI, Y.; YAMAMOTO, S.; DALMON, Y.; YAMAGUCHI, <sup>a</sup>; IKEDA, Y.; ICHINOKI, H.; NOTAGUCHI, M.; GOTO, K. and ARAKI, T. 2005. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. **Science**. 309. 1052-1056.
- ALBANI, D.; HAMMOND-KOSACK, M.C.U.; SMITH, C.; CONLAN, S.; COLOT, V.; HOLDSWORTH, M. and BEVAN, M.W. 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.
- ANDERSON, J.P.; BADRUZSAUFARI, E.; SCHENK, P.M.; MANNERS, J.M.; DESMOND, O.J.; EHLERT, C.; MACLEAN, D.J.; EBERT, P.R. and KAZAN, K. 2004. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. **Plant Cell**. 16. 3460-3479.
- ARENAS-HUERTERO, F.; ARROYO, A.; ZHOU, L.; SHEEN, J. And LEÓN, P. 2000. Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. **Genes and Development**. 14. 2085-2096.
- ARROYO, A.; BOSSI, F.; FINKELSTEIN, R. R. and LEÓN, P. 2003. Three genes that affect sugar sensing (*abscisic acid insensitive 4*, *abscisic acid insensitive 5*, and *constitutive triple response 1*) are differentially regulated by glucose in Arabidopsis. **Plant Physiology**. 133. 231-242.
- ASSMANN, S.M. 2005. G protein signaling in the regulation of Arabidopsis seed germination. **Sci STKE**. 2005. cm11
- AVONCE, N.; LEYMAN, B.; MASCORRO-GALLARDO, J. O.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M. and ITURRIAGA, G. 2004. The Arabidopsis trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. **Plant Physiology**. 136. 3649-3659.
- BAENA-GONZÁLES, E.; ROLLAND, F.; THEVELEIN, J.M. and SHEEN, J. 2007. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signaling. **Nature**. 448. 938-943.
- BARRERO, J.M.; RODRÍGUEZ, P.L.; QUESADA, V.; PIQUERAS, P.; PONCE, M.R. and MICOL, J.L. 2006. Both abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways govern the induction of NCED3, AAO3 and ABA1 in response to salt stress. **Plant, Cell & Environment**. 29. 2000-2008.
- BECKETT, D. 2001. Regulated assembly of transcription factors and control of transcription initiation. **Journal of Molecular Biology**. 314. 335-352.
- BENAVENTE, L.M. and ALONSO, J.M. 2006. Molecular mechanisms of ethylene signaling in Arabidopsis. **Molecular bioSystems**. 2. 165-73.
- BENSMIHEN, S.; GIRAUDAT, J. and PARCY, F. 2005. Characterization of three homologous basic leucine zipper transcription factors (bZIP) of the ABI5 family during Arabidopsis thaliana embryo maturation. **Journal of Experimental Botany**. 56. 597-603.
- BIES-ETHEVE, N.; CONCEIÇÃO, A. da S.; GIRAUDAT, J.; KOORNNEF, M.; LEON-KLOOSTERZIEL, K.; VALON, C. and DELSENY, M. 1999. Importance of the B2 domain of the Arabidopsis ABI3 protein for Em and 2S albumin gene regulation. **Plant Molecular Biology**. 40. 1045-1054.
- BLACKWOOD, E.M. and KADONAGA, J.T. 1998. Going the distance: a current view of enhancer action. **Science**. 281. 61-63.

- BROCARD, I.M.; LYNCH, T.J. and FINKELSTEIN, R.R. 2002. Regulation and role of the Arabidopsis abscisic acid-insensitive 5 gene in abscisic acid, sugar, and stress response. **Plant Physiology**. 129. 1533-1543.
- BROCARD-GIFFORD, I.M.; LYNCH, T.J. and FINKELSTEIN, R.R. 2003. Regulatory networks in seeds integrating developmental, abscisic acid, sugar, and light signaling. **Plant Physiology**. 131. 78-92.
- BROCARD-GIFFORD, I.M.; LYNCH, T.J.; GARCIA, M.E.; MALHOTRA, B. and FINKELSTEIN, R.R. 2004. The *Arabidopsis thaliana* *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE8* locus encodes a novel protein mediating abscisic acid and sugar responses essential for growth. **The Plant Cell**. 16. 406-421.
- CAICEDO, A.L.; STINCHECOMBE, J.R.; OLSEN, K.M.; SCHMITT, J. and PURUGGANAN, M.D. 2004. Epistatic interaction between Arabidopsis *FRI* and *FLC* flowering time genes generates a latitudinal cline in a life history trait. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**. 101. 15670-15675.
