

EDUARDO BASSI SIMONI

**O PAPEL DUAL DE AtbZIP60 E AtbZIP9 COMO  
MODULADORES DAS VIAS DE ESTRESSE NO RETÍCULO  
ENDOPLASMÁTICO E ESTRESSE OSMÓTICO**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S599p  
2019  
Simoni, Eduardo Bassi, 1995-  
O papel dual de AtbZIP60 e AtbZIP9 como moduladores  
das vias de estresse no retículo endoplasmático e estresse  
osmótico / Eduardo Bassi Simoni. – Viçosa, MG, 2019.  
viii, 46 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Pedro Augusto Braga dos Reis.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 38-43.

1. Transdução de sinal celular. 2. Fatores de transcrição.  
3. Stress (Fisiologia). 4. Plantas. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

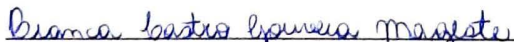
CDD 22. ed. 571.6

EDUARDO BASSI SIMONI

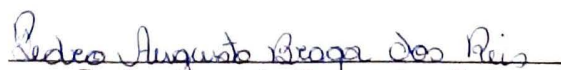
**O PAPEL DUAL DE AtbZIP60 E AtbZIP9 COMO  
MODULADORES DAS VIAS DE ESTRESSE NO RETÍCULO  
ENDOPLASMÁTICO E ESTRESSE OSMÓTICO**

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

APROVADA: 29 de julho de 2019.

  
Bianca Castro Gouveia Mageste

  
Elizabeth Pacheco Batista Fontes

  
Pedro Augusto Braga dos Reis  
(Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por toda a força e saúde necessária para chegar até aqui, por proporcionar tudo que sou e que tenho;

Aos meus pais, minha irmã e minha família, pelo suporte, amor incondicional, por fazerem de tudo para estar onde estou;

Ao Professor Pedro Augusto pela orientação, paciência e confiança. Agradeço por cada cobrança de resultados, que me permitiram chegar aqui;

À professora Elizabeth Fontes por me permitir fazer parte do seu laboratório e por todos os ensinamentos;

Aos incríveis amigos que Viçosa e a UFV me proporcionaram, tornando minha estadia muito mais prazerosa;

Aos amigos do LBMP, por serem sempre tão prestativos. Por tornarem o ambiente de trabalho mais alegre e muito mais leve, sem vocês as horas de trabalho com certeza seriam mais longas. Em especial ao Célio e a Débora, por toda a ajuda durante o percurso deste trabalho;

À Universidade Federal de Viçosa, ao BIOAGRO e ao INCTIPP pela estrutura disponibilizada para a execução deste trabalho;

À Capes, CNPq e a FAPEMIG pelo suporte financeiro para realização deste projeto.

À Glaucia e Marlene por toda a colaboração;

A todos aqueles que torceram por mim ao longo dessa caminhada e contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho.

# SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Fatores de transcrição bZIP .....	3
2.2. Via de resposta a proteínas mal dobradas ( <i>Unfolded Protein Response</i> – UPR).....	5
2.3 Vias de morte celular mediada por NRP/DCD .....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Material Vegetal .....	11
3.2 Obtenção das construções de DNA.....	11
3.3 Ensaio de interação proteína-proteína pelo sistema de duplo-híbrido de leveduras ...	13
3.4 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 .....	14
3.5 Transformação de Arabidopsis e seleção de transformantes independentes .....	14
3.6 Ensaio de Complementação de Fluorescência Bimolecular (BiFC) .....	15
3.7 Ensaio de tolerância à seca.....	16
3.8 Estresse em plântulas de Arabidopsis.....	16
3.9 Isolamento e transfecção de Protoplastos de Arabidopsis.....	17
3.10 Extração de RNA e síntese de cDNA .....	17
3.11 Ensaios de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).....	18
Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para clonagens, diagnósticos e qPCR .....	19
Tabela 2. Listagem de clones em <i>Escherichia coli</i> utilizados no desenvolvimento do trabalho .....	20
4. RESULTADOS .....	21
<i>Interação entre bZIP9 e bZIP60</i> .....	22
<i>Superexpressão de bZIP9 e bZIP60 promove tolerância a seca em Arabidopsis</i> .....	26
<i>Indução de morte celular por tunicamicina</i> .....	27
<i>O papel de bZIP9 e bZIP60 na modulação dos genes NRPs</i> .....	28
<i>O papel dos genes NRPs na indução de bZIP9 e bZIP60</i> .....	30
5. DISCUSSÃO.....	32
6. CONCLUSÃO .....	37
7. BIBLIOGRAFIA.....	38
SUPLEMENTO .....	44

## RESUMO

SIMONI, Eduardo Bassi, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **O papel dual de AtbZIP60 e AtbZIP9 como moduladores das vias de estresse no retículo endoplasmático e estresse osmótico.** Orientador: Pedro Augusto Braga dos Reis.

O desenvolvimento e adaptação de plantas a condições ambientais é altamente correlacionado com a regulação da expressão gênica. Sobre condições de estresse, eventos celulares são desencadeados no intuito de restabelecer a homeostase celular. Da mesma forma, a via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR) é caracterizada como sendo um mecanismo celular citoprotetor essencial a respostas aos estresses bióticos e abióticos, os quais são capazes de alterar a homeostase do retículo endoplasmático (RE). Mediante qualquer perturbação no RE que cause acúmulo de proteínas mal dobradas em sua porção luminal, os receptores acoplados ao RE são ativados e desencadeiam a sinalização da via UPR. Uma vez ativada, essa cascata de sinalização promove o aumento da expressão de genes relacionados com o dobramento e a degradação de proteínas. Entretanto, em condições de estresse prolongado, a resposta de defesa não é capaz de restaurar o equilíbrio, dessa forma, vias de morte celular programada (PCD) são ativadas. A via NRP/DCD (*Asparagine-Rich Protein/Development and Cell Death*), uma via de morte celular programada mediada por proteínas ricas em asparagina, é responsiva e conecta sinais de estresse no RE e estresse osmótico. Embora esta via seja conservada entre as espécies, o mecanismo molecular não é totalmente caracterizado, assim como seus componentes. Além de seu papel essencial na via UPR, a chaperona molecular BiP modula negativamente a via de morte celular mediada por proteínas NRP/DCD. Com intuito de elucidar o mecanismo molecular da referida via de resposta a estresses e seus moduladores, AtbZIP60 e AtbZIP9 foram os alvos de estudos deste trabalho. Bem caracterizada como uma proteína da via UPR, bZIP60 apresenta duas isoformas que, conseqüentemente, podem apresentar respostas alternativas em condições de estresse distintas. Ao contrário de bZIP60, bZIP9 é pouco caracterizado em relação a sua função molecular e suas interações na célula com outras moléculas. Portanto, nós investigamos como bZIP60 e bZIP9 são modulados sobre condições de estresse osmótico e no RE, assim como o papel desses fatores de transcrição (FT) na via de morte celular programada mediada por proteínas NRP/DCD. Nós avaliamos como

esses genes respondem a tratamentos com PEG (polietilenoglicol) e TUN (tunicamicina) em plântulas Col-0 (Columbia) de Arabidopsis. Ambos os genes apresentaram um aumento de expressão em resposta a ambos os estresses. Os FT bZIP usualmente atuam como dímeros, homodímeros ou heterodímeros, dessa forma, nós avaliamos se bZIP9 interage com bZIP60 ou se é capaz de formar homodímero. Não foi possível realizar a abordagem de duplo-híbrido em leveduras devido a capacidade de auto-ativação de ambos os FT. Interessantemente, através do ensaio BiFC (complementação bimolecular de fluorescência) nós identificamos que bZIP9 pode formar homodímeros assim como interagir com bZIP60, sendo que, a interação foi intensificada quando as plantas foram tratadas com o indutor TUN. Devido a interação dos FT e o aumento de suas expressões em condições de estresse no RE e osmótico, nos perguntamos se essa expressão elevada em Arabidopsis poderia promover tolerância a estresse osmótico e no RE. Nós observamos uma resposta dual de bZIP9 e bZIP60 perante ambos os estresses. Linhagens superexpressando bZIP9 e bZIP60 foram mais tolerantes a condições de seca quando comparadas com Col-0 ou com a linhagem nocaute de bZIP60 (*bzip60*). Essas linhagens superexpressando os FT apresentaram fenótipo turgido, alto conteúdo relativo de água durante o estresse, assim como uma maior taxa de sobrevivência após a reidratação. Apesar disso, sobre condições prolongadas de estresse no RE, as mesmas linhagens apresentaram um fenótipo de clorose mais proeminente quando comparados com Col-0 e *bzip60*. Além disso, nós avaliamos a influência dos FT na via de morte celular mediada por proteínas NRP desencadeada por estresse no RE. Linhagens superexpressando bZIP9 e bZIP60, Col-0 e *bzip60* foram induzidas com TUN. A linhagem *bzip60* não mostrou indução de *NPR1*, enquanto o gene *NRP2* foi reprimido nessa condição. Entretanto, as linhagens superexpressando os FT mostraram um aumento na expressão de *NRP1* quando comparado com Col-0 e *bzip60*. Nós também avaliamos a influência da superexpressão de NRP/DCD na expressão gênica de bZIP9 e bZIP60. Transformamos protoplastos com vetores carreando os genes NRPs e avaliamos a resposta após 8h de indução. A superexpressão de NRP1 e NRP2 estimulou positivamente a expressão dos FT. De acordo com tudo que foi mencionado, os resultados mostraram que bZIP9 e bZIP60 estão envolvidos em respostas a estresse osmótico e no RE, assim como modulam os genes NRP/DCD e

são induzidos por eles. Experimentos adicionais são necessários para a compreensão do mecanismo desses FT em respostas a estresses.

## ABSTRACT

SIMONI, Eduardo Bassi, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **The dual role of AtbZIP60 and AtbZIP9 as modulators of endoplasmic reticulum and osmotic stress pathways.** Adviser: Pedro Augusto Braga dos Reis.

Plant development and adaptation to environmental conditions are highly correlated with the gene expression regulation. Upon stress conditions, cellular events are triggered in order to restore the cell homeostasis. Likewise, the unfolded protein response (UPR) is well characterized as an essential cytoprotective mechanism that responds to biotic and abiotic stresses, which alter the homeostasis of the endoplasmic reticulum (ER). Upon any disruption in the ER homeostasis that cause unfolded protein accumulation in the lumen, the ER-membrane attached receptors are activated and trigger the UPR signaling. Once activated, this signaling promotes the up regulation of synthesis, folding and protein degradation genes. Yet, upon prolonged stress conditions the defense response is not able to restore ER balance; therefore, activates the programmed cell death response (PCD). The NRP/DCD (Asparagine-Rich Protein/Development and Cell Death)-mediated cell death response connects the signal from ER and osmotic stress. Although this pathway is conserved among species, the molecular mechanism it is not fully characterized, as well as the executors and modulators. Besides the essential role in the UPR pathway, the molecular chaperone BiP negatively modulates the NRP-mediated cell death response. In order to shed light on the molecular mechanisms of this stress response pathway and the unknown modulators, the AtbZIP60 and AtbZIP9 were the targets of this investigation. As a well characterized protein of the UPR response, bZIP60 shows two different isoforms in the cell, which can represent alternative responses upon distinct stress conditions. Unlike bZIP60, bZIP9 is poorly characterized in relation to the molecular function and the cellular partners in the cell. Therefore, we assessed how the bZIP60 and bZIP9 are modulated upon ER and osmotic stress conditions as well as the role of this transcription factors (TFs) in the NRP/DCD-mediated cell death response. The role of bZIP60 and bZIP9 in the drought and osmotic signaling is not fully understood, thus, we evaluate how those genes respond to PEG (polyethylene glycol) and TUN (tunicamycin) treatment in Arabidopsis Col-0 (Columbia) seedlings. Both genes were up regulated by either osmotic or ER stress. bZIP TFs usually perform as dimers,

homodimers or heterodimers; thus, we tested whether bZIP9 can interact with bZIP60 or can form homodimer. We could not perform the yeast two-hybrid approach, once both genes present the self-activation in yeast system. Interestingly, by BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) we identified that bZIP9 can form homodimer and interact with the bZIP60; moreover, the interaction is intensified when the plants were treated with ER stressor TUN. Because of the bZIP9 and bZIP60 interaction and their up regulation upon ER and osmotic stress, we asked whether the overexpression of those genes in Arabidopsis would promote tolerance to drought stress or extended ER stress. We observed a dual response of the bZIP9 and bZIP60 in response to drought stress and ER stress. bZIP9 and bZIP60 overexpressing lines were more tolerant to drought conditions compared to Col-0 or *bzip60* knockout line. The overexpressing lines display a turgid phenotype, higher water relative content during the stress and higher survival rate after rehydration as compared to Col-0. Nevertheless, upon extended ER stress, the overexpressing lines presented more prominent chlorosis phenotype compared to Col-0 and *bzip60*. Moreover, we evaluated the influence of bZIP9 and bZIP60 on the NRP-mediated cell death response triggered by ER stress. bZIP9 and bZIP60 overexpressing lines, Col-0 and *bzip60* knockout line were induced by TUN. *bzip60* line did not show induction of *NRP1*, while *NRP2* gene was repressed in that condition. However, the bZIP9 and bZIP60 overexpressing lines showed the up regulation of *NRP1* when compared to Col-0 and *bzip60*. We also evaluated the influence of overexpression of NRP/DCD in the *bZIP9* and *bZIP60* gene expression. We transformed protoplast with vectors carrying NRPs genes and evaluated the response after 8h of induction. The overexpression of NRP1 and NRP2 up regulates *bZIP9* and *bZIP60* gene expression. Accordingly, the results showed that bZIP9 and bZIP60 are involved in ER and osmotic stress response, moreover, they modulate the NRP/DCD genes and are induced by them. Other experiments should be carried out to understand the mechanism of bZIP9 and bZIP60 in the stress responses.

# 1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da humanidade, a agricultura é considerada uma atividade essencial para o desenvolvimento socioeconômico das populações. Nos dias atuais, as práticas agrícolas e agropecuárias são consideradas pilares da economia em diversos países. Plantações podem sofrer diferentes tipos de estresses, tanto bióticos, quanto abióticos. Como exemplos: pragas biológicas, microrganismos, extremos de temperatura, salinidade, déficit hídrico, entre outros. O impacto desses estresses pode ser prejudicial ao crescimento, desenvolvimento e produtividade de culturas agrônomicas relevantes, tendo como consequência, restrições para a agricultura mundial, comprometendo a produtividade agrícola e segurança alimentar.

Como organismos sésseis, as plantas são capazes de se adaptarem às mudanças das condições ambientais a fim de sobreviverem. A ativação de vias de sinalização celular, com consequente superexpressão e/ou repressão de genes específicos, representa umas das principais maneiras de resposta e defesa desses organismos e, desta forma, a minimizar os efeitos nocivos causados.

A via de resposta a proteínas mal dobradas (*unfolded protein response* – UPR) serve de exemplo como mecanismo de defesa a determinadas situações de estresse. A ativação da via culmina no desencadeamento de uma sinalização celular que, por sua vez, estimula a reprogramação gênica com o intuito de restabelecer o equilíbrio do organismo. Contudo, dependendo da intensidade da perturbação ou do tempo de incidência, vias de morte celular programadas são estimuladas.

Inicialmente identificada em soja, a via de sinalização que integra sinais de estresse no RE e de estresse osmótico em um processo de morte celular programada mediada por proteínas NRP/DCD apresenta-se conservada nos organismos vegetais. Essa via tem sido caracterizada como uma relevante resposta adaptativa de plantas a estresses e a eventos de desenvolvimento, como senescência natural de folhas (Reis e Fontes, 2012; Reis *et al.*, 2016). A chaperona molecular BiP, localizada no RE, além de seu papel fundamental na via da UPR (Howell, 2013; Wan e Jiang, 2015), apresenta-se como um modulador negativo dessa via de morte celular induzida por estresses, sendo capaz de interferir tanto a nível transcricional quanto a nível pós-transcricional (Reis *et al.*, 2011).

