

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Estudo das interações entre as subunidades do fator de transcrição NF-Y em mamona (*Ricinus communis*).**

Leila Spagnolo Fonini

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Márcia Maria Auxiliadora Nashenveng Pinheiro Margis

Co-orientadora: Dra. Ana Paula Körbes

Porto Alegre

Outubro de 2013

### CIP - Catalogação na Publicação

FONINI, LEILA SPAGNOLO  
Estudo das interações entre as subunidades do fator  
de transcrição NF-Y em mamona (*Ricinus communis*). /  
LEILA SPAGNOLO FONINI. -- 2013.  
64 f.  
Orientadora: Márcia Maria Auxiliadora Nashenveng  
Pinheiro Margis.

Coorientadora: Ana Paula Körbes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia do Estado  
do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, BR-RS,  
2013.

1. Biologia Molecular. I. Nashenveng Pinheiro  
Margis, Márcia Maria Auxiliadora, orient. II. Körbes,  
Ana Paula, coorient. III. Título.

## **Instituições e Fontes Financiadoras**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular Vegetal, localizado no Departamento de Genética da UFRGS e foi financiado pela CAPES e pelo CNPq.

## Índice

Abreviaturas.....	3
Lista de figuras e tabelas.....	4
Resumo.....	5
Abstract.....	6
1.Introdução.....	7
1.1. O cis-elemento CCAAT.....	7
1.2. O Fator de transcrição NF-Y.....	8
1.3. O Fator de transcrição NF-Y em plantas.....	9
1.3.1. A subunidade NF-YA.....	10
1.3.2. A subunidade NF-YB.....	12
1.3.2.1. NF-YB do tipo LEC1.....	13
1.3.2.2. NF-YB do tipo não-LEC1.....	15
1.3.3. A subunidade NF-YC.....	16
1.4. A associação do trímero.....	17
1.5. O modelo de estudo.....	19
2. Objetivos.....	21
3. Materiais e Métodos.....	22
4. Resultados e Discussão.....	28
4.1. Perfil de expressão de NF-YA em sementes de mamona.....	29
4.2. Interações entre NF-YA e LEC1 ou L1L.....	31
4.3. Interações entre NF-YA e NF-YC.....	32
4.4. Formação de trímeros entre NF-YA, NF-YC e LEC1 ou L1L.....	36
5. Conclusões e Perspectivas.....	45
6. Referências Bibliográficas.....	46
7. Apêndice .....	56

## Abreviaturas

ABA: Ácido Absísico

ABI3: ABA insensitive 3

ABI5: ABA insensitive 5

bHLH: basic helix-loop-helix

BR: Brassinoesteroide

bZIP: Basic Leucine Zipper

c/EBP: CCAAT/enhancer binding protein

CBF: CCAAT binding factor

CCT: CONSTANS, CONTANS-LIKE, TOC1

CO: Constans

CP1: CCAAT binding protein 1

CTF: CCAAT Transcription factor

HAP: Heme activated protein

HFM: Histone fold motif

L1L: Leafy cotyledon 1 - like -

LEC1: Leafy cotyledon 1

MADS: Família de fatores de transcrição cujo nome remete aos primeiros membros identificados, MCM1, AG, DEFA and SRF.

MHC II: Complexo principal de histocompatibilidade de classe II

NF1: Nuclear factor 1

NF-Y: Nuclear factor Y

SD: Synthetic defined media

VRN2: Vernalization 2

## Lista de figuras e tabelas

Figura 1	Alinhamento do domínio conservado de NF-YA.....	13
Figura 2	Alinhamento do domínio conservado de NF-YB.....	15
Figura 3	Alinhamento do domínio conservado de NF-YC.....	19
Figura 4	Modelo da formação do trímero em plantas.....	21
Figura 5	As cinco fases do desenvolvimento de sementes de mamona....	24
Figura 6	Duplo-híbrido em levedura.....	28
Figura 7	Duplo-híbrido em levedura modificado.....	29
Figura 8	Perfil de expressão dos genes NF-YA durante o desenvolvimento da semente.....	32
Figura 9	Interações entre NF-YA (AD) e NF-YC (BD).....	36
Figura 10	Interação entre NF-YA (BD) e NF-YC (AD).....	37
Figura 11	Formação de trímeros envolvendo LEC1.....	39
Figura 12	Formação de trímeros envolvendo L1L.....	40
Figura 13	Formação de trímeros entre LEC1, NF-YA (AD) e NF-YC (BD)..	41
Figura 14	Formação de trímeros entre LEC1, NF-YA (BD) e NF-YC (AD ).	42
Figura 15	Formação de trímeros entre L1L, NF-YA (AD) e NF-YC (BD).....	43
Figura 16	Formação de trímeros entre L1L, NF-YA (BD) e NF-YC (AD).....	44
Tabela 1	Interações entre NF-YA e NF-YC.....	34
Tabela 2	Interações entre NF-YA e NF-YC.....	35

## Resumo

NF-Y é um fator de transcrição heterotrimérico que reconhece e se liga ao motivo CCAAT, o qual está presente em diversos promotores eucarióticos, regulando genes relacionados, por exemplo, com o desenvolvimento, a proliferação celular e a síntese de ácidos graxos. Enquanto em animais cada subunidade é codificada por apenas um gene, em plantas, cada subunidade é codificada por uma família gênica. Em mamona, a subunidade “A” é codificada por seis genes, a subunidade “B” por doze genes e a subunidade “C” por sete genes. Com relação aos membros da subunidade B, duas classes de proteínas foram identificadas, as do tipo LEC1 (LEC1 e L1L) e as do tipo Não-LEC1. Os genes que codificam as proteínas do tipo LEC1 estão presentes no genoma de plantas vasculares, apresentam padrão de expressão semente-específico e codificam proteínas que formam dímeros com membros de NF-YC, possivelmente regulando genes relacionados à embriogênese, à maturação da semente e à síntese de ácidos graxos, por exemplo. Em plantas, poucos trabalhos investigaram o modo de associação entre as subunidades deste fator de transcrição, e o modelo animal é atualmente aceito. No entanto, especula-se que a subunidade A tenha uma função reguladora negativa, e que as subunidades B e C atuem em conjunto com outros fatores de transcrição e outras proteínas regulatórias. No presente trabalho, análises de PCR quantitativa mostraram que cinco dos seis genes que codificam a subunidade A são expressos durante o desenvolvimento de sementes de mamona, indicando que esses genes possuem expressão tempo-espaçial compatível com a expressão dos genes do tipo LEC1, podendo teoricamente atuar como seus parceiros moleculares. A análise do interatoma entre os membros da subunidade A e os membros das subunidades B e C demonstra que esses fatores atuam de maneira complexa, tendo parceiros moleculares preferenciais e, diferentemente do modelo atualmente aceito, alguns membros das subunidades A e C parecem formar dímeros. Além disso, pode ser visto que LEC1 e L1L não apresentam os mesmos parceiros moleculares em sua totalidade, corroborando com a hipótese de que seus papéis não sejam totalmente redundantes.

## Abstract

NF- Y is a heterotrimeric transcription factor that recognizes and binds to the CCAAT motif, which is present in many eukaryotic promoters regulating genes related to, for example, process such as development, cellular proliferation and synthesis of fatty acids. Whereas in animals each subunit is encoded by a single gene, in plants, each subunit is encoded by a gene family. In castor, subunit "A" is encoded by six genes , the subunit "B" by twelve genes and subunit "C" by seven genes. Regarding the members of the B subunit, two classes of proteins have been identified, the LEC1-type (LEC1 and L1L ) and the non-LEC1 type. The genes LEC1-type genes are present in the genome of vascular plants and have seed-specific expression and encode proteins which form dimers with members of the NF- YC, possibly regulating genes involved in embryogenesis and seed maturation and fatty acids synthesis. In plants, only few studies have investigated the association mode of the subunits of this transcription factor, and the animal model is currently accepted. However, it is speculated that the "A" subunit has a negative regulatory function, and that the "B" and "C" subunits act in concert with other transcription factors and other regulatory proteins. In the present study, quantitative PCR analysis showed that five of the six genes encoding the subunit "A" are expressed during castor seed development, indicating that these genes have time and spatial expression compatible with the gene expression of LEC1-type, which may theoretically act as its molecular partners. The analysis of the interactions between members of subunit "A" and members of the subunits "B" and "C" shows that these factors act in a complex manner, with specific preferences of molecular partners. Unlike of currently accepted model, some members of the subunits A and C appear to form dimers. Moreover, it can be seen that LEC1 and L1L have not always coincident molecular partners, corroborating the hypothesis that their roles are not fully redundant.