- CARLES, C.; BIES-ETHEVE, N.; ASPART, L.; LEON-KLOOSTERZIEL, K.M.; KOORNNEEF, M.; ECHEVERRIA, M. and DELSENY, M. 2002. Regulation of *Arabidopsis thaliana* *Em* genes: role of *ABI5*. **The Plant Journal**. 30. 373-383.
- CHAN, K.; HAN, X.D. and KAN, Y.W. 2001. An important function of *Nrf2* in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**. 98. 4611-4616.
- CHANG, G.; KWOK, S.F.; BLEECKER, A.B. and MEYEROWITZ, E.M. 1993. Arabidopsis ethylene-response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators. **Science**. 262. 539-544.
- CHEN, J. G. and JONES, A. M. 2004. *AtRGS1* function in *Arabidopsis thaliana*. **Methods in Enzymology**. 389. 338-350.
- CHEN, Y.; JI, F.; XIE, H.; LIANG, J. and ZHANG, J. 2006. The regulator of G-protein signaling proteins involved in sugar and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* seed germination. **Plant Physiology**. 140. 302-310.
- CHENG, W.-H.; ENDO, A.; ZHOU, L.; PENNEY, J.; CHEN, H.-C.; ARROYO, A.; LEON, P.; NAMBARA, E.; ASAMI, T.; SEO, M.; KOSHIBA, T. and SHEEN, J. 2002. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. **The Plant Cell**. 14. 2723-2743.
- CHIOU, T.J. and BUSH, D.R. 1998. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**. 95. 4784-4788.
- CHO, Y.-E.; YOO, S.-D. and SHEEN, J. 2006. Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. **Cell**. 127. 579-589.
- CHOI, H.; HONG, J.; HA, J.; KANG, J. and KIM, S.Y. 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. **Journal of Biological Chemistry**. 275. 1723-1730.
- CHUANG, C.F.; RUNNING, M.P.; WILLIAMS, R.W. and MEYEROWITZ, E.M. 1999. The *PERIANTHIA* gene encodes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in *Arabidopsis thaliana*. **Genes and Development**. 13. 334-344.
- CICERI, P.; LOCATELLI, F.; GENGA, A.; VIOTTI, A. and SCHMIDT, R. J. 1999. The activity of the maize *Opaque2* transcriptional activator is regulated diurnally. **Plant Physiology**. 121. 1321-1327.
- CIERESZKO, I.; JOHANSSON, H. and KLECZKOWSKI, L.A. 2001. Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in *Arabidopsis*. **Biochemical Journal**. 354(Pt 1). 67-72.

- CIERESZKO, I. and KLECZKOWSKI, L.A. 2002. Effects of phosphate deficiency and sugars on expression of rab18 in Arabidopsis: hexokinase-dependent and okadaic acid-sensitive transduction of the sugar signal. **Biochimica et biophysica acta**. 1579. 43-49.
- CORD NETO, G. 1998. **O envolvimento do ativador transcricional *Opaco-2* no metabolismo da lisina e na síntese de proteínas de reserva durante o desenvolvimento da semente de milho**. Campinas: UNICAMP, 1998. 81p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- CORRÊA, L.G.G. 2004. **Análise filogenética de fatores de transcrição bZIP em angiospermas**. Campinas: UNICAMP, 2004. 65p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M. K. and SCHEIBLE, W. R. 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. **Plant Physiology**. 139, 5-17.
- DAMERVAL, C. and LE GUILLOUX, M. 1998. Characterization of novel proteins affected by the O2 mutation and expressed during maize endosperm development. **Molecular Genetics and Genomics**. 257. 354-361.
- DARLINGTON, G.J.; ROSS, S.E. and MACDOUGALD, O.A. 1998. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. **Journal of Biological Chemistry**. 273. 30057-30060.
- DAY, D.A. and TUIITE, M. F. 1998. Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. **Journal of Endocrinology**. 157. 361-371.
- DEKKERS, B. J.; SCHUURMANS, J. A. and SMEEKENS, S. C. 2004. Glucose delays seed germination in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**. 218. 579-588.
- DEPPMANN, C.D.; ALVANIA, R.S. and TAPAROWSKY, E.J. 2006. Cross-species annotation of basic leucine zipper factor interactions: insight into the evolution of closed interaction networks. **Molecular Biology and Evolution**. 23. 1480-1492.
- DESPRES, C.; DeLONG, C.; GLAZE, S.; LIU, E. and FOBERT, P.R. 2000. THE Arabidopsis NPR1/Nim1 protein enhances the DNA binding activity of subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. **Plant Cell**. 12. 179-181.
- DOYLE, J.J. and DOYLE, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**. 9. 11-15.
- EFERT, R.; SIBILIA, M.; HILBERG, F.; FUCHSBICHLER, A.; KUFFERATH, I.; GUERTL, B.; ZENZ, R.; WAGNER, E.F. and ZATLOUKAL, K. 1999. Functions of c-Jun in liver and heart development. **Journal of Cell Biology**. 145.1049-1061.
