

PATRÍCIA PEREIRA FONTES

**IDENTIFICAÇÃO DE INTERAÇÕES PROTEÍNA-PROTEÍNA DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO GmbZIPE2 DE SOJA (*Glycine max*)**

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
2016

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

T

F682i
2016
Fontes, Patrícia Pereira, 1991-
Identificação de interações proteína-proteína do fator
de transcrição GmbZIPE2 de soja (*Glycine max*) / Patrícia
Pereira Fontes. - Viçosa, MG, 2016.
vii, 42f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.
Orientador : Luciano Gomes Fietto.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Referências bibliográficas: f.33-40.

1. Soja - Interação proteína-proteína. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular. Programa de Pós-graduação em Bioquímica
Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 633.34

PATRÍCIA PEREIRA FONTES

**IDENTIFICAÇÃO DE INTERAÇÕES PROTEÍNA-PROTEÍNA DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO GmbZIPE2 DE SOJA (*Glycine max*)**

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: 22 de julho de 2016.

Pedro Augusto Braga dos Reis

Maria Cristina Baracat-Pereira

Luciano Gomes Fietto
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado em cada passo, dando sabedoria e força para chegar até aqui.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de estudar em uma instituição de excelência, pela ótima estrutura física e pelo agradável ambiente de estudos e trabalho.

Ao Professor Luciano Gomes Fietto, pela confiança em meu trabalho e pelos seus ensinamentos, tanto profissionais quanto pessoais. Obrigada pela disponibilidade e paciência.

À Professora Maria Cristina Baracat-Pereira e ao Professor Pedro Augusto Braga dos Reis, pela excelente contribuição científica. O conhecimento e colaboração de vocês foram essenciais para o enriquecimento do trabalho.

Aos meus pais, que apesar de todas as dificuldades, sempre me apoiaram, acreditando nas minhas escolhas, e me deram força para continuar e não desistir.

Aos meus irmãos, que torceram e vibraram junto comigo.

Ao meu esposo Claudinei, pelo imenso amor e paciência. Obrigada pelo companheirismo e apoio durante essa caminhada.

Às meninas da soja, obrigada pela troca de conhecimentos e pelo excelente ambiente de trabalho. Em especial, à Silvana, Amanda e Vanessa.

À Silvana, por ser meu apoio e alicerce desde que cheguei ao laboratório. Obrigada por sua atenção, orientação, dedicação. O que sei hoje foi graças aos seus ensinamentos. Obrigada pela paciência e pela amizade. Essa conquista hoje também é sua.

À Amanda, parceirona de bZIP, agradeço por cada momento que passamos juntas, e por dividir seu bZIP comigo. Só a sua companhia já é motivo de agradecer a Deus. Obrigada pelas boas conversas e risadas e alguns cochilos após o almoço.

À Vanessa, que sofreu/lutou comigo nesse mestrado, menina de ouro e exemplo para todos. Obrigada por estar sempre ao meu lado, mesmo que seja nos piores grupos de trabalho. Você me ensinou demais e essa conquista tem muito de você.

À Ayla, Dani e Ananda, amigas sem igual, que abrilhantaram meus dias de trabalho e com as quais aprendi demais. Obrigada por serem tão especiais e companheiras e por estarem sempre presentes.

A todos do LBM, obrigada pela acolhida e por todos os momentos que vivemos juntos.

Ao Eduardo, que de secretário se tornou um grande amigo, sempre muito solícito, tornou a nossa vida na pós um pouco menos burocrática.

Aos amigos, pela torcida e por sempre estarem dispostos a me escutar e a ajudar em todos os momentos.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelos ensinamentos.

Aos funcionários, obrigada pela ajuda e ótima convivência.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

A todos que ajudaram, direta ou indiretamente, na realização desse trabalho, obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	3
2.1. Fatores de transcrição e modulação de vias de defesa de plantas.....	3
2.2. Fatores de transcrição bZIP	4
2.3. Interações proteína-proteína de fatores de transcrição bZIP.....	5
2.4. GmbZIPE2	7
3. Objetivos	11
3.1. Objetivos específicos	11
4. Material e métodos	12
4.1. Clonagem do gene de GmbZIPE2	12
4.2. Ensaio de transativação do GmbZIPE2.....	12
4.3. Varredura para identificação de interação proteína-proteína pelo sistema de duplo híbrido de leveduras.....	13
4.4. Caracterização das interações pela ativação de genes repórteres	14
4.5. Análise das sequências obtidas no sequenciamento	15
4.6. Predição de peptídeos de trânsito de cloroplasto para a proteína GmbZIPE2.....	15
4.7. Técnicas de biologia molecular	15
5. Resultados	16
5.1. Ensaio de transativação do sistema repórter pela isca GmbZIPE2.....	16
5.2. Identificação e caracterização de parceiros de interação do GmbZIPE2.....	16
5.3. Análise das sequências dos clones do duplo híbrido	19
6. Discussão	26
7. Conclusão	32

8. Bibliografia	33
9. Anexo	41
9.1. pDONR201	41
9.2. pDEST32	41
9.3. pEXP-AD502	41
9.4. pDEST22	42

RESUMO

FONTES, Patrícia Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Identificação de interações proteína-proteína do fator de transcrição GmbZIPE2 de soja (*Glycine max*)**. Orientador: Luciano Gomes Fietto. Coorientadores: Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa e Murilo Siqueira Alves.

Em vias de defesa envolvidas na interação planta/patógeno e planta/ambiente, a modulação da transcrição é etapa fundamental na ativação de respostas intracelulares. Esses mecanismos são regulados principalmente pelos fatores de transcrição (FT), que entre os mais estudados em plantas estão a família basic leucine zipper motif (bZIP). Interações dos bZIP com outras proteínas modulam a atividade destes transfatores por diversos mecanismos, e essa modulação afeta vias de transdução de sinais nas plantas. O GmbZIPE2 (Glyma05g168100.1) de soja tem sua expressão alterada em resposta à infecção por patógenos e ao tratamento com fitormônios de defesa, sugerindo que esse transfator possa estar envolvido em vias de sinalização de interação planta-patógeno. O objetivo deste trabalho foi identificar interações proteicas do GmbZIPE2 utilizando o ensaio de duplo-híbrido de leveduras. Identificamos que a proteína GmbZIPE2 foi capaz de interagir com *G. max* uncharacterized LOC100786585 (RbcX), identificada no Phytozome como Chaperonin-like Rbcx Protein, que atua como chaperona no dobramento da Rubisco, e a proteína *G. max* uncharacterized LOC100777895, cuja função biológica descrita no Uniprot é relacionada à montagem do fotossistema II (PSII). Uma vez que interage com proteínas envolvidas com a fotossíntese e que podem atuar como moléculas sinalizadoras do estado fotossintético da célula, o GmbZIPE2 pode estar relacionado à transmissão de sinais do cloroplasto para o núcleo, atuando na via de sinalização retrógrada.

ABSTRACT

FONTES, Patrícia Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Identification of protein-protein interaction of the transcription factor GmbZIPE2 of soybean (*Glycine max*)**. Adviser: Luciano Gomes Fietto. Co-advisers: Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa and Murilo Siqueira Alves.

In defence pathways triggered after the plant /pathogen interaction and upon environment stress, the transcriptional modulation is a critical step for the activation of intracellular responses. This modulation is mainly regulated by transcriptional factors (TF). The basic leucine zipper family (bZIP) is the most studied TF in plants. The interaction between bZIP and other proteins modulates the activity of these transcriptional factors by several mechanisms, and that modulation affects the signal transduction pathways. The GmbZIPE2 (Glyma05g168100.1) is responsive to pathogen infection and treatment with phytohormones related to defense, suggesting that GmbZIPE2 is part of pathogen response signaling pathways in soybean. The aim of this study was to identify protein that can interact with GmbZIPE2 using yeast two-hybrid. We found that the GmbZIPE2 was able to interact with *G. max* uncharacterized LOC100786585 (RbcX), identified in Phytozome as Chaperonin-like Rbcx Protein, that acts as chaperone in folding of Rubisco, and the *G. max* uncharacterized LOC100777895, that was described to the assembly of photosystem II (PSII). These interactions suggest that GmbZIPE2 can be related to signal transmission from chloroplast to the nucleus.

1. Introdução

A cultura de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) ocupa espaço relevante na economia mundial. Neste contexto, a soja é uma das principais fontes de proteína e óleos, principalmente no Brasil, onde a safra de 2014/2015 ocupou aproximadamente 32,09 milhões de hectares, com produtividade média de 2998 kg por hectare. As estimativas para a safra de 2015/2016 são 95306,1 t com produtividade média de 2876 kg/ha (Conab, 2016). A produtividade da cultura da soja, no entanto, pode ser afetada por diversos fatores estressantes, como clima, qualidade do solo e doenças.

As plantas submetidas a estresses desencadeiam respostas no intuito de diminuir os impactos no seu desenvolvimento. Em estresses bióticos, o sistema de imunidade inata é acionado pelo reconhecimento de PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), desencadeando a PTI (PAMP-triggered immunity). No entanto, muitos patógenos ultrapassam essa primeira barreira ao liberar moléculas efetoras que inibem a PTI. O reconhecimento desses efetores pelas plantas desencadeia a segunda fase de defesa ETI (effector-triggered immunity) (Boller and He, 2010). As respostas das plantas envolvem ainda a produção de fitormônios, como ácido salicílico (SA), ácido abscísico (ABA), jasmonato (JA) e etileno (ET), que ativam respostas intracelulares em respostas a estresses bióticos e abióticos (Pieterse et al., 2012).

Esses mecanismos de resposta são regulados por proteínas regulatórias, sendo estas principalmente os fatores de transcrição (FT) (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006), que regulam a expressão dos genes ao interagir com cis-elementos presentes no DNA. Dentre os FT mais estudados em plantas estão os que contêm o domínio zíper de leucina básico (bZIP), transfatores envolvidos no controle de diferentes processos biológicos, sendo a defesa contra patógenos um dos menos estudados (Jakoby et al., 2002; Singh et al., 2002; Alves et al., 2013).

A função dos fatores de transcrição bZIP é regulada principalmente por interações com outras proteínas. Essas interações modulam as atividades dos transfatores por diversos mecanismos, tais como modificação pós-traducional, degradação, localização subcelular e inativação (Alves et al., 2014). Essa modulação afeta diversas vias de transdução de sinais na defesa das plantas, principalmente na resposta contra patógenos. Um dos primeiros bZIP estudados em resposta a estresse biótico foi o G/HBF-1 em soja. Após a invasão do patógeno, o reconhecimento de elicitores leva à interação de cinases com o FT, resultando

em sua fosforilação e consequente translocação para o núcleo e transcrição de genes alvo (Dröge-Laser et al., 1997).

Entre os fatores bZIPs de soja responsivos à infecção por *Phakopsora pachyrhizi* (Alves et al., 2015), o GmbZIPE2 (Glyma05g168100.1) foi caracterizado funcionalmente como responsivo à infecção por este patógeno e à fitormônios. A proteína foi capaz de se ligar ao H-box, cis-elemento relacionado a patógenos, e induziu a expressão de genes de vias importantes para a defesa da planta, como CHS15-6 e PR-1 (Gonçalves, 2014). Estes resultados corroboram a hipótese de que esse transfator possa estar envolvido em vias de sinalização na defesa planta-patógeno (Alves, 2013; Gonçalves, 2014; Alves et al., 2015).

Pela importância das interações proteína-proteína na função dos bZIPs e pelas evidências de que o GmbZIPE2 possa estar envolvido nas vias de sinalização em resposta a patógenos, o objetivo do trabalho foi contribuir para desvendar a rede de interações do GmbZIPE2 no intuito de entender as vias em que ele possa atuar na resposta da soja a estresses.

2. Revisão de Literatura

2.1. Fatores de transcrição e modulação de vias de defesa de plantas

As plantas estão sempre expostas a desafios, seja devido a alterações climáticas, qualidade e manejo do solo e à infecção por patógenos. Na defesa contra patógenos, o reconhecimento de padrões moleculares e/ou efetores dos fungos, vírus e bactérias desencadeiam sinais intracelulares que ativam respostas que levam a uma massiva reprogramação gênica, acarretando na produção de fitoalexinas, na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e na indução de genes de defesa, dentre eles os que codificam proteínas relacionadas à defesa contra patógenos (proteínas PR) (Schwessinger and Zipfel, 2008; van Verk et al., 2009).

No reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), os receptores de reconhecimento de padrões (pattern recognition receptors, PRR) desencadeiam uma resposta de defesa chamada de PTI (PAMP-triggered immunity). Grande parte destes PAMPs é importante para o ciclo de vida do patógeno e são preservados entre as espécies. No entanto, alguns patógenos conseguem ultrapassar essa primeira barreira de defesa por produzir efetores que inibem essa resposta primária. As plantas, por sua vez, são capazes de reconhecer essas moléculas efetoras por meio de receptores intracelulares, os NBS-LRR (nucleotide-binding site leucine-rich repeat), que acionam a segunda estratégia de defesa, a ETI (effector-triggered immunity) (Boller and He, 2010; Dodds and Rathjen, 2010; Duan et al., 2016). Os efetores geralmente são os principais responsáveis pela origem da coevolução planta-patógeno. A PTI é uma resposta normalmente eficiente contra patógenos não adaptados, sendo a ETI mais ativa contra patógenos adaptados e considerada uma resposta mais rápida e amplificada da PTI, resultando em resistência à doença e, geralmente, morte celular localizada (resposta de hipersensibilidade - HR). Os principais eventos associados com PTI e ETI são rápido influxo de cálcio, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativação de cascatas MAPK, modulação da transcrição de genes de defesa, entre outros. (Jones and Dangly, 2006; Dodds and Rathjen, 2010; Meng and Zhang, 2013)

As respostas das plantas a estresses podem ainda envolver os hormônios vegetais, incluindo jasmonato (JA), ácido salicílico (SA), ácido abscísico (ABA) e etileno (ET), moléculas de sinalização importantes para uma resposta eficiente a estímulos bióticos e abióticos. Normalmente, a sinalização por SA relaciona-se com a resistência a patógenos

biotróficos e hemibiotróficos; já vias relacionadas com ET e JA ativam a resistência contra patógenos necrotróficos (Yang et al., 1997; Pieterse et al., 2012). ABA, por sua vez, é o principal hormônio relacionado a estresses abióticos. No entanto, estas vias de sinalização por hormônios não são exclusivas de determinado estresse, podendo ter ação em mais de um estresse e na resposta a estresses múltiplos, atuando sinérgica ou antagonicamente (Prasch and Sonnewald, 2015).

As vias de sinalização de defesa em plantas são reguladas por proteínas regulatórias, sendo os fatores de transcrição um dos principais exemplos. Os fatores de transcrição são proteínas que se ligam ao DNA e que, por interagirem com componentes da maquinaria de transcrição, são capazes de modular a função de um determinado gene de acordo com o ambiente bioquímico, ativando ou reprimindo a sua expressão (Chen et al., 2002; Udvardi et al., 2007; Boyle and Després, 2010).

Os fatores de transcrição são classificados em famílias de acordo com a conservação dos motivos de ligação ao DNA. Em plantas, as principais famílias de fatores de transcrição relacionados à defesa são: WRKY, AP2/ERF, MYC, MYB, NAC, Whirly e bZIP (Eulgem, 2005). Estes fatores determinam a especificidade e as vias de respostas desencadeadas em determinados estresses (Atkinson and Urwin, 2012).

Dentre os fatores bZIP, uma das mais abundantes famílias de transfatores em plantas e com diversas funções descritas na literatura, poucos membros são descritos como atuantes em vias de defesa contra patógenos (Jakoby et al., 2002; Singh et al., 2002; Alves et al., 2013). Um exemplo é o TabZIP1 de trigo, isolado e caracterizado por Zhang et al. (2008), envolvido na resposta de defesa ao patógeno da ferrugem através de vias mediadas por ET/MeJA.

2.2. Fatores de transcrição bZIP

A família bZIP é uma das maiores famílias de fatores de transcrição em plantas e estão envolvidos na regulação de genes em resposta a estresse abiótico, maturação de semente, desenvolvimento floral e defesa a patógeno (Jakoby et al., 2002). A família é caracterizada pela presença de um domínio básico de zíper de leucina (Basic Leucine Zipper), sendo a região rica em aminoácidos básicos envolvida na ligação ao DNA, e o zíper de leucina, caracterizado pela repetição de leucina a cada sete resíduos, intercalados por outros aminoácidos hidrofóbicos, formando uma hélice anfipática, importante para a homo e heterodimerização das proteínas (Schindler et al., 1992; Jakoby et al., 2002).

Os fatores bZIP de soja foram classificados em dez grupos (A, B, C, D, E, F, G, H, I e S) quanto à similaridade de sequência e aos motivos conservados (Liao et al., 2008), mesmos dez grupos utilizados anteriormente na subdivisão dos bZIP de *Arabidopsis thaliana* por Jakoby et al. (2002).

Apesar da abundância de fatores da família bZIP, poucos estudos têm buscado a caracterização funcional dessas proteínas em vias de sinalização a estresse e defesa de soja. Os bZIPs GmbZIP44, GmbZIP62 e GmbZIP78 foram caracterizados como possíveis reguladores negativos da sinalização de ABA e possuem função na tolerância a sal e frio (Liao et al., 2008). Alves et al. (2015) mostraram que o gene GmbZIP105 é responsivo ao tratamento por fitormônios e infecção por *Phakopsora pachyrhizi*, tendo a expressão induzida em plantas de soja tratadas com SA e MeJA (metil jasmonato) e na fase inicial da infecção.

A função e as respostas mediadas por bZIP são reguladas pela homo- e heterodimerização, mecanismo essencial para modular a afinidade dos FT por determinado cis-elemento e determinar a via de sinalização a ser desencadeada sob determinado estresse. A compreensão das interações proteína-proteína é essencial para o entendimento da função do FT em diferentes processos biológicos (Sornaraj et al., 2016).

2.3. Interações proteína-proteína de fatores de transcrição bZIP

As interações proteína-proteína possuem importantes funções em uma variedade de processos biológicos, como transdução de sinais, respostas a diferentes estresses e de defesa, resultando, em modificação pós-traducional, alteração da localização subcelular, degradação, inativação, dentre outros (Feldbrügge et al., 1994; Ding et al., 2009; Alves et al., 2013). A homo- e heterodimerização de fatores de transcrição são eventos cruciais na ativação ou repressão de vias de transdução de sinais, visto que podem aumentar a seletividade da interação DNA-proteína, importante para o entendimento molecular dos processos celulares (Chen et al., 2002; Singh et al., 2002; Pawson and Nash, 2003; Van Verk et al., 2009; Perez-Rodriguez et al., 2009; Paul et al., 2011).

Diversos exemplos de interações proteína-proteína envolvendo bZIPs em vias de defesa (Figura 1) têm sido descritos. Em *A. thaliana*, a ação de TGA é controlada pela localização subcelular de NPR1 (nonexpressor of pathogenesis-related proteins 1). Em situações normais, a maior parte de NPR1 está presente no citoplasma, na forma oligomérica. Sob estímulo de patógenos, a produção de SA acarreta em mudanças no

estado redox da célula, resultando na monomerização de NPR1. NPR1 monomérico transloca-se para o núcleo e os monômeros interagem com os TGAs, que se ligam a promotores e levam à transcrição de genes responsivos a SA (Fu et al., 2012; Pieterse et al., 2012; Kaltdorf and Naseem, 2013; Pajerowska-Mukhtar et al., 2013).

Em *A. thaliana*, o AtbZIP10 regula positivamente a resposta de hipersensibilidade (HR) e sua função é modulada pela interação com a proteína LSD1 (lesions simulating disease resistance 1). Patógenos ativam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando à dissociação do complexo AtbZIP10/LSD1 e o bZIP então é dirigido para o núcleo, ativando a transcrição de genes de defesa (Kaminaka et al., 2006).

Já em soja, um dos primeiros bZIPs estudados em resposta a estresse biótico foi o G/HBF-1. Após o ataque de *Pseudomonas syringae glycinea*, o reconhecimento de elicitores leva à fosforilação de G/HBF1, que resulta na sua translocação para o núcleo. No núcleo, este regula a expressão de genes biossintéticos ao se ligar a cis-elementos relacionados a elicitores de agentes patogênicos, denominados G-box (CACGTG) e H-box (CCTACC), encontrados no promotor do gene da chalcona sintase CHS15, envolvido na produção de diterpenoides e flavonoides durante a resposta a agentes patogênicos (Dröge-Laser et al., 1997).

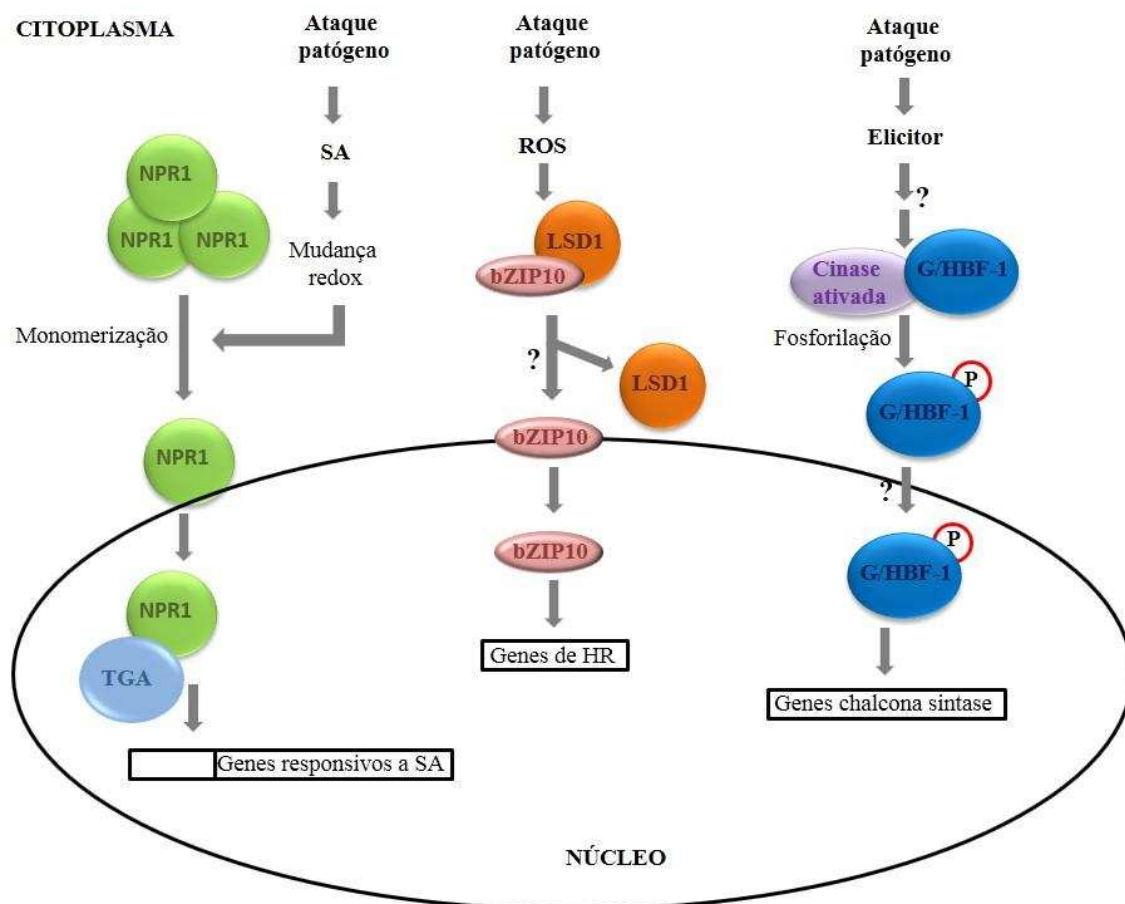


Figura 1: Representação esquemática de interações entre proteínas e bZIPs na modulação de respostas de defesa. O ataque de um patógeno, em *Arabidopsis thaliana*, desencadeia uma via de sinalização mediada por SA, que altera o estado redox da célula, levando a monomerização de NPR1. NPR1 monomérico transloca-se para o núcleo, interage com TGA e o complexo ativa a expressão de genes responsivos a SA. Já o complexo AtbZIP10/LSD1O é dissociado na presença de ROS, via de sinalização ativada por ataque de patógenos. AtbZIP10 é direcionado para o núcleo e ativa a transcrição de genes HR e relacionados com a defesa basal. Em soja, após a invasão do patógeno, o reconhecimento de elicitores resulta na fosforilação de G/HBF1, que após ser translocado para o núcleo, regula a expressão de genes da biossíntese fenilpropanoide, como a chalcona sintase CHS15. Os pontos de interrogação (?) representam processos ou componentes ainda não elucidados (adaptada de Alves et al., 2013).

2.4. GmbZIPE2

Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, foram identificados quatro fatores de transcrição da família bZIP de soja que apresentaram expressão diferenciada em resposta à infecção por *P. pachyrhizi* (Alves et al., 2015). Um destes fatores é o GmbZIPE2 (Glyma05g168100.1 - XP_003525005), que é um FT RF2-like, com massa

molecular de aproximadamente 42 kDa. Foi classificado como membro do grupo E, grupo do qual há poucos dados funcionais disponíveis.

A proteína GmbZIPE2 é similar em sequência de aminoácidos ao fator de transcrição TabZIP1 de trigo, o qual foi caracterizado como responsivo a infecções por *Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici*, fungo causador da ferrugem do trigo, o que corrobora com a hipótese da função deste bZIP estar relacionado à defesa contra esse patógeno (Zhang et al., 2008).

Na caracterização funcional da proteína GmbZIPE2, Alves (2013) mostrou que a construção YFP-GmbZIPE2 se localiza tanto no citoplasma quanto no núcleo das células, o que sugere que a ação da proteína bZIP possa estar sob controle da localização subcelular. O fator de transcrição mostrou-se ainda responsivo a fitormônios, com expressão diminuída tanto após tratamento com SA quanto com MeJA, e à infecção por *P. pachyrhizi*, com expressão induzida em 24 hpi e 48 hpi em plantas suscetíveis (EMBRAPA48) e reprimida em todos os tempos de infecção analisados em plantas resistentes (PI561356). Esses dados indicam que esse transfator está envolvido em vias de sinalização da interação planta-patógeno (Alves et al., 2015).