Embora alguns elementos da via já tenham sido bem caracterizados, o entendimento a respeito de outros componentes, mecanismos de regulação, resposta a diferentes estresses, assim como sobre sua interação com a via UPR se fazem necessário. O fator de transcrição AtbZIP60, localizado no RE, está envolvido na resposta a diversos processos celulares, como estresses salino, seca, sinalização hormonal e processo de morte celular desencadeada por estresse. AtbZIP60 pode apresentar duas isoformas, sendo que a primeira se encontra inserida na membrana do RE, enquanto a segunda apresenta-se no núcleo (Nagashima *et al.*, 2011; Howell, 2013). No entanto, o papel fisiológico e molecular destas isoformas na resposta a diferentes condições de estresse ainda não é completamente elucidado.

Além de ser um fator importante na sinalização e na resposta a UPR, chaperona molecular BiP modula a via de morte celular mediada por NRP/DCD por um mecanismo molecular ainda não caracterizado. Por meio de transcriptomas de soja, foi possível observar que a superexpressão de BiP apresentou níveis de expressão maiores para o gene de GmbZIP61 (Carvalho *et al.*, 2014). Entretanto, o papel desempenhado por GmZIP61 na resposta à seca mediada por BiP e na modulação na via de morte celular mediada por NRP/DCD não é compreendido. Baseado na conservação da via de NRP/DCD entre as espécies, foi identificado o fator de transcrição AtbZIP9, homólogo em Arabidopsis de GmbZIP61, como possível modulador da via de tolerância à seca mediado por BiP. Pouco se sabe a respeito da função de AtbZIP9, sua interação com outras moléculas, participação em vias de sinalização, assim como sobre sua atuação em regulações transcricionais.

Portanto, a presente proposta de pesquisa consiste na caracterização molecular e funcional dos fatores de transcrição AtbZIP60 e AtbZIP9 em resposta a déficit hídrico e estresse no retículo endoplasmático, assim como o papel dos mesmos com a via de morte celular mediada pelas proteínas NRP/DCD.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Fatores de transcrição bZIP

A regulação da expressão gênica é um processo crucial em inúmeras etapas do desenvolvimento de um ser vivo. Seja para o preciso funcionamento do organismo, a correta utilização de recursos energéticos e até mesmo com a finalidade de acionar vias de defesa à uma determinada situação de risco, a regulação da expressão gênica é de extrema importância. Nos eucariotos, dentre as diversas maneiras em que essa regulação pode ocorrer, a atuação de fatores à nível transcricional é amplamente relevante.

Fatores de transcrição (FTs) caracterizam-se como proteínas que possuem a capacidade de interagir com sequências específicas das moléculas de DNA e, dessa forma, estimulam ou reprimem a expressão de determinado(s) gene(s). Os FTs compõem um grupo gigantesco de proteínas, em torno de 100 famílias de FTs já foram definidas na planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Pruneda-Paz *et al.*, 2014), sendo que o padrão de agrupamento se deve principalmente às características dos domínios de ligação dessas proteínas ao DNA.

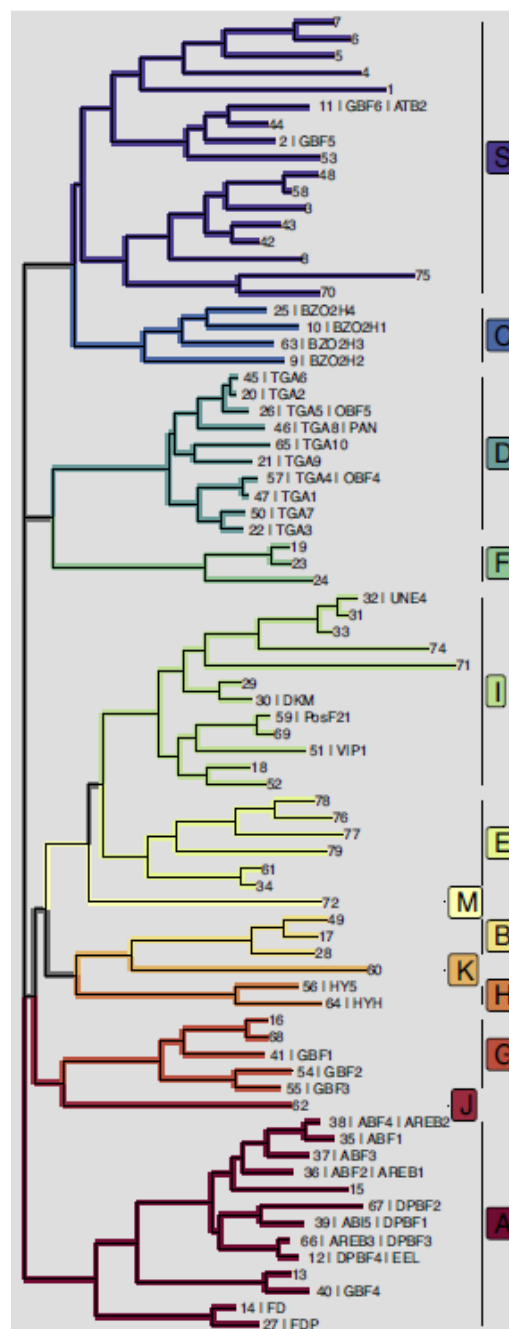
Os FTs de zíper de leucina (*basic leucine zipper* - bZIP) constituem uma dessas famílias de moléculas reguladoras e são encontradas em diversos processos vitais de animais e plantas. Foi constatado que o tamanho da família bZIP varia consideravelmente entre os seres eucariotos: 53 em humanos, 78 em *Arabidopsis*, 92 em arroz, 125 em milho e 247 em colza (Droge-Laser *et al.*, 2018).

Estruturalmente, os bZIPs podem ser caracterizados por possuírem dois motivos proteicos. Um deles, composto por aminoácidos de caráter básico, é responsável por fazer a interação específica do FTs ao DNA, enquanto o outro motivo é o denominado zíper de leucina, região que permite a dimerização de moléculas de bZIP (Noman *et al.*, 2017). Devido ao fato dos bZIPs atuarem, na maioria das vezes, em dímeros, a heterodimerização proporciona uma ampla flexibilidade regulatória, como por exemplo, em relação à região alvo desses FTs (Rodrigues-Martinez *et al.*, 2017).

Exemplificando a participação dos bZIPs em diversos processos celulares, estudos em plantas evidenciam que esses FTs desempenham papéis cruciais nos mais distintos eventos, incluindo regulação de genes para o desenvolvimento de

sementes, para a maturidade floral, assim como em mecanismos de imunidade e, dessa forma, atuam na diferenciação de órgãos e tecidos, defesa de patógenos, metabolismo energético, sinalização celular, entre outros processos (Noman *et al.*, 2017).

Se tratando da planta modelo *Arabidopsis*, os 78 membros que compõem o grupo AtbZIP foram divididos em 13 grupos, designados de A-M (Figura 1) (Droge-Laser *et al.*, 2018). Os integrantes de cada grupo têm similaridade de sequência na sua respectiva região básica e, além disso, possuem características comuns, como o tamanho do domínio ZIP e sua posição na sequência de proteínas (Alves *et al.*, 2013; Noman *et al.*, 2017).



**Figura 1. Árvore filogenética da família bZIP em *Arabidopsis thaliana*.** Os bZIPs foram organizados e agrupados baseado em suas similaridades no domínio bZIP (Droge-Laser *et al.*, 2018).

A família K é composta por apenas um único membro, denominado bZIP60, que, em conjunto com os três membros do grupo B (bZIP17, bZIP28 e bZIP49), desempenha um papel essencial na resposta à estresses no retículo endoplasmático (Howell, 2013; Wan e Jiang, 2016). bZIP60 é um fator crucial na via de resposta a proteínas mal dobradas (via UPR- *unfolded protein response*). Esse fator de transcrição, sob condições de estresse, pode sofrer um processamento que dá origem a uma forma “*spliced*” do bZIP60, capaz de se realocar no núcleo e exercer sua função transcricional. Sabe-se que diferentes tipos de indutores de estresse são capazes de estimular esse evento, como por exemplo, agentes químicos (tunicamicina e ditiotreitol – DDT), hormônios (ácido salicílico) e até mesmo fatores abióticos, como o calor (Parra-Rojas *et al.*, 2015).

Composta por 4 bZIPs, pouco se sabe a respeito das proteínas que compõem a família C, como suas funções, interações com outras moléculas, participações em vias de sinalização, assim como sobre suas atuações em regulações transcricionais. Estruturalmente, os bZIPs desta família se caracterizam por apresentar um zíper de leucina estendido com até nove “*heptad repeats*”. Além disso, são conservadas regiões alvo para possíveis modificações regulatórias, como locais de fosforilação que controlam a translocação nuclear e as propriedades de ligação ao DNA (Jakoby *et al.*, 2002). Estudos evidenciaram que esses quatro FTs preferencialmente se heterodimerizam com os bZIPs S1(subgrupo) da família S (Weltmeier *et al.*, 2006; Ehlert, 2006; Droge-Laser *et al.*, 2018). Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar a atuação completa desses bZIPs no organismo vegetal.

## **2.2. Via de resposta a proteínas mal dobradas (*Unfolded Protein Response – UPR*)**

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela essencial e altamente dinâmica, uma vez que está envolvida em diversos processos celulares importantes, como a síntese proteica, dobramento, processamento e controle de qualidade de proteínas recém-sintetizadas, assim como na manutenção da homeostase de Ca<sup>2+</sup>

(Silva *et al.*, 2015). Não obstante, todo o transcurso do processamento de proteínas é muito sensível, sendo que, falhas no procedimento podem resultar em proteínas com conformações não ativas. Mesmo sob condições apropriadas, algumas proteínas ainda podem apresentar uma incorreta conformação e, dessa forma, serem prejudiciais para a planta. Entretanto, com o intuito de se estabelecer um equilíbrio, proteínas mal dobradas são eliminadas pela via de degradação de proteínas associada ao RE (ERAD - Endoplasmic reticulum-associated degradation) (Howell, 2013).

A princípio, esse mecanismo de degradação de proteínas é capaz de proporcionar estabilidade para a célula vegetal. Entretanto, sob efeito de condições ambientais estressantes e/ou situações que exigem intensa secreção de proteínas, o equilíbrio é perdido. Como resultado do desbalanço, ocorre o acúmulo de proteínas mal dobradas na organela, condição responsável por gerar o chamado estresse no RE. Com o objetivo de restabelecer o equilíbrio no RE, as células eucarióticas desenvolveram uma via de sinalização citoprotetora conhecida como via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR) (Gardner *et al.*, 2013; Wan e Jiang, 2016).

A ativação da via UPR se caracteriza por promover a superexpressão de chaperonas moleculares residentes no RE, assim como componentes da via ERAD. Além disso, esse acúmulo de proteínas é capaz de estimular uma regulação traducional com o intuito de prevenir a tradução de novos RNA mensageiros (mRNA) e, conseqüentemente, diminuir a síntese proteica. Dessa forma, a restauração do equilíbrio pode ser dividida em três esforços: (1) aumentar a capacidade de dobramento de proteínas pelo RE; (2) acelerar a degradação de proteínas mal dobradas; e (3) aliviar a carga de proteínas direcionadas para o RE (Gardner *et al.*, 2013; Wan e Jiang, 2016).

Em animais, as diversas vias de sinalização da UPR foram classificadas e agrupadas em três segmentos principais. Um dos segmentos tem seu início através da *ER-membrane-associated activating transcription factor 6* (ATF6) que, em condições normais, reside na membrana do RE; entretanto, sob condições de estresse, é capaz de se realocar no complexo de Golgi. Uma vez no complexo de Golgi, ATF6 sofre proteólise, liberando a porção solúvel e funcional caracterizada como *basic leucine zipper* (bZIP), estrutura que possui a capacidade de se realocar para o núcleo da célula e, assim, atuar como um fator de transcrição estimulando

genes relacionados a síntese de chaperonas do RE capazes de auxiliar no correto dobramento de outras proteínas. Similar a ATF6, o segundo segmento, que tem seu início com o receptor transmembrana *inositol-requiring enzyme 1* (IRE1), também atua na regulação gênica, entretanto, através de um “*splicing*” não convencional do RNA mensageiro de *X-box binding protein 1* (XBP1). Como resultado, a célula produz mais lipídeos para o aumento do RE, assim como para os componentes da via ERAD, no intuito de acelerar a degradação de proteínas mal dobradas. Por fim, o terceiro segmento da via UPR em mamíferos envolve a enzima *protein kinase RNA-like ER kinase* (PERK). A PERK, por sua vez, possui a capacidade de fosforilar o fator de iniciação da tradução eIF2a, levando a sua inativação e, conseqüentemente, a uma rápida redução da iniciação da tradução e a repressão da síntese proteica global (Wan e Jiang, 2016).

Dos três braços citados, o segmento iniciado por PERK não foi observado em leveduras ou plantas, enquanto o segmento de IRE1 é a única via bem conservada em todos os eucariotos. Diferentemente do que se é encontrado em mamíferos, a via UPR em plantas, apresenta apenas os dois primeiros “braços” da UPR na resposta ao estresse no RE, obviamente, com seus respectivos homólogos. Esses braços podem ser, simplificadaamente, caracterizados como processos que culminam na ativação de transdutores de sinais encontrados na membrana do RE, capazes de estimular uma série de eventos celulares. Como resultado, ocorre a relocação de fatores de transcrição no núcleo celular que, por sua vez, irão estimular os genes anteriormente mencionados.

Na célula vegetal, o primeiro braço envolve os fatores de transcrição associados a membrana bZIP17 (responsivo a estresse salino) e bZIP28 (responsivo a estresses no RE). Apesar de serem ativados por estímulos diferentes, ambos foram identificados como sendo análogos de ATF6 e, dessa forma, apresentam funções e mecanismos similares à essa enzima de mamíferos. Em condições normais, BiP se encontra associado ao domínio interno, de bZIP17/28 e, assim sendo, faz com que os fatores de transcrição permaneçam ancorados ao RE. Entretanto, em situações de estresse no RE, BiP, no intuito de exercer sua função como chaperona molecular, se desprende das porções internas de bZIP17/28, permitindo que esses fatores sejam liberados do RE. Uma vez liberados, bZIP17/28 são transportados para o complexo de Golgi, onde são clivados por duas proteases: *site-1 protease* (S1P) e *site-2*

*protease* (S2P). Como consequência, a clivagem separa o domínio luminal do RE do domínio bZIP N-terminal. Separado, o domínio N-terminal adquire sua conformação ativa, permitindo que ele entre no núcleo celular e atue como um fator de transcrição (Liu e Howell, 2016; Wan e Jiang, 2016).

O segundo braço tem seu início com a participação de um receptor, também localizada na membrana do RE, que possui tanto uma função quinase, quanto uma função ribonuclease, denominada *inositol-requiring enzyme 1* (IRE1). IRE1 encontra-se na membrana do RE como um monômero inativo, entretanto, possui a capacidade de sofrer mudanças conformacionais e, assim, se dimerizar. Essa mudança conformacional é um ponto crítico para a ativação de endonucleases, uma vez que essa dimerização permite a formação do sítio ativo que irá realizar o processo de “*splicing*”. Várias hipóteses foram propostas no que se diz respeito ao desencadeamento da sinalização do mencionado braço a partir de IRE1. A hipótese que prevalece sugere que o desprendimento de BiP de IRE1 em situações de estresse, semelhante ao que ocorre com bZIP17/28, concomitante à ligação das proteínas mal dobradas, causadoras do estresse no RE, diretamente no receptor IRE1, são os fatores necessários para que as mudanças conformacionais ocorram (Howell, 2013; Wan e Jiang, 2016; Kim *et al.*, 2018).