- EHLERT, A.; WELTMEIER, F.; WANG, X.; MAYER, C.S.; SMEEKENS, S.; VICENTE-CARBAJOSA, J. and 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 Journal**. 46. 890-900.
- EMERSON, B.M. 2002. Specificity of gene regulation. **Cell**. 109. 267-70.
- FINKELSTEIN, R. R. 1994. Mutations at two new Arabidopsis ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. **Plant Journal**. 5. 765-771.
- FINKELSTEIN, R.R.; WANG, M.L.; LYNCH, T.J.; RAO, S. and GOODMAN, H.M. 1998. The Arabidopsis abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA 2 domain protein. **Plant Cell**. 10. 1043-1054.
- FINKELSTEIN, R.R. and LYNCH, T.J. 2000. The Arabidopsis abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. **The Plant Cell**. 12. 599-609.

- FINKELSTEIN, R.R.; GAMPALA, S.S. and Rock, C.D. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. **The Plant Cell**. 14:S-15-S-45.
- FINKELSTEIN, R.R.; GAMPALA, S.S.; LYNCH, T.J.; THOMAS, T.L. and ROCK, C.D. 2005. Redundant and distinct functions of the ABA response loci ABA-INSENSITIVE(ABI)5 and ABRE-BINDING FACTOR (ABF)3. **Plant Molecular Biology**. 59. 253-67.
- FRANCO-ZORRILLA, J.M.; MARTÍN, A.C.; LEYVA, A. and PAZ-ARES, J. 2005. Interaction between phosphate-starvation, sugar, and cytokinin signaling in *Arabidopsis* and the roles of cytokinin receptors CRE1/AHK4 and AHK3. **Plant Physiology**. 138. 847-857.
- FROMMER, W.B.; SCHULZE, W.X. and LALONDE, S. 2003. Plant science. Hexokinase, Jack-of-all-trades. **Science**. 300. 261-263.
- FUJIKI, Y.; ITO, M.; NISHIDA, I. and WATANABE, A. 2000. Multiple signaling pathways in gene expression during sugar starvation. Pharmacological analysis of gene expression in suspension-cultured cells of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**. 124. 1139-1148.
- FUKAZAWA, J.; SAKAI, T.; ISHIDA, S.; YAMAGUCHI, I.; KAMIYA, Y. and 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.
- GAZIOLA, S. A.; ALESSI, E. S.; GUIMARÃES, P. E.; DAMERVAL, C. and AZEVEDO, R. A. 1999. Quality protein maize: a biochemical study of enzymes involved in lysine metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.
- GIBSON, S.I. 2000. Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. **Plant Physiology**. 124. 1532-1539.
- GIBSON, S.I.; LABY, R.J. and KIM, D. 2001. The sugar-insensitive1 (sis1) mutant of *Arabidopsis* is allelic to ctr1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 280. 196-203.
- GIBSON, S.I. 2004. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. **Journal of Experimental Botany**. 55. 253-264.
- GIBSON, S.I. 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. **Current Opinion in Plant Biology**. 8. 93-102.
- GIESE, J.O.; HERBERS, K.; HOFFMANN, M.; KLÖSGEN, R.B. and SONNEWALD, U. 2005. Isolation and functional characterization of a novel plastidic hexokinase from *Nicotiana tabacum*. **FEBS Letters**. 579. 827-831.
- HARTIG, K. and BECK, E. 2006. Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. **Plant Biology**. 8. 389-396.
- HEINEKAMP, T.; STRATHMANN, A.; KUHLMANN, M.; FROISSARD, M.; MÜLLER, A.; PERROT-RECHENMANN, C. and DRÖGE-LASER, W. 2004. The tobacco bZIP transcription factor BZI-1 binds the *GH3* promoter *in vivo* and modulates auxin-induced transcription. **The Plant Journal**. 38. 298-309.
- HOLSTEGE, F.C.P. and YOUNG, R.A. 1999. Transcriptional regulation: contending with complexity. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**. 96. 2-4.
- HORN, P.J. and PETERSON, C.L. 2006. Heterochromatin assembly: A new twist on an old model. **Chromosome Research**. 14. 83-94.
- HUANG, T.; BOHLENLUS, H.; ERIKSSON, S.; PARCY, F. and NILSSON, O. 2005. The mRNA of the *Arabidopsis* gene FT moves from leaf to shoot apex and induce flowering. **Science**. 309. 1694-1696.

- HUIJSER, C.; KORTSTEE, A.; PEGO, J.; WEISBEEK, P.; WISMAN, E. and SMEEKENS, S. 2000. The Arabidopsis *SUCROSE UNCOUPLED-6* gene is identical to *ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4*: involvement of abscisic acid in sugar responses. **The Plant Journal**. 23. 577-585.