Gonçalves (2014) demonstrou a interação do GmbZIPE2 com cis-elementos presentes na região promotora do gene da chalcona sintase 15 (CHS15), ao observar a formação do complexo GmbZIPE2/H-box em ensaio de mudança de mobilidade eletroforética. Weisshaar et al. (1991) também identificaram três bZIPs, CPRF-1, CPRF-2 e CPRF-3 de salsinha capazes de interagir com cis-elementos presentes no gene da CHS.

A CHS15, EC 2.3.1.74, catalisa a condensação descarboxilativa da p-coumaroil-CoA com três malonil-CoA produzindo a naringenina chalcona (Figura 2), intermediário chave na biossíntese dos fenilpropanoides, como flavonoides e antocianinas, grupo estruturalmente diverso de metabólitos secundários envolvidos na interação planta-ambiente (Noel et al., 2005; Abe and Morita, 2010). Muitos fenilpropanoides induzidos por estresse são derivados de um esqueleto flavonoide de 15 carbonos, o resultado da reação da CHS15 (Harborne, 1988). A indução de CHS e acúmulo de fitoalexinas têm sido observados em interações incompatíveis mais rapidamente do que em interações compatíveis (Heath, 2000). Em soja, a indução de genes envolvidos na via de fenilpropanoides após infecção por *P. pachyrhizy* ocorre pelo menos um dia antes em plantas resistentes que em susceptíveis (Goellner et al., 2010).

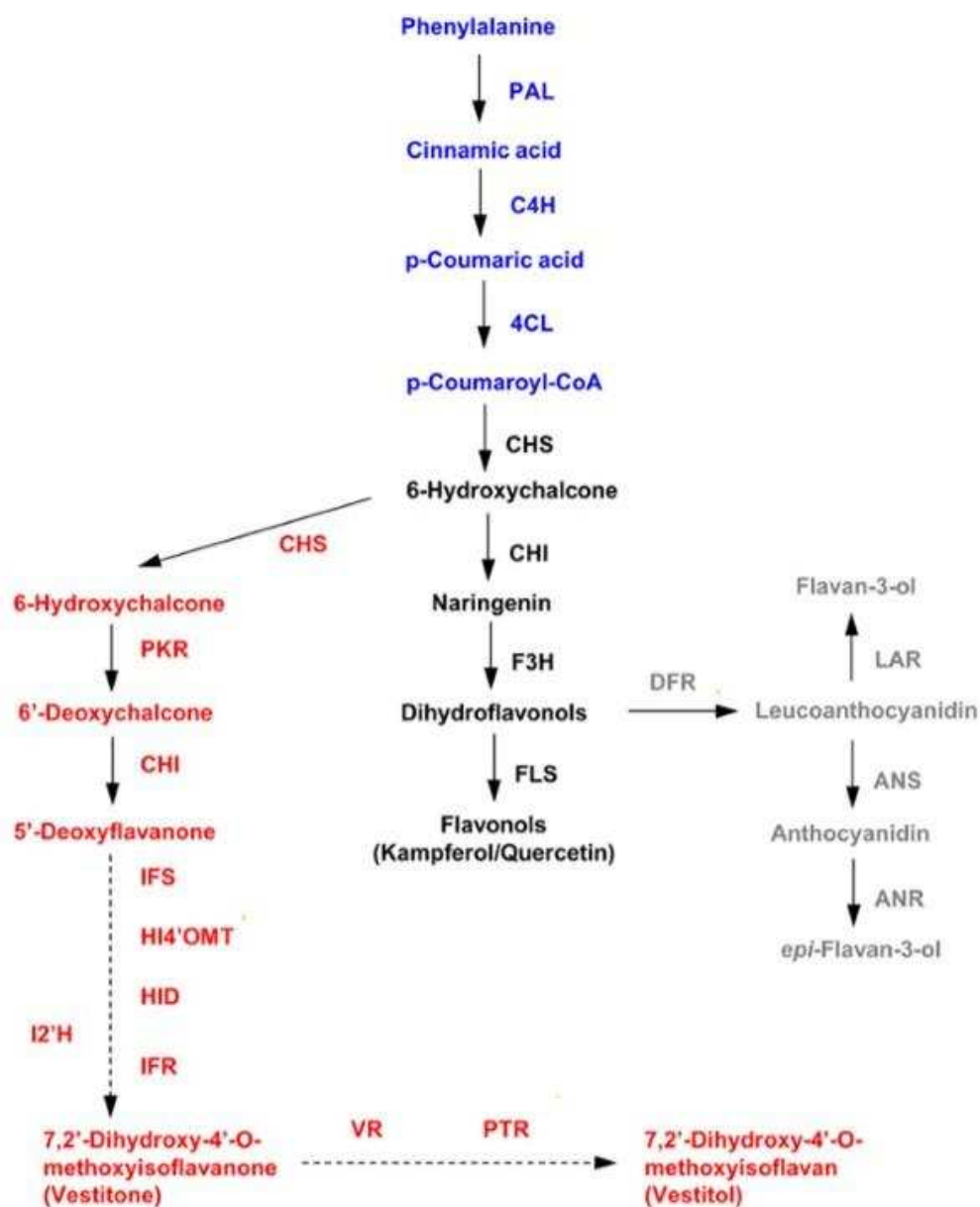


Figura 2: Representação esquemática das principais vias de biossíntese de fenilpropanoides em plantas. As cores representam as classes dos compostos envolvidos nas vias. Azul: fenilpropanoides; preto: flavonoides; vermelho: isoflavonoides; cinza: antocianinas. Abreviações: ANS, anthocyanidin synthase; ANR, anthocyanidin reductase; C4H, Cinnamate 4-hydroxylase; CHI, chalcone isomerase; CHS, chalcone synthase; 4CL, p-coumaroyl CoA-ligase; DFR, dihydroflavonol reductase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; FLS, flavanol synthase; HID, 2-hydroxyisoflavanone dehydratase; HI4'OMT, S-adenosyl-L-Met:2,7,4'-trihydroxyisoflavanone 4'-O-methyltransferase; IFR, isoflavone reductase; IFS, isoflavone synthase; I2'H, isoflavone 2'-hydroxylase; LAR, leucoanthocyanidin reductase; PAL, Phe ammonia lyase; PKR, polyketide reductase; PTR, pterocarpin reductase; VR, vestitone reductase. (García-Calderón et al., 2015 adaptado)

A superexpressão do gene GmbZIPE2 em protoplastos de soja resultou na indução da expressão dos genes CHS15-6 importante para a defesa da planta. Este resultado corrobora com o papel do GmbZIPE2 na defesa da planta, porém mais estudos são necessários para a elucidação do mecanismo utilizado por esse bZIP (Gonçalves, 2014).

Diante da importância das interações proteína-proteína na função dos bZIPs, controlando tanto sua localização quanto sua atividade e das evidências de que o GmbZIPE2 possa estar envolvido em vias de sinalização a estresse, especialmente na resposta contra patógenos, conhecer e caracterizar parceiros de interação da proteína pode auxiliar a desvendar a sua função na resposta de defesa de soja.

3. Objetivos

Identificar parceiros de interação da proteína GmbZIPE2 de soja.

3.1. Objetivos específicos

- Identificar parceiros de interação do GmbZIPE2;
- Compreender o papel das interações na resposta a estresse;
- A partir das interações obtidas, inferir sobre possíveis vias de sinalização em que o fator de transcrição possa atuar.

4. Material e métodos

4.1. Clonagem do gene de GmbZIPE2

Para clonar a sequência codificadora do GmbZIPE2, o gene foi amplificado com oligonucleotídeos específicos (Tabela 1) a partir de cDNA de soja. Em uma segunda reação de PCR utilizando primers com a sequência attb (Tabela 1) foi obtida a sequência de interesse flanqueada pelos sítios de recombinação. Os produtos da amplificação foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), e inseridos no vetor pDONR201 (Anexo 9.1) pela enzima BP clonase (Invitrogen). O vetor obtido, pDONR201-GmbZIPE2, foi utilizado para transferência do cDNAs para o vetor pDEST32 (LEU2,CEN, Gentamicina^R) (Anexo 9.2) pela enzima LR clonase (Invitrogen), pelo sistema Gateway, resultando no clone pBD-GmbZIPE2 (pDEST32-GmbZIPE2), em que a sequência do GmbZIPE2 está fusionada ao domínio de ligação ao DNA (BD) do Gal4p.

Tabela 1: Oligonucleotídeos específicos para amplificação e clonagem do GmbZIPE2 e para amplificação de vetores

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')
GmbZIPE2 Fw	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGCAAATTCAAAGGGCTC
GmbZIPE2 Rv	AGAAAGCTGGGTCGCGGCCGCAAGCTTCTAAATTCTGA GAGCAGGGT
attb1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC
attb2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC
pEXP-AD502 Fw	CGGTCCGAACCTCATAACAACCTC
pEXP-AD502 Rv	GTAAATTTCTGGCAAGGTAGAC

4.2. Ensaio de transativação do GmbZIPE2

Um ensaio preliminar de transativação foi realizado para determinar a capacidade da proteína GmbZIPE2 sozinha ativar o sistema repórter. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* AH109 (MATa, trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his3-200, *gal4Δ*, *gal80Δ*, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ) foi transformada pelo método do acetato de lítio/polietilenoglicol, com os vetores pBD-GmbZIPE2 e pAD-vazio (que seria utilizado no screening) e o resultado da transformação foi plaqueado em meio de seleção SD (synthetic dropout) na ausência de leucina e triptofano (SD-LEU-TRP).

As colônias AH109 pDEST32-GmbZIPE2/pAD-vazio foram crescidas em meio líquido e utilizadas no ensaio de transativação do gene repórter HIS3, segundo orientações do manual da Clontech, variando-se a concentração 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol) no meio. O resultado desse ensaio foi utilizado para determinar a concentração do inibidor a ser utilizado na varredura.

4.3. Varredura para identificação de interação proteína-proteína pelo sistema de duplo híbrido de leveduras

A varredura pelo duplo híbrido de leveduras foi realizada de acordo com as instruções do manual da Clontech. Como isca foi utilizada a construção pBD-GmbZIPE2 e como presa uma biblioteca de cDNA de soja (Alves et al., 2011). A biblioteca foi construída com o vetor pEXP-AD502 (TRP1, CEN, Ampicilina^R) (Anexo 9.3), vetor que permite a produção da proteína fusionada ao domínio de ativação (AD) de Gal4p.

Leveduras AH109 foram transformadas utilizando o método do acetato de lítio/polietilenoglicol, com o vetor pBD-GmbZIPE2 e os transformantes foram selecionados em meio deficiente em leucina (SD-LEU). Após confirmação dos transformantes, as leveduras AH109 pBD-GmbZIPE2 foram inoculadas em meio SD-LEU e crescidas overnight a 28°/180 rpm. O pré-inóculo foi transferido para 80 mL de meio SD-LEU e mantido a 28°/180 rpm até D.O.₆₀₀ 0,4-0,6. A cultura foi centrifugada a 5000 x g por 10 min, e o pellet ressuspensionado em água destilada autoclavada. O passo de lavagem foi repetido três vezes. Na última lavagem, o pellet foi ressuspensionado no mix de transformação (7,2 mL de polietilenoglicol (PEG) 50 % (m/v), 1,08 mL de acetato de lítio 1 M, 1,5 mL de DNA fita simples de salmão (ssDNA) previamente fervido por 5 min e 1,02 mL de DNA (20 µL de biblioteca de cDNA de soja + 1 mL de água)) e mantido a 42°C por 50 min. A transformação foi centrifugada a 3000 x g/20°C por 10 min e o pellet lavado com água destilada por três vezes e ressuspensionado em meio seletivo SD-LEU-TRP-HIS. A transformação foi plaqueada em meio SD-LEU-TRP-HIS adicionado de 30 mM de 3-AT.

As colônias crescidas foram transferidas para meio de seleção líquido e os plasmídeos foram extraídos com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Com os primers do pEXP-AD502 (Tabela 1) as sequências das presas obtidas foram amplificadas e os produtos de PCR foram submetidos ao sequenciamento. Para amplificação do número de cópias dos vetores-presa e manutenção em estoque, os

plasmídeos extraídos foram utilizados para a transformação de bactérias DH5 α eletrocompetentes. O plasmídeo-presca extraído foi utilizado para transformar AH109 pBD-GmbZIPE2 para que os experimentos fossem repetidos e tivesse maior confiabilidade da interação encontrada.

4.4. Caracterização das interações pela ativação de genes repórteres

As interações obtidas foram caracterizadas quanto à ativação de dois genes repórteres, segundo orientações do manual da Clontech.

O primeiro desses genes repórteres, HIS3, codifica a enzima His3p (imidazolglicerol-fosfato desidratase). A expressão desse gene confere capacidade de crescimento em meio deficiente em histidina a linhagens de leveduras auxotróficas para esse aminoácido. Essa enzima possui um inibidor competitivo, o 3-AT. A força das interações reflete-se na expressão dos níveis de His3p e, conseqüentemente, na sobrevivência das leveduras em elevadas concentrações do inibidor.

Para este ensaio, as leveduras obtidas na varredura foram plaqueadas em meios seletivos SD-LEU-TRP-HIS com diferentes concentrações de 3-AT, variando de 30 a 100 mM, e crescidas em estufa a 28°C por 4 dias.

O segundo gene, o LacZ, codifica a enzima β -galactosidase e a atividade desse gene pode ser visualizada pela degradação de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo), ensaio no qual as interações entre proteínas são identificadas pelo aparecimento de coloração azul.