Em *Arabidopsis*, foram identificados dois homólogos para IRE1 de mamíferos. No caso da planta *Arabidopsis*, um dos mRNAs alvos de IRE1 é do fator de transcrição bZIP60 (Wakasa *et al.*, 2012), homólogo ao XBP1 de mamíferos e ao HAC1 de leveduras. A região no mRNA de bZIP60 que é reconhecida pelo sítio ativo de IRE1 apresenta duas estruturas em forma de “*loop*”, sendo que cada “*loop*” apresenta três regiões específicas com bases conservadas, dessa forma, exemplificando a especificidade da interação. Este processamento é capaz de retirar um segmento de 23pb do mRNA responsável pela tradução da porção transmembrana da proteína. O mRNA processado, além de não se apresentar ancorado à membrana do RE, apresenta região sinal para localização nuclear, onde ele será realocado. Uma vez no núcleo, bZIP60 heterodimeriza com bZIP17/28 e, desse modo, regulam positivamente genes envolvidos na resposta a estresse (Howell, 2013; Wan e Jiang, 2016; Kim *et al.*, 2018).

Além do controle transcricional executado pelos seus braços, a UPR possui a capacidade de estimular chaperonas moleculares residentes do RE, como: *binding*

*protein* (BiP), *calnexin*, *calreticulin*, *shepherd* e *ERdj* (KIM *et al.*, 2018). Essas chaperonas possuem a função de auxiliar polipeptídios nascentes a adquirirem conformações adequadas e, dessa forma, auxiliam na formação de proteínas funcionais. Entre essas chaperonas, destaca-se a proteína BiP. Estudos demonstraram que a proteína BiP possui múltiplas funções, entre elas: participa do enovelamento e maturação de proteínas que serão secretadas, auxilia no encaminhamento de proteínas mal dobradas para o processo de degradação, assim como regula a própria via UPR (Carvalho *et al.*, 2014).

Sob condições de estresse severas e prolongadas, a via UPR por si só pode não ser capaz de restaurar o funcionamento do retículo e o crescimento celular, desta forma, ativa o processo de morte celular (Ruberti e Brandizzi, 2014). Tem sido demonstrado que o estresse prolongado no RE desencadeia tanto vias de sinalização de morte celular programada (PCD—*programmed cell death*) específicas do RE quanto vias de PCD compartilhadas, ou seja, provocadas juntamente com outros estímulos de morte (Reis *et al.*, 2016).

### **2.3 Vias de morte celular mediada por NRP/DCD**

Específica de plantas, e conhecida como via de morte celular mediada por proteínas NRPs, foi descrita em soja sendo uma via de sinalização de PCD que integra sinais de estresse no RE e osmótico e tem sido caracterizada como uma relevante resposta adaptativa de plantas a estresses e a eventos de desenvolvimento, como senescência natural de folhas (Irsigler *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2008; Reis e Fontes., 2012; Pimenta *et al.*, 2015). Apesar de, inicialmente, ter sido retratada em soja, essa via integrativa de morte celular apresenta evidências de ser conservada em outras espécies de plantas (Silva *et al.*, 2015; Reis *et al.*, 2016).

A via tem seu início pela indução do fator de transcrição GmERD15. Esse se liga ao promotor dos genes NRP/DCD, os quais apresentam um domínio rico em asparagina e um domínio de desenvolvimento e morte celular específico de plantas (DCD – *development and cell death domain*) (Alves *et al.*, 2011). As proteínas NRP/DCD são diferencialmente reguladas por condições de estresse e eventos de desenvolvimento em células vegetais. Apesar da função molecular não ser totalmente clara, sabe-se que as proteínas NRPs integram uma via de morte celular responsiva a estresse osmótico e estresse no retículo endoplasmático. Por sua vez, essas

proteínas levam à ativação do promotor de genes GmNAC081 e GmNAC030, induzindo à expressão destes (Mendes *et al.*, 2013; Reis *et al.*, 2012). Atuando em conjunto, os fatores de transcrição GmNAC081 e GmNAC030 são capazes de estimular a morte celular por colapso do vacúolo através da expressão da enzima de processamento vacuolar (VPE), que apresenta atividade caspase-1 e, dessa forma, atua como a executora do processo de PCD desta via (Mendes *et al.*, 2013; Hatsugai *et al.*, 2015).

Foi observado que, em soja, BiPD atua modulando o nível de expressão e a atividade de genes relacionados com a via, como GmNRP-A, GmNRP-B, GmNAC81 e VPE. Dessa forma, BiP, além de seu papel fundamental na via UPR, também se apresenta como um modulador negativo dessa via de morte celular induzida por estresses, uma vez que a sua superexpressão atrasa a resposta de morte celular por estresse osmótico, estresse no RE e durante eventos de seca, promovendo melhor adaptação de linhagens transgênicas durante estresses. Sendo assim, BiP se caracteriza por ser uma componente chave para melhorar a tolerância de plantas aos diversos estresses (Reis *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2014; Camargos *et al.*, 2019).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, o qual se localiza no Instituto de Biotecnologia aplicada à Agropecuária – BIOAGRO na Universidade Federal de Viçosa e está associado ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) em Interações Planta-Patógeno.

#### 3.1 Material Vegetal

Foi utilizado como planta modelo para o trabalho (*wild type*) o ecotipo Columbia-0. Foi utilizado o mutante nocaute do gene *AtbZIP60* (SALK\_50203) por inserção de T-DNA obtido do ABRC (Arabidopsis Biological Research Center). SALK\_50203 será aqui designado como *bzip60*. A confirmação do mutante foi feita por PCR, utilizando-se os três primers *bZIP60LP*, *bZIP60RP* e *LBB1.3* (Tabela1), respectivamente. Plantas homozigotas para a mutação em *bZIP60*, foram utilizadas para análises posteriores.

#### 3.2 Obtenção das construções de DNA

Os genes *AtbZIP60* (AT1G42990), *AtbZIP9* (AT5G24800), *AtNRP1* (AT5G42050) e *AtNRP2* (AT3G27090) foram amplificados a partir de cDNA de *Arabidopsis* utilizando os oligonucleotídeos *bZIP60 Fwd/bZIP60 –Rv*, *bZIP9 Fwd/bZIP9 RvsNS*, *AtNRP1 Fwd/ AtNRP1 Rvs* e *AtNRP2 Fwd/ AtNRP2 Rvs*, respectivamente, adaptados ao sistema *Gateway*® *cloning technology* (Thermo Fisher Scientific) (Tabela 1).

Procederam-se a duas reações sequenciais de PCR (30 ciclos - volume final de 25µL e 50µL, respectivamente) contendo 1uL de cDNA (~200 ng), 1 µL de oligonucleotídeos fwd (10 µM), 1 µL de oligonucleotídeos rvs (10 uM), 4 uL de dNTPs (2,5 mM), 5 µL de tampão da enzima 10X, 4 µL de MgSO<sup>4</sup> (50 mM) e 0,2 µL de enzima *Platinum Taq High Fidelity polymerase* (Thermo Fisher Scientific) (2 U). As reações consistiram na amplificação da ORF utilizando oligonucleotídeos específicos na primeira etapa e inserção das regiões de recombinação sítio dirigida attB1 e attB2 na segunda etapa. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação de cada ORF encontram-se descritos na Tabela 1.

Depois de amplificados, os insertos foram purificados diretamente do gel de agarose utilizando o *kit QIAquick Gel extraction Kit* (QIAGEN) e inseridos em vetores de entrada pDONR 221® e pDONR 207® (Thermo Fisher Scientific) por meio de recombinação sítio dirigida utilizando a enzima BP Clonase (Thermo Fisher Scientific). Os produtos da reação de recombinação foram transformados em células de *E. coli* linhagem DH5α eletrocompetentes e os transformantes selecionados em meio LB-ágar suplementado com canamicina (para o vetor pDONR221) ou gentamicina (para o vetor pDONR207), nas concentrações de 100 µM e 20 µM, respectivamente. Os DNAs plasmidiais das colônias positivas foram extraídos utilizando o *kit QIAprep Spin Miniprep kit* (QIAGEN). Os clones resultantes, pUFV3154 (pDONR221-bZIP60ns), pUFV3077 (pDONR207-bZIP60ns), pUFV3112 (pDONR207-bZIP9ns), pUFV1197 (pDONR207-NRP1ns) e pUFV1198 (pDONR207-NRP2ns) (Tabela 2), foram confirmados utilizando os primers pDONR-FWD/bZIP60 -Rv, pDONR-FWD/bZIP9 RvsNS, pDONR-FWD/ AtNRP1 Rvs, pDONR-FWD/ AtNRP2 Rvs, respectivamente.

Em sequência, por meio da reação de recombinação catalisada pela enzima LR Clonase (Thermo Fisher Scientific), o inserto de bZIP9 foi transferido para os vetores de expressão em leveduras pDEST22 e pDEST32 (*Two Hybrid Yeast System* - Thermo Fisher Scientific). Os clones resultantes foram pUFV3316 (pAD-AtbZIP9), pUFV3315 (pBD-AtbZIP9), que expressam os domínios de ativação da transcrição (AD) ou o domínio de ligação (BD) ao DNA do fator GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae*. A confirmação desses clones se deu mediante a utilização dos primers pDEST22Fwd ou pDEST32Fwd e bZIP9 RvsNS. Simultaneamente, os insertos de bZIP60, bZIP9, NRP1 e NRP2 foram transferidos também para vetores de expressão em plantas pEarleyGate101, pEarleyGate103, p EarleyGate104 pSPYNEGW, pSPYCEGW. Nos clones resultantes, bZIP9-SPYNE (pUFV3318) e bZIP9-SPYCE (pUFV3317), o cDNA de bZIP9 está ligado, respectivamente, ao domínio N-terminal (NE) ou ao domínio C-terminal (CE) de YFP, sob controle do promotor 35S. Para a confirmação, foram utilizados os primers bZIP9 Fwd e SPYCE ou SPYNE-RVS. O clone bZIP9-pEarleyGate103 (pUFV3314), que contém o a região codificante de bZIP9 fusionada a GFP na porção carboxi-terminal, o clone bZIP60- pEarleyGate101 (pUFV3121), que contém a região codificante de bZIP60 com YFP fusionado no seu carboxi-terminal, assim como os clones bZIP9-pEarleyGate104 (pUFV3321), NRP1-pEarleyGate104 (pUFV3321) e NRP2-pEarleyGate104 (pUFV3322), que contém as

região codificantes de bZIP9, NRP1 e NRP2 fusionados a YFP na porção amino-terminal (todos os cinco sob o controle do promotor 35S), foram confirmados utilizando o primer MC36-FWD e seus respectivos primers reverse. Todos clones gerados encontram-se descritos na Tabela 2.

Para obter a forma “*spliced*” do bZIP60 (bZIP60t), pDONR207 contendo a sequência de bZIP60 foi utilizado para amplificar o DNA utilizando os primers Bzip60Trun FW/ Bzip60Trun RVS (ambos apresentam fosfato na região 5’). Para essa amplificação foi utilizada a enzima Q5® *High-Fidelity DNA Polymerase* (New England BioLabs-NEB). O vetor amplificado com a ausência da região transmembrana do bZIP60 foi purificado diretamente do gel de agarose utilizando o *kit QIAquick Gel extraction Kit* (QIAGEN) e, depois, usado na reação de ligase (Promega). A reação de ligase foi utilizada para transformar *E. coli* DH5α, para gerar pDONR207-bZIP60t e enviados para sequenciamento automatizado de Sanger para a confirmação da identidade do clone. Esse vetor de entrada foi utilizado para transferir, por reação de LR clonase, para os vetores de destino pDEST22, pDEST32, pEarleyGate103, pSPYNEGW e pSPYCEGW. A confirmação dos clones pDEST22-bZIP60t (pUFV3081), pDEST32-bZIP60t (pUFV3080), pEarleyGate103-bZIP60t (pUFV3313), pSPYNEGW-bZIP60t (pUFV3320) e pSPYCEGW-bZIP60t (pUFV3319) se deu através de PCR com a utilização dos primers do respectivo vetor (mencionados anteriormente) com o bZIP60 Fwd ou bZIP60 –Rv. Todos clones gerados encontram-se descritos na Tabela 2.

### **3.3 Ensaio de interação proteína-proteína pelo sistema de duplo-híbrido de leveduras**

Para testar a interação entre bZIP60 e bZIP9, leveduras AH109 foram co-transformadas com as construções pUFV3081 (bZIP60t – domínio AD de Gal4) e pUFV3315 (bZIP9 – domínio BD de Gal4), assim como com as construções pUFV3316 (bZIP9 – domínio AD de Gal4) e pUFV3080 (bZIP60t – domínio BD de Gal4) (Tabela 2).

O procedimento de transformação foi realizado da seguinte maneira: A levedura *S. cerevisiae* estirpe AH109 (MATa, Trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATAHIS3MEL1GAL2UAS-GALTATA::MELUAS MEL1TATA-lacZ) foi transformada com as construções mencionadas acima, juntamente com 2 µg

de DNA carreador de esperma de salmão (ssDNA) utilizando-se o método PEG-acetato de lítio. Os transformantes positivos foram selecionados em meio sólido SD deficiente em leucina e triptofano (SD/-leu/-trp/), já que os vetores possuem marcas auxotróficas para esses aminoácidos. As colônias positivas foram crescidas por 16 horas em meio líquido SD/-leu/-trp/ até atingirem a densidade ótica (D.O.) superior a 1,0 e a cultura foi diluída em meio SD/-leu/-trp/ até D.O. igual a 1,0, 0,1 e 0,01. Todas as diluições foram plaqueadas pelo método de gotas em meio seletivo com deficiência em leucina, triptofano e histidina, e suplementado com concentrações variando de 0 - 100 mM de 3-aminotriazol. As placas foram incubadas por três dias a 28°C.

### **3.4 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101**

Aproximadamente 50 ng de DNA plasmídial e 50 µL de células competentes foram eletroporadas a 2500 V durante 4 a 5 milissegundos. Em seguida, 800 µL de meio LB foi adicionado e prosseguiu-se à incubação durante 2 horas a 28°C. Após o período de incubação, as células recuperadas foram centrifugadas durante 3 min. a 4000xg e concentradas para 100 µL. A solução foi plaqueada em meio LB sólido contendo 40 mg/L de gentamicina e 100 mg/L de espectinomicina ou canamicina, dependendo da resistência característica do vetor. As placas foram incubadas durante dois dias ininterruptos a 28°C e as colônias positivas foram diagnosticadas no final dessa etapa, por meio de PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos para os genes de interesse. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídeo 0,1 µg/mL.

### **3.5 Transformação de *Arabidopsis* e seleção de transformantes independentes**

As construções obtidas, contendo os genes expressos nos vetores pEarleyGate101 e pEarleyGate103 foram utilizadas na transformação de *Arabidopsis* via metodologia de mergulho floral (Fontes *et al.*, 2004) mediado por *A. tumefaciens* para obtenção de linhagens superexpressando bZIP60 e bZIP9.

*A. tumefaciens*, estirpe GV3101 contendo as construções supracitadas foram inoculadas, separadamente, em meio LB seletivo (40 mg/L de gentamicina e 100 mg/L de espectinomicina ou canamicina) por 24 h a 28 °C. Em seguida, 1 mL do inóculo foi reinoculado em 200 mL de LB seletivo, que foi incubado 24 h a 28 °C. Após o período de incubação, as células foram sedimentadas por centrifugação, ressuspendidas em

250 mL de sacarose 5% (p/v), contendo Silwett L-77 3% (p/v) e usadas para transformar *Arabidopsis* pelo método de mergulho floral (Fontes *et al.*, 2004). As plantas recém-transformadas foram mantidas em casa-de-vegetação para a obtenção de sementes. Essas sementes transgênicas foram esterilizadas utilizando tampão de esterilização (1ml de água sanitária, 4 ml de etanol absoluto e 3 ml de água) por 15 min, seguido de três lavagens com etanol absoluto e plaqueadas em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) meia força, contendo canamicina 100 mg/L ou 100 mg/L de espectinomicina para a seleção dos transformantes independentes.