## 1. Introdução

A iniciação da transcrição é o é um passo muito importante na regulação da expressão gênica. O controle desse processo se dá através de uma série de eventos controlados por sequências de DNA posicionadas na proximidade de genes, os promotores, e por elementos mais distantes. Dentro das sequências promotoras encontram-se sequências menores, os *cis*-elementos, que são reconhecidas por reguladores específicos, que vão atuar no recrutamento de fatores de remodelamento da cromatina e da maquinaria transcricional (BENOIST *et al.*, 1980; BUCHER, 1990; TIJAN & MANIATIS, 1994).

Fatores de transcrição são proteínas que possuem o papel de ativar ou reprimir a transcrição gênica através da ligação a elementos *cis*-regulatórios presentes nos promotores. Os sítios de ligação para os fatores de transcrição geralmente estão organizados em grupos que podem conter dezenas de *cis*-elementos, que controlam o padrão de expressão espaço-temporal do gene alvo (CHEN & RAJEWSKY, 2007).

Os fatores de transcrição estão geralmente agrupados em famílias, com base na presença de domínios que atuam na determinação da especificidade de ligação ao DNA. Além dos fatores de transcrição, existem outras formas de regulação da expressão gênica, incluindo a regulação por miRNAs, cascatas de sinalização, splicing alternativo de RNAm, poliadenilação, modificações na cromatina e mecanismos de localização, modificação e degradação proteica (CHEN & RAJEWSKY, 2007).

### 1.1. O *cis*-elemento CCAAT

O motivo “CCAAT-box”, que possui a sequência CCAAT como cerne, é um *cis*-elemento funcional, presente em diversos promotores eucarióticos, tendo sido um dos primeiros a ser identificado (BENOIST *et al.*, 1980; EFSTRADIATIS *et al.*, 1980). Em um estudo com 500 promotores eucarióticos, BUCHER (1990) estabeleceu que o pentanucleotídeo “CCAAT” (e seu reverso “ATTGG”) está presente em aproximadamente 30% desses e está frequentemente posicionado na

região -212 a -57. Entretanto, nesse trabalho, não foi possível estabelecer quais proteínas se ligam a esta sequência.

O elemento CCAAT pode ser encontrado nos mais variados promotores. Em *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, está presente em promotores de genes que codificam enzimas envolvidas em rotas de respiração celular (GUARENTE, 1984; FORSBURG & GUARENTE, 1988; MANTOVANI, 1998) e no fungo *Aspergillus nidulans*, o pentanucleotídeo está presente em genes que codificam as enzimas de síntese de penicilina (LITTLEJOHN & HINES, 1992; LITZKA, *et al.*, 1996). Em eucariotos mais derivados, o *cis*-elemento está presente em uma grande diversidade de promotores, como aqueles tecido específicos, regulados ao longo do desenvolvimento (BERRY *et al.*, 1992; RONCHI *et al.*, 1996); genes constitutivos (ROY & LEE, 1995; MARZIALI *et al.*, 1997); genes regulados pelo ciclo celular (MANTOVANI, 1998) e genes envolvidos no metabolismo de colesterol (DOOLEY, *et al.*, 1998), por exemplo.

## 1.2. O Fator de transcrição NF-Y

O Fator Nuclear Y (NF-Y, do inglês “Nuclear factor of the Y box”) é um fator de transcrição conservado, que reconhece e se liga à sequência CCAAT presente em diversos promotores eucarióticos, regulando, positivamente ou negativamente, a expressão de diversos conjuntos de genes. Em 1987, foi identificado o fator NF-Y (também chamado de CBF, CP1 ou  $\alpha$ -CP1) como uma proteína que se liga ao Y Box dos promotores de genes do MHC II (DORN, 1987). Mais tarde, outros estudos demonstraram o requerimento dos nucleotídeos CCAAT para a ligação. (HATAMOCHI *et al.*, 1988; KIM *et al.*, 1990; HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN *et al.*, 1987; HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN *et al.*, 1990).

Nas décadas de 1980 e 1990, foram relatados vários estudos de identificação das proteínas que se ligam ao pentanucleotídeo. GRAVES *et al.*, (1986) e LANDSCHULZ (1988) identificaram e purificaram uma proteína de fígado de rato capaz de se ligar à sequência CCAAT (c/EBP - CCAAT/enhancer binding protein). Outros dois fatores de transcrição que se ligam como um dímero a promotores em células HeLa foram identificados, CTF e NF1 – CCAAT transcription

factor (JONES, 1985), que reconhecem a sequência CCAA (ZORBAS *et al.*, 1992), onde o “T” não é obrigatório (OSADA *et al.*, 1997).

Em *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pombe* existe um fator de transcrição que regula a expressão de genes cujos promotores contêm a sequência CCAAT; esse fator, chamado HAP (Heme activated protein), é composto por quatro subunidades, nomeadas HAP2/3/4/5. Esse fator tetramérico reconhece e se liga à sequência CCAAT sendo que a subunidade HAP4 possui o domínio de ativação da transcrição e é expressa somente na ausência de fontes de carbono fermentáveis (FORSBURG & GUARENTE, 1989; DE RISI *et al.*, 1997; TURCOTTE *et al.*, 2010).

Diversos fatores de transcrição eucarióticos se ligam ao DNA na forma de oligômeros como os zíperes de leucina e os motivos bHLH, por exemplo. No entanto, nenhuma das subunidades de NF-Y apresenta homologia com algum motivo conhecido e representam um tipo particular de proteínas heteroméricas que se ligam ao DNA (SINHA *et al.*, 1995). Além disso, o fator de transcrição NF-Y pode atuar de forma sinérgica com outros fatores de transcrição, visto que o pentanucleotídeo CCAAT é encontrado próximo a outros cis-elementos conhecidos (MANTOVANI, 1999).

### **1.3. O Fator de transcrição NF-Y em plantas**

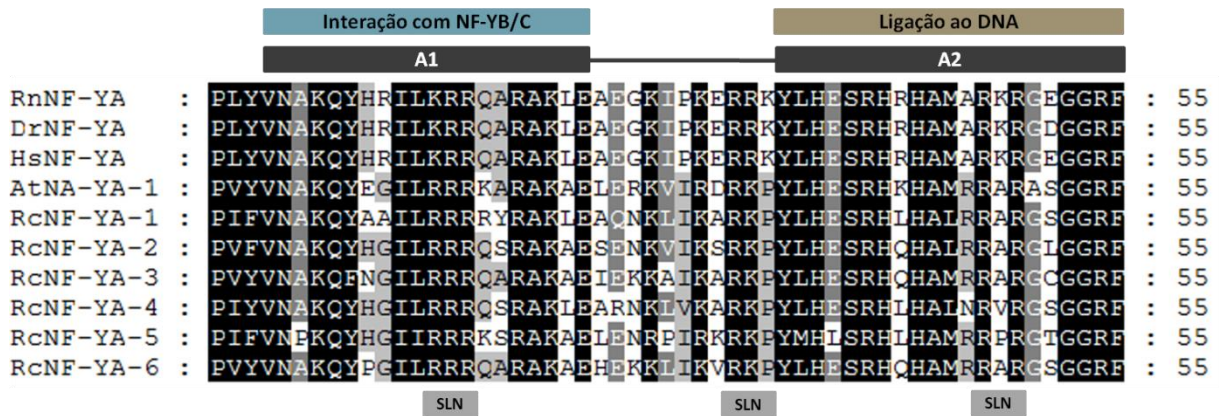
Em animais, cada subunidade que compõe o fator de transcrição NF-Y é codificada por apenas um gene. No entanto, em plantas, a duplicação genômica originou famílias gênicas que codificam cada uma dessas subunidades (GUSMAROLI *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, alguns autores utilizaram a nomenclatura HAP2/3/5 para designar os membros de NF-Y em plantas. Entretanto, devido ao fato de não existir em plantas uma quarta subunidade, homóloga ao HAP4 de fungos; aliado ao fato de que os trabalhos mais recentes em *Arabidopsis thaliana* se referem a esses genes como NF-Y, PETRONI *et al.* (2012) e LALOUM *et al.* (2013) sugeriram que essa nomenclatura seja adotada. Assim, no presente trabalho, a nomenclatura NF-Y será utilizada.

Em comparação com o que se conhece acerca da estrutura e das funções do fator NF-Y em animais, o conhecimento sobre o fator NF-Y em plantas é ainda incipiente; no entanto, os estudos em plantas modelo e cultiváveis vêm se acumulando, demonstrando que esse fator atua em uma ampla gama de processos (LALOUM *et al.*, 2013). Ainda assim, não está provado que o fator atua como um trímero em plantas, e alguns trabalhos sugerem que o dímero NF-YB/C atue em conjunto com outros fatores de transcrição (WENKEL *et al.*, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 2009) e que membros de NF-YA podem ser reguladores negativos da transcrição (YAMAMOTO *et al.*, 2009).