No ensaio desse gene repórter, as leveduras foram transferidas para membrana de nitrocelulose sobre meio sólido YPD-A, e deixadas crescer a 28°C overnight. A membrana foi submersa em nitrogênio líquido para a lise das células e colocada sobre papel filtro embebido em Tampão Z (Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM pH7,0) adicionado de X-gal (0,5 mg/mL) e beta-mercaptoetanol. A membrana foi incubada a 28°C até o desenvolvimento de coloração azul.

A atividade do gene repórter LacZ foi quantificada também pelo ensaio de transativação em meio líquido, que utiliza ONPG (o-nitrofenil- β -galactosídeo) como substrato, que, quando quebrado pela enzima, altera a coloração para amarelo. Para o ensaio, as leveduras foram inoculadas em meio SD-LEU-TRP e crescidas overnight a 28°C. O pré-inóculo foi então transferido para meio YPD-A e crescido até a D.O.₆₀₀ ~1,0. As células foram recuperadas por centrifugação e ressuspensas em Tampão Z,

clorofórmio e SDS e lisadas sob agitação em vórtex. ONPG (4mg/mL em tampão Z) foi adicionado para iniciar a reação. As amostras foram incubadas a 28°C e, assim que houve o aparecimento da cor amarelada, a reação foi parada pela adição de Na₂CO₃ 1 M. A atividade foi determinada pela diferença na absorbância a 420 nm. Os ensaios foram realizados com três réplicas biológicas (Amberg et al., 2005). O controle positivo dos ensaios foram os plasmídeos clonados com duas proteínas que já se tem a confirmação da interação entre elas.

4.5. Análise das sequências obtidas no sequenciamento

As sequências obtidas foram analisadas no programa Vecscreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>) para retirada da região correspondente ao vetor pEXP-AD502 e posteriormente analisadas no ORFINDER (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) para identificação do frame de leitura das sequências. As sequências foram analisadas por busca de similaridade no Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) e NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para identificação das proteínas correspondentes.

4.6. Predição de peptídeos de trânsito de cloroplasto para a proteína GmbZIPE2

Para a predição da existência de peptídeos de trânsito de cloroplasto (cTP) na proteína GmbZIPE2, a sequência aminoacídica foi analisada em algoritmos de predição de sequências sinais TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) e PSORT (<http://psort.hgc.jp/form.html>).

4.7. Técnicas de biologia molecular

Todas as técnicas de Biologia Molecular não descritas foram conduzidas de acordo com Sambrook et al. (1989).

5. Resultados

5.1. Ensaio de transativação do sistema repórter pela isca GmbZIPE2

O ensaio de transativação do sistema repórter HIS3 pela proteína GmbZIPE2 se fez necessário para evitar a captura de presas inespecíficas, principalmente devido à proteína isca de interesse ser um transfator. Nesse ensaio, a levedura AH109 pBD-GmbZIPE2/pEXP-AD502-vazio foi capaz de crescer apenas no meio seletivo SD-LEU-TRP-HIS sem a adição de inibidor, indicando apenas uma pequena atividade de transativação da isca. Em todas as concentrações de 3-AT testadas, não foi observado crescimento. Assim, a concentração a ser utilizada na varredura foi 30 mM de 3-AT.

5.2. Identificação e caracterização de parceiros de interação do GmbZIPE2

Após sete dias de incubação das placas da varredura do duplo híbrido de leveduras, 22 clones foram obtidos, identificados como 1DH, 2DH, e assim até o 22DH, sendo estes transferidos para meio líquido seletivo SD-LEU-TRP-HIS. Apenas os clones 1, 2, 3, 9, 10, 11, 15, 18, 19, 21 e 22 DH cresceram e a partir desses foi realizada a extração do DNA.

Os plasmídeos obtidos foram utilizados para a amplificação dos genes contidos no vetor com os primers pEXP-AD502 (Tabela 1) para estimar o tamanho dos insertos de cDNA das presas (Figura 3). Os produtos do PCR apresentaram tamanhos variados, de 500 até 1500 pb. Apenas dois clones apresentaram mais de uma banda de amplificação, podendo indicar a presença de mais de um vetor da biblioteca de cDNA na levedura. Os produtos dos PCR foram enviados para sequenciamento.

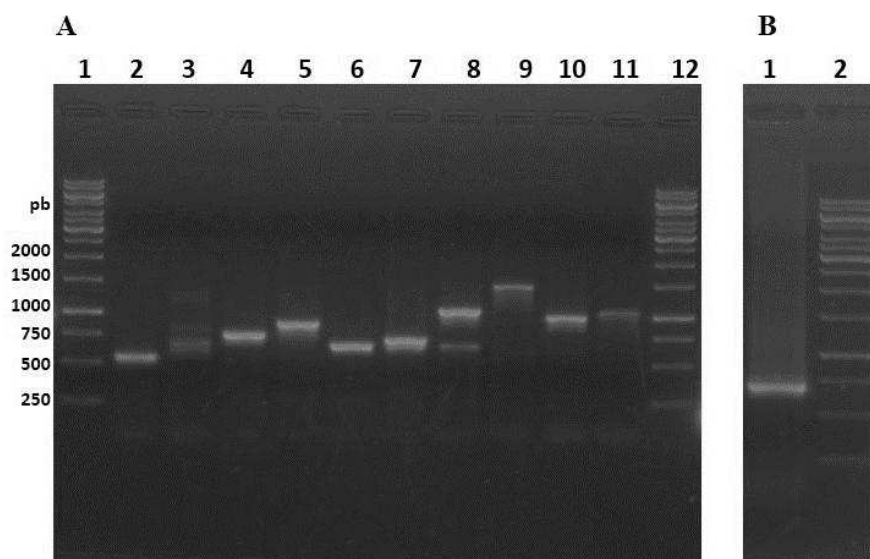


Figura 3: Gel de agarose para visualização dos fragmentos amplificados a partir dos clones obtidos no screening do duplo híbrido. A: 1. 1 kb DNA Ladder (Sinapse), 2: 1DH, 3: 2DH, 4: 3DH, 5: 9DH, 6: 10DH, 7: 11DH, 8: 15DH, 9: 18DH, 10: 19DH, 11: 22DH, 12: 1 kb DNA Ladder (Sinapse); **B:** 1: 21 DH; 2: 1 kb DNA Ladder (Sinapse).

O ensaio de transativação do gene repórter HIS3 e LacZ foi realizado com os clones, variando-se a concentração de 3-AT nos meios. Apenas os clones 3 e 18 DH cresceram em meios adicionados de 3-AT e apresentaram coloração azul, similar ao controle positivo dos experimentos. Ao aliar os resultados dos genes repórteres com o sequenciamento descrito abaixo, as demais colônias foram consideradas falso-positivas, pois o quadro de leitura das proteínas identificadas não estava em frame com o domínio AD-GAL4 do vetor e, por essa mudança na tradução, códons de parada apareciam logo no início do gene.

Os plasmídeos-presa extraídos foram então utilizados para transformar AH109 pBD-GmbZIPE2 para que os ensaios de transativação fossem realizados e assim ter maior confiabilidade da interação encontrada. No ensaio do gene repórter HIS3, os clones 3DH apresentaram crescimento até 45 mM de 3-AT e os 18DH cresceram até 100 mM (Figura 4). Observa-se ainda que o GmbZIPE2 apresenta capacidade de homodimerização, crescendo até 20 mM do inibidor.

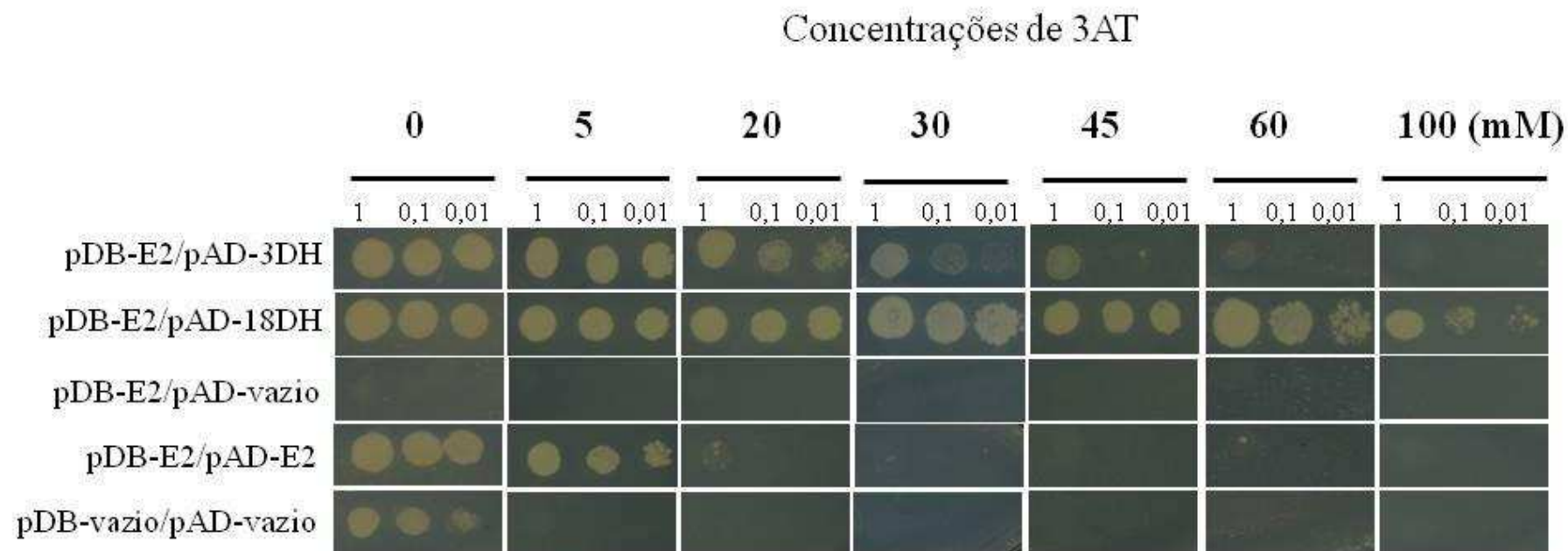


Figura 4: Ensaio de ativação do gene repórter HIS3. Crescimento das colônias em meio sólido seletivo SD-LEU-TRP-HIS com diferentes concentrações de 3-AT após quatro dias de incubação a 28°C. As concentrações de 3-AT utilizadas foram 0, 5, 20, 30, 45, 60 e 100 mM do inibidor. O ensaio foi realizado com os clones pBD-E2/pAD-3DH, pBD-E2/pAD-18DH, pDB-E2/pAD-vazio, pBD-E2/pAD-E2 e pBD-vazio/pAD-vazio, com as gotas referentes a DO 1, 0,1 e 0,01. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica e como controle positivo foi utilizado duas proteínas que já se sabe da interação.

Como os ensaios de duplo-híbrido são suscetíveis a muito falso-positivos, o uso de mais de um gene repórter auxilia na identificação de verdadeiras interações. No teste de transativação do gene repórter LacZ, os dois clones também foram capazes de ativar o sistema, apresentando coloração azul no ensaio qualitativo com X-Gal, semelhante ao controle positivo, e atividade, medida em unidades relativas de β -galactosidase, no ensaio do ONPG, de aproximadamente 4 e 2,5 vezes maior que o controle negativo para os clone 3DH e 18DH, respectivamente (Figura 5).

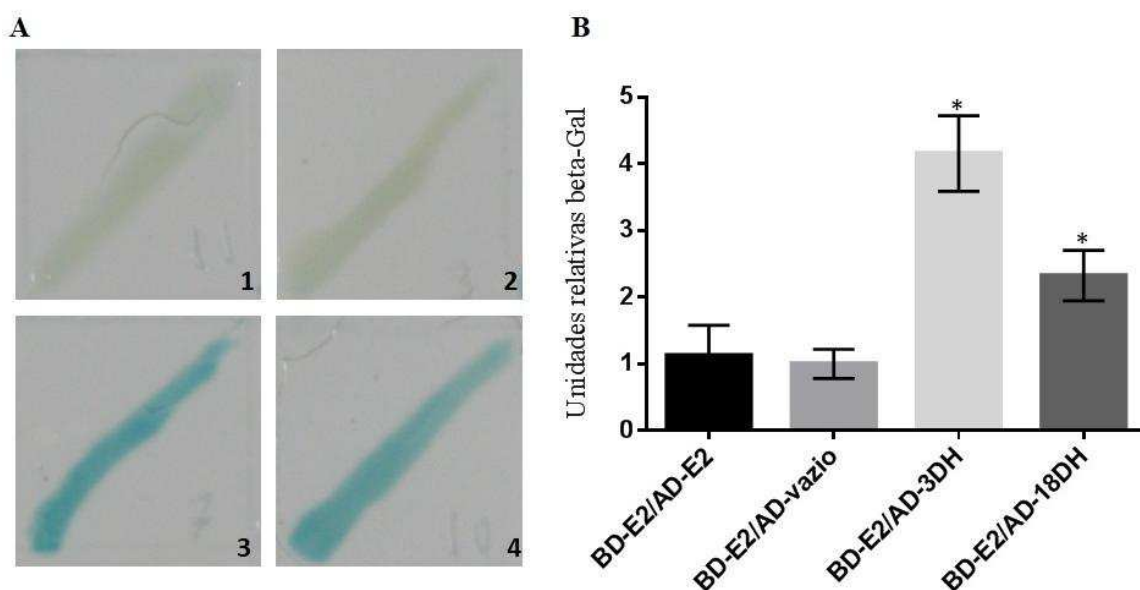


Figura 5: Ensaio qualitativo e quantitativo da atividade da enzima β -galactosidase. A. Ensaio qualitativo em membrana de nylon: 1: BD-E2/AD-E2; 2: DB-E2/AD-vazio, 3: BD-E2/AD-3DH, 4: BD-E2/AD-18DH. B: Ensaio quantitativo da ativação do gene repórter lacZ. O asterisco indica os valores das médias que diferem estatisticamente do controle no Teste t.