As placas contendo as sementes foram incubadas por 3 dias a 4 °C antes de serem transferidas para uma incubadora a 22 °C e fotoperíodo de 12 h, para o crescimento das plantas. Após um mês de germinação, os transformantes independentes foram transplantados para vasos e mantidos em casa de vegetação na temperatura de 22°C para a obtenção de sementes da geração F2 (T1).

### **3.6 Ensaio de Complementação de Fluorescência Bimolecular (BiFC)**

A interação das proteínas de interesse foi mediada por *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101, transformada segundo descrito no item 3.3, em folhas de *N. benthamiana* por agroinoculação. Culturas carreando as construções bZIP60-SPYCEGW, bZIP60-SPYNEGW, bZIP9-SPYCEGW e bZIP9-SPYNEGW foram crescidas em meio LB, contendo os antibióticos adequados, à 28°C por 16 horas. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 2500 x g por 5 minutos e lavadas duas vezes com tampão de infiltração (MgCl<sub>2</sub> 10mM, MES 10mM, pH 5,6 e acetoceringona 100uM). Cada solução de infiltração foi preparada contendo a concentração ideal (O.D.600nm = 0,3) dos transformantes de interesse juntamente com células capazes de promover a expressão de um supressor viral do silenciamento pós-transcricional (HCPro - *helper-component proteinase*). Utilizando seringas estéreis sem agulha, folhas jovens (4 a 5 semanas) de *N. benthamiana* foram infiltradas, por meio de uma leve pressão através dos estômatos da epiderme inferior. A interação proteica foi verificada por microscopia de varredura a laser confocal (LSM 510 META invertido – ZEISS), três dias após a agroinoculação. As imagens foram processadas com auxílio do software “LSM Image Browser 4” (ZEISS). A excitação do GFP foi a 488 nm e a emissão foi detectada usando um filtro de 500-530 nm. As seguintes construções foram analisadas:

1. bZIP60-SPYCE + pSPYNE
2. bZIP60-SPYNE + pSPYCE
3. bZIP9-SPYCE + pSPYNE
4. bZIP9-SPYNE + pSPYCE
5. bZIP60-SPYCE + bZIP9-SPYNE
6. bZIP9-SPYCE + bZIP60-SPYNE
7. bZIP9-SPYCE + bZIP9-SPYNE

Fragmentos das folhas foram infiltrados com tunicamicina 10 µg/mL duas horas antes da análise em microscopia confocal.

### **3.7 Ensaio de tolerância à seca**

O ensaio de tolerância à seca foi realizado com linhagens superexpressando bZIP60 e bZIP9, *bzip60* superexpressando bZIP60, *bzip60* e Col-0, de 3 semanas após a germinação. Após a germinação em placas de meio MS, as plantas de 14 dias de idade foram transplantadas para potes, previamente pesados com um solo misto e bem irrigado. Os potes foram distribuídos aleatoriamente nas bandejas, e as bandejas rotacionadas frequentemente durante o estresse. Após 15 dias de adaptação, as plantas foram cultivadas em estufa (22 °C, 10 h de luz / 14 h de ciclo escuro) por 15 dias, com irrigação suspensa. Após o estresse, foi adicionada a mesma quantidade de água em todas as bandejas. Após 2 dias foi analisada a taxa de sobrevivência.

### **3.8 Estresse em plântulas de Arabidopsis**

Para os ensaios de indução de estresse osmótico e no retículo endoplasmático, inicialmente plântulas de Arabidopsis foram germinadas em meio MS (½ força) (MURASHIGE e SKOOG, 1962). Transcorridos 15 dias, essas foram transferidas para placas de 12 poços contendo meio MS (½ força) líquido, e deixadas aclimatando por 24 h. Os tratamentos foram iniciados pela substituição do meio por uma solução de polietilenoglicol 10% (p/v) (PEG: MW 8000 e MW 3350) em meio MS (½ força) líquido, para indução de estresse osmótico, e pela adição de uma solução de Tunicamicina (TUN) 5 µg/mL em meio MS (½ força) líquido. Para cada tratamento foram utilizadas 4 repetições, sendo cada uma composta por 5 plântulas. Para os controles (tempo de

0 h), utilizou-se apenas meio MS (½ força) líquido acrescido de DMSO (para o tratamento com tunicamicina) ou meio MS (½ força) líquido puro (para o tratamento com PEG).

Os tempos de tratamento foram de 0 h e 8 h para tunicamicina e de 0 h, 8 h, 16h e 24h para PEG. Após os tempos de tratamento as plântulas foram retiradas da solução, o excesso de meio foi removido com papel e elas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Todo o material biológico foi armazenado a -80 °C após o ensaio.

Indução de morte celular por tunicamicina também foi feita por infiltração em folhas 5 semanas após a germinação, conforme descrito por Cai *et al.* (2007). Tunicamicina a 15 µg/mL (ou DMSO) foi infiltrada com uma seringa em folhas de plantas de *Arabidopsis* de cinco semanas.

### **3.9 Isolamento e transfecção de Protoplastos de *Arabidopsis***

Protoplastos de plantas *nrp1* (SALK\_041306), *nrp2* (CS449852) e Col-0 foram isolados de acordo com Yoo, Cho e Sheen, 2007. Protoplastos de Col-0 foram transfectados com os clones pUFV3321 (NRP1-pEarleyGate104) e pUFV3322 (NRP2-pEarleyGate104), seguindo a metodologia da referência mencionada.

### **3.10 Extração de RNA e síntese de cDNA**

O RNA total foi extraído de plântulas de *Arabidopsis* utilizando o reagente Trizol® (Life Technologies), segundo recomendações do fabricante. Para a eliminação de DNA, o RNA total foi tratado com 2U de DNase livre de RNase (Life Technologies). O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific) na razão 260 nm/280 nm e examinado por eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,5% (p/v), corado com brometo de etídio 0,1 µg/mL. O cDNA foi sintetizado utilizando 4 µg de RNA total, oligo-dT (18) a 5 µM, dNTP 0,5 mM e 1U da enzima Transcriptase Reversa M-MLV (Thermo Fisher Scientific), segundo as recomendações do fabricante.

### 3.11 Ensaios de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Todos os procedimentos de PCR em tempo real, incluindo testes de eficiência, validações, e experimentos, foram conduzidos de acordo com as recomendações contidas nos manuais fornecidos pela empresa ThermoFisher. As reações foram conduzidas no equipamento ABI7500 Real Time PCR Systems (ThermoFisher), utilizando *SYBR® Green PCR Master Mix* (Life Technologies).

As reações de amplificação foram realizadas utilizando-se 20 ng de cDNA, primers a 0,6µM e o protocolo descrito a seguir: 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos a 94°C por 15 s e 60°C por 1 min, seguido da etapa de dissociação. A expressão de genes foi avaliada utilizando o método comparativo de Ct:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e  $2^{-\Delta Ct}$ .

Para experimentos com cDNA de *Arabidopsis* foi utilizado o gene da actina como controle endógeno para a normalização dos dados, enquanto os genes CNX (calnexina) e RAB18 foram utilizados como marcadores de estresse no RE e de estresse osmótico respectivamente (REIS *et al.*, 2016). A sequência de todos os oligonucleotídeos utilizados para as reações de qRT-PCR encontram-se descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos utilizados para clonagens, diagnósticos e qPCR

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Gene/sequência em que se anela
<b>bZIP60LP</b> <b>bZIP60RP</b> <b>LBB1.3</b>	GGAAGAAAAGTCCTCTCGGAG CACAGCATCATCGTCTCCTTC GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	Confirmação de knockout
<b>bZIP60 Fwd</b> <b>bZIP60 -Rv</b>	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGCGGAGGAATTTG AGAAAGCTGGGTCCGCCGCAAGGGTTAAGATTT	AtbZIP60
<b>bZIP9 Fwd</b> <b>bZIP9 RvsNS</b>	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGATAATCACACAGCTAAAG AGAAAGCTGGGTCTGGCCAGATGTCTGAGACGC	AtbZIP9
<b>AtNRP1 Fwd</b> <b>AtNRP1 Rvs</b>	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGAGTATAATAAC AGAAAGCTGGGTCTTTCAAGGGTTTTGGTCAGC	AtNRP1
<b>AtNRP2 Fwd</b> <b>AtNRP2 Rvs</b>	AAAAAGCAGGCTTCACAAGCTTCTGGCAATTA AGAAAGCTGGGTCTTCCAATATATGTTAACTATTGG	AtNRP2
<b>Bzip60Trun FW</b> <b>Bzip60Trun RVS</b>	CTGTTGGGTTCCCTGCTTTG AGACTCCTGCTTCGACATCAT	Clonagem do bZIP60t
<b>bZIP60us_FWD</b> <b>bZIP60u_REV</b> <b>BZIP60S_REV</b>	GGAGACGATGATGCTGTGGCT CAGGGATTCCAACAAGAGCACAG CAGGGAACCCAACAGCAGACT	Região de "splicing" do bZIP60
<b>AttB1_2942</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	Sequência sítio gateway AttB1
<b>AttB1_2943</b>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	Sequência sítio gateway AttB2
<b>3397 (Fwd)</b> <b>3398 (Rvs)</b>	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATC TGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	pDONR221/207
<b>MC36 (Fwd)</b>	TCCTTCGCAAGACCCTTCCTC	Promotor 35S
<b>DEST32-Fwd</b>	AACCGAAGTGCGCCAAGTGTCTG	Vetor pDEST32
<b>DEST22-Fwd</b>	TATAACGCGTTTGGGAATCACT	Vetor pDEST22
<b>DEST22-Rvs</b>	AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC	Vetores pDEST32 / pDEST22
<b>qRTACTINA Fwd</b> <b>qRTACTINA Rvs</b>	ATGTCGTGAGCCATCCTGTC ACACCGGATTCGTGCGGCAT	Actina 3
<b>qRT-CN1 Fwd</b> <b>qRT-CN1 Rvs</b>	ATGAGACAACGGCAACTATTTTCC CCATAATCCTCATGTCCTTCACT	Calnexina 1
<b>qRT-RAB18 Fwd</b> <b>qRT-RAB18 Rvs</b>	CGATCCAGCAGCAGTATGAC TTCGAAGCTTAACGGCCACC	RAB18

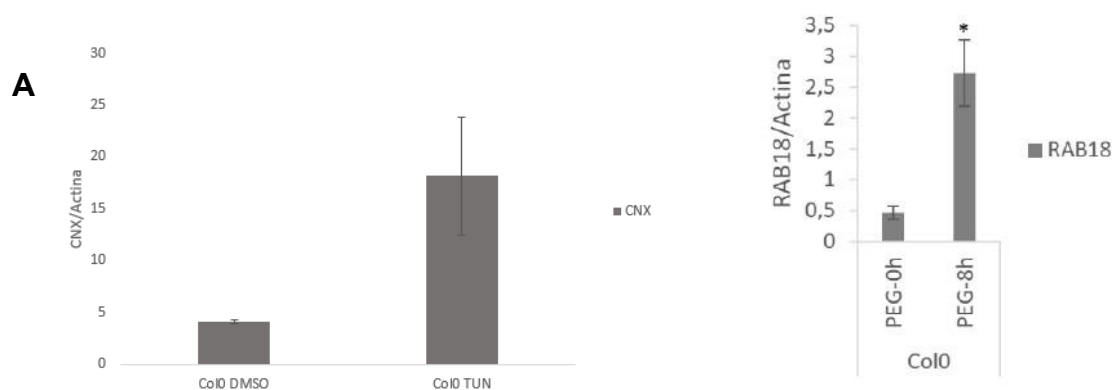
**Tabela 2.** Listagem de clones em *Escherichia coli* utilizados no desenvolvimento do trabalho

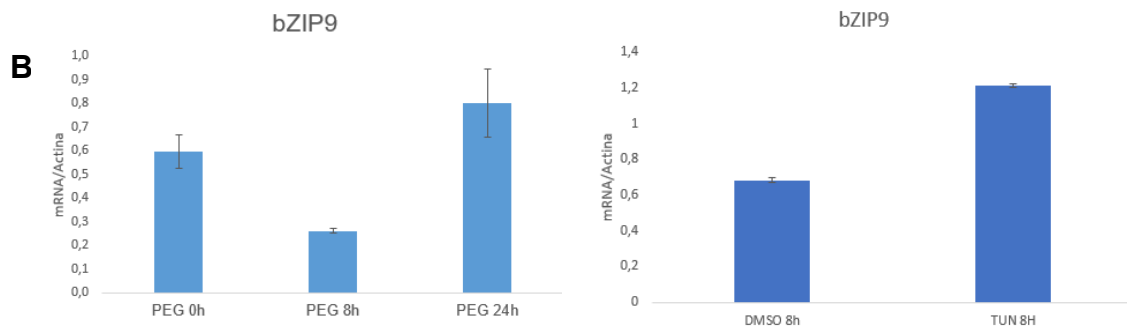
Identificação do clone	Descrição	Vetor
pUFV3077	pDONR207NS-AtbZIP60	pDONR207
pUFV3154	pDONR221NS-AtbZIP60	pDONR221
pUFV3112	pDONR207NS-AtbZIP9	pDONR207
pUFV1197	pDONR207NS-AtNRP1	pDONR207
pUFV1198	pDONR207NS-AtNRP2	pDONR207
pUFV3079	pDONR207NS-AtbZIP60t	pDONR207
pUFV3316	pAD-AtbZIP9	pDest22
pUFV3315	pBD-AtbZIP9	pDest32
pUFV3080	pAD-AtbZIP60t	pDest22
pUFV3081	pBD-AtbZIP60t	pDest32
pUFV3121	35S::AtbZIP60-YFP	pEarleyGate101
pUFV3314	35S::AtbZIP9-GFP	pEarleyGate103
pUFV3313	35S::AtbZIP60t-GFP	pEarleyGate103
pUFV3323	35S::AtbZIP9-YFP	pEarleyGate104
pUFV3321	35S::AtNRP1-YFP	pEarleyGate104
pUFV3322	35S::AtNRP2-YFP	pEarleyGate104
pUFV3317	bZIP9 <sup>79-828</sup> -cYFP	pSPYCE
pUFV3318	bZIP9 <sup>79-828</sup> -nYFP	pSPYNE
pUFV3319	bZIP60t <sup>79-828</sup> -cYFP	pSPYCE
pUFV3320	bZIP60t <sup>79-828</sup> -nYFP	pSPYNE

## 4. RESULTADOS

*bZIP9* é induzido por estresse osmótico e estresse no retículo endoplasmático (RE).

A via de tolerância à seca mediada pelo chaperona molecular BiP ainda não foi completamente caracterizada. BiP atua modulando o processo de morte celular mediado por proteínas NRP/DCD. O transcriptoma de plantas de soja superexpressando BiP (Carvalho *et al.*, 2014) evidenciou um aumento na expressão de um fator de transcrição da família bZIP, bZIP61 o qual apresenta homologia (48.48%) com o fator bZIP9 de Arabidopsis. O fator de transcrição AtbZIP9 pertence ao grupo C da família bZIP em Arabidopsis, a qual está associada a resposta a deficiência por nutrientes, além disso, *AtbZIP9* está envolvido em processos de resposta a estresse salino (Ortiz-Espín *et al.*, 2017). Uma vez que o homólogo de *bZIP9* em soja (*bZIP61*) apresenta a expressão aumentada em plantas superexpressando BiP e este gene modula vias de estresse osmótico e do RE, foi avaliado se *bZIP9* é induzido por estas condições. Assim, plântulas de Arabidopsis (Col-0) foram submetidas a tratamento com indutores de estresse osmótico (PEG 10%) por 8 e 24h e do RE (TUN 5µg/mL) por 8h. A efetividade dos tratamentos foi monitorada através da expressão do gene marcador de estresse no retículo endoplasmático *CNX* e do gene marcador de estresse osmótico *RAB18* após 8h de tratamento (Figura 3A). Em condição de estresse osmótico, *bZIP9* se mostrou reprimido no tempo inicial de 8h de tratamento, mas, com uma indução mais prolongada de 24h, apresentou-se induzido em relação ao controle. Já em condição de estresse do RE o gene de *bZIP9* foi induzido no tempo de 8h de tratamento (Figura 2B).