### **1.3.1. A subunidade NF-YA**

As proteínas NF-YA são caracterizadas por dois domínios conservados, presentes nas proteínas de eucariotos mais derivados. Uma sequência de aproximadamente 56 aminoácidos composta por duas alfa-hélices putativas (A1 e A2) caracteriza os membros da subunidade A. Um domínio de aproximadamente 20 aminoácidos (A1) parece ser crucial para a interação com NF-YB e NF-YC. Um segundo domínio próximo, de aproximadamente 21 aminoácidos (A2) parece ser responsável pela ligação ao DNA (XING *et al.*, 1993; XING *et al.*, 1994; ROMIER *et al.*, 2003) (Figura 1). Apesar da conservação desses domínios, as proteínas NF-YA têm tamanhos e estruturas variáveis. LALOUM *et al.*, (2013) fizeram uma análise profunda das sequências de plantas e mostraram que o domínio conservado se encontra em uma porção central, enquanto que em mamíferos ele ocupa uma porção C-termina. Além disso, nesse trabalho foi demonstrado que a região rica em glutamina, que seria responsável pela ativação da transcrição em animais (COUSTRY *et al.*, 1998), é menos pronunciada em plantas.



**Figura 1 - Alinhamento do domínio conservado de NF-YA**

Para este alinhamento foram utilizadas sequências de NF-YA de rato (RN), peixe zebra (Dr.), humano (Hs), *A. thaliana* (At.) e mamona (Rc). A1 e A2 representam alfa-hélices. SLN: Sinal de localização nuclear. Motivos baseados em: ROMIER *et al.*, 2003.

Os primeiros trabalhos que identificaram os fatores NF-Y em plantas datam dos anos 1990. Em 1995, ALBANI & ROBERT identificaram o fator NF-YA em canola. LEVESQUE-LEMAY *et al.*, (2003), demonstraram que, ao expressar um transcrito anti-senso (homólogo ao *NF-Y9* de *A. thaliana*) em tecidos reprodutivos a fertilidade da planta foi afetada. Em *Medicago truncatula*, foi identificado o gene *MtHAP2-1/NF-YA1*, expresso na zona meristemática, cujo silenciamento prejudica a formação de nódulos nas raízes (COMBIER *et al.*, 2006). Esse é um exemplo de como os membros de NF-Y evoluíram e se especializaram. Mais recentemente, foi demonstrado que a expressão do gene que codifica NF-YA5 de *A. thaliana* é induzida em plantas expostas à seca e ao ABA e que a proteína regula a expressão de genes responsivos a estresses, aumentando a tolerância à seca (LI *et al.*, 2008). Além disso, essa proteína está envolvida em uma via de sinalização por luz azul e ABA (WARPEHA *et al.*, 2007) e atua de forma redundante às subunidades NF-YA1, 6 e 9 na gametogênese e na embriogênese, sendo que a sua superexpressão causa transição da fase vegetativa para a fase embrionária.

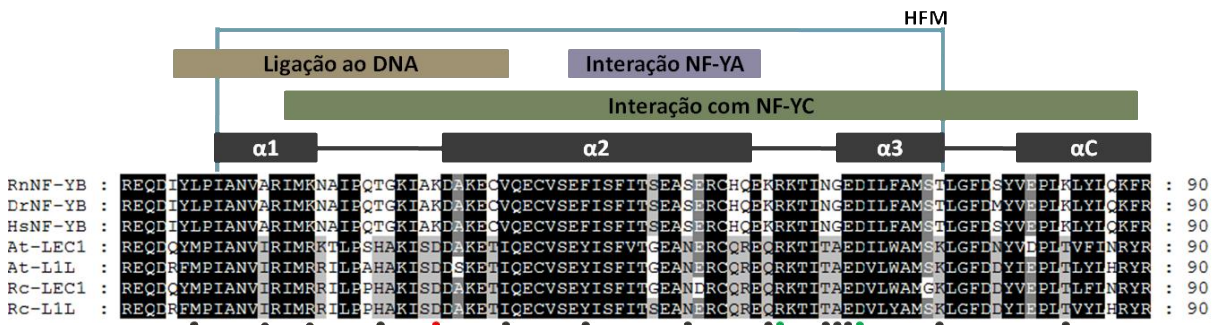
Diversos autores mostram que os membros de NF-YA podem ser substituídos por outras proteínas na formação do complexo heterotrimérico. A proteína CONSTANS, que promove o florescimento em *A. thaliana*, possui um domínio CCT, que exibe algumas similaridades com a proteína HAP2. Essa proteína

interage com NF-YB e NF-YC, formando um complexo trimérico capaz de atuar na regulação da expressão gênica (WENKEL *et al.*, 2006). Em *Arabidopsis*, a proteína NF-YA4 está implicada na resposta ao estresse de retículo endoplasmático, no qual há o acúmulo de proteínas mal dobradas (LIU *et al.*, 2010). Essa subunidade interage com o fator de transcrição bZIP28, que atua nas respostas a estresse de retículo, levantando a questão de que esse fator pode estar potencializando a transcrição de genes regulados por bZIP28 (LIU & HOWELL, *et al.*, 2010). Além disso, plantas transgênicas superexpressando AtNF-YA1 se tornam hipersensíveis ao estresse salino e ao ABA após a germinação e os níveis de mRNA de dois genes cujos produtos regulam processos dependentes de ABA na germinação, ABI3 e ABI5, são induzidos sob estresse salino nessas plantas (LI *et al.*, 2013).

### 1.3.2. A subunidade NF-YB

As proteínas NF-YB são caracterizadas por um domínio contendo três alfa-hélices separadas por voltas beta que apresenta similaridade com a histona H2B (BAXEVANIS *al.*, 1995); além disso, outra alfa-hélice está presente adjacente ao motivo HFM (Figura 2). Em plantas, essas proteínas podem ser classificadas em do tipo-LEC1 ou do tipo não-LEC1 (LOTAN *et al.*, 1998). As proteínas codificadas pelos genes *LEC1* são caracterizadas pela presença de alguns resíduos de aminoácidos diferentes dos membros não-LEC1 no domínio conservado (KWONG *et al.*, 2003; KIRKBRIDE *et al.*, 2013), sendo que o aspartato na posição 55 é crítico para a função das proteínas do tipo LEC1 (LEE *et al.*, 2003) (Figura 2).

Os genes que codificam membros de NF-YB são classificados em seis grupos ancestrais, com a exceção do grupo dos genes do tipo *LEC1*, que formam um grupo à parte (LALOUM *et al.*, 2013). Aparentemente, os genes do tipo *LEC1* surgiram em plantas vasculares, a partir da duplicação e divergência funcional de genes do tipo *não-LEC1*, tornando-se específicos de semente (XIE *et al.*, 2008; CAGLIARI, 2013).



**Figura 2 – Alinhamento do domínio conservado de NF-YB**

Para esse alinhamento foram utilizadas sequências de NF-YA de rato (Rn), peixe zebra (Dr), humano (Hs), *A. thaliana* (At) e mamona (Rc). Os círculos representam os principais aminoácidos conservados presentes em membros do tipo LEC1, em vermelho, o resíduo de aspartato (D) crítico para função de LEC1, ausente em membros não-LEC1. HFM: Motivo histona (H2B). Em verde, resíduos de arginina (R) e aspartato (D), requeridos na interação com NF-YC. Motivos baseados em ROMIER *et al.*, (2003).

### 1.3.2.1. NF-YB do tipo LEC1

Os genes do tipo *LEC1* (*LEC1* e *LEC1-like*) são os genes da subunidade B mais estudados em plantas. Muitos estudos têm mostrado que eles estão envolvidos em diversos processos, desde a morfogênese do embrião até o amadurecimento da semente (LOTAN *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2003; KWONG *et al.*, 2003), embora não pareçam ter funções idênticas (KWONG *et al.*, 2003).

Em *Arabidopsis*, *LEC1* possui funções cruciais na embriogênese e desenvolvimento da semente (HARADA, 1999) e é expresso no embrião e no endosperma em fases intermediárias do desenvolvimento, quando sua expressão decai até o estágio de maturação da semente (LOTAN *et al.*, 1998; LE *et al.*, 2010). Além disso, uma fraca expressão de *LEC1* também é detectada em brotos estiolados (WARPEHA *et al.*, 2007; SIEFERS *et al.*, 2009). Esse padrão de expressão é consistente com o fenótipo de mutantes de perda de função *lec1* germinados no escuro, que possuem hipocótilos curtos (BROCARD-GIFFORD *et al.*, 2003) e com a superexpressão de *LEC1*, que gera plantas com hipocótilos longos (JUNKER *et al.*, 2012a).