5.3. Análise das sequências dos clones do duplo híbrido

As sequências obtidas no sequenciamento foram analisadas e, após o alinhamento destas no BLAST e Phytozome, identificaram-se as proteínas codificadas por cada clone da biblioteca (Tabela 3). A partir desses dados, os transformantes, exceto 3 e 18 DH, foram considerados falso-positivos, atentando-se para o estudo apenas das proteínas codificadas pelos clones 3 e 18 DH (destacadas em negrito na Tabela 3). A análise do quadro de leitura mostrou que ambas estavam em frame com o domínio AD-GAL4 do vetor, indicando que a tradução da proteína final correspondia à identificada no alinhamento.

Tabela 3: Identificação dos clones obtidos no screening.

Clone	Proteína
1DH	-Não foi possível identificar-
2DH**	G. max probable fructose-bisphosphate aldolase 2
3DH	G. max uncharacterized LOC100786585 (RbcX)
9DH*	G. max thioredoxin-like 1-1, chloroplastic-like
10DH*	Calcium binding complex CML38-like
11DH*	G. max aminolivulinate, delta-, dehydratase (HEMB)
15DH*	G. max differentially expressed in soybean LOC548098
18DH	G. max uncharacterized LOC100777895
19DH*	G. max putative lactoylglutathionelyase-like, transcript X2
21DH**	Predicted G. max serine hidroxymethyltrasnferase 3, X1
22DH*	G. max uncharacterized LOC547916 (BetV-like)

*Sequência do clone não está em frame com o domínio AD-GAL4 do vetor. ** Alinhou apenas na região 3'UTR.

A sequência do clone 3DH apresentou similaridade de 99% (249/251 pb) com a proteína G. max uncharacterized LOC100786585 no NCBI (NP_001241067.1), identificada no Phytozome como Chaperonin-like Rbcx Protein, Glyma08g335500. A região identificada no screening compreende 112 pb da CDS e parte da região 3'UTR.

A região codificadora do gene compreende de 272-949 pb, tendo a proteína então 225 resíduos de aminoácidos (aa) e 25,6 kDa. O splicing alternativo do transcrito primário pode resultar em outros dois transcritos, sendo que apenas o primário contém a região identificada na interação com o GmbZIPE2, que corresponde a região de 839-1079 pb do mRNA de 1141pb. A região de 620-808 pb do mRNA corresponde à região do domínio RbcX, como mostrado na figura 6, que caracteriza a funcionalidade da proteína.

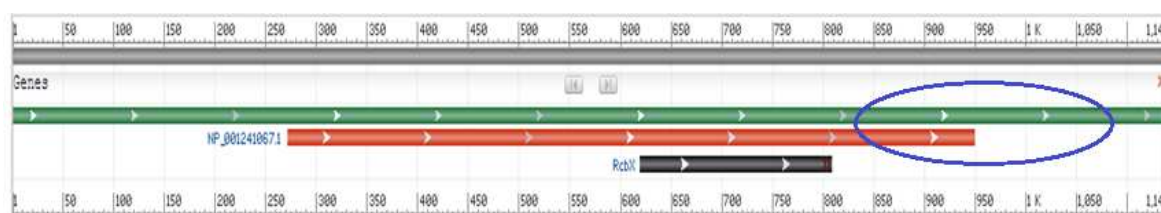


Figura 6: Representação esquemática do gene Glycine max uncharacterized LOC100786585. Representação do mRNA, da CDS e região correspondente ao domínio RbcX da proteína em soja. A região circutada de azul corresponde a identificada na interação com o GmbZIPE2 (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/359806917?report=graph>)

Em *A. thaliana*, a proteína RbcX é identificada como uma proteína do tilacóide no cloroplasto que atua como chaperona no dobramento da Rubisco, um processo complexo e não completamente entendido. A ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) I, enzima responsável pela fixação de CO₂ atmosférico durante a fotossíntese, é composta por oito subunidades maiores (RbcLs - codificadas pelo genoma plastidial) e 8 menores (RbcSs – codificadas pelo genoma nuclear) (Kolesiński et al., 2011). Seu correto dobramento depende de chaperonas moleculares, moléculas importantes para mediar dobramento e prevenir agregação de polipeptídeos recém-formados ou desnaturados pelo estresse, sendo a proteína RbcX apontada como importante nesse sistema de enovelamento de certas Rubiscos de cianobactérias, atuando downstream ao sistema chaperonina (Saschenbrecker et al., 2007; Liu et al., 2010; Durão et al., 2015). A RbcX funcionaria como uma braçadeira molecular, ao se ligar à subunidade RbcL, na região C-terminal – EIKFEFD, que permanece parcialmente desordenada após processamento pela chaperonina, e estabilizar a formação do dímero antiparalelo, facilitando assim a formação do complexo RbcL₈. Por possuir ortólogos em plantas e algas verdes, essa é considerada uma via conservada de dobramento (Kolesinski et al., 2013; Durão et al., 2015).

A proteína RbcX atua como homodímero no estroma do cloroplasto. Em *A. thaliana*, as características iniciais das proteínas RbcX em plantas superiores foram relatadas por Kolesiński et al. (2011). Foram descritas duas isoformas de RbcX, denominadas X1 (At4G04330) e X2 (At5G19855). A duplicação gênica muitas vezes pode estar relacionada à adaptação da planta a vários estímulos ambientais e estresses. A proteína X2 apresenta expressão estável em diferentes estresses e a X1 tem expressão responsiva a esses estresses, como salinidade, dessecação, frio, nos quais sua expressão é aumentada de 6 a 12 vezes, e oxidativo, em que sua expressão diminui, possivelmente decorrente à menor taxa de tradução da Rubisco (Saschenbrecker et al., 2007; Bracher et al., 2011; Kolesiński et al., 2011).

No genoma de *Glycine max* Wm82.a2.v1 no Phytozome, cinco genes foram identificados com RbcX. O alinhamento das sequências aminoacídicas com os ortólogos de *A. thaliana* (Figura 7) revela similaridades entre as sequências, sendo que a RbcX encontrada no screening foi agrupada no mesmo clado que a isoforma X2 de *Arabidopsis* e de outras duas RbcX de soja. Essas últimas apresentam região aminoacídica idêntica a encontrada na interação com GmbZIPE2, podendo ser também parceiras de interação do transfator.

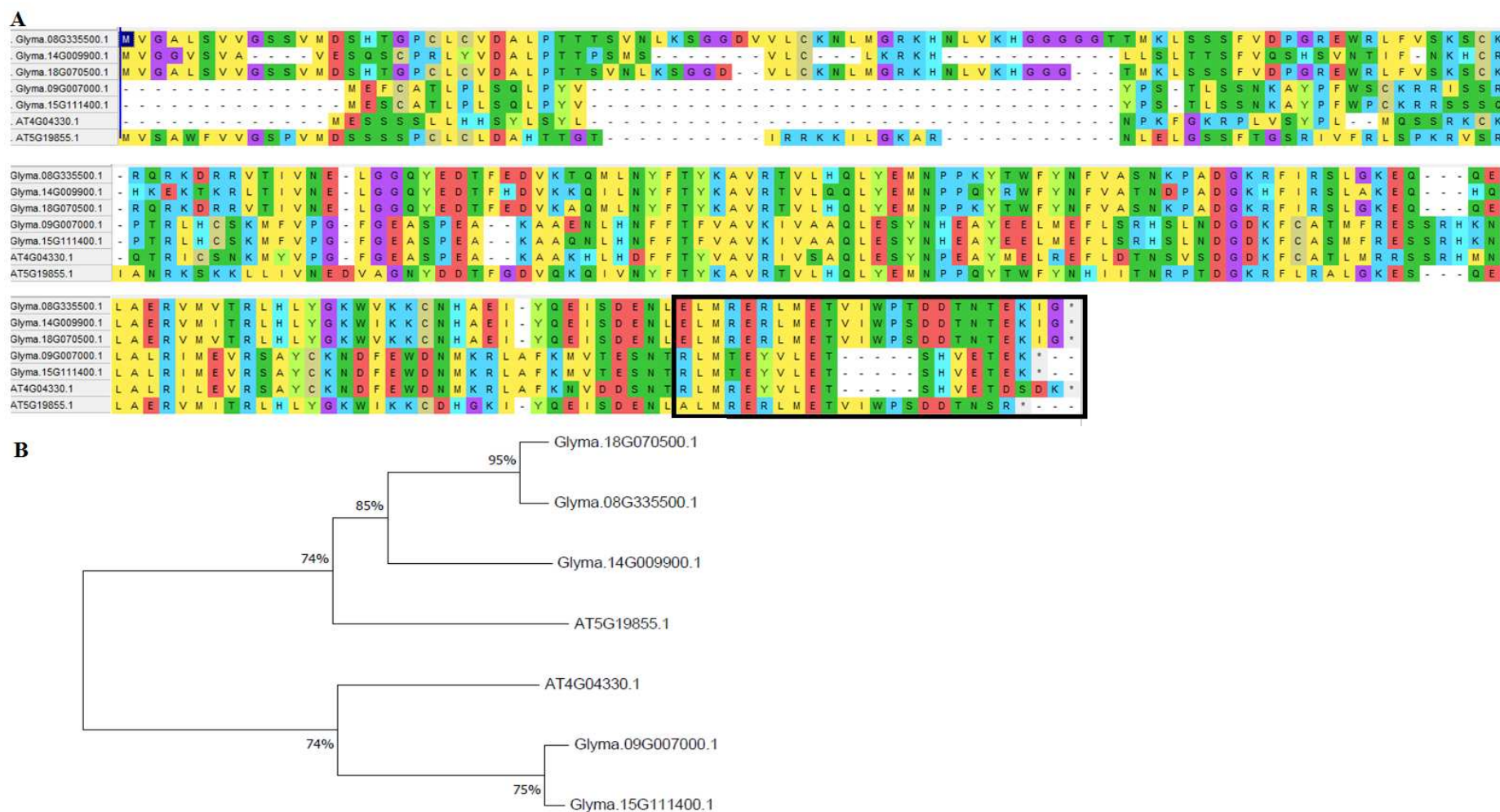


Figura 7: Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos das proteínas RbcX de soja e *A. thaliana*. A. Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos das proteínas. A região destacada em preto corresponde aos resíduos de aminoácidos encontrados na interação com GmbZIPE2. **B:** Árvore filogenética inferida usando o método de Neighbor-Joining realizadas em MEGA7.

A segunda sequência obtida, do clone 18DH, apresentou similaridade de 94% (636/680 pb) com a proteína não caracterizada de *G. max* LOC100777895 no NCBI (NP_001241154.1), no Phytozome identificada pelo Glyma09g232600.1. O mRNA do gene possui 955pb, sendo que a CDS de 67-588 pb, tendo a proteína 173 aa e 19,1 kDa. A região identificada no screening corresponde à região do 5'UTR e a região N-terminal da proteína, de 1-515 pb da CDS do gene. No Phytozome não há descrição de nenhum domínio conservado. No Uniprot, no entanto, a proteína é relacionada à montagem do fotossistema II (PSII), com localização predita para o tilacoide do cloroplasto, sendo uma proteína integral da membrana. A análise da proteína em ferramentas de predição de regiões transmembrana (TMHMM - <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>, TMPred - http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html- e DAS-TM - <http://mendel.imp.ac.at/sat/DAS/DAS.html>) indicou a presença de duas hélices transmembrana, de aproximadamente 102 a 124 aa e de 139 a 161 aa.

Ao alinhar a sequência obtida pelo BLASTX, esta apresenta 66% de identidade e 75% de positividade com a proteína Predicted Low Psii Accumulation 2, chloroplastic de *Vigna radiata* var. *radiata*. No Phytozome, a busca pelas palavras-chave “low PSII accumulation” identifica cinco genes no genoma da soja. No alinhamento das sequências de resíduos de aas das proteínas de soja e *A. thaliana*, a proteína não caracterizada de *G. max* apresentou-se mais similar à LPA2 de *Arabidopsis*, estando no mesmo clado que as proteínas LPA3 de ambos organismos (Figura 8).