**Figura 2. Expressão de *bZIP9* em resposta a estresse osmótico e estresse no retículo endoplasmático.** RNA total foi isolado de plântulas de *Arabidopsis* de 15 dias tratadas com PEG (10% p/v) ou tunicamicina (5µg/mL) por 8 h (para PEG um tempo adicional de 24h foi usado). Meio MS ½ foi usado como controle para PEG e MS ½ acrescido de DMSO como controle para tunicamicina. O nível de transcritos dos genes selecionados, como indicado, foi quantificado por qRT-PCR. A expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta Ct}$  e o gene da Actina foi utilizado como controle endógeno. CNX e RAB18 são genes marcadores de estresse no retículo endoplasmático e estresse osmótico, respectivamente. Col-0 denota a linhagem selvagem. (A) Indução de CNX por tratamento com tunicamicina e indução de RAB18 por tratamento com PEG. (B) Expressão de *bZIP9* em plantas Col-0 em resposta aos tratamentos com PEG e tunicamicina.

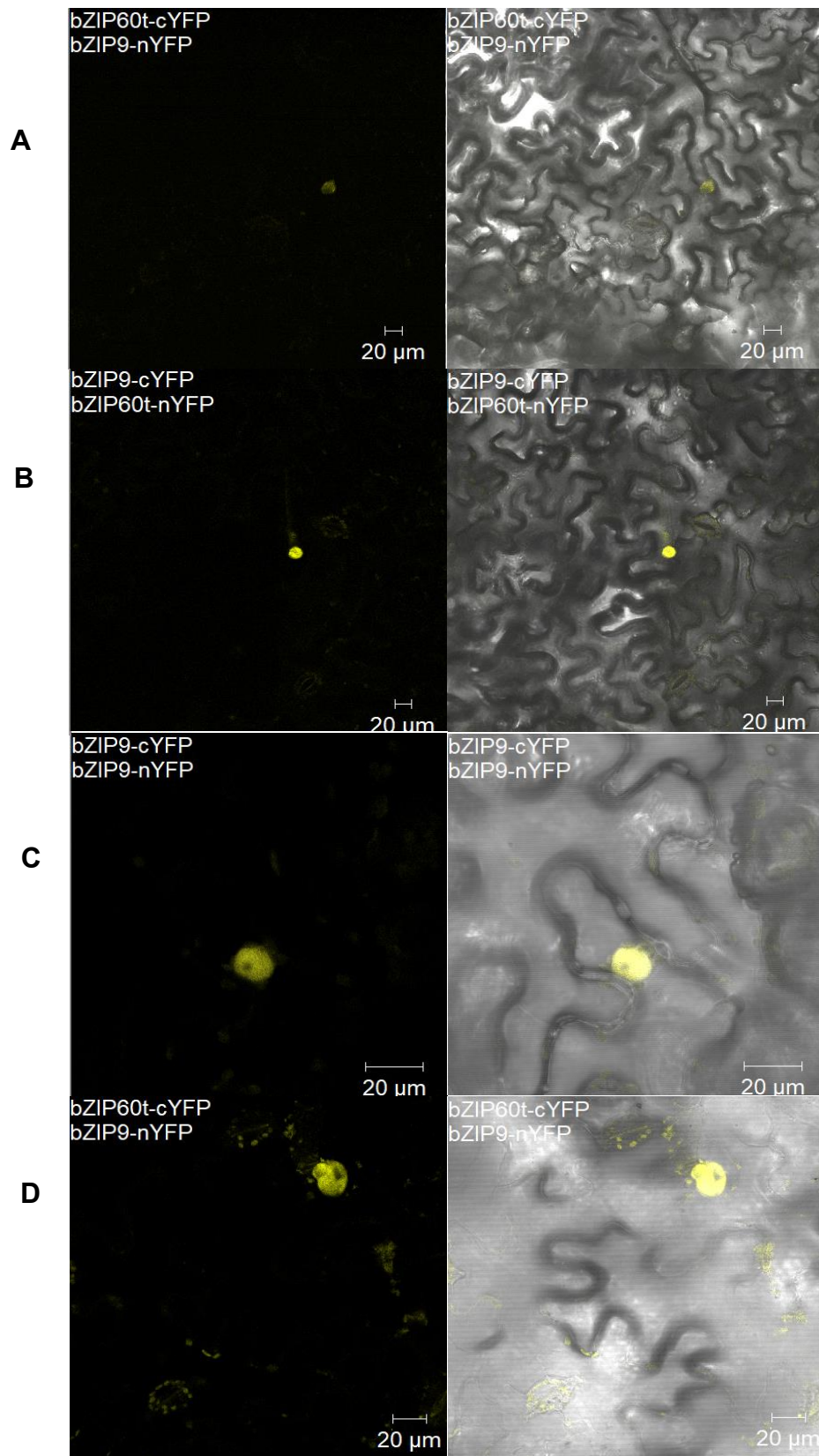
#### *Interação entre bZIP9 e bZIP60*

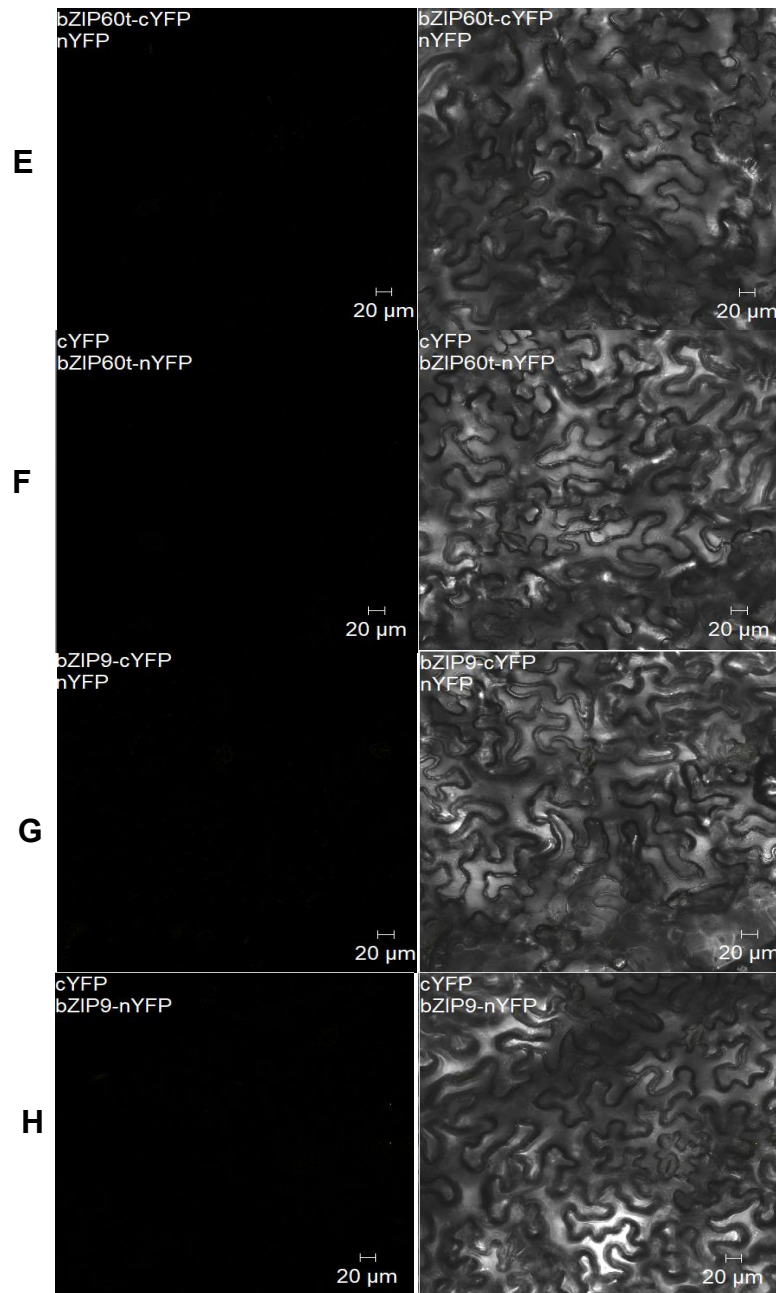
O grupo C de fatores de transcrição da família ZIP é comumente envolvido na formação de heterodímeros com genes do grupo S. Embora *bZIP60* pertença ao grupo K, avaliou-se a interação entre *bZIP9* e *bZIP60* por ambos apresentarem indução em condições de estresse osmótico (PEG) e do retículo endoplasmático (Figura 2 e S1) e por apresentarem resposta a estresse salino (Ortiz-Espín *et al.*, 2017 e Henriquez-Valencia *et al.*, 2015). Primeiramente, foi realizado um ensaio de autotransativação em levedura. Este ensaio permite a identificação da atividade de transativação em leveduras e avaliação da metodologia de duplo-híbrido para identificação de interações. Leveduras da linhagem AH109 foram cotransformadas com as construções de *bZIP9* fusionada ao domínio de ligação ao DNA de GAL4 (BD-*bZIP9*) e a construção contendo o domínio de ativação a transcrição sem fusão a nenhum gene (AD-vazio). O crescimento da levedura cotransformada foi avaliado por meio de

prototrofia à histidina em meio seletivo na ausência de leucina, histidina e triptofano. A levedura contendo as construções BD-bZIP9 e AD-vazio apresentou o crescimento em meio seletivo na ausência de leucina, histidina e triptofano, além de meio seletivo contendo o inibidor competitivo 3AT (3-aminotriazol) (Figura S2). A capacidade de autotransativação de bZIP9 impede a realização de duplo-híbrido utilizando a construção de bZIP9 fusionada ao domínio de ligação ao DNA. Neste contexto, não foi possível avaliar a possível interação entre bZIP9 e o fator bZIP60, que também apresenta capacidade de crescimento em meio seletivo na ausência de leucina, histidina e triptofano e suplementado com 3AT.

Os fatores de transcrição da família bZIP são caracterizados por terem mecanismo de atuação na forma de dímero, homodímeros ou heterodímeros. Desta forma, investigamos a capacidade do gene de bZIP9 formar homo/heterodímero e a sua possível interação com bZIP60. O ensaio de Complementação de Fluorescência Bimolecular (BiFC), além de detectar a interação *in vivo* entre proteínas candidatas, permite identificar a localização subcelular da interação. Culturas de *A. tumefaciens*, estirpe GV3101, carreando as combinações das construções foram agroinoculadas em folhas de *N. benthamiana*. Após 72 horas, fragmentos das folhas infiltradas foram analisados em microscopia confocal. Foi observado que a fluorescência emitida por YFP foi fracamente reconstituída no núcleo das células coexpressando bZIP60t-SPYCE e bZIP9-SPYNE (Figura 3A), bem como em folhas coexpressando bZIP9-SPYCE e bZIP60t-SPYNE (Figura 3B). Avaliando a construção bZIP9-SPYNE e bZIP9-SPYCE, foi possível observar que a fluorescência emitida por YFP foi fortemente reconstituída no núcleo das células, evidenciando uma possível homodimerização do FT bZIP9 (Figura 3C).

Com o intuito de avaliar a influência do estresse no retículo endoplasmático sobre a interação destas proteínas, porções das folhas previamente infiltradas com as construções desejadas foram infiltradas com tunicamicina (indutor de estresse no retículo) 10ug/mL e, após 2 horas de indução, analisadas. Diferentemente do que foi constatado sem a presença do indutor, foi observado que a fluorescência emitida por YFP foi fortemente reconstituída no núcleo das células coexpressando bZIP60t-SPYCE e bZIP9-SPYNE (Figura 3D). Nenhuma fluorescência foi detectada quando bZIP60t e bZIP9 foram coinfiltradas com o vetor complementar vazio (Figura 3 E, F, G, H).



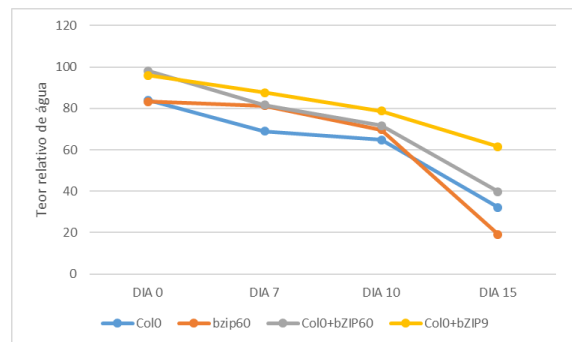
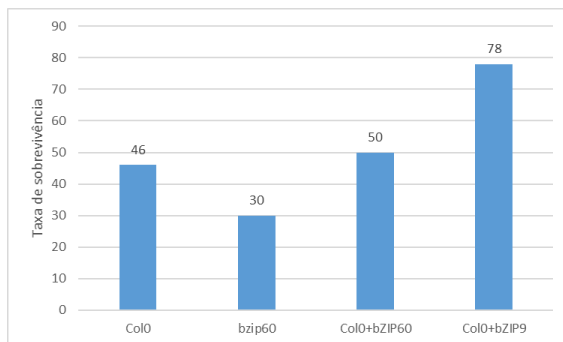
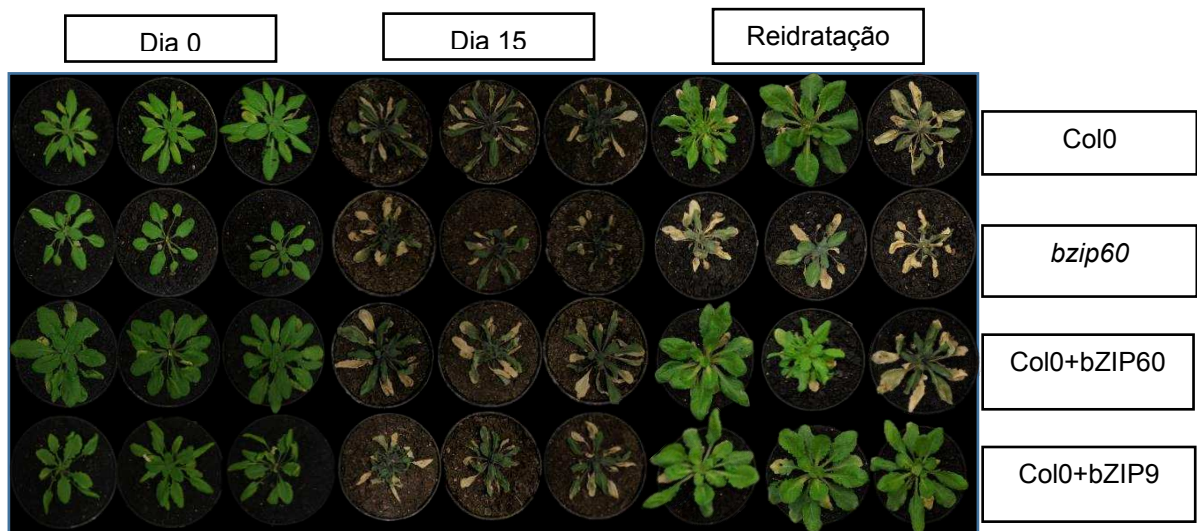


**Figura 3. Ensaio de Complementação de Fluorescência Bimolecular (BiFC).** Fragmentos não fluorescentes da proteína amarela fluorescente (YFP), NE e CE, foram fusionados a bZIP60 e bZIP9. Diferentes combinações das construções, conforme indicado, foram agroinfiltradas em folhas de *N. benthamiana* e analisadas por microscopia confocal, 72 h após agroinfiltração.