Durante a embriogênese, *LEC1* atua na identidade do embrião. O mutante de perda de função *lec1* tem o amadurecimento do embrião interrompido e produz cotilédones foliares, com a presença de tricomas (MEINKE, 1992), enquanto que a expressão ectópica de *LEC1* resulta na formação de folhas cotiledonares e no comprometimento do crescimento da raiz (LOTAN *et al.*, 1998; JUNKER *et al.*, 2012a).

Durante o amadurecimento da semente, *LEC1* regula a síntese de compostos de armazenamento e de lipídeos (YAMAMOTO *et al.*, 2009; MU *et al.*, 2008; KAGAYA *et al.*, 2005) e essas funções são dependentes da presença de ABA (JUNKER *et al.*, 2012b). Além disso, a superexpressão de *LEC1* ou *L1L* pode resultar em mudanças significativas no conteúdo de lipídeos em diversas espécies de plantas como *A. thaliana* (MU *et al.*, 2008), milho (SHEN *et al.*, 2010) e canola (TAN *et al.*, 2011).

*LEC1* e *L1L* podem ativar a expressão dos genes *CRUCIFERIN* e *SUCROSE SYNTHASE 2* em *A. thaliana*, em combinação com *NF-YC2*. Essa ativação é dependente do elemento *ABRE* (ABA responsive element) e ocorre na presença de ABA ou de *bZIP67*, e é inibida na presença de membros de *NF-YA*, que podem não estar fazendo parte do complexo transcricional mas sim, impedindo a função do complexo pelo seqüestro de algum membro (YAMAMOTO *et al.*, 2009).

KWONG (2003) evidenciou que, apesar de *LEC1* e *L1L* atuarem principalmente durante a embriogênese e apresentarem fenótipos idênticos em resposta à expressão ectópica de seus genes, um não é capaz de complementar a mutação no outro. Além disso, a supressão da expressão de cada um dos genes induz fenótipos diferentes: mutantes *lec1* param o desenvolvimento do embrião em uma fase tardia, com cotilédones disformes e podem ser resgatados antes da dessecação, produzindo plântulas viáveis; por outro lado, o silenciamento de *L1L* tem o desenvolvimento do embrião interrompido em uma fase mais inicial, e os mutantes não podem ser recuperados. Ainda, o fato de *L1L* ser expresso em fases mais iniciais da embriogênese e *LEC1* ser expresso um pouco mais tarde evidencia uma diferença nas funções desses genes.

Ortólogos de *LEC1* e *L1L* já foram identificados em outras espécies de plantas além de *A. thaliana*, tais como cenoura (YAZAWA *et al.*, 2004), girassol, (FAMBRINI *et al.*, 2006; SALVINI *et al.*, 2012), cacau (ALEMANNO *et al.*, 2008); videira (SCHELLENBAUM *et al.*, 2008; MAILLOT *et al.*, 2009), milho (SHEN *et al.*,



2010), canola (TAN *et al.* 2011) e coníferas (UDDENBERG *et al.*, 2011) e vários estudos indicam que esses ortólogos compartilham algumas funções.

Além disso, já foi demonstrado que LEC1 e L1L ativam promotores de genes expressos durante o amadurecimento da semente interagindo com fatores responsivos a ABA, como bZIP67, em associação com AtNF-YA5 e AtNF-YC9. Esses resultados demonstram que os fatores NF-Y podem estar implicados na sinalização por ABA em *A. thaliana* (YAMAMOTO *et al.*, 2009) e a expressão constitutiva dos genes *LEC1* e *L1L* de *A. thaliana* e canola leva ao aumento da síntese de ácidos graxos em *A. thaliana* (MU *et al.*; 2008).

Além das funções na embriogênese, as proteínas do tipo LEC1 possuem outras funções no desenvolvimento vegetal. LEC1 atua na integração de redes de sinalização por auxina, BR e luz, pela regulação de *YUCCA10*, cujo produto está envolvido na biossíntese de auxina. Experimentos de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) com plantas superexpressando *LEC1* permitiram mostrar um enriquecimento de genes relacionados a fitormônios e ao crescimento, indicando que LEC1 pode integrar eventos regulatórios na sinalização por luz e brassinoesteroides após a germinação (JUNKER *et al.*, 2012a). L1L pode regular o florescimento em *A. thaliana* por meio da regulação de alguns *loci* como *FLOWERING LOCUS T* (FT) e *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (SOC1) (CAO *et al.* 2007).

A multiplicidade de fenótipos existentes nos mutantes *lec1*, como o desenvolvimento de tricomas em cotilédones, intolerância à dessecação, suspensor anormal e defeitos no acúmulo de amido, proteínas e lipídeos, demonstram o envolvimento desse fator de transcrição na morfogênese do embrião, na especificação dos cotilédones, na síntese e no acúmulo de componentes de reserva e em processos relacionados à dessecação e à dormência (JUNKER *et al.*, 2012b).

### **1.3.2.2. NF-YB do tipo não-LEC1**

Os membros de NF-YB do tipo não-LEC1 possuem o domínio conservado NF-YB, sem apresentar os resíduos de aminoácidos específicos das proteínas do tipo LEC1. Ao contrário dos membros do tipo LEC1 que têm expressão restrita às

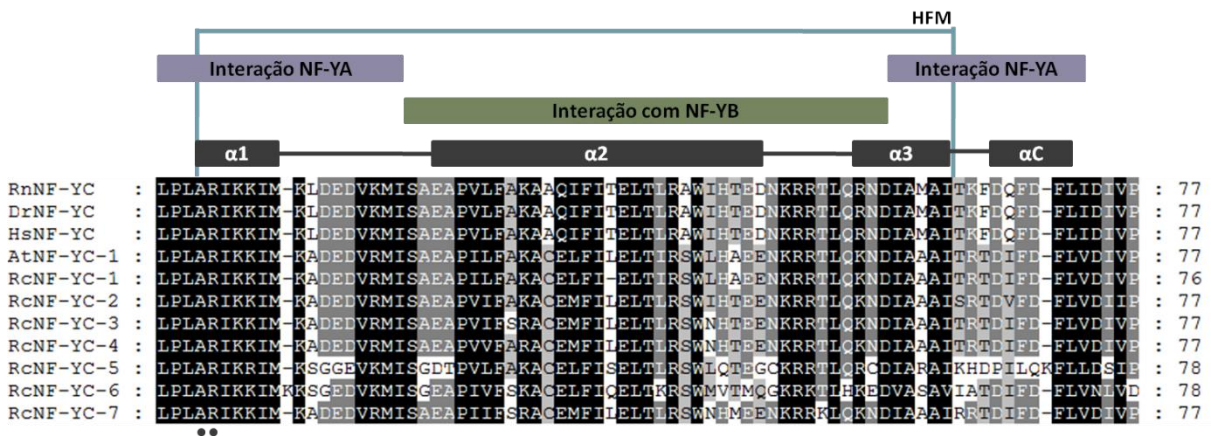
sementes, eles são expressos em diferentes tecidos e fases do desenvolvimento (SIEFERS *et al.*, 2009).

Apesar de menos estudados, diversos trabalhos englobando os genes do tipo não-LEC1 vêm surgindo nos últimos anos. Plantas de *A. thaliana* superexpressando o gene *NF-YB1* apresentaram tolerância ao estresse de seca (NELSON, *et al.*, 2007) e quando a planta se encontra sob estresse de retículo, o fator bZIP28 atua em conjunto com NF-YA4, NF-YB3 e NF-YC2 na resposta ao estresse (LIU *et al.*, 2010). Ainda, NF-YB2 parece atuar no crescimento da raiz, sendo expresso nas áreas de maior divisão celular nesse órgão (BALLIF *et al.*, 2011), e no florescimento, assim como NF-YB3, por meio da regulação dos loci *FT* e *SOC1* (CAI *et al.*, 2007; KUMIMOTO *et al.*, 2008; LIANG *et al.*, 2012).

Além disso, os membros do tipo não-LEC1 estão associados à gênese de cloroplastos em arroz, regulando a expressão de genes cujos produtos têm localização cloroplastídica (MIYOSHI *et al.*, 2003). Em trigo, NF-YB3 atua na regulação da fotossíntese pela modulação da expressão de genes envolvidos com o processo fotossintético e com a síntese de clorofila (STEPHENSON *et al.*, 2011).