- HUNTER, B.G.; BEATLY, M.K.; SINGLETARY, G.W.; HAMAKER, B.R.; DILKES, B.P.; LARKINS, B.A. and JUNG, R. 2002. Maize opaque endosperm mutations create extensive changes in patterns of gene expression. **Plant Cell**. 14. 2591-2612.
- IKNER, A. and SHIOZAKI, K. 2005. Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. **Mutation Research**. 569. 13-27.
- JAKOBY, M.; WEISSHAAR, B.; DÖGE-LASER, W.; VICENT-CARBAJOSA, J.; TIEDEMANN, J.; KROJ, T. and PARCY, F. 2002. bZIP transcription factors in Arabidopsis. **Trends in Plant Science**. 7. 106-111.
- JANG, J.-C. and SHEEN, J.S. 1997. Sugar sensing in higher plants. **Trends in Plant Science**. 2. 208-214.
- KAMINAKA, H.; NAKE, C.; EPPLE, P.; DITTGEN, J.; SCHUTZE, K.; CHABAN, C.; HOLT B.F. 3<sup>rd</sup>, MERKLE, T.; SCHAFFER, E.; HARTEK, K. and DANGL, J.L. 2006. bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in Arabidopsis following infection. **EMBO Journal**. 25. 4400-4411.
- KANG, J.-J.; CHOI, H.-I.; IM, M.-Y. and KIM, S.Y. 2002. Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-response abscisic acid signaling. **Plant Cell**. 14. 343-357.
- KIEBER, J.J.; ROTHENBERG, M.; ROMAN, G.; FELDMANN, K.A. and ECKER, J.R. 1993. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. **Cell**. 72. 427-441.
- KIM, M.; LIM, J.H.; AHN, C.S.; PARK, K.; KIM, G.T.; KIM, W.T. and PAI, H.S. 2006. Mitochondria-associated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. **Plant Cell**. 18. 2341-2355.
- KONDO, S.; MURAKAMI, T.; TATSUMI, K.; OGATA, M.; KANEMOTO, S.; OTORI, K.; ISEKI, K.; WANAKA, A. and IMAIZUMI, K. 2005. OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes. **Nature Cell Biology**. 7. 186-194.
- KORNBERG, R.D. 1999. Eukaryotic transcriptional control. **Trends in Genetics**. 15. 46-49.
- KOUSSEVITZKY, S.; NOTT, A.; MOCKLER, T.C.; HONG, F.; SACHETTO-MARTINS, G.; SURPIN, M.; LIM, J.; MITTLER, R. and CHORY, J. 2007. Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. **Science**. 316. 715-719.
- KUHLMANN, M.; HORVAY, K.; STRATHMANN, A.; HEINEKAMP, T.; FISCHER, U.; BOTTNER, S. and 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. **Journal of Biological Chemistry**. 278. 8786-8794.
- KWONG, M.; KAN, Y.W. and CHAN, J.Y. 1999. The CNC basic leucine zipper factor, Nrf1, is essential for cell survival in response to oxidative stress-inducing agents. Role for Nrf1 in gamma-gcs(l) and gss expression in mouse fibroblasts. **Journal of Biological Chemistry**. 274. 37491-37498.
- LABY, R. J.; KINCAID, M. S.; KIM, D. and GIBSON, S. I. 2000. The Arabidopsis sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. **The Plant Journal**. 23. 587-596.
- LANDSCHULZ, W.H.; JOHNSON, P.F. and McKNIGHT, S.L. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. **Science**. 240. 1759-1764.

- LARA, P.; ONATE-SANCHEZ, L.; ABRAHAM, Z.; FERRANDIZ, C.; DIAZ, I.; CARBONERO, P. and VICENTE-CARBAJOSA, J. 2003. Synergistic activation of seed storage protein gene expression in *Arabidopsis* by *ABI3* and two bZIPs related to OPAQUE2. **Journal of Biological Chemistry**. 278. 21003-21011.
- LEE, T.I. and YOUNG, R.A. 2000. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. **Annual Review of Genetics**. 34. 77-137.
- LEE, J.Y.; COLINAS, J.; WANG, J.Y.; MACE, D.; OHLER, U. and BENFEY, P.N. 2006. Transcriptional and post-transcriptional regulation of transcription factor expression in *Arabidopsis* roots. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**. 103. 6055-6060.
- LEÓN, P. and SHEEN, J. 2003. Sugar and hormone connections. **Trends in Plant Science**. 8. 110-116.
- LEÓN-KLOOSTERZIEL, K. M.; GIL, M. A.; RUIJS, G. J.; JACOBSEN, S. E.; OLSZEWSKI, N. E.; SCHWARTZ, S. H.; ZEEVAART, J. A. and KOORNNEEF, M. 1996. Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. **Plant Journal**. 10. 655-661.