### *Superexpressão de bZIP9 e bZIP60 promove tolerância a seca em Arabidopsis*

Homólogos de bZIP60 de *Arabidopsis* já foram mostrados sendo capazes de aumentar a tolerância à seca em outros organismos (Wang *et al.*, 2017; Tang e Page., 2013), no entanto, o mecanismo para esta tolerância ainda não está elucidado. Para comprovar o papel de bZIP60 na tolerância à seca e avaliar o envolvimento de bZIP9 em mecanismo de tolerância à seca, foi conduzido um ensaio de déficit hídrico em plantas de *Arabidopsis*. O experimento de déficit hídrico foi realizado utilizando as plantas *wild-type* (Col-0), *bzip60*, superexpressando bZIP60 e superexpressando bZIP9. Plantas de mesma idade (15 dias) foram transplantadas individualmente para potes com mesma quantidade de substrato. Foi colocada a mesma quantidade de água induzindo a homogeneidade para o início do experimento. Neste ponto, a irrigação foi interrompida por 15 dias. Após este período em condição de déficit hídrico as plantas foram reidratadas com a mesma quantidade de água e então, após 3 dias, foi calculada a taxa de sobrevivência (Figura 4B). O fenótipo das plantas foi observado durante o curso do estresse (figura 4A), da mesma forma que o teor relativo de água (TRA) (figura 4C).

No início do experimento todas as linhagens apresentavam o fenótipo túrgido, característico de plantas irrigadas. Ao longo do estresse, plantas *bzip60* apresentaram um fenótipo mais sensível ao déficit hídrico quando comparadas as plantas Col-0. De forma oposta, plantas superexpressando bZIP60 e bZIP9 apresentaram um fenótipo mais resistente ao déficit hídrico quando comparadas às plantas Col-0. Esse padrão pôde ser observado pelos valores de TRA ao longo das semanas. Após a reidratação, a proporção de plantas que retornaram ao fenótipo túrgido (sobreviveram ao estresse) variou de acordo com o genótipo: 78% das plantas superexpressando bZIP9, 50% das plantas superexpressando bZIP60, 46% das plantas Col-0 e apenas 30% das plantas *bzip60*.



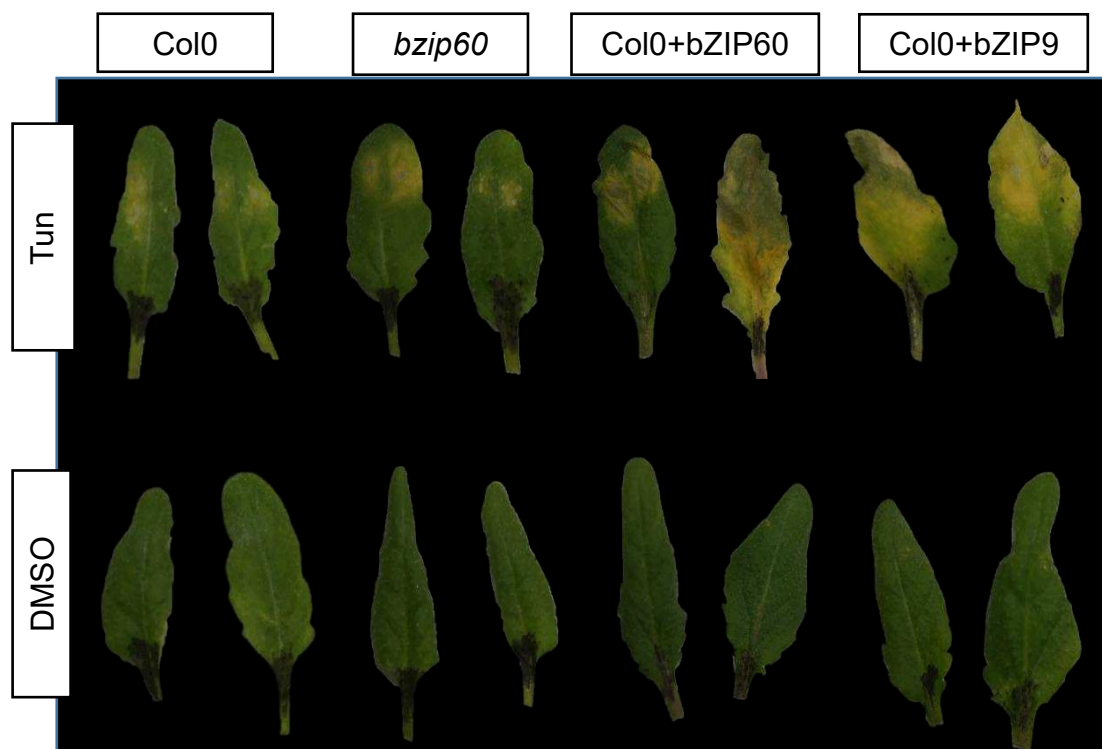
**Figura 4. Ensaio de tolerância à seca.** (A) Linhagens *bzip60*, superexpressando bZIP60, superexpressando bZIP9 e Col-0 foram expostas a déficit hídrico por 15 dias. Após o período de estresse, as plantas foram reidratadas e avaliadas depois de 2 dias. (B) Taxa de sobrevivência das plantas após a reidratação. (C) Teor relativo de água durante o período de 15 dias de estresse. O experimento foi conduzido duas vezes.

#### *Indução de morte celular por tunicamicina*

Como bZIP9 e bZIP60 apresentam indução por condições de estresse no RE por meio de tunicamicina, decidimos avaliar o efeito do estresse prolongado desencadeando morte celular em plantas de *Arabidopsis*. As linhagens superexpressando bZIP9 (bZIP9ox) e bZIP60 (bZIP60ox) e nocaute de bZIP60 (*bzip60*) foram utilizadas para o experimento de infiltração de tunicamicina. Após 4

dias da infiltração foi observado o fenótipo das folhas. Como controle foi infiltrado DMSO (figura 5).

Foi possível observar que o fenótipo de clorose foi acelerado em plantas superexpressando bZIP9 e bZIP60 quando comparadas a Col-0. Plantas nocaute para bZIP60 apresentaram um perfil similar a Col-0 (Figura 5).

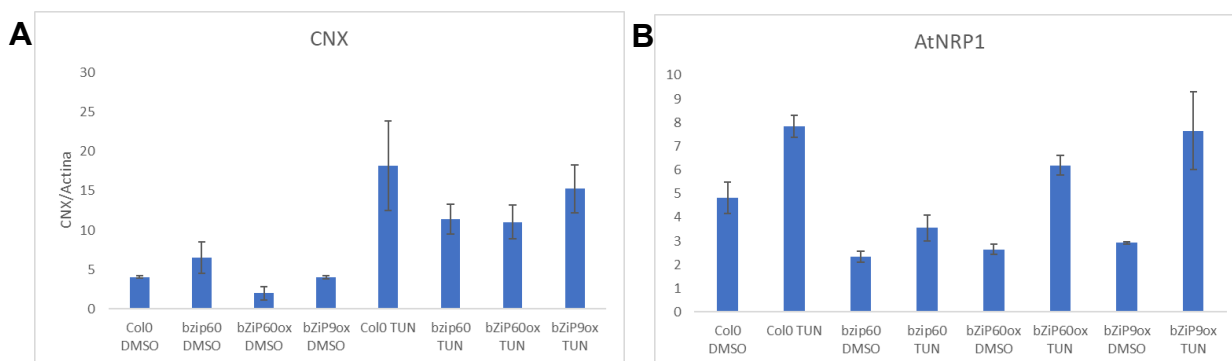


**Figura 5. Indução de morte celular por tunicamicina.** Plantas Col-0, superexpressando bZIP60, superexpressando bZIP9 e *bzip60* de 5 semanas foram infiltradas com tunicamicina (15µg/ml). Após 4 dias, foram analisados os fenótipos de morte celular. DMSO foi utilizado como controle.

#### *O papel de bZIP9 e bZIP60 na modulação dos genes NRPs*

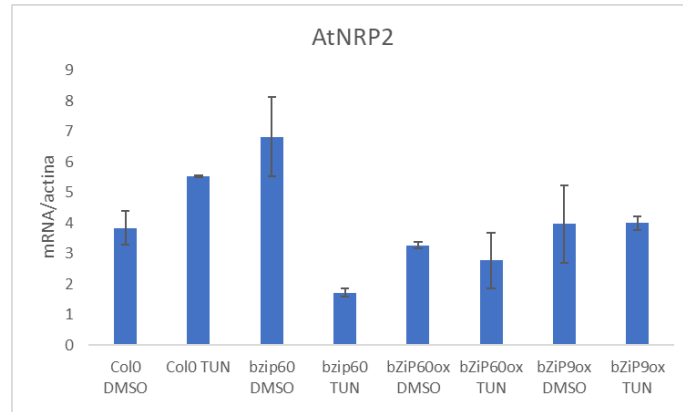
Com o objetivo de observar a participação de bZIP60 e bZIP9 na via de sinalização mediada por proteínas NRP/DCD, foram examinados os perfis de expressão de *NRP1* e *NRP2* em plantas Col-0, *bzip60*, superexpressando bZIP60 e superexpressando bZIP9, todas em condição de estresse no RE. Para isso, plântulas de *Arabidopsis* de 15 dias foram submetidas a tratamento com tunicamicina (5 µg/mL) por 8h e a expressão gênica foi verificada por qRT-PCR. A efetividade dos tratamentos

foi monitorada através da expressão do gene marcador de estresse no retículo endoplasmático *CXN* (Figura 6A). Constatou-se que, as plantas apresentando o nocaute gênico para *bZIP60*, quando comparadas com Col-0, não foram capazes de induzir *NRP1* em situação de estresse. De forma antagônica, nas plantas superexpressando *bZIP60* e superexpressando *bZIP9*, *NRP1* foi induzida pelo tratamento com tunicamicina (Figura 6B).



**Figura 6. Expressão de AtNRP1 em resposta ao estresse no retículo endoplasmático.** RNA total foi isolado de plântulas de Arabidopsis de 15 dias tratadas com tunicamicina (5µg/mL) por 8 h. Meio MS ½ acrescido de DMSO foi usado como controle para tunicamicina. O nível de transcritos dos genes selecionados, como indicado, foi quantificado por qRT-PCR (Figura S5). A expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta Ct}$  e o gene da Actina foi utilizado como controle endógeno. CNX é o gene marcador de estresse no retículo endoplasmático. Col-0 denota a linhagem selvagem, *bzip60* a linhagem *bzip60* (nocaute para o gene *bZIP60*), *bZIP60ox* a linhagem superexpressando *bZIP60* e *bZIP9ox* a linhagem superexpressando *bZIP9*. (A) Indução de CNX por tratamento com tunicamicina. (B) Expressão de NRP1 em plantas Col-0, *bzip60*, superexpressando *bZIP60* e superexpressando *bZIP9* em resposta aos tratamentos com tunicamicina.

Diferente do que foi visto anteriormente, plantas superexpressando *bZIP60* e superexpressando *bZIP9* não foram capazes de induzir a expressão de *NRP2*. Por fim, plantas *bzip60*, além de não apresentarem indução de *NRP2*, aparecem sendo capazes de reprimir o gene de *NRP2* quando comparado com Col-0 (Figura 7).

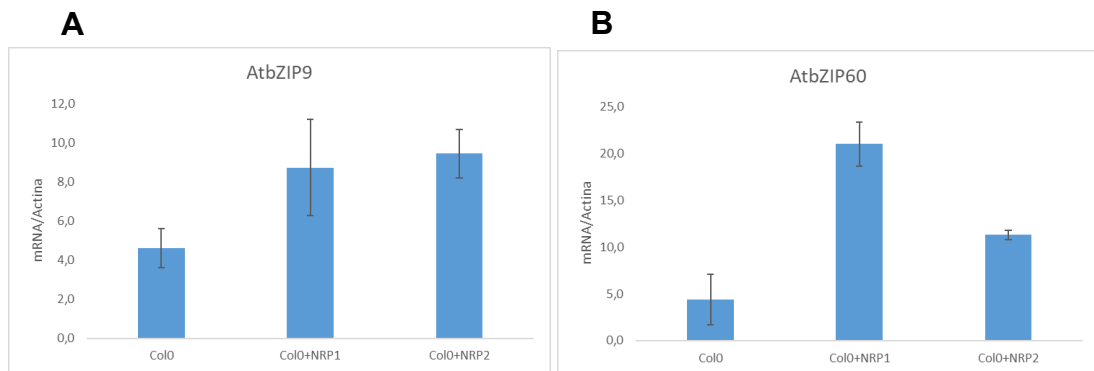


**Figura 7. Expressão de AtNRP2 em resposta ao estresse no retículo endoplasmático.** RNA total foi isolado de plântulas de Arabidopsis de 15 dias tratadas com tunicamicina (5µg/mL) por 8 h. Meio MS ½ acrescido de DMSO foi usado como controle para tunicamicina. O nível de transcritos dos genes selecionados, como indicado, foi quantificado por qRT-PCR (Figura S5). A expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta Ct}$  e o gene da Actina foi utilizado como controle endógeno. CNX é o gene marcador de estresse no retículo endoplasmático. Col-0 denota a linhagem selvagem, bzip60 a linhagem *bzip60* (nocaute para o gene bZIP60), bZIP60ox a linhagem superexpressando bZIP60 e bZIP9ox a linhagem superexpressando bZIP9. Expressão de NRP2 em plantas Col-0, *bzip60*, superexpressando bZIP60 e superexpressando bZIP9 em resposta aos tratamentos com tunicamicina.

#### *O papel dos genes NRPs na indução de bZIP9 e bZIP60*

Ainda no propósito de avaliar a interação das proteínas bZIP60 e bZIP9 com a via de morte celular programada, cDNAs produzidos a partir de RNA de protoplastos de Col-0 transfectados com *NRP1* e *NRP2* foram utilizados para as análises seguintes. Para isso, o tempo de incubação dos protoplastos transformados foi de 8 horas (Yoo, Cho e Sheen, 2007) para a análises de RNA.

Protoplastos transformados com os genes de *NRP1* e *NRP2* apresentaram a indução do gene de bZIP9 quando comparados com protoplastos transformados com o vetor vazio (Figura 8A). Por outro lado, avaliando as expressões de *bZIP60* nas mesmas condições, foi possível identificar um aumento na expressão desse gene em protoplastos superexpressando *NRP1* e *NRP2* (Figura 8B).



**Figura 8. bZIP9 e bZIP60 são induzidos por NRP1 e NRP2.** Protoplastos de Col-0 foram transfectados com 35S:YFP-NRP1 e 35S:YFP-NRP2 e, após 8 horas, tiveram seu RNA extraído e analisado o perfil de expressão de bZIP9 e bZIP60 em resposta à superexpressão de *NRP1* e *NRP2*. AtActina2 foi usado como controle endógeno. Os dados representam três repetições biológicas.