### **1.3.3. A subunidade NF-YC**

As proteínas NF-YC são caracterizadas por um domínio conservado contendo quatro alfa-hélices putativas, no qual uma região é responsável pela interação com membros NF-YB e outras regiões são responsáveis pela interação com NF-YA. Assim como os membros de NF-YB, os fatores NF-YC possuem um motivo HFM, mas esse é mais relacionado à histona H2A (ROMIER *et al.* 2003; DOLFINI *et al.*, 2012) (Figura 3).



**Figura 3 – Alinhamento do domínio conservado de NF-YC.**

Nesse alinhamento foram utilizadas as sequências de NF-YA de rato (Rn), peixe zebra (Dr), humano (Hs), *A. thaliana* (At) e mamona (Rc). Os círculos representam uma região de ligação ao DNA (LALOU *et al.*, 2013). HFM: Motivo de histona (H2A). Motivos baseados em ROMIER *et al.*, 2003.

Um dos primeiros estudos com NF-YC em plantas mostrou que a montagem do complexo heterotrimérico é regulada por luz e citocinina, e esse complexo atua na regulação do gene que codifica a subunidade  $\gamma$  da enzima cloroplasto ATP sintase (KUSNETSOV *et al.*, 1999). Estudos em *A.thaliana* e tomate permitiram identificar membros de NF-YC capazes de interagir com CO e CO-like, respectivamente, envolvidos na regulação do florescimento (WENKEL *et al.*, 2006; BEN-NAIM *et al.*, 2006). Em *A.thaliana*, NF-YC 3, 6 e 9 interagem fisicamente com NF-YB2 e 3 atuando na ativação do locus FT durante a iniciação floral dependente do fotoperíodo (KUMIMOTO *et al.*, 2010).

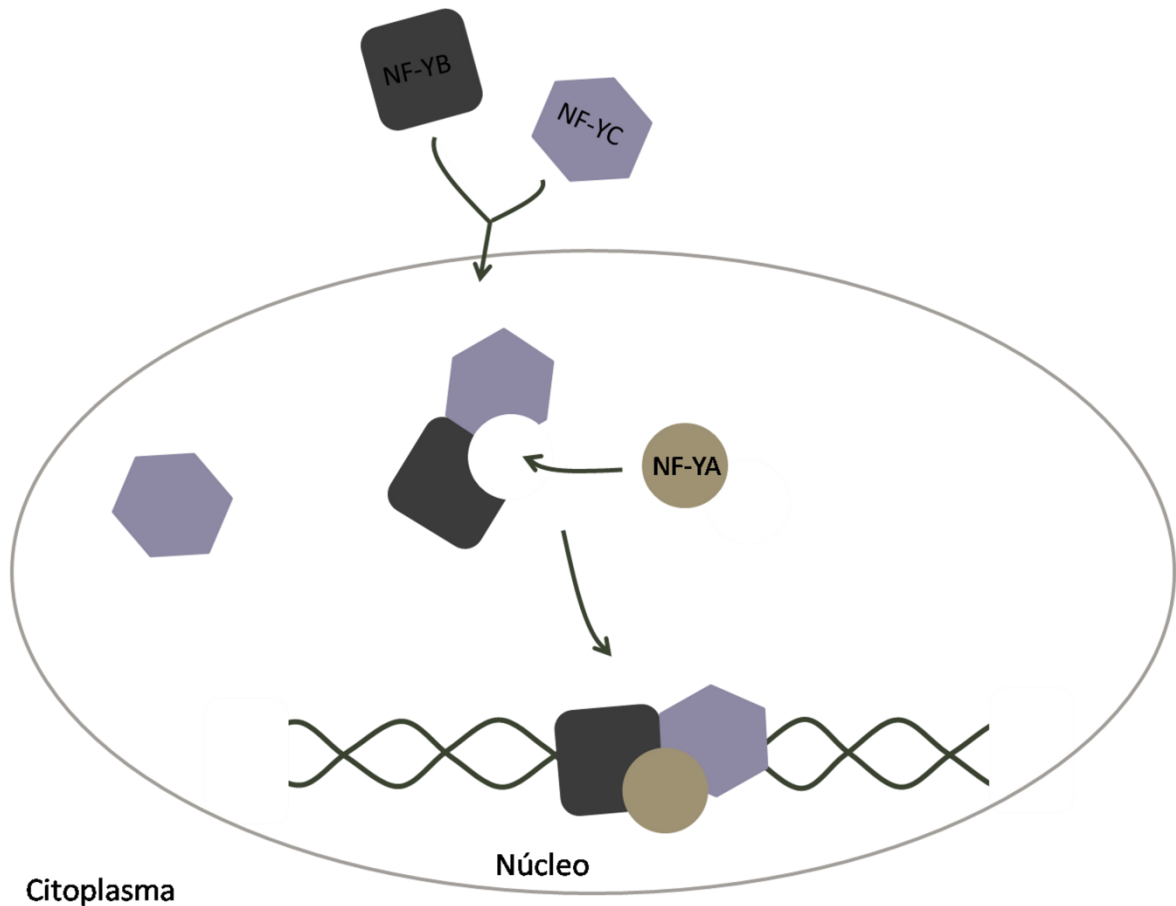
Durante a interação entre o feijoeiro e bactérias do gênero *Rhizobium*, NF-YC1 desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de nódulos, possivelmente pela ativação de genes do ciclo celular, permitindo a ativação das divisões celulares na região cortical da raiz. Além disso, a superexpressão do gene *NF-YC1* parece ter influência no processo de seletividade da infecção das raízes de feijoeiro por uma determinada cepa de *Rhizobium* e apresenta um impacto positivo na formação de nódulos, sugerindo a especialização desse membro na simbiose dessa leguminosa (ZANETTI *et al.*, 2007).

#### 1.4. A associação do trímero

Visto que NF-YB e NF-YC possuem regiões de sequências homólogas às histonas H2B e H2A respectivamente, e elas são importantes para a heterodimerização, SINHA (1995) sugeriu um modelo em que no fator NF-Y de rato, inicialmente um dímero é formado entre as subunidades NF-YB e NF-YC e, então o membro da subunidade NF-YA se liga e passa a fazer parte do complexo que então adquire a capacidade de ligação ao DNA. Esse modelo sugere que a associação entre NF-YB e NF-YC resulta na formação de uma interface que permite a interação com NF-YA, já que o mesmo não é capaz de interagir com as outras subunidades separadamente. Além disso, já se sabe que o fator NF-Y reconhece e se liga à cavidade menor do DNA e que as sequências que flanqueiam o pentanucleotídeo influenciam no grau de curvatura do DNA (RONCHI *et al.*, 1995) e as regiões importantes para a interação entre as subunidades e a ligação ao DNA já foram identificadas (SINHA *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 1996).

Até o momento, não há qualquer estudo aprofundado sobre a formação de trímeros entre os fatores de transcrição NF-Y em plantas e o modelo animal é amplamente aceito (HACKENBERG *et al.*, 2012; CALVENZANI *et al.*, 2012; LALOUM *et al.*, 2013) (Figura 4). Sabe-se, no entanto, que os membros da subunidade “A” apresentam localização exclusivamente nuclear (LIU & HOWELL, 2010; CAO *et al.*, 2011; HACKENBERG *et al.*, 2012); os membros de NF-YB têm localização variável: AtNF-YB3 foi descrito como nuclear (CAI *et al.*, 2007), mas outros membros são predominantemente localizados no citoplasma, e seu transporte para o núcleo é mediado pela interação com NF-YC (HACKENBERG *et al.*, 2012), em contraste com a localização subcelular em mamíferos, onde NF-YA e NF-YB são nucleares, e NF-YC, citoplasmático, migrando para o núcleo após a dimerização com NF-YB (FRONTINI, *et al.*, 2004).

Uma variação a esse modelo seria sustentada pela evidência de que o dímero NF-YB/C poderia se ligar a sequências que não possuem o CCAAT-box quando NF-YA é substituído por outros fatores de transcrição como bZIP28 (LIU & HOWELL, 2010), bZIP67 (YAMAMOTO *et al.*, 2009), MADS18 (MASIERO *et al.*, 2002), CO e COL (WENKEL *et al.*, 2006) e VRN2 (LI *et al.*, 2011).