- LI, Y.; LEE, K. K.; WALSH, S.; SMITH, C.; HADINGHAM, S.; SOREFAN, K.; CAWLEY, G. and BEVAN, M. W. 2006. Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in *Arabidopsis* by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. **Genome Research**. 16. 414-427.
- LIU, X.; YUE, Y.; LI, B.; NIE, Y.; LI, W.; WU, W.H. and MA, L. 2007. A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. **Science**. 315. 1712-1716.
- LOGEMANN, J.; SCHELL, J. and WILLMITZER, L. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. **Analytical Biochemistry**. 163. 16-20.
- LOPEZ-MOLINA, L.; MONGRAND, S. and CHUA, N.H. 2001. A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**. 98. 4782-4787.
- LOPEZ-MOLINA, L. and CHUA, N.H. 2002. A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**. 41. 541-547.
- LOPEZ-MOLINA, L.; MONGRAND, S.; MCLACHLIN, D.T.; CHAIT, B.T. and CHUA, N.H. 2002. ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. **Plant Journal**. 32. 317-328.
- LOPEZ-MOLINA, L.; MONGRAND, S.; KINOSHITA, N. and CHUA, N.H. 2003. AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation. **Genes & Development**. 17. 410-418.
- LORENZO, O.; PIQUERAS, R.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.J. and SOLANO, R. 2003. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **Plant Cell**. 15. 165-178.
- LUSCOMBE, N.M.; AUSTIN, S.E.; BERMAN, H.M. and THORNTON, J.M. 2000. An overview of the structures of protein-DNA complexes. **Genome Biology**. 1. REVIEWS001.
- LUKOWITZ, W.; NICKLE, T. C.; MEINKE, D. W.; LAST, R.L.; CONKLIN, P. L. and SOMERVILLE, C. R. 2001. *Arabidopsis* *cyt1* mutants are deficient in a mannose-1-phosphate guanylyltransferase and point to a requirement of N-linked glycosylation for cellulose biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**. 98. 2262-2267.
- MATA, J.; MARGUERAT, S. and BÄHLER, J. 2005. Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. **Trend in Biochemical Sciences**. 30. 506-514.

- MENKENS, A.E.; SCHINDLER, U. and CASHMORE, A.R. 1995. The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. **Trends in Biochemical Sciences**. 20. 506-510.
- MOORE, B.; ZHOU, L.; ROLLAND, F.; HALL, Q.; CHENG, W.-H.; LIU, Y.-X.; HWANG, I.; JONES, T. and SHEEN, J. 2003. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light and hormonal signaling. **Science**. 300. 332-336.
- MOYE-ROWLEY, W.S. 2003. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. **Eukariotic Cell**. 2. 381-389.
- MURAKAMI, T.; KONDO, S.; OGATA, M.; KANEMOTO, S.; SAITO, A.; WANAKA, A. and IMAIZUMI, K. 2006. Cleavage of the membrane-bound transcription factor OASIS in response to endoplasmic reticulum stress. **Journal of Neurochemistry**. 96. 1090-1100.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497, 1962.
- MYERS, L.C. and KORNBERG, R.D. 2000. Mediator of transcriptional regulation. **Annual Review of Biochemistry**. 69. 729-749.
- NARLIKAR, G.J.; FAN, H.Y. and KINGSTON, R.E. 2002. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. **Cell**. 108. 475-487.
- NEWMAN, J. R. and KEATING, A. E. 2003. Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays. **Science**. 300. 2097-2101.
- NIGGWEG, R.; THUROW, C.; KEGLER, C. and 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. **Journal of Biological Chemistry**. 275. 19897-19905.
- NIU, X.; HELENTJARIS, T. and BATE, N.J. 2002. Maize ABI4 binds coupling element1 in abscisic acid and sugar response genes. **Plant Cell**. 14. 2565-2575.
- OÑATE, L.; VICENTE-CARBAJOSA, J.; LARA, P.; DIAZ, I. and 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. **Journal of Biological Chemistry**. 274. 9175-9182.
- ONODERA, Y.; SUZUKI, A.; WU, C.Y.; WASHIDA, H. and TAKAIWA, F. 2000. A rice functional transcriptional activator, RISBZ1, responsible for endosperm-specific expression of storage protein genes through GCN4 motif. **Journal of Biological Chemistry**. 276. 14139-14152.
- van OOSTEN, J.J.; GERBAUD, A.; HUIJSER, C.; DIJKWEL, P.P.; CHUA, N.H. and SMEEKENS, S.C. 1997. An Arabidopsis mutant showing reduced feedback inhibition of photosynthesis. **Plant Journal**. 12. 1011-1020.