## 5. DISCUSSÃO

O papel de tolerância a seca mediado por BiP tem sido evidenciado em diferentes espécies (Alvim *et al.*, 2001; Valente *et al.*, 2009, Carvalho *et al.*, 2014; Reis *et al.*, 2016). A análise global de expressão de plantas superexpressando BiP em condições de déficit hídrico evidenciaram um retardo na expressão de genes relacionados à sinalização em resposta a hormônio, proteção à seca e associados à senescência. Além destes, genes da via de morte celular mediada por NRP/DCD e da UPR também apresentaram um atraso na expressão quando comparados com plantas controle (*wild type*) (Carvalho *et al.*, 2014). A progressão do déficit hídrico em plantas de soja evidenciou um aumento da expressão de genes da UPR, sendo estes menos expressos em plantas superexpressando BiP. Ambos os braços da UPR ativados por bZIP28 e bZIP60 são ativados com a progressão do estresse, sendo estes genes essenciais para manutenção do controle de qualidade do RE (QC-ER) e manutenção de homeostase celular. Experimentos realizados em milho (*Zea mays*) mostraram que o gene de ZmbZIP17 é capaz de modular tanto genes responsivos a UPR quanto genes responsivos a ABA (Yang *et al.*, 2013). Além disso, o transcriptoma de plantas *Boea hygrometrica* apresentou uma maior expressão de genes do QC-ER quando comparado com plantas mais sensíveis a seca (Zhu *et al.*, 2015). Tais resultados mostram a importância das vias de sinalização que respondem a alterações no RE na tolerância a condições de déficit hídrico.

### *bZIP9 é induzido por estresse osmótico e RE*

O fator de transcrição AtbZIP9 pertence ao grupo C de fatores de transcrição bZIP e foi identificado em resposta a manutenção da homeostase energética e também no envolvimento em resposta à germinação em condições de estresse salino (Dröge-Laser e Weiste, 2018; Ortiz-Espín *et al.*, 2017). Além disso, seu homólogo em soja, bZIP61, mostrou-se induzido em plantas superexpressando BiP em condições normais (Carvalho *et al.*, 2014). bZIP60 já tem o seu papel bem caracterizado em resposta ao estresse no RE, mas seu papel na resposta a condições de seca e ao estresse osmótico ainda não é completamente entendido. Neste contexto, avaliamos o papel destes fatores de transcrição nas respostas associadas a estresse do RE, osmótico e déficit hídrico. Embora não tenha sido relacionado com a via de morte

celular mediada por proteínas NRP/DCD, bZIP9 apresentou um aumento da expressão em condições de estresse no RE (TUN) e osmótico (PEG) (Figura 2B), no entanto, não foi avaliada a indução deste gene em condições dos estresses combinados. Os genes primeiramente caracterizados na via mediada por NRP/DCD apresentam uma indução sinérgica quando submetidos a ambos os estresses (Costa *et al.*, 2008; Faria *et al.*, 2011). bZIP60 também foi induzido em ambas as condições como previamente evidenciado (Howell., 2017; Ruberti *et al.*, 2018; Parra-Rojas *et al.*, 2015) (Figura S1). Nas condições avaliadas, somente o tratamento com tunicamicina proporcionou o processamento deste fator de transcrição. No tratamento com PEG o gene apresentou um aumento de expressão, entretanto, sua forma processada não foi identificada (Figura S6). Este fato evidencia que o papel na resposta ao estresse osmótico pode estar relacionado ao papel de bZIP60 associado à membrana do RE e não atuando como fator de transcrição.

#### *bZIP9 forma homodímero e interage com bZIP60*

A família bZIP de fatores de transcrição é caracterizada por apresentar um domínio de ligação ao DNA e um domínio zíper de leucina que permite a dimerização em proteínas desta família. bZIP9 e bZIP60 já foram caracterizados por formar heterodímero com outros fatores da família bZIP (Liu e Howell., 2010; Weltmeier *et al.*, 2006), no entanto, a interação entre eles ainda não foi comprovada. Como ambos os genes apresentam atividade de autotransativação não foi possível avaliar a interação por meio de duplo-híbrido. Por meio de BiFC mostramos que bZIP9 apresenta a capacidade de formar homodímero e também de formar heterodímero com bZIP60. A interação entre ambos foi intensificada quando as plantas de *Nicotiana benthamiana* foram tratadas previamente com tunicamicina (Figura 3D). Tal feito pode ser explicado pela instabilidade da proteína de bZIP60 em condições normais, uma vez que bZIP60 é degradada pelo proteassomo em condições normais e após a indução com indutores de estresse este processo de degradação é minimizado. Processo previamente descrito por XBP1, ortólogo de bZIP60 em mamíferos (Yoshida *et al.*, 2001; Calfon *et al.*, 2002).

### *Superexpressões de bZIP9 e bZIP60 apresentam respostas contrastantes em condições de estresse no RE e de déficit hídrico*

Uma vez que ambos os genes apresentaram a expressão aumentada em condições de estresse osmótico e do RE em plantas Col-0, avaliamos a superexpressão destes em plantas de Arabidopsis em condições de déficit hídrico e sob indução prolongada por tunicamicina. A superexpressão de bZIP9 e bZIP60 promoveu uma maior tolerância das plantas em condições de déficit hídrico quando comparadas às plantas Col-0 e *bzip60*. A superexpressão destes bZIPs promoveu um retardamento na queda no teor relativo de água ao longo do estresse e, após a reidratação, apresentaram uma maior taxa de sobrevivência (Figura 4). Ao contrário da resposta ao déficit hídrico, plantas superexpressando bZIP9 e bZIP60 apresentaram um fenótipo de morte celular mais acelerado quando comparado às plantas Col-0 e *bzip60* em condições de estresse no RE. Em *Boea hygrometrica*, a superexpressão da forma processada do fator BhbZIP60 também apresentou um fenótipo de tolerância à seca (Wang *et al.*, 2017). Diferentemente da superexpressão feita em *Boea hygrometrica*, utilizamos a superexpressão do gene não processado. Embora apresente alta homologia com o gene de Arabidopsis, BhbZIP60 é capaz de complementar parcialmente o fenótipo nocaute de bZIP60 de Arabidopsis. Além disso, plantas de *Boea hygrometrica* em condições de déficit hídrico apresentam o processamento do mRNA de BhbZIP60, o que não é observado em Arabidopsis (Figura S6). O papel da atuação de bZIP60 e bZIP9 na resposta ao déficit hídrico pode envolver mecanismos de sinalização à ABA. Foram identificados genes responsivos a ABA sendo modulados por BhbZIP60. bZIP60 de Arabidopsis também é modulado pela resposta de ABA de uma maneira dinâmica. Sob a indução de ABA, os genes DIG alteram os sítios de ligação no promotor de bZIP60 (Song *et al.*, 2016), mas o papel de bZIP60 nesta sinalização não é conhecido. Por meio de análises globais de expressão (<http://bar.utoronto.ca>), foi evidenciado que o gene de bZIP9 também é induzido por ABA. Por outro lado, bZIP9 também foi identificado sendo capaz de interagir com bZIP53, o qual modula a enzima prolina desidrogenase, responsável por catalisar a primeira reação de degradação de prolina. O metabolismo de prolina representa um papel importante na adaptação a estresse e na indução de senescência (Weltmeier *et al.*, 2006; Zhang e Becker., 2015).

O efeito mais acelerado de morte celular em plantas superexpressando bZIP9 e bZIP60 pode estar relacionado ao mecanismo de resposta a estresse mediado por proteínas do RE e relacionadas a UPR. Em condições iniciais de estresse, ocorre a ativação de genes que tentam manter a homeostase celular, no entanto, com o estresse prolongado estes genes moduladores podem desencadear uma resposta de morte celular mais proeminente. Em milho, já foi mostrado que em condições iniciais de estresse no RE, Ire1 promove a degradação de RNAs de genes de peroxidases por um mecanismo de degradação dependente de Ire1, o que gera um aumento na expressão de genes canônicos da UPR, como bZIP60. Em condições prolongadas de estresse, a atividade de Ire1 é diminuída, diminuindo também genes inibidores de morte celular e de manutenção de homeostase, além de modular positivamente genes ativadores do processo de morte celular (Srivastava *et al.*, 2018). Este processo pode explicar o mecanismo de “*splicing*” de bZIP60 em condições iniciais de estresse RE causado por indutores como TUN e DTT. Estes fatores aumentam a taxa de processamento de bZIP60 e este aumento pode ser devido a mudança no potencial redox da célula e a consequente diminuição de enzimas que lidam com esta mudança. Em condições de estresse mais severo e prolongado, este padrão se altera fazendo com que genes pró-apoptóticos sejam ativados.

#### *O papel de bZIP9 e bZIP60 nos genes NRPs*

A via de morte celular mediada por NRPs foi identificada em soja, mas apresenta-se conservada entre as espécies (Costa *et al.*, 2008; Faria *et al.*, 2011; Mendes *et al.*, 2013; Reis *et al.*, 2016). Esta via conecta os estresses osmótico e do RE em uma via de morte celular programada. Pelo fato de ser modulado por BiP, esta via pode envolver transdutores da UPR como moduladores ou como alvos. Foi mostrado que tanto bZIP9 quanto bZIP60 são induzidos por estresse osmótico e do RE (Figura 2 e S1). Em condições de estresse no RE, plantas superexpressando bZIP9, bZIP60 e plantas nocaute de bZIP60 apresentam um comportamento diferente em relação a indução de genes NRP/DCD. Plantas nocaute para o gene de bZIP60 não apresentam indução do gene *NRP1* após 8h de indução e o gene de *NRP2* foi reprimido nesta condição. No entanto, a superexpressão, tanto de bZIP9 quanto de bZIP60, leva ao aumento da expressão de *NRP1* quando comparada às plantas Col-

0 e bzip60 (Figura 6B). Este resultado mostra que bZIP60 se comporta como um modulador positivo dos genes NRPs em condições de estresse no RE.

Também foi avaliado se o aumento da expressão dos genes NRPs acarreta alteração nos genes de bZIP9 e bZIP60. Protoplastos de Arabidopsis Col-0 foram transformados com construções que permitiram a expressão dos genes de NRP1 e NRP2. Após 8h de indução, foi evidenciado um aumento na expressão dos genes de bZIP9 e bZIP60 quando induzidos pelos genes NRP1 e NRP2. Estes resultados dão indícios que a via de estresse mediada por NRP/DCD pode levar ao aumento na expressão dos genes bZIP9 e bZIP60 e que eles podem atuar como moduladores da expressão de NRPs em diferentes condições.

## 6. CONCLUSÃO

A família de fatores de transcrição bZIP está envolvida na regulação de uma série de processos biológicos relacionados a desenvolvimento e respostas a estresses abióticos e bióticos. Neste trabalho evidenciamos o papel dual dos genes bZIP9 e bZIP60 nos mecanismos de resposta a déficit hídrico e a estresse no RE.

bZIP9 é capaz de atuar como homodímero e heterodímero. A formação de heterodímero pode envolver além de outros fatores a proteína bZIP60 processada. Tanto bZIP9 quanto bZIP60 são induzidos por estresse osmótico e estresse no RE e são capazes de modular a expressão dos genes da via de morte celular mediada por NRP/DCD (NRP1 e NRP2). Além disso, a expressão de NRP1 e NRP2 em protoplastos de Arabidopsis promoveu o aumento da expressão de bZIP9 e bZIP60, evidenciando a ativação destes genes em resposta a via NRP/DCD.

A superexpressão de bZIP9 e bZIP60 apresentou um mecanismo dual de resposta ao déficit hídrico e a condições de estresse prolongado no RE. Plantas superexpressando bZIP9 e bZIP60 são mais tolerantes ao déficit hídrico enquanto em condições de estresse no RE apresentam um fenótipo de morte celular mais intenso.

Coletivamente estes resultados mostram a atuação de bZIP9 e ZIP60 em resposta a estresse osmótico e do RE e a uma possível modulação na via de morte celular mediada por NRP/DCD.

## 7. BIBLIOGRAFIA

Alves, M. S. *et al.* A novel transcription factor, ERD15 (Early Responsive to Dehydration 15), connects endoplasmic reticulum stress with an osmotic stress-induced cell death signal. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 22, p. 20020-20030, 2011.

Alves, M. S. *et al.* Plant bZIP transcription factors responsive to pathogens: a review. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 4, p. 7815–7828, 2013.

Alvim, F. C. *et al.* Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. **Plant Physiol**, v. 126, n. 3, p. 1042-54, 2001.

Bao, Y. e Howell, S.H. The Unfolded Protein Response Supports Plant Development and Defense as well as Responses to Abiotic Stress. **Front Plant Sci.**, v. 5, n. 344, 2017.

Cai, Y. M. *et al.* Two proteases with caspase-3-like activity, cathepsin B and proteasome, antagonistically control ER-stress-induced programmed cell death in Arabidopsis. **New Phytologist**, v. 218, n. 3, p. 1143-1155, 2017.

Calfon, M. *et al.* IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. **Nature**, v. 415, n. 6867, p. 92–96, 2002.

Carvalho, H. H. *et al.* The endoplasmic reticulum binding protein BiP displays dual function in modulating cell death events. **Plant Physiol**, v. 164, n. 2, p. 654-670, 2014.

Carmargos, L. F. *et al.* Development and cell death domain-containing asparaginerich protein (DCD/NRP): an essential protein in plant development and stress responses. **Theor. Exp. Plant Physiol**, v. 31, n. 1, p. 59-70, 2019.

Carvalho, H. H. *et al.* The Molecular Chaperone Binding Protein BiP Prevents Leaf Dehydration-Induced Cellular Homeostasis Disruption. **PLoS One**, v. 9, n. 1, 2014.

Costa, M. D. L. *et al.* A New Branch of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling and the Osmotic Signal Converge on Plant-specific Asparagine-rich Proteins to Promote Cell Death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 20209-20219, 2008.

Droge-Laser, W. e Weiste, C. The C/S1 bZIP Network: A Regulatory Hub Orchestrating Plant Energy Homeostasis. **Trends Plant Sci**, v. 23, n. 5, 422-433, 2018.

Droge-Laser, W. *et al.* The Arabidopsis bZIP transcription factor family — na update. **Curr Opin Plant Biol.**, v. 45, p. 36-49, 2018.

Ehlert, A. *et al.* Two-hybrid protein–protein interaction analysis in Arabidopsis protoplasts: establishment of a heterodimerization map of group C and group S bZIP transcription factors. **Plant J.**, v. 46, n. 5, p. 890-900, 2006.

Faria, J. A. *et al.* The NAC domain-containing protein, GmNAC6, is a downstream component of the ER stress- and osmotic stress-induced NRP-mediated cell-death signaling pathway. **BMC Plant Biol.**, v. 11, n. 129, 2011.

Fontes, E. P. B. *et al.* The Geminivirus Nuclear Shuttle Protein Is a Virulence Factor That Suppresses Transmembrane Receptor Kinase Activity. **Genes e Development**, v. 18, n. 20, p. 2545–2556, 2004.

Gardner, B. M. *et al.* Endoplasmic Reticulum stress sensing in the unfolded protein response. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, 2013.

Hatsugai, N. *et al.* Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 234, 2015.

Henriquez-Valencia, C. *et al.* bZIP17 and bZIP60 Regulate the Expression of BiP3 and Other Salt Stress Responsive Genes in an UPR-Independent Manner in *Arabidopsis thaliana*. **J Cell Biochem**, v.116, n.8, p. 1638–1645, 2015.

Howell, S. H. Endoplasmic Reticulum Stress Responses in Plants. **Annu Rev Plant Biol**, v. 64, p. 477-499, 2013.

Irsigler, A. S. T. *et al.* Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways. **BMC Genomics**, n8, v. 431, 2007.

Jakoby, M. *et al.* bZIP transcription factors in Arabidopsis. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 3, p. 106-111, 2002.

Kim, J. S. *et al.* ER-Anchored Transcription Factors bZIP17 and bZIP28 Regulate Root Elongation. **Plant Physiology**, v. 176, n. 3, p. 2221-2230, 2018.

Liu, J. X. e Howell, S. H. Endoplasmic Reticulum Protein Quality Control and Its Relationship to Environmental Stress Responses in Plants. **Plant Cell**, v. 22, n. 9, p. 2930-2942, 2010.

Liu, J.X. e HOWELL, S.H. Managing the protein folding demands in the endoplasmic reticulum of plants. **The New Phytologist**, v. 221, n. 2, p. 418-428, 2016.