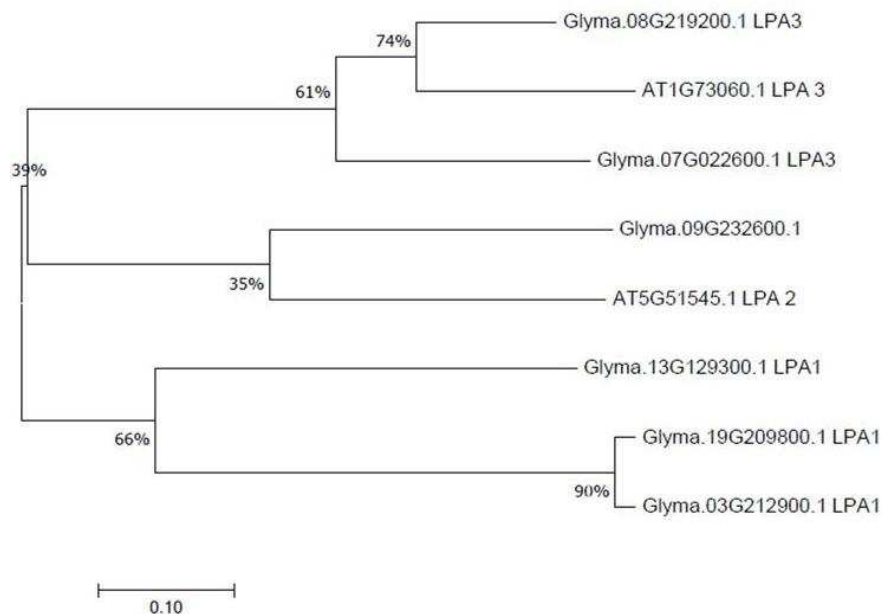


Figura 8: Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos das proteínas LPA 1, 2 e 3 de soja e *A. thaliana* e a proteína *G. max uncharacterized LOC100777895*. Árvore filogenética inferida usando o método de Neighbor-Joining realizadas em MEGA7 para as proteínas LPA 1, 2 e 3 de soja e *A. thaliana* e a proteína *G. max uncharacterized LOC100777895*.

5.4. Predição da localização subcelular de GmbZIPE2

A análise da sequência aminoacídica do GmbZIPE2 em algoritmos de predição de sequências sinais como o TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) e PSORT (<http://psort.hgc.jp/form.html>) indicaram a possível presença de um peptídeo de trânsito cloroplasto (cTP) e a possível localização dessa proteína no plastídeo (Figura 9).

A

MANSKGSSGFRNFMYPGKHPLLPKSPFPSVSQAYADYVPNPAVGLKAGNRPR
 DGNTHHQRTSSESLVIEEQPSWLDDLLNEPETPVRRGGHRRSSSDSFAYIDTVNA
 SNINYANQDEYKYKNMMSIPSWSSQDFDRSKDARHVPVYAEMNSVKQKNRSWD
 SFSNAMTNPVGVPSPGKDSAAFQSSGLQCTPHEADGLPPASSEKHDSVESGLQDA
 KPFPEKKDSSHAKSSASET**DTKRAKQQFAQRSRVRLQYIAELERNVQVLQAEG**
SEVSAELEFLNQQNLILSMENKALKQRLANIAQEQLIKYLEQEVLEREIGRLRALYQ
 QQQQPQTQPQQPPSGSHRTNSRDLESQFANLSLKHKDTNSGQDPALRI

B

CENTER FOR
BIOLOGICAL
SEQUENCE
ANALYSIS
CBS

ChloroP 1.1 Server - prediction results

Technical University of Denmark

```
### chlorop v1.1 prediction results #####
Number of query sequences: 1
```

Name	Length	Score	cTP	CS- score	cTP- length

Sequence	375	0.524	Y	3.773	35

Figura 9: Predição da localização subcelular de GmbZIPE2. **A:** Sequência aminoacídica da proteína GmbZIPE2. Em vermelho, destaca-se a região predita como peptídeo de trânsito de cloroplasto (cTP) e, em verde, a região correspondente ao domínio bZIP. **B:** Resultado obtido no ChloroP na análise da sequência de resíduos de aminoácidos do transfator. "Y" significa que a sequência apresenta uma região que pode conter um cTP.

6. Discussão

Os fatores de transcrição bZIP são regulados por interações proteína-proteína e a compreensão desse mecanismo é essencial para o entendimento da função do FT em diferentes processos biológicos. A homodimerização é um dos exemplos de interação que modula a afinidade dos FTs por determinado cis-elemento (Sornaraj et al. 2016). A levedura Ah109 pBD-GmbZIPE2/ pAD-GmbZIPE2 foi capaz de ativar o sistema repórter HIS e LacZ (Figura 4 e 5). Isso demonstra a capacidade do bZIP em formar homodímeros, o que caracteriza um mecanismo de regulação da função desse fator nas vias de defesa, seja a estresse biótico ou abiótico, já que estas interações podem afetar a afinidade e especificidade de ligação aos cis-elementos (Jakoby et al. 2002).

O entendimento desses mecanismos de regulação, como a descoberta de possíveis parceiros de interação do transfator, pode auxiliar a desvendar a sua função na resposta de defesa de soja. Em nosso estudo, a proteína GmbZIPE2 foi capaz de interagir com 3DH- G. max uncharacterized LOC100786585 (RbcX) e 18DH- G. max uncharacterized LOC100777895, similar a LPA. Ambas as proteínas identificadas na varredura são aparentemente proteínas plastidiais. Para que a interação entre estas e o GmbZiPE2 seja possível, é necessária a colocalização das proteínas em um mesmo compartimento subcelular. Essa é uma desvantagem da técnica de duplo híbrido, já que as interações obtidas no ensaio podem não ocorrer no contexto celular devido a diferenças na localização subcelular.

A predição da localização subcelular de GmbZiPE2 indicaram a possível presença de um peptídeo de trânsito cloroplasto (cTP) e a possível localização dessa proteínas no plastídeo. Alves (2013) havia demonstrado que a função da proteína bZIP poderia estar sob controle da localização subcelular devido à dupla localização do transfator. O ensaio, no entanto não consegue determinar de forma precisa se a construção YFP-GmbZIPE2 se localizou apenas no espaço citoplasmático ou se também pode ser encontrada nas demais organelas, como predito nos algoritmos. A dupla localização de moléculas em diferentes compartimentos subcelulares pode estar associada à transmissão de sinais. A resistência a doenças ou tolerância a estresses abióticos se dá por essa transmissão, que permite a fina comunicação entre diferentes vias de sinalização (Kangasjärvi et al., 2012), existindo crosstalk entre as resposta a estresse biótico e abiótico (Saibo et al., 2009).

A relativa “força” das interações, verificada pelo crescimento dos transformantes até 45 e 100 mM de 3-AT, para o clone 3DH e 18DH respectivamente (Figura 4),

corroborar a ideia de que estas interações possam desempenhar papel importante na modulação do GmbZIPE2 e, a partir das funções relatadas na literatura de cada proteína, pode-se supor o mecanismo de sinalização envolvendo o transfator e seus parceiros de interação (Figura 10).

Em situações ambientais favoráveis, por exemplo, em que não há necessidade de montagem/reparo de PSII, a proteína LPA pode estar na membrana do tilacoide não associada com proteínas do fotossistema e, ao interagir com o GmbZIPE2, o retém na membrana, impedindo que o transfator atue na sinalização. Nessas condições, a fotossíntese está atuando em condições ótimas, podendo acarretar na maior tradução de Rubisco, que mantém RbcX atuando como chaperona, interagindo com as RbcLs (Figura 10A).

A cadeia transportadora de elétrons na fotossíntese, no entanto, é um grande sensor de estresses, auxiliando em ajustes que otimizem a eficiência fotossintética. Assim, as condições ambientais são percebidas por esses checkpoints moleculares, como o estado redox dos componentes da cadeia transportadora de elétrons, a pressão de excitação de PSII ou a concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Lepage et al., 2013). Em condições estressantes, ROS são produzidos como resultado da geração de fótons em maior quantidade do que a necessária ou mesmo de respostas celulares a estresses diversos, podendo ser altamente tóxicos para as células. Para que estes efeitos sejam reduzidos, as plantas possuem mecanismos de desintoxicação, seja pela ação de enzimas (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), dentre outras) ou de antioxidantes não enzimáticos (flavonoides, carotenoides, antocianinas). Em respostas a vários estresses, bióticos e abióticos, o conteúdo desses antioxidantes é alterado no organismo (Pfannschmidt, 2003; Fernández and Strand, 2008; Brunetti et al., 2015; Devi and Giridhar, 2015).

Mesmo com os sistemas antioxidantes, os danos oxidativos podem induzir inibição dos fotossistemas e mecanismos de reparo, que envolvem a substituição da proteína do centro de reação D1, principal alvo dos danos oxidativos. As proteínas LPA estão envolvidas na montagem e reparo de PSII. LPA1 pode atuar como chaperona, assistindo no dobramento e integração de D1 na membrana tilacoide e promovendo a interação de D1 e D2. Já LPA3 interage com CP43 e LPA2, auxiliando na montagem de CP43 no complexo PSII. A associação de LPA nessas condições com a membrana aumenta, no intuito de auxiliar na montagem das subunidades do PSII durante o mecanismo de reparo para a manutenção das atividades fotossintéticas (Peng et al., 2006; Cai et al., 2010; Järvi et al.,

2015). Nessas situações, LPA deixaria de interagir com o GmbZIPE2 para assistir na montagem do PSII, liberando-o no estroma (Figura 9B).

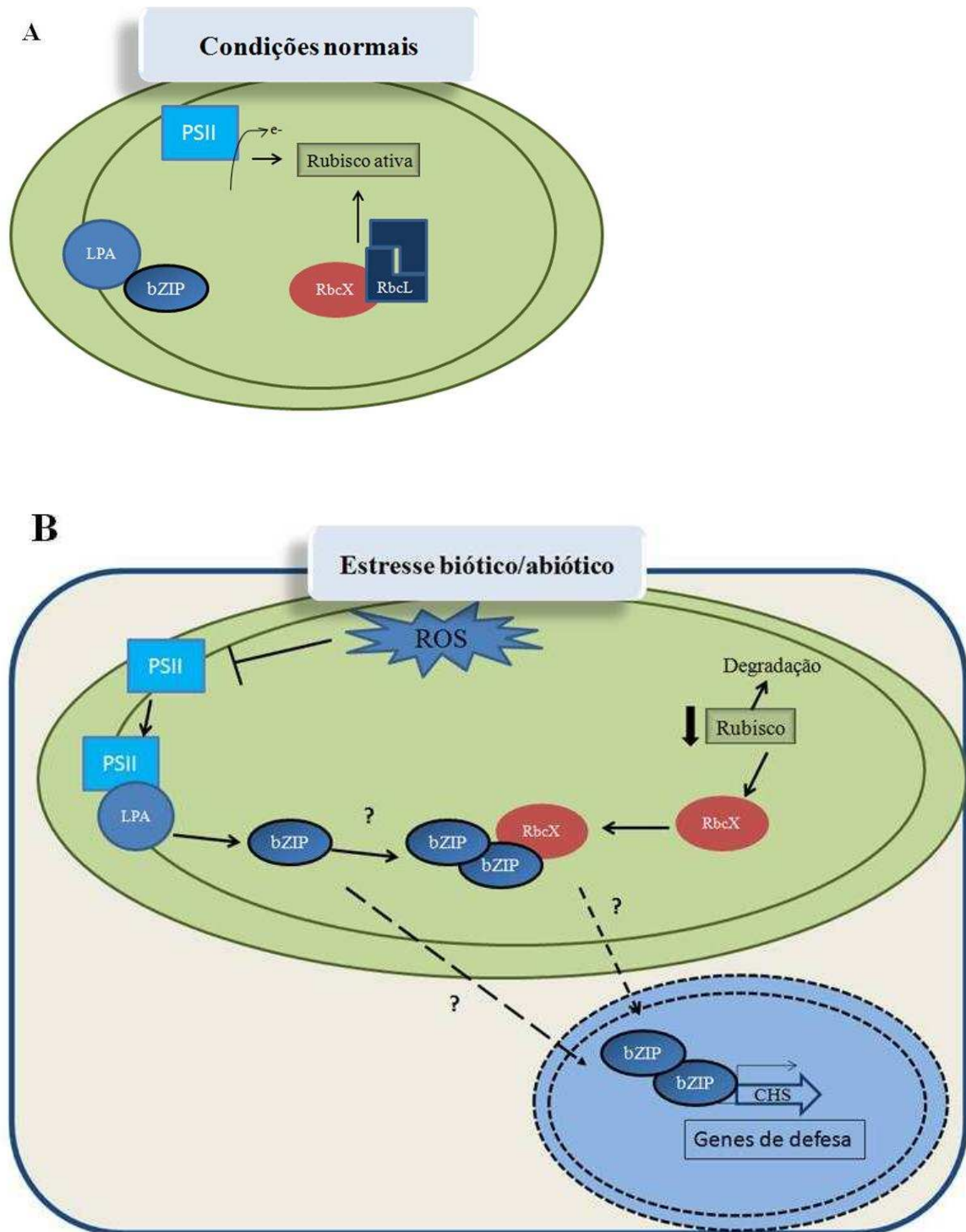


Figura 10: Modelo esquemático da via inferida para a possível atuação do fator de transcrição GmbZIPE2 em resposta a estresse bióticos e abióticos na sinalização retrógrada. A. Via representativa da situação normal. A interação com LPA mantém o GmbZIPE2 associado a membrana, impedindo que o transfator atue na sinalização. A fotossíntese atuando em

condições ótimas, pode acarretar na maior tradução de Rubisco, que mantém RbcX atuando como chaperona da Rubisco, interagindo com as RbcLs. **B. Via representativa da situação sob estresse.** Em condições estressantes, a produção de ROS podem induzir inibição dos fotossistemas e mecanismos de reparo. Nessas situações, LPA deixa de interagir com o GmbZIPE2, liberando-o no estroma, para assistir na montagem do PSII. A inibição da fotossíntese e consequente diminuição da Rubisco. Assim, pode ser que nessas condições a RbcX livre interaja com o GmbZIPE2, que agora se encontra no estroma do cloroplasto, desencadeando a sinalização da resposta a estresse.