- OSTERLUND, M.T.; WEI, N. and DENG, X.W. 2000. The roles of photoreceptor system and the COP-1 targeted destabilization of HY5 in the light control of Arabidopsis seedling development. **Plant Physiology**. 124. 1520-1524.
- OSUNA, D.; USADEL, B.; MORCUENDE, R.; GIBON, Y.; BLÄSING, O.E.; HÖHNE, M.; GÜNTHER, M.; KAMLAGE, B.; TRETHERWEY, R.; SCHEIBLE, W.R. and STITT, M. 2007. Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived Arabidopsis seedlings. **Plant Journal**. 49. 463-91.
- de PAAPE, A.; VUYLSTEKE, M.; van HUMMELEN, P.; ZABEAU, M. and van der STRAETEN, D. 2004. Transcriptional profiling by cDNA-APLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to ethylene in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**. 39. 537-559.

- PASTORI, G. M.; KIDDLE, G.; ANTONIW, J.; BERNARD, S.; VELJOVIC-JOVANOVIC, S.; VERRIER, P. J.; NOCTOR, G. and FOYER, C. H. 2003. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. **The Plant Cell**. 15. 939-951.
- PATTON, E.E.; PEYRAUD, C.; ROUILLON, A.; SURDIN-KERJAN, Y.; TYERS, M. and THOMAS, D. 2000. SCF<sup>Met30</sup>-mediated control of the transcriptional activator Met4 is required for the G1-S transition. **EMBO Journal**. 19. 1613-1624.
- PEGO, J.V.; WEISBEEK, P.J. and SMEEKENS, S.C. 1999. Mannose inhibits Arabidopsis germination via a hexokinase-mediated step. **Plant Physiology**. 119. 1017-1023.
- PONTIER, D.; MIAO, Z.-H. and 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, J.M.; KLESSIG, D.F. and LAM, E. 2002. Differential regulation of TGA transcription factors by post-transcriptional control. **Plant Journal**. 32. 641-653.
- PRICE, J.; LI, T. C.; KANG, S. G.; NA, J. K. and JANG, J.-C. 2003. Mechanisms of glucose signaling during germination of Arabidopsis. **Plant Physiology**. 132. 1424-1438.
- PRICE, J.; LAXMI, A.; SAINT MARTIN, S. and JANG, J.-C. 2004. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis. **Plant Cell**. 16. 2128-2150.
- RAMON, M.; ROLLAND, F.; THEVELEIN, J.M.; van DIJCK, P.; LEYMAN, B. 2006. ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on Arabidopsis growth and starch breakdown. **Plant Molecular Biology**. 63. 195-206.
- RIECHMANN, J.L.; HEARD, J.; MARTIN, J.; REUBER, F.; JIANG, C.Z.; KEDDIE, J.; ADAM, L.; PINEDA, O.; RATCLIFFE, O.J.; SAMAHA, R.R.; CREELMAN, R.; PILGRIM, M.; BROUN, P.; ZHANG, J.Z.; GHANDERHARI, D.; SHERMAN, B.K. and YU, G.L. 2000. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. **Science**. 290. 2105-2110.
- RIECHMANN, J.L. 2002. Transcriptional regulation: a genomic overview. **The Arabidopsis Book**. Somerville C.r. and Meyerowitz E.M. (eds), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp.1-46.
- ROCK, C. 2000. Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. **New Phytologist**. 148. 357-396.
- ROLLAND, F.; WINDERICKX, J. and THEVELEIN, J.M. 2001. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. **Trends in Biochemical Sciences**. 26. 310-317.
- ROLLAND, F.; WINDERICKX, J. and THEVELEIN, J.M. 2002a. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. **FEMS Yeast Research**. 2. 183-201.
- ROLLAND, F.; MOORE, B. and SHEEN, J. 2002b. Sugar sensing and signaling in plants. **The Plant Cell**. Supplement. 185-205.
- ROLLAND, F. and SHEEN, J. 2005. Sugar sensing and signalling networks in plants. **Biochemical Society Transactions**. 33(Pt 1). 269-271.
- ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E. and SHEEN, J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**. 2006. 675-709.
- ROMAN, G.; LUBARSKY, B.; KIEBER, J.J.; ROTHENBERG, M. and ECKER, J.R. 1995. Genetic analysis of ethylene signal transduction in Arabidopsis thaliana: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. **GENETICS**. 139. 1393-1409.

- ROOK, F.; GERRITS, N.; KORTSTEE, A.; van KAMOEN, M.; WEISBEEK, P. and SMEEKENS S. 1998. Sucrose-specific signaling represses translation of the Arabidopsis ATB2 bZIP transcription factor gene. **The Plant Journal**. 15. 253-263.