**Figura 4 – Modelo da formação do trímero em plantas**

NF-YB e NF-YC, co-localizados no citoplasma, interagem e entram no núcleo da célula. A formação desse dímero cria uma interface que permite a associação de NF-YA. Somente após a formação do trímero há o reconhecimento da sequência alvo e ligação ao DNA. NF-YB só entra no núcleo quando associado à NF-YC; NF-YA possui localização nuclear e NF-YC está presente tanto no citoplasma quanto no núcleo, sozinho ou associado aos outros membros de NF-Y (LIU & HOWELL, 2010; CAO *et al.*, 2011; HACKENBERG *et al.*, 2012). Esquema baseado no modelo proposto por SINHA *et al.* (1995) e modificado por LALOUM *et al.* (2013).

### 1.5. O modelo de estudo

Os fatores NF-Y já foram estudados em diversas espécies de plantas, e, apesar da clara participação das proteínas do tipo LEC1 na regulação da síntese de ácidos graxos (MU *et al.*, 2008), muito pouco se têm avançado no estudo desses genes em plantas oleaginosas. Os poucos estudos abrangem oleaginosas como cacau (ALEMANNO *et al.*, 2008), girassol (FAMBRINI *et al.*, 2006; CHIAPETTA *et*

*al.*, 2009) e canola (TAN *et al.*, 2011; LEVESQUE-LEMAY *et al.*, 2003; LIU & HOWELL, 2010).

A mamona (*Ricinus communis*) é um arbusto perene, cultivado principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da Índia, China e Brasil. A semente desta oleaginosa pode acumular 60% de óleo na forma de triacilglicerol, que serve como reserva energética para a germinação da semente e o crescimento da plântula. O óleo de mamona é o único em que 90% do seu conteúdo de triacilglicerol é composto pelo ácido ricinoleico (ácido 12 - hidróxi-9-cis-octadecenoico). O grupamento hidróxi presente nessa molécula confere propriedades únicas a este óleo, tornando a mamona uma matéria-prima favorável a diversos ramos industriais, como a fabricação de cosméticos, tintas, revestimentos, plásticos, produtos fungicidas, anticongelantes e lubrificantes, além da produção de biodiesel (GOODRUM & GELLER, 2005; CHEN *et al.*, 2007).

A multiplicidade de cópias dos genes NF-Y em plantas levanta a importante questão: cada membro de uma subunidade interage com quaisquer outros membros das outras subunidades de NF-Y ou cada membro de cada subunidade interage apenas com um específico membro de cada uma das duas outras subunidades de NF-Y (THIRUMURUGAN *et al.*, 2008)? Para compreender o processo de regulação transcricional desencadeado durante o desenvolvimento da semente e síntese de ácidos graxos, é importante identificar quais os membros das subunidades NF-YA e NF-YC interagem com LEC1 e L1L para formar o fator de transcrição NF-Y em sementes de mamona.

## Objetivos

Tendo em vista a escassez de trabalhos abordando os fatores de transcrição NF-Y em plantas em comparação aos de animais, já bem caracterizados, o objetivo geral desta dissertação foi determinar a capacidade de interação entre membros de diferentes subunidades do fator de transcrição NF-Y em plantas de mamona.

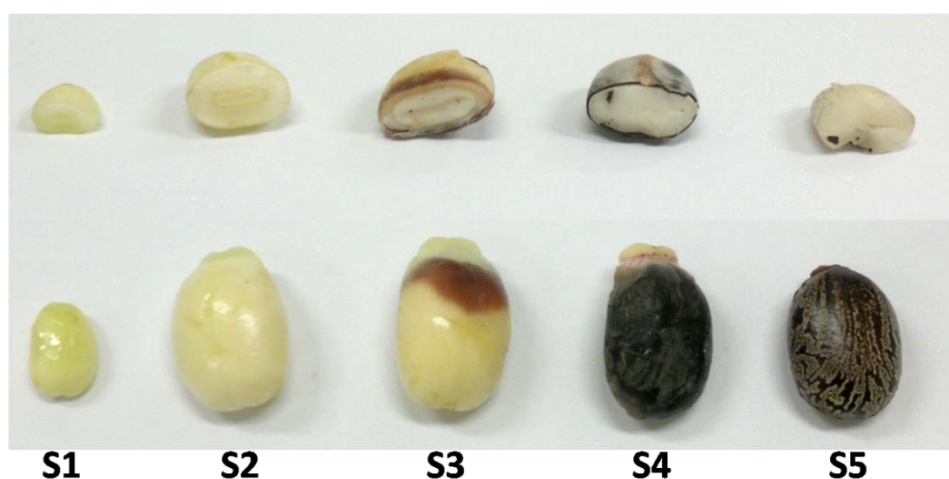
Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Analisar a expressão dos seis genes de NF-YA em cinco diferentes fases do desenvolvimento de sementes de mamona, por PCR quantitativa.
2. Testar a formação de dímeros entre membros de NF-YA que são expressos em semente e LEC1 e L1L pela técnica de duplo-híbrido em levedura.
3. Testar a formação de dímeros entre membros de NF-YA e membros de NF-YC expressos em semente.
4. Testar a formação de trímeros por meio de um duplo-híbrido modificado.

## Materiais e Métodos

### Material Vegetal

Sementes de mamona da cultivar IAC Guarani em diferentes estádios de desenvolvimento foram cedidas pela Embrapa Clima Temperado. Com base nas diferenças morfológicas externas, foram coletadas amostras de cinco diferentes fases de desenvolvimento (GREENWOOD & BEWLEY, 1981; CHEN *et al.*, 2004). Foram coletadas quatro replicatas biológicas, compostas por um conjunto de três sementes para cada uma das cinco fases. A fase S1 corresponde à primeira fase, quando o pró-embrião dá início ao desenvolvimento do embrião. Na fase S2, o embrião assume a forma globular e o aumento de volume da semente se deve à expansão do integumento. Nessas duas primeiras fases, a testa ainda possui coloração totalmente marfim. Na fase S3, o embrião apresenta formato de coração e se inicia o desenvolvimento dos cotilédones; o endosperma aumenta em volume com a deposição de óleo, proteína e outras substâncias de reserva. A testa já começa a escurecer. Na fase S4 o endosperma atinge seu volume máximo e os cotilédones atingem a maturidade. A testa já assume a coloração escura. A fase S5 corresponde à semente madura, que consiste em uma massa de endosperma e um embrião com dois cotilédones delgados no centro do endosperma, cobertos por um tegumento (testa) e com a presença de carúncula. (Figura 5).



**Figura 5 – A cinco fases do desenvolvimento das sementes de mamona.**

S1 a S5 representam cada uma das 5 fases coletadas. Baseado em: GREENWOOD & BEWLEY, 1981 & CHEN *et al.*, 2004.



## **Purificação de RNA**

O material vegetal foi pulverizado em nitrogênio líquido e aproximadamente 100 mg foi utilizado para a purificação de RNA. O RNA total foi extraído utilizando-se 1 ml de Trizol (Invitrogen). As amostras foram homogeneizadas, permaneceram por 5 minutos à temperatura ambiente e foram centrifugadas a 12000g por 10 minutos a 4°C para facilitar a remoção do óleo. Foram adicionados 200 µl de clorofórmio e as amostras foram agitadas vigorosamente. Após permanecerem por 5 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C. A porção superior, fase aquosa, foi coletada e transferida para um novo tubo contendo 500 µl de isopropanol e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. O RNA foi coletado através de centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C. A lavagem do RNA obtido foi realizada com 1 ml de etanol 70% e o mesmo foi ressuspendido em 50 µl de água destilada deionizada autoclavada, incubado a 65°C por 15 minutos e permaneceu estocado a -80°C.

## **Síntese de cDNA**

A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se a transcriptase M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). Inicialmente, o RNA purificado foi tratado com DNase (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante. Foi, então, preparada uma mistura de reação (mix) contendo 1 µl de oligonucleotídeo Poli-T (0,5 µM) e 1 µl dNTP (10 µM). A este mix foi adicionado 1 µg de RNA tratado com DNase. As reações foram incubadas por 5 minutos a 65°C e imediatamente transferidas para o gelo. Posteriormente, foram adicionados 27 µl de água destilada deionizada autoclavada e 10 µl do tampão da enzima transcriptase reversa M-MLV (Promega). As reações foram homogeneizadas e foi adicionado 1 µl da enzima (200U/µl). Após a incubação por 2 horas a 37°C, o material foi incubado a 70°C por 15 minutos. O volume final foi diluído 10 vezes e armazenado a -20°C.