Em condições estressantes e respostas imunes, apesar da aparente necessidade de produção de energia, os genes relacionados à fotossíntese são down-regulados (Kangasjärvi et al., 2012). Em estresse biótico, por exemplo, o gene nuclear que codifica para RbcS foi down-regulado (Bilgin et al., 2010). Análises proteômicas revelaram que sob estresse por seca, diversas proteínas da fotossíntese têm menor expressão em soja (Das et al., 2016). A redução dos níveis fotossintéticos pode ser uma defesa da planta para diminuir a fonte de carbono disponível para o patógeno ou em consequência da necessidade de priorizar energia para as vias de defesa ou de aclimatização (Daurelio et al., 2015). A inibição da fotossíntese pode diminuir a tradução da Rubisco ou a presença de ROS pode resultar na oxidação dos resíduos de Cys em vez de serem carbonilados, acarretando na sua degradação (Foyer and Noctor, 2009). Assim, pode ser que nessas condições a RbcX livre interaja com o GmbZIPE2, que agora se encontra no estroma do cloroplasto, desencadeando a sinalização da resposta a estresse (Figura 10B).

Outro mecanismo de regulação do transfator que explicaria as interações poderia ser pela interação com peptídeos oriundos da degradação oxidativa de proteínas parceiras do cloroplasto como moléculas sinalizadoras, como proposto por Møller and Sweetlove (2010).

No entanto, a real configuração dessa via de sinalização só será elucidada a partir de mais estudos. O que podemos discutir é que se o GmbZIPE2 for transportado do cloroplasto ao núcleo, onde atuará na regulação gênica, este poderia ser um candidato a atuar na sinalização retrógrada.

Na sinalização retrógrada, o sinal do cloroplasto é transportado do plastídeo e age no núcleo, onde o sinal coordena a expressão de genes nucleares, não só de genes relacionados com a fotossíntese como também de resposta a diversos estresses (Fernández and Strand, 2008; Leister, 2012). Sinais relativos à disponibilidade de luz, por exemplo,

são provenientes do cloroplasto e transmitidos para o núcleo (Foyer et al., 2016). Três moléculas clássicas de sinalização retrógrada são o Mg-ProtoporfirinaIX (Mg-ProtoIX), o 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato (PAP), que se acumula em resposta a estresse de seca e alta luminosidade, e o β -ciclocitral (β -CC), produto de oxidação do β -caroteno (Leister, 2012). Outras moléculas também são reconhecidas como envolvidas na sinalização retrógrada, como o MEcPP (methylerythritol cyclodiphosphate), precursor de isoprenoides, o estado redox dos componentes da cadeia transportadora de elétrons e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Fernández and Strand, 2008; Xiao et al., 2012).

Há ainda moléculas proteicas envolvidas na convergência dos sinais dos plastídios. GUN1, proteína PPR (pentatricopeptiderepeat) do cloroplasto, e ABI4, fator de transcrição AP2-like que se liga ao promotor de LHCB (proteína de ligação à clorofila a/b) (Nott et al., 2006; Fernández and Strand, 2008). Sun et al. (2011) descreveram ainda a atuação do transfator PTM ligado à membrana do cloroplasto, que é ativado por clivagem proteolítica e transmite múltiplos sinais do cloroplasto para o núcleo, onde ativa a transcrição. Além dessas, Whirly (WHY1), proteína de ligação a DNA fita simples, é encontrada tanto no núcleo quanto no cloroplasto de uma mesma célula e, apesar de o mecanismo/estímulo pelo qual WHY1 é translocada ainda não esteja claro, essa proteína é um ótimo candidato para atuar na via de sinalização retrógrada (Grabowski et al., 2008; Isemer et al., 2012).

Neste contexto, os plastídios são capazes de auxiliar as células durante as respostas de estresse, integrando as informações das redes de sinalização citoplasmáticas e plastidiais. (Fernández and Strand, 2008). As respostas a estresse podem envolver a indução/repressão de diversas vias, seja de defesa ou relacionadas à fotossíntese, processos muito complexos, cuja especificidade da resposta desencadeada vai depender do aparato bioquímico das células (Atkinson and Urwin, 2012). As vias de defesa envolvem diversos componentes, sendo difícil definir quais são necessários e suficientes para conferir defesa (Dixon and Paiva, 1995).

A identificação de FT que podem se ligar a cis-elementos requeridos para a sinalização retrógrada é essencial para o entendimento dos mecanismos de sinalização e interação entre as vias (Nott et al., 2006). Dentro dessas questões discutidas e dos resultados encontrados na caracterização do GmbZIPE2 e de seus parceiros de interação, esse transfator pode estar relacionado à transmissão de sinais do cloroplasto para o núcleo, uma vez que interage com moléculas relacionadas com a fotossíntese e que podem ser sinais de como está o estado fotossintético da célula sob determinado estresse. A ação do GmbZIPE2 pode levar à transcrição de genes da via de fenilpropanoides, envolvidos na

defesa a patógenos e na ação antioxidantes como quelantes dos ROS. No entanto, mais estudos são necessários para a confirmação desse papel do transfator e do mecanismo de transmissão de sinais para o completo entendimento da via de defesa desencadeada pelo GmbZIPE2.

7. Conclusão

A proteína GmbZIPE2 foi capaz de interagir com *G. max* uncharacterized LOC100786585 (RbcX) e com *G. max* uncharacterized LOC100777895 (similar à LPA).

8. Bibliografia

- Abe, I.; Morita, H. Structure and function of the chalcone synthase superfamily of plant type III polyketide synthases. *Natural product reports*, v. 27, n. 6, p. 809-838, 2010.
- Alves, M.S. Caracterização bioquímica e funcional de fatores de transcrição envolvidos na resposta a estresses biótico e abiótico em soja. Tese de Doutorado (Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa MG, 2013.
- Alves, M.S.; Dadalto, S.P.; Gonçalves, A.B.; De Souza, G.B.; Barros, V.A.; Fietto, L.G. Plant bZIP Transcription Factors Responsive to Pathogens: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 4, p. 7815-7828, 2013.
- Alves, M.S.; Dadalto, S.P.; Gonçalves, A.B.; De Souza, G.B.; Barros, V.A.; Fietto, L.G. Transcription Factor Functional Protein-Protein Interactions in Plant Defense Responses. *Proteomes*, v. 2, n. 1, p. 85-106, 2014.
- Alves, M.S.; Fontes, E.P.B.; Fietto, L.G. EARLY RESPONSIVE to DEHYDRATION 15, a new transcription factor that integrates stress signaling pathways. *Plant signaling & behavior*, v. 6, n. 12, p. 1993-1996, 2011.
- Alves, M.S.; Soares, Z.G.; Vidigal, P.M.; Barros, E.G.; Poddanosqui, A.M.; Aoyagi, L.N.; Abdelnoor, R.V.; Marcelino-Guimarães, F.C.; Fietto, L.G. Differential expression of four soybean bZIP genes during *Phakopsora pachyrhizi* infection. *Functional & Integrative Genomics*, p. 1-12, 2015.
- Amberg, D.C.; Burke, D.J.; Strathern, J.N. Assay of β -Galactosidase in Yeast: Assay of Crude Extracts. *CSH protocols*, v. 2006, n. 1, p. 80-85, 2005.
- Atkinson, N.J.; Urwin, P.E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, v. 63, n. 10, p. 3523-3543, 2012.
- Bilgin, D.D.; Zavala, J.A.; Zhu, J.I.N.; Clough, S.J.; Ort, D.R.; De Lucia, E.V.A.N. Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant, Cell & Environment*, v. 33, n. 10, p. 1597-1613, 2010.
- Boller, T.; He, S. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*, v. 324, n. 5928, p. 742-744, 2009.
- Boyle, P.; Després, C. Dual-function transcription factors and their entourage: unique and unifying themes governing two pathogenesis-related genes. *Plant Signaling & Behavior*, v. 5, n. 6, p. 629-634, 2010.

Bracher, A.; Starling-Windhof, A.; Hartl, F.U.; Hayer-Hartl, M. Crystal structure of a chaperone-bound assembly intermediate of form I Rubisco. *Nature structural & molecular biology*, v. 18, n. 8, p. 875-880, 2011.

Brunetti, C.; Guidi, L.; Sebastiani, F.; Tattini, M. Isoprenoids and phenylpropanoids are key components of the antioxidant defense system of plants facing severe excess light stress. *Environmental and Experimental Botany*, v. 119, p. 54-62, 2015.

Cai, W.; Ma, J.; Chi, W.; Zou, M.; Guo, J.; Lu, C.; Zhang, L. Cooperation of LPA3 and LPA2 is essential for photosystem II assembly in Arabidopsis. *Plant physiology*, v. 154, n. 1, p. 109-120, 2010.

Chen, H.Y.; Hsieh, E.J.; Cheng, M.C.; Chen, C.Y.; Hwang, S.Y.; Lin, T.P. ORA47 (octadecanoid-responsive AP2/ERF-domain transcription factor 47) regulates jasmonic acid and abscisic acid biosynthesis and signaling through binding to a novel cis-element. *New Phytologist*, 2016.

Chen, W.; Provart, N.J.; Glazebrook, J.; Katagiri, F.; Chang, H.S.; Eulgem, T.; Mauch, F.; Luan, S.; Zou, G.; Whitham, S.A.; Budworth, P.R.; Tao, Y.; Xie, Z.; Chen, X.; Lam, S.; Kreps, J.A.; Harper, J.F.; Si-Ammour, A.; Mauch-Mani, B.; Heinlein, M.; Kobayashi, K.; Hohn, T.; Dangl, J.L.; Wang, X.; Zhu, T. Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*, v. 14, n. 3, p. 559–574, 2002.

Conab, 2016. Acompanhamento da Safra Brasileira. SAFRA 2015/16, v. 3, n. 10 - Décimo levantamento | JULHO 2016. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_07_11_17_36_02_boletim_graos_julho_2016.pdf. Acessado em 10/07/2016.

Das, A.; Eldakak, M.; Paudel, B.; Kim, D.W.; Hemmati, H.; Basu, C.; Rohila, J.S. Leaf proteome analysis reveals prospective drought and heat stress response mechanisms in soybean. *BioMed research international*, v. 2016, 2016.

Daurelio, L.D.; Tondo, M.L.; Romero, M.S.; Merelo, P.; Cortadi, A.A.; Talón, M.; Tadeo, F.R.; Orellano, E.G. Novel insights into the Citrus sinensis nonhost response suggest photosynthesis decline, abiotic stress networks and secondary metabolism modifications. *Functional Plant Biology*, v. 42, n. 8, p. 758-769, 2015.

Devi, M.K.A.; Giridhar, P. Variations in Physiological Response, Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzyme Activities, Proline and Isoflavones Content in Soybean Varieties Subjected to Drought Stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, v. 85, n. 1, p. 35-44, 2015.

Dias, L.P.; De Oliveira-Busatto, L.A.; Bodanese-Zanettini, M.H. The differential expression of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] WRKY genes in response to water deficit. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 107, p. 288-300, 2016.

Ding, X.D.; Richter, T.; Chen, M.; Fujii, H.; Seo, Y.S.; Xie, M.T.; Zheng, X.W.; Kanrar, S.; Stevenson, R.A.; Dardick, C.; Li, Y.; Jiang, H.; Zhang, Y.; Yu, F.H.; Bartley, L.E.; Chern, M.; Bart, R.; Chen, X.H.; Zhu, L.H.; Farmerie, W.G.; Gribskov, M.; Zhu, J.K.; Fromm, M.E.; Ronald, P.C.; Song, W.Y. A Rice Kinase-Protein Interaction Map. *Plant Physiology*, v. 149, n. 3, p. 1478-1492, 2009.

Dixon, R.A.; Paiva, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*, v. 7, n. 7, p. 1085, 1995.

Dodds, P.N.; Rathjen, J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, v. 11, n. 8, p. 539-548, 2010.

Dröge-Laser, W.; Kaiser, A.; Lindsay, W.P.; Halkier, B.A.; Loake, G.J.; Doerner, P.; ... & Lamb, C. Rapid stimulation of a soybean protein serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses. *The EMBO journal*, v. 16, n. 4, p. 726-738, 1997.

Duan, D.; Fischer, S.; Merz, P.; Bogs, J.; Riemann, M.; Nick, P. An ancestral allele of grapevine transcription factor MYB14 promotes plant defence. *Journal of experimental botany*, p. erv569, 2016.

Dubos, C.; Stracke, R.; Grotewold, E.; Weisshaar, B.; Martin, C.; Lepiniec, L. MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in plant science*, v. 15, n. 10, p. 573-581, 2010.

Durão, P.; Aigner, H.; Nagy, P.; Mueller-Cajar, O.; Hartl, F.U.; Hayer-Hartl, M. Opposing effects of folding and assembly chaperones on evolvability of Rubisco. *Nature chemical biology*, v. 11, n. 2, p. 148-155, 2015.

Eulgem, T. Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. *Trends in Plant Science*, v. 10, n. 2, p. 71-78, 2005.