- ROOK, F.; CORKE, F.; CARD, R.; MUNZ, G.; SMITH, C. and BEVAN, M. W. 2001. Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. **The Plant Journal**. 26. 421-433.
- ROOK, F. and BEVAN, M.W. 2003. Genetic approaches to understanding sugar-response pathways. **Journal of Experimental Botany**. 54. 495-501.
- ROOK, F.; HADINGHAM, S. A.; LI, Y. and BEVAN, M. W. 2006. Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. **Plant, Cell & Environment**. 29. 426-434.
- ROSE, M.; ALBIG, W. and ENTIAN, K.D. 1991. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinase-PI and hexokinase-PII. **European Journal of Biochemistry**. 199. 511-518.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. E. 1989. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory.
- SANYAL, S.; SANDSTROM, D.J.; HOEFFER, C.A. and RAMASWAMI, M. 2002. AP-1 functions upstream of CREB to control synaptic plasticity in *Drosophila*. **Nature**. 416. 870-874.
- SATOH R.; FUJITA, Y.; NAKASHIMA, K.; SHINOZAKI, K. and YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2004. A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-response expression of the ProDH gene in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**. 45. 309-317.
- SAUER, F. and TJIAN, R. 1997. Mechanisms of transcriptional activation: differences and similarities between yeast, *Drosophila*, and man. **Current Opinion in Genetics and Development**. 7. 176-181.
- SCHINDLER, U.; BECKMANN, H. and CASHMORE, A.R. 1992. TGA1 and G-box binding factors: two distinct classes of Arabidopsis leucine zipper proteins compete for the G-box-like element TGACGTGG. **Plant Cell**. 4. 1309-1319.
- SHEEN, J.; ZHOU, L. and JANG, J.C. 1999. Sugars as signaling molecules. **Current Opinion in Plant Biology**. 2. 410-418.
- SHINOZAKI, K. and YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**. 3. 217-223.
- SHINOZAKI, K. and YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**. 58. 221-227.
- SIGH, K.B. 1998. Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control. **Plant Physiology**. 118. 1111-1120.
- SILVEIRA, A.B.; GAUER, L.; TOMAZ, J.P.; CARDOSO, P.R.; CARMELLO-GUERREIRO, S. and VINCENTZ, M. 2007. The Arabidopsis AtbZIP9 protein fused to the VP16 transcriptional activation domain alters leaf and vascular development. **Plant Science**. 172. 1148-1156.
- SMALE, S.T. and KADONAGA, J.T. 2003. The RNA polymerase II core promoter. **Annual Review of Biochemistry**. 72. 449-479.
- SMALLE, J.; KUREPA, J.; YANG, P.; EMBORG, T.J.; BABYCHUK, E.; KUSHNIR, S. and VIERSTRA, R.D. 2003. The pleiotropic role of the 26S proteasome subunit RPN10 in Arabidopsis growth and development supports a substrate-specific function in abscisic acid signaling. **Plant Cell**. 15. 965-980.

- SMEEKENS, S. and ROOKS, F. 1997. Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. **Plant Physiology**. 115. 7-13.
- SMEEKENS, S. 1998. Sugar regulation of gene expression in plants. **Current Opinion in Plant Biology**. 1. 230-234.
- SMEEKENS, S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 51. 49-81.
- STONE, S.L.; WILLIAMS, L.A.; FARMER, L.M.; VIERSTRA, R.D. and 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 and Development**. 12. 599-606.
- TATEMATSU, K.; KUMAGAI, S.; MUTO, H.; SATO, A.; WATAHIKI, M.K.; HARPER, R.M.; LISCUM, E. and YAMAMOTO K.T. 2004. MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in Arabidopsis thaliana. **Plant Cell**. 16. 379-393.
- THOMAS, S.G.; PHILLIPS, A.L. and HEDDEN P. 1999. Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. 96. 4698-4703.
- TO, J. P. C.; REITER, W.-D. and GIBSON, S. I. 2002. Mobilization of seed storage lipid by Arabidopsis seedlings is retarded in the presence of exogenous sugars. **BMC Plant Biology**. 2. 11p.
- TRAVIS, A.J.; SUI, D.; RIEDEL, K.D.; HOFMANN, N.R.; MOSS, S.B.; WILSON, J.E. and KOPF, G.S. 1999. A novel NH(2)-terminal, nonhydrophobic motif targets a male germ cell-specific hexokinase to the endoplasmic reticulum and plasma membrane. **Journal of Biological Chemistry**. 274. 34467-34475.
- ULM, R.; BAUMANN, A.; ORAVECZ, A.; MATE, Z.; ADAM, E.; OAKELEY, E.J.; SCHAFER, E. and NAGY, F. 2004. Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**. 101. 1397-1402.
- UNO, Y.; FURIHATA, T.; ABE, H.; YOSHIDA, R.; SHINOZAKI, K. and 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. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**. 97. 11632-11637.