## **Análises de expressão por RT-qPCR**

Para as reações de PCR quantitativo, as amostras de cDNA foram diluídas cinco vezes. Foi preparada uma mistura de reação contendo 0,2 $\mu$ M de cada primer (direto e reverso); 0,1mM de dNTPs; 1x PCR Buffer, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25U Platinum Taq Polimerase e 0,1x SyBr Green (Invitrogen). As reações de RT-qPCR foram realizadas com um passo inicial de desnaturação de 5 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 10 segundos a 60° e 15 segundos a 72°C. O método utilizado para avaliar a expressão relativa aos genes *EF1 $\alpha$*  (*Elongation factor 1 $\alpha$* ) e *UBI2* (*Ubiquitina 2*) foi o  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) e a análise estatística empregada foi ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett.

## **Duplo-híbrido em levedura**

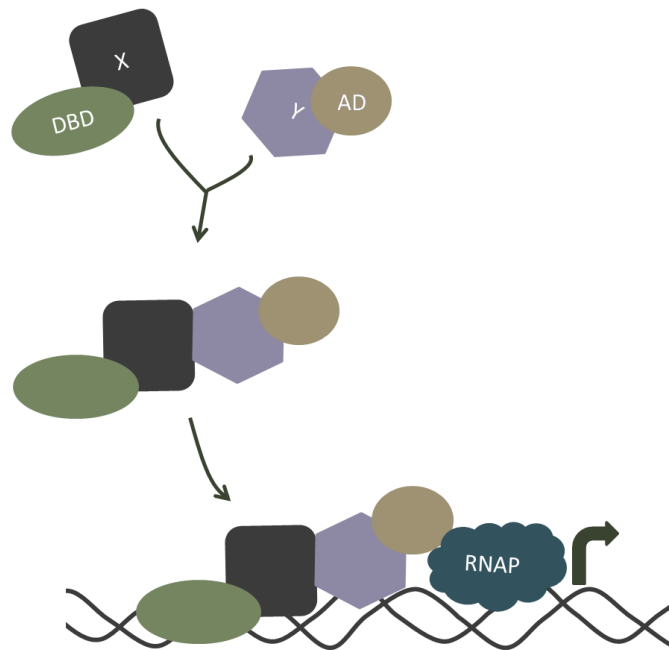
A análise das interações entre NF-YA e NF-YC e entre NF-YA e LEC1 ou L1L foram realizadas por duplo híbrido em levedura. Essa técnica consiste na expressão de duas proteínas fusionadas ou ao domínio de ativação da transcrição ou ao domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição Gal4. Se essas duas proteínas interagirem, elas irão restaurar a função do fator de transcrição Gal4, promovendo a transcrição do gene repórter e permitindo o crescimento da levedura na ausência de marcadores auxotróficos e do repórter (Figura 6).

Para esta técnica, as sequências codificadoras das subunidades NF-YA foram amplificadas por PCR a partir de cDNA de semente com oligonucleotídeos iniciadores específicos (Apêndice), foram clonadas no vetor de entrada pENTR. Os clones foram confirmados através de PCR, clivagem com duas enzimas de restrição e sequenciamento. Os clones foram recombinados para os vetores de destino pDEST22 e pDEST32 (Invitrogen) através de reação com a enzima LR Clonase II (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante, e foram confirmados através de PCR e clivagem com enzimas de restrição. Os vetores pDEST22 e pDEST32 permitem a expressão de uma proteína fusionada ao domínio de ativação da transcrição do fator Gal4 e ao domínio de ligação ao DNA do fator Gal4, respectivamente (as sequências codificadoras das subunidades NF-YC, LEC1 e L1L

já haviam sido previamente clonadas nesses vetores em um trabalho prévio do grupo). Todas as transformações foram realizadas por choque térmico, com bactérias DH5 $\alpha$  termocompetentes (Apêndice). As cepas de leveduras utilizadas foram AH109 (Clontech) e PJ-694a, gentilmente cedida pelo Prof. Shaker Chuck Farah, da USP (JAMES *et al.*, 1996) (Apêndice). As leveduras foram transformadas pelo método mediado por LiAc, ssDNA e PEG (GIETZ *et al.*, 2005) (Apêndice). Os marcadores auxotróficos utilizados foram o triptofano para o pDEST22, a leucina para o pDEST32, e o gene repórter avaliado foi o *HIS3*.

Os plasmídeos que permitiam expressar as proteínas fusionadas ao domínio de ligação ao DNA foram testados quanto à capacidade de auto-ativação da transcrição em concentrações crescentes de 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT). A proteína NF-YA3 apresentou auto-ativação até 30 mM de 3-AT, e a concentração utilizada para a visualização das interações foi de 40 mM. As outras proteínas não apresentaram auto-ativação em 5 mM de 3-AT e a concentração de 10mM foi utilizada para visualização das interações. Nesse teste, os plasmídeos que codificam as proteínas fusionadas ao domínio de ligação (pDEST32) são transformadas em levedura juntamente com o vetor que codifica o domínio de ativação da transcrição vazio (pDEST22).

As leveduras transformadas foram plaqueadas em meio SD-LT. Foram escolhidas quatro colônias isoladas, que foram diluídas em 100  $\mu$ l de água deionizada estéril e plaqueadas em dois meios SD-LTH independentes na forma de gotas de 5 $\mu$ l. Cada possível interação de NF-YA com NF-YC foi testada em dois sentidos: em um deles, a subunidade A está clonada no vetor pDEST22 e a subunidade C no vetor pDEST32 e no outro a subunidade A está clonada no vetor pDEST32 e a subunidade C no vetor pDEST22. As interações positivas foram caracterizadas pelo crescimento em meio SD na ausência de leucina, triptofano e histidina (SD-LTH). As interações negativas foram caracterizadas pela ausência de crescimento em meio SD sem os marcadores auxotróficos e o repórter (SD-LTH) e o crescimento no meio SD suplementado com leucina, triptofano e histidina (SD+LTH).



**Figura 6 – Duplo-híbrido em levedura.**

As proteínas X e Y são expressas fusionadas ao domínio de ligação ao DNA ou de ativação da transcrição, respectivamente. Se essas proteínas interagirem, elas irão restaurar a atividade do fator de transcrição Gal4 e ativar a transcrição do gene repórter.

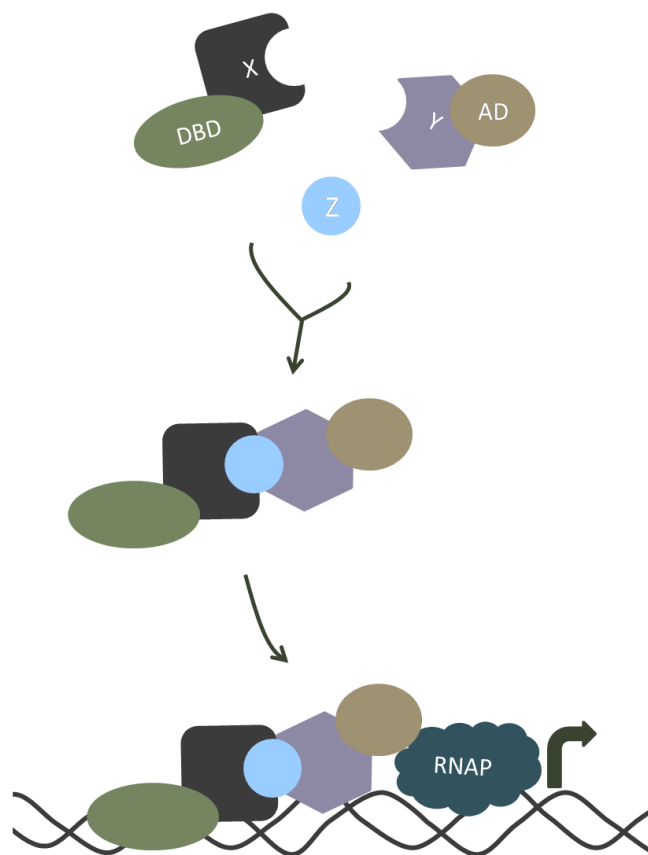
### Duplo-híbrido em levedura modificado

Também chamado de “Triplo-híbrido em levedura”, essa técnica consiste em um duplo híbrido com a expressão adicional de uma terceira proteína não-fusionada (ZHANG & LAUTAR, 1996). Essa técnica pode ser aplicada quando as proteínas fusionadas aos domínios do fator de transcrição Gal4 não interagem.

As sequências codificadoras de LEC1 e L1L foram amplificadas por PCR a partir de cDNA de sementes e clonadas no vetor pGEM T (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante. Os plasmídeos foram digeridos com enzimas de restrição Sac1 e Pst1 e os fragmentos foram purificados do gel de agarose com o kit ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) e ligados no vetor pVT-103u (VERNET, *et al.*, 1987) por uma reação com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante. Todas as transformações foram realizadas por choque térmico, com bactérias DH5 $\alpha$  termocompetentes (Apêndice).