Feldbrügge, M.; Sprenger, M.; Dinkelbach, M.; Yazaki, K.; Harter, K.; Weisshaar, B. Functional analysis of a light-responsive plant bZIP transcriptional regulator. *Plant Cell*, v. 6, n. 11, p. 1607-1621, 1994.

Fernández, A.P.; Strand, A. Retrograde signaling and plant stress: plastid signals initiate cellular stress responses. *Current opinion in plant biology*, v. 11, n. 5, p. 509-513, 2008.

Foyer, C.H.; Karpinska, B.; Krupinska, K. The functions of WHIRLY1 and REDOX-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1 in cross tolerance responses in plants: a hypothesis. *Phil. Trans. R. Soc. B*, v. 369, n. 1640, p. 20130226, 2014.

- Foyer, C.H.; Noctor, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & redox signaling*, v. 11, n. 4, p. 861-905, 2009.
- Foyer, C.H.; Rasool, B.; Davey, J.W.; Hancock, R.D. Cross-tolerance to biotic and abiotic stresses in plants: a focus on resistance to aphid infestation. *Journal of experimental botany*, v. 67, n. 7, p. 2025-2037, 2016.
- Fu, Z.Q.; Yan, S.; Saleh, A.; Wang, W.; Ruble, J.; Oka, N.; Mohan, R.; Spoel, S.H.; Tada, Y.; Zheng, N.; Dong, X. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, v. 486, n. 7402, p. 228-232, 2012.
- García-Calderón, M.; Pons-Ferrer, T.; Mrázova, A.; Pal'ove-Balang, P.; Vilkova, M.; Pérez-Delgado, C.M.; Vega, J.M.; Eliášová, A.; Repcák, M.; Márquez, A.J.; Betti, M. Modulation of phenolic metabolism under stress conditions in a *Lotus japonicus* mutant lacking plastidic glutamine synthetase. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, 2015.
- Goellner, K.; Loehrer, M.; Langenbach, C.; Conrath, U.W.E.; Koch, E.; Schaffrath, U. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Molecular Plant Pathology*, v. 11, n. 2, p. 169-177, 2010.
- Gonçalves, A.B. Caracterização funcional do fator de transcrição GmbZIZE2 de soja (*Glycine max*). Dissertação (Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa MG, 2014.
- Grabowski, E.; Miao, Y.; Mulisch, M.; Krupinska, K. Single-stranded DNA-binding protein Whirly1 in barley leaves is located in plastids and the nucleus of the same cell. *Plant physiology*, v. 147, n. 4, p. 1800-1804, 2008.
- Harborne, J.B. *The Flavonoids: Advances in Research since 1980*. New York: Chapman and Hall. ed 1988.
- Heath, M.C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 3, n. 4, p. 315-319, 2000.
- Isemer, R.; Krause, K.; Grabe, N.; Kitahata, N.; Asami, T.; Krupinska, K. Plastid located WHIRLY1 enhances the responsiveness of *Arabidopsis* seedlings toward abscisic acid. *Frontiers in Plant Science*, v. 3, p. 283, 2012.
- Jakoby, M.; Weisshaar, B.; Dröge-Laser, W.; Vicente-Carbajosa, J.; Tiedemann, J.; Kroj, T.; Parcy, F. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, v. 7, n. 3, p. 106-111, 2002.

Järvi, S.; Suorsa, M.; Aro, E. Photosystem II repair in plant chloroplasts—regulation, assisting proteins and shared components with photosystem II biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, v. 1847, n. 9, p. 900-909, 2015.

Jones, J.D.G.; Dangl, J.L. The plant immune system. *Nature*, v. 444, n. 7117, p. 323-329, 2006.

Kaltdorf, M.; Naseem, M. How many salicylic acid receptors does a plant cell need? *Science Signaling*, v. 6, n. 279, p. jc3-jc3, 2013.

Kaminaka, H.; Nake, C.; Epple, P.; Dittgen, J.; Schutze, K.; Chaban, C.; Holt III, B.F.; Merkle, T.; Schafer, E.; Harter, K.; Dang, J.L. bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in *Arabidopsis* following infection. *The EMBO Journal*, v. 25, n. 18, p. 4400-4411, 2006.

Kangasjärvi, S.; Neukermans, J.; Li, S.; Aro, E.M.; Noctor, G. Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. *Journal of Experimental Botany*, p. 402, 2012.

Kolesinski, P.; Golik, P.; Grudnik, P.; Piechota, J.; Markiewicz, M.; Tarnawski, M.; Dubin, G.; Szczepaniak, A. Insights into eukaryotic Rubisco assembly—crystal structures of RbcX chaperones from *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1830, n. 4, p. 2899-2906, 2013.

Kolesiński, P.; Piechota, J.; Szczepaniak, A. Initial characteristics of RbcX proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, v. 77, n. 4-5, p. 447-459, 2011.

Leister, D. Retrograde signaling in plants: from simple to complex scenarios. *Frontiers in plant science*, v. 3, p. 135, 2012.

Lepage, E.; Zampini, E.; Brisson, N. Plastid genome instability leads to reactive oxygen species production and plastid-to-nucleus retrograde signaling in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, v. 163, n. 2, p. 867-881, 2013.

Liao, Y.; Zou, H.F.; Wei, W.; Hao, Y.J.; Tian, A.G.; Huang, J.; Liu, Y.F.; Zhang, J.S.; Chen, S.Y. Soybean GmbZIP44, GmbZIP62 and 132 GmbZIP78 genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, v. 228, n. 2, p. 225-240, 2008.

Liu, C.; Young, A.L.; Starling-Windhof, A.; Bracher, A.; Saschenbrecker, S.; Rao, B.V.; Berninghausen, O.; Mielke, T.; Hartl, F.U.; Beckmann, R.; Hayer-Hartl, M. Coupled chaperone action in folding and assembly of hexadecameric Rubisco. *Nature*, v. 463, n. 7278, p. 197-202, 2010.

Møller, I.M.; Sweetlove, L.J. ROS signalling–specificity is required. *Trends in plant science*, v. 15, n. 7, p. 370-374, 2010.

Noel, J.P.; Austin, M.B.; Bomati, E.K. Structure–function relationships in plant phenylpropanoid biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 8, n. 3, p. 249-253, 2005.

Nott, A.; Jung, H.S.; Koussevitzky, S.; Chory, J. Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.*, v. 57, p. 739-759, 2006.

Pajeroska-Mukhtar, K.M.; Emerine, D.K.; Mukhtar, M.S. Tell me more: Roles of NPRs in plant immunity. *Trends in plant science*, v. 18, n. 7, p. 402-411, 2013.

Paul, F.E.; Hosp, F.; Selbach, M. Analyzing protein–protein interactions by quantitative mass spectrometry. *Methods*, v. 54, n. 4, p. 387-395, 2011.

Pauwels, L.; Morreel, K.; De Witte, E.; Lammertyn, F.; Van Montagu, M.; Boerjan, W.; Inze, D.; Goossens, A. Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 4, p. 1380-1385, 2008.

Pawson, T.; Nash, P. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science*, v. 300, n. 5618, p. 445-452, 2003.

Peng, L.; Ma, J.; Chi, W.; Guo, J.; Zhu, S.; Lu, Q.; Lu, C.; Zhang, L. LOW PSII ACCUMULATION1 is involved in efficient assembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, v. 18, n. 4, p. 955-969, 2006.

Perez-Rodriguez, P.; Riano-Pachon, D.M.; Correa, L.G.; Rensing, S.A.; Kersten, B.; Mueller-Roeber, B. PlnTFDB: Updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic Acids Research*, p. 805, 2009.

Pfannschmidt, T. Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends in plant science*, v. 8, n. 1, p. 33-41, 2003.

Pieterse, C.M.J.; van der Does, D.; Zamioudis, C.; Leon-Reyes, A.; van Wees, S.C.M. Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 28, p. 489-521, 2012.

Prasch, C.M.; Sonnewald, U. Signaling events in plants: stress factors in combination change the picture. *Environmental and Experimental Botany*, v. 114, p. 4-14, 2015.

Saibo, N.J.M.; Lourenço, T.; Oliveira, M.M. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of Botany*, v. 103, n. 4, p. 609-623, 2009.

Sambrook, J.; Russell David, W. Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 3. Cold spring harbor laboratory press, 1989.

Saschenbrecker, S.; Bracher, A.; Rao, K.V.; Rao, B.V.; Hartl, F.U.; Hayer-Hartl, M. Structure and function of RbcX, an assembly chaperone for hexadecameric Rubisco. *Cell*, v. 129, n. 6, p. 1189-1200, 2007.

Schindler, U.; Menkens, A.E.; Beckmann, H.; Ecker, J.R.; Cashmore, A.R. Heterodimerization between light-regulated and ubiquitously expressed Arabidopsis GBF bZIP proteins. *The EMBO journal*, v. 11, n. 4, p. 1261, 1992.

Schwessinger, B.; Zipfel, C. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 11, n. 4, p. 389-395, 2008.

Singh, K.; Foley, R.C.; Oñate-Sánchez, L. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 5, n. 5, p. 430-436, 2002.

Sornaraj, P.; Luang, S.; Lopato, S.; Hrmova, M. Basic leucine zipper (bZIP) transcription factors involved in abiotic stresses: a molecular model of a wheat bZIP factor and implications of its structure in function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1860, n. 1, p. 46-56, 2016.

Sun, X.; Feng, P.; Xu, X.; Guo, H.; Ma, J.; Chi, W.; Lin, R.; Lu, C.; Zhang, L. A chloroplast envelope-bound PHD transcription factor mediates chloroplast signals to the nucleus. *Nature communications*, v. 2, p. 477, 2011.

Udvardi, M.K.; Kakar, K.; Wandrey, M.; Montanari, O.; Murray, J.; Andriankaja, A.; Zhang, J.; Benedito, V.; Hofer, J.M.I.; Chueng, F.; Town, C.D. Legume transcription factors: Global regulators of plant development and response to the environment. *Plant Physiology*, v. 144, n. 2, p. 538-549, 2007.

Van Verk, M.C.; Gatz, C.; Linthorst, H.J.M. Transcriptional regulation of plant defense responses. *Advances in Botanical Research*, v. 51, p. 397-438, 2009.

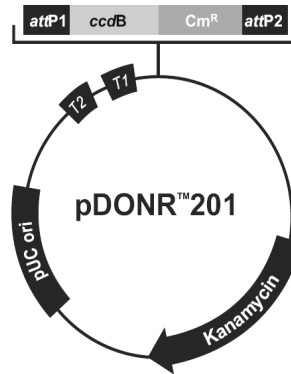
Vannini, C.; Iriti, M.; Bracale, M.; Locatelli, F.; Faoro, F.; Croce, P.; Pirona, R.; Di Maro, A.; Coraggio, I.; Genga, A. The ectopic expression of the rice Osmyb4 gene in Arabidopsis increases tolerance to abiotic, environmental and biotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 69, n. 1, p. 26-42, 2006.

Vannini, C.; Locatelli, F.; Bracale, M.; Magnani, E.; Marsoni, M.; Osnato, M.; Mattana, M.; Baldoni, E.; Coraggio, I. Overexpression of the rice Osmyb4 gene increases chilling and freezing tolerance of Arabidopsis thaliana plants. *The Plant Journal*, v. 37, n. 1, p. 115-127, 2004.

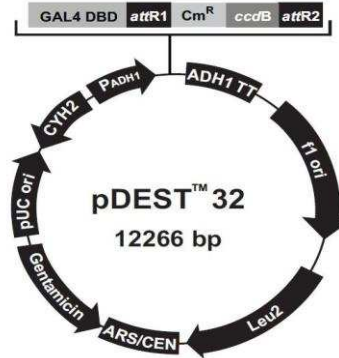
- Weisshaar, B.; Armstrong, G.A.; Block, A.; e Silva, O.D.C.; Hahlbrock, K. Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. *The EMBO journal*, v. 10, n. 7, p. 1777, 1991.
- Xiao, Y.; Savchenko, T.; Baidoo, E.E.; Chehab, W.E.; Hayden, D.M.; Tolstikov, V.; Corwin, J.A.; Kliebenstein, D.J.; Keasling, J.D. Dehesh, K. Retrograde signaling by the plastidial metabolite MEcPP regulates expression of nuclear stress-response genes. *Cell*, v. 149, n. 7, p. 1525-1535, 2012.
- Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology*, v. 57, p. 781-803, 2006.
- Yang, Y.; Shah, J.; Klessig, D.F. Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes & Development*, v. 11, n. 13, p. 1621-1639, 1997.
- Zhang, Y.; Zhang, G.; Xia, N.; Wang, X.J.; Huang, L.L.; Kang, Z.S. Cloning and characterization of a bZIP transcription factor gene in wheat and its expression in response to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 73, n. 4, p. 88-94, 2008.

9. Anexo

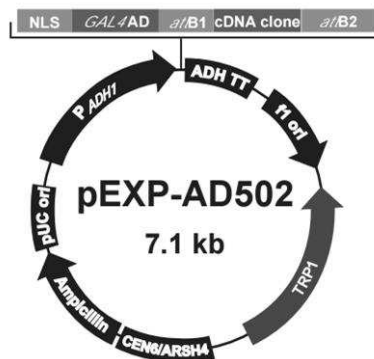
9.1. pDONR201



9.2. pDEST32



9.3. pEXP-AD502



9.4. pDEST22