Ma, S. *et al.* Expression Stabilities of Candidate Reference Genes for RT-qPCR under Different Stress Conditions in Soybean. **PLoS One**, v. 8, n. 10, 2013.

Mendes, G.C. *et al.* GmNAC30 and GmNAC81 integrate the endoplasmic reticulum stress-and osmotic stress-induced cell death responses through a vacuolar processing enzyme. **PNAS**, v. 110, p. 19627-19632, 2013.

Murashige, T. E. e Skoog, F. A. Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

Nagashima, Y. *et al.* Arabidopsis IRE1 catalyses unconventional splicing of bZIP60 mRNA to produce the active transcription factor. **Sci Rep**, v. 1, n. 29, 2011.

Noman, A. *et al.* Basic leucine zipper domain transcription factors: the vanguards in plant immunity. **Biotechnol Lett**, v. 39, n. 12, p. 1779-1791, 2017.

Ortiz-Espín, A. *et al.* Mitochondrial AtTrxo1 is transcriptionally regulated by AtbZIP9 and AtAZF2 and affects seed germination under saline conditions. **J Exp Bot**, v. 68, n. 5, p. 1025-1038.

Parra-Rojas, J. *et al.* The Dynamic of the Splicing of bZIP60 and the Proteins Encoded by the Spliced and Unspliced mRNAs Reveals Some Unique Features during the Activation of UPR in *Arabidopsis thaliana*. **Plos One**, v. 10, n.4, 2015.

Pruneda-Paz, J. L. *et al.* A genome-scale resource for the functional characterization of *Arabidopsis* transcription factors. **Cell Rep**, v.8, n. 2, p. 622-632, 2014.

Reis, P. A. B. e FONTES, E. P. B. N-rich protein (NRP)-mediated cell death signaling: a new branch of the ER stress response with implications for plant biotechnology. **Plant Signaling e Behavior**, v. 7, n. 6, p. 628-632, 2012.

Reis, P. A. B. *et al.* Functional and regulatory conservation of the soybean ER stress-induced DCD/NRP mediated cell death signaling in plants. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 156, 2016.

Reis, P. A. B. *et al.* The Binding Protein BiP Attenuates Stress-Induced Cell Death in Soybean via Modulation of the N-Rich Protein-Mediated Signaling Pathway. **Plant Physiology**, v. 157, n. 4, p. 1853–1865, 2011.

Rodrigues-Martinez. Combinatorial bZIP dimers display complex DNA-binding specificity landscapes – 2017.

Ruberti, C. e Brandizzi, F. Conserved and plant-unique strategies for overcoming endoplasmic reticulum stress. **Frontiers in Plant Science**, n. 5, p. 69, 2014.

Sang-Dong Yoo, SD. *et al.* Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. **Nature protocols**, v. 2, n. 7, p. 1565-1572, 2007.

Silva, P. A. *et al.* Comprehensive analysis of the endoplasmic reticulum stress response in the soybean genome: conserved and plant-specific features. **BMC genomics**, v. 16, n. 783, 2015.

Song, L. *et al.* A transcription factor hierarchy defines an environmental stress response network. **Science**, v. 354, n. 6312, 2016.

Srivastava, R. *et al.* Response to Persistent ER Stress in Plants: A Multiphasic Process That Transitions Cells from Prosurvival Activities to Cell Death. **Plant Cell**, v. 30, n. 6, p. 1220-1242, 2018.

Tang, W. e Page, M. Transcription factor AtbZIP60 regulates expression of Ca<sup>2+</sup> - dependent protein kinase genes in transgenic cells. **Mol. Biol. Rep.**, v.40, n.3, p. 2723–2732, 2013.

Valente, M. A. *et al.*, The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. **J Exp Bot.**, v. 60, n. 2, p. 533-546, 2009.

Wakasa, Y. *et al.* Multiple roles of the ER stress sensor IRE1 demonstrated by gene targeting in rice. **Sci Rep**, 2012.

WAN, S. e JIANG, L. Endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolded protein response (UPR) in plants. **Protoplasma**, v. 253, p. 753-764, 2016.

Wang, B. *et al.* BhbZIP60 from Resurrection Plant *Boea hygrometrica* Is an mRNA Splicing-Activated Endoplasmic Reticulum Stress Regulator Involved in Drought Tolerance. **Front Plant Sci**, v. 8, n. 245, 2017.

Weltmeier, F. *et al.* Combinatorial control of Arabidopsis proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. **EMBO J**, v. 25, n. 13, p. 3133-3143, 2006.

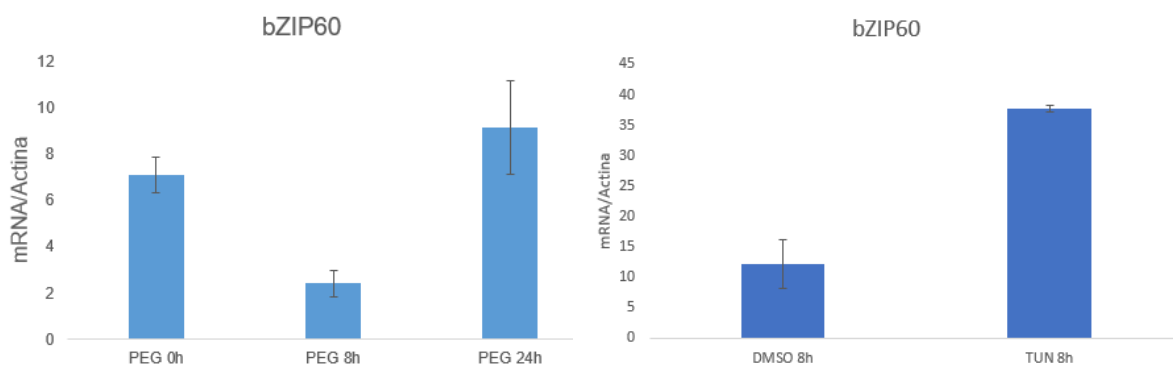
Yang, Y. G. *et al.* Maize membrane-bound transcription factor Zmbzip17 is a key regulator in the crosstalk of ER quality control and ABA signaling. **Plant Cell Physiol.**, v. 54, n. 12, 2020–2033, 2013.

Yoshida, H. *et al.* XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. **Cell**, v. 107, n. 7, p.881–891, 2001.

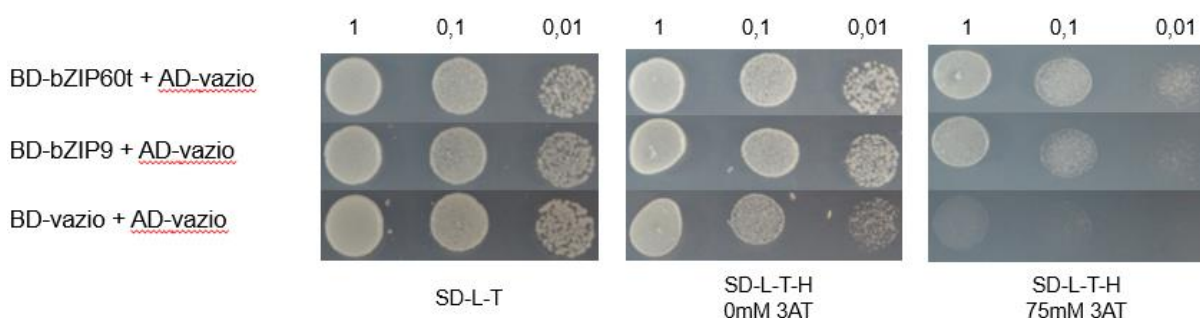
Zhang, L. e Becker, D. F. Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant senescence. **Front Plant Sci**, v. 6, n. 552, 2015.

Zhu, Y. *et al.* Global transcriptome analysis reveals acclimation-primed processes involved in the acquisition of desiccation tolerance in *Boea hygrometrica*. **Plant Cell Physiol**, v. 56, n. 7, p. 1429–1441, 2015.

## SUPLEMENTO

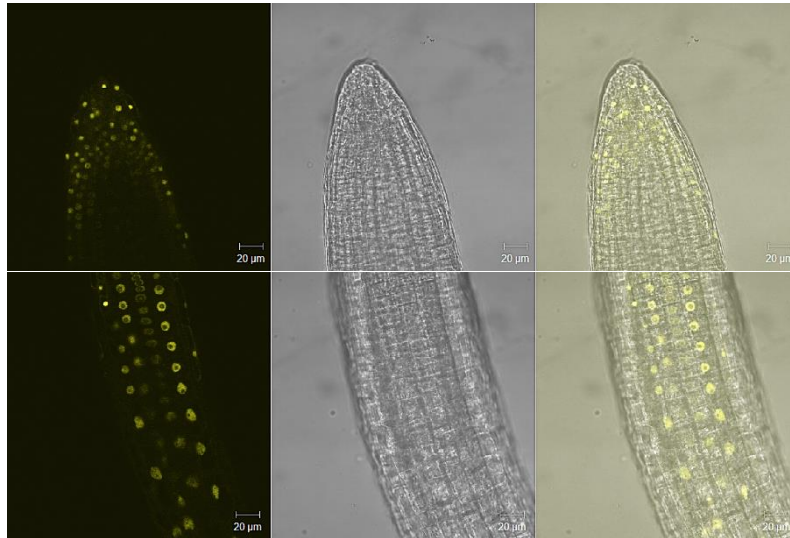


**Figura S1. Expressão de bZIP60 em resposta a estresse osmótico e estresse no retículo endoplasmático.** RNA total foi isolado de plântulas de *Arabidopsis* de 15 dias tratadas com PEG (10% p/v) ou tunicamicina (5µg/mL) por 8 h (para PEG um tempo adicional de 24h foi usado). Meio MS ½ foi usado como controle para PEG e MS ½ acrescido de DMSO como controle para tunicamicina. O nível de transcritos dos genes selecionados, como indicado, foi quantificado por qRT-PCR. A expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta Ct}$  e o gene da Actina foi utilizado como controle endógeno. CNX e RAB18 são genes marcadores de estresse no retículo endoplasmático e estresse osmótico, respectivamente. Col-0 denota a linhagem selvagem.

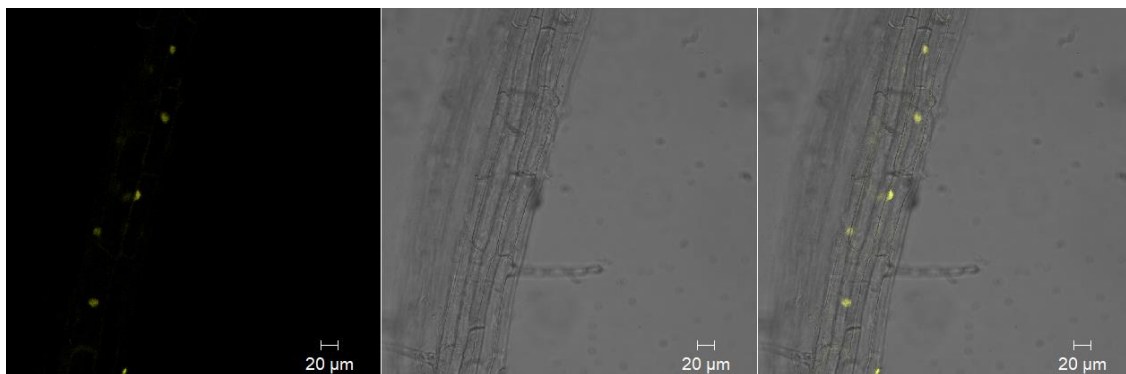


**Figura S2. Ensaio de transativação de bZIP60t e bZIP9 em leveduras.** Os plasmídeos contendo as fusões BD-GAL4 como indicado na figura e o vetor vazio (pDEST32) foram introduzidos separadamente na cepa de levedura AH109. Foram feitas diluições da cultura para as densidades óticas de 1, 0,1 e 0,01. Os transformantes foram incubados por 4 dias a 28°C em meio SD na ausência dos

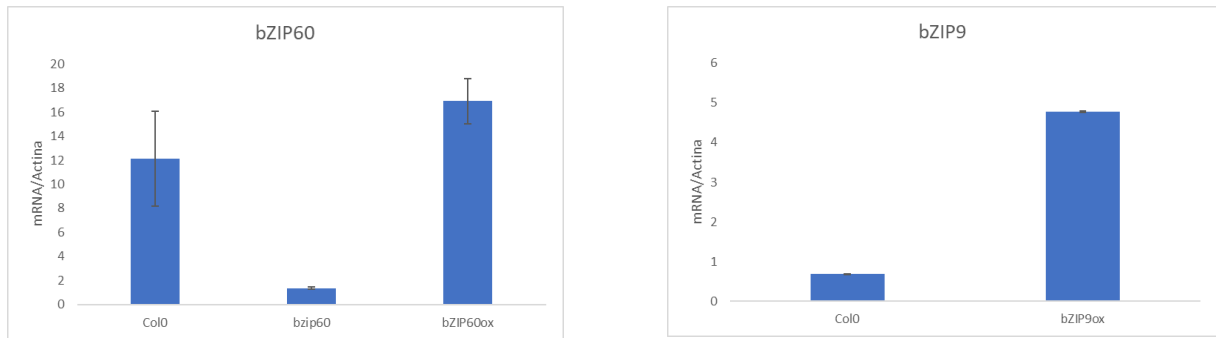
aminoácidos indicados. Transativação de BD-bZIP60t e BD-bZIP9 em meio suplementado com 0 ou 75mM de 3AT (3-aminotriazol).



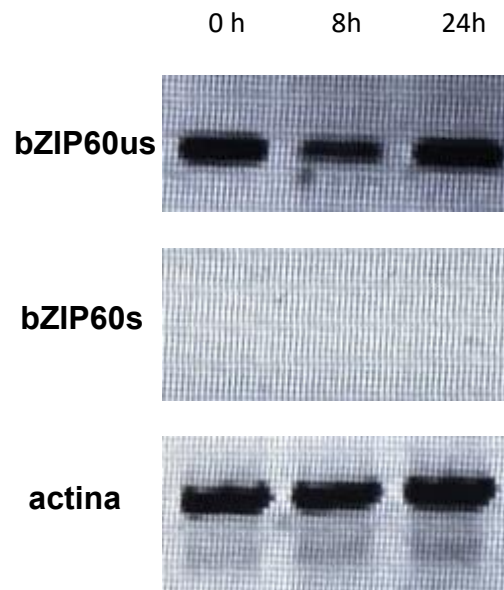
**Figura S3. Localização subcelular de bZIP9.** Raízes de *A. thaliana* transformadas com a construção 35S::bZIP9-YFP. A localização subcelular da proteína foi monitorada por microscopia confocal. Barras de escala = 20µm.



**Figura S4. Localização subcelular de bZIP60 sob influência do indutor tunicamicina.** Raízes de *A. thaliana* transformadas com a construção 35S::bZIP60-YFP. A localização subcelular da proteína foi monitorada por microscopia confocal. Barras de escala = 20µm.



**Figura S5. Confirmação da superexpressão das linhagens bZIP60ox e bZIP9OX.** RNA total foi isolado de plântulas de Arabidopsis de 15 dias crescidas em meio MS ½. O nível de transcritos dos genes selecionados, como indicado, foi quantificado por qRT-PCR. A expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta Ct}$  e o gene da Actina foi utilizado como controle endógeno. Col-0 denota a linhagem selvagem.



**Figura S6. Avaliação do processamento de bZIP60 em plantas Col0 sob condições de estresse osmótico.** RNA total foi isolado de plântulas de Arabidopsis (Col0) de 15 dias tratadas com PEG (10% p/v) por 8 h e 24h. Meio MS ½ foi usado como controle para PEG. O nível de transcritos dos genes selecionados, como indicado, foi quantificado por RT-PCR. O gene da Actina foi utilizado como controle endógeno.