- VETTORE, A. L.; YUNES, J. A.; CORD NETO, G.; SILVA, M. J. da; ARRUDA, P. and LEITE, A. 1998. The molecular and functional characterization of an *Opaque-2* homologue gene from *Coix* and a new classification of plant bZIP proteins. **Plant Molecular Biology**. 35. 249-263.
- VICENTE-CARBAJOSA, J.; OÑATE, L.; LARA, P.; DIAZ, I. and CARBONERO P. 1998. Barley BLZ1: a bZIP transcriptional activator that interacts with endosperm-specific gene promoters. **Plant Journal**. 13. 629-640.
- VILLARD, J. 2004. Transcription regulation and human diseases. **Swiss Medical Weekly**. 134. 571-579.
- VINCENTZ, M. G. A.; BANDEIRA-KOBARG, C.; GAUER, L.; SCHLÖGL, P. and LEITE, A. 2003. Evolutionary pattern of angiosperm bZIP factors homologous to the maize *Opaque-2* regulatory protein. **Journal of Molecular Evolution**. 55. 1-12.

- WALSH, J.; WATERS, C.A. 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, A.L. 2002. Eukaryotic transcription factors. **Current Opinion in Structural Biology**. 12. 107-114.
- WELLMER, F.; KIRCHER, S.; RÜGNER, A.; FROHNMEYER, H.; SCHÄFER, E. and HARTER, K. 1999. Phosphorylation of the parsley bZIP transcription factor CPRF-2 is regulated by light. **Journal of Biological Chemistry**. 274. 29476-29489.
- WELTMEIER, F.; EHLERT, A.; MAYER, C.S.; DIETRICH, K.; WANG, X.; SCHUTZE, K.; ALONSO, R.; HARTER, K.; VICENTE-CARBAJOSA, J. and DROGE-LASER, W. 2006. Combinatorial control of Arabidopsis praline dehydrogenase transcription by specific heterodimerization of bZIP transcription factors. **EMBO Journal**. 25. 3133-3143.
- WINGENDER, E.; CHEN, X.; HEHL, R.; KARAS, H.; LIEBICH, I. And MATYS, V. 2000. TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. **Nucleic Acids Research**. 28. 316-319.
- WRAY, G.A.; HAHN, M.W.; ABOUHEIF, E.; BALHOFF, J.P.; PIZER, M.; ROCKMAN, M.V. and ROMANO, A. 2003. The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. **Molecular Biology and Evolution**. 20. 1377-1419.
- XIAO, W.; SHEEN, J. and JANG, J. C. 2000. The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. **Plant Molecular Biology**. 44. 451-461.
- XIONG, L. and ZHU, J.-K. 2001. Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. **Physiologia Plantarum**. 112. 152-166.
- YAMAGUCHI, S.; MITSUI, S.; YAN, L.; YAGITA, K.; MIYAKE, S. and OKAMURA, H. 2000. Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. **Molecular Cell Biology**. 20. 4773-4781.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. and SHINOZAKI, K. 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**. 57. 781-803.
- YANAGISAWA, S.; YOO, S.-D. and SHEEN, J. 2003. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signaling in plants. **Nature**. 425. 521-525.
- YIN, Y.; ZHU, Q.; DA, S.; LAMB, C. and BEACHY, R. 1997. RF2a, a bZIP transcriptional activator of the phloem-specific rice tungro bacilliform virus promoter, function in vascular development. **EMBO Journal**. 16. 5247-5259.
- YUAN, K. and WYSOCKA-DILLER, J. 2006. Phytohormone signaling pathways interact with sugars during seed germination and seedling development. **Journal of Experimental Botany**. 57. 3359-3367.
- YUNES, J. A.; VETTORE A. L.; da SILVA, M. J.; LEITE, A. and ARRUDA, P. 1998. Cooperative DNA binding and sequence discrimination by the *Opaque2* bZIP factor. **The Plant Cell**. 10. 1941-1955.
- ZHAO, C.; CRAIG, J.C.; PETZOLD, H.E.; DICKERMAN, A.W. and BEERS, E.O. 2005. The xylem and phloem transcriptomes from secondary tissues of the Arabidopsis root-hypocotil. **Plant Physiology**. 138. 803-818.
- ZHANG, Y.; FAN, W.; KINKEMAN, M.; LI, X. and 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. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**. 96. 6523-6528.
- ZHOU, L.; JANG, J.-C.; JONES, T. L. and SHEEN, J. 1998. Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by a *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. **Proceedings of National Academy of Sciences of USA**. 95. 10294-10299.

ZIMMERMANN, P.; HIRSCH-HOFFMANN, M.; HENNING, L. and GRUISSEM, W. 2004. GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. Plant Physiology. 136. 2621-2632.