Nesta técnica, as leveduras previamente transformadas com os plasmídeos pDEST22 e pDEST32 são inoculadas em meio SD-LT e transformadas

de acordo com o protocolo descrito no Apêndice. A formação de trímeros foi caracterizada pelo crescimento em meio SD na ausência de leucina, triptofano, uracila e histidina (SD-LTUH). As interações negativas foram caracterizadas pela ausência de crescimento em meio SD sem os marcadores e o repórter (SD-LTUH) e o crescimento no meio SD suplementado com leucina, triptofano, uracila e histidina (SD+LTUH). Quando a interação por duplo-híbrido é confirmada, não se pode inferir sobre a formação de trímero através deste método, já que a proteína expressa pelo sistema de triplo-híbrido serve como uma ponte para a interação de duas proteínas fusionadas que não interagem entre si na ausência da terceira.



**Figura 7 – Duplo-híbrido em levedura modificada.**

As proteínas X e Y são expressas fusionadas ao domínio de ligação ao DNA ou de ativação da transcrição, respectivamente e não interagem. Se uma proteína Z for expressa e permitir a formação de um trímero, a atividade do fator de transcrição Gal4 será restaurada e permitirá a ativar a transcrição do gene repórter HIS3.

#### 4. Resultados e Discussão

Vários aspectos do desenvolvimento são controlados por complexas redes de fatores de transcrição, que convertem sinais do ambiente em regulação da expressão gênica. Enquanto alguns fatores de transcrição atuam por meio da ligação a *cis*-elementos individuais, outros atuam de forma combinatória, junto com outros fatores de transcrição, como o NF-Y em plantas, por exemplo. Além disso, a forma como diferentes subunidades do mesmo fator de transcrição são distribuídas espacialmente e temporalmente implica em efeitos variáveis no controle da expressão gênica. Em animais, a existência de um gene codificando cada uma das subunidades impõe a formação de um único fator NF-Y. Em plantas, a presença de múltiplos genes possibilita a formação de diferentes complexos NF-Y, potencialmente conferindo a esse fator numerosas funções (LALOUM et al., 2013).

A presença de múltiplos genes codificando cada uma das subunidades em plantas suscita uma importante questão: A interação entre os membros de cada subunidade é específica ou depende somente da coexpressão em um mesmo tecido e da colocalização subcelular?

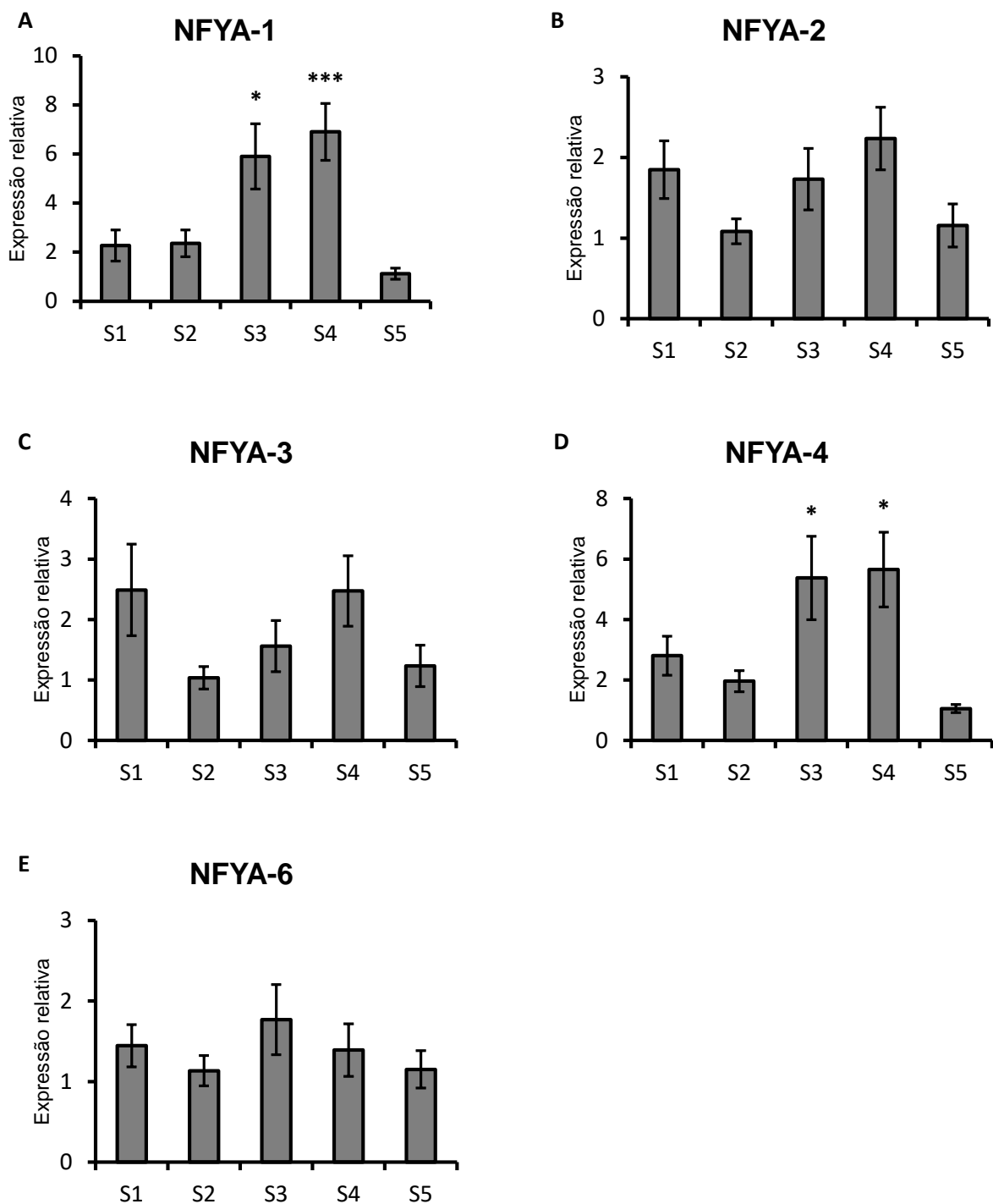
Para responder a esta pergunta:

- a) Traçamos o perfil da expressão dos seis genes que codificam subunidades NF-YA em sementes de mamona por RT-qPCR. Os perfis de expressão de LEC1, L1L e de NF-YC já foram alvo de um trabalho prévio do nosso grupo (CAGLIARI, 2013). De acordo com os esses dados, LEC1 e L1L de mamona são expressos em fases intermediárias do desenvolvimento de sementes (S3 e S4, principalmente) e os sete membros de NF-YC são expressos em semente.
- b) Testamos as interações entre NF-YA e LEC1 ou L1L, e entre NF-YA e NF-YC por meio de duplo-híbrido em levedura. As interações entre NF-YC e LEC1 ou L1L não foram testadas porque já foram alvo de investigação em um trabalho do nosso grupo. Nesse trabalho, observou-se que LEC1 é capaz de interagir com NF-YC2, 3, 4 e 5, enquanto L1L interage com NF-YC1, 2, 3, 4, 5 e 6. (CAGLIARI, 2013).
- c) Testamos a formação de trímeros entre NF-YA, NF-YC e LEC1 ou L1L por meio de duplo-híbrido em levedura modificado.

#### **4.1. Perfil de expressão de NF-YA em sementes de mamona**

A análise do perfil de expressão dos seis genes que codificam os membros de NF-YA revelou que, com exceção do gene NF-YA5, todos os membros são expressos em sementes de mamona em todas as cinco fases de desenvolvimento (Figura 6). O gene NF-YA5 não foi detectado em qualquer fase de desenvolvimento, sugerindo que esse gene não é expresso em semente. Os genes NF-YA2, 3 e 6 são expressos de forma constante ao longo do desenvolvimento das sementes, enquanto os genes NF-YA1 e 4 são mais expressos nas fases S3 e S4 - as mesmas onde ocorrem os picos de expressão de LEC1 e L1L segundo dados do nosso grupo (CAGLIARI, 2013).

Para entender a variabilidade e a diversificação funcional dos complexos NF-Y em plantas, é necessário elucidar as especificidades das interações entre os membros de cada subunidade. Assim, com base nesses resultados de expressão, mesmo que NF-YA5 fosse capaz de interagir fisicamente com LEC1 e L1L, ele não é expresso em sementes, o que indica que uma possível interação não seja funcional nesse órgão. Por isso, esse gene não foi considerado nas análises posteriores.



**Figura 8 – Perfil de expressão dos genes NF-YA durante o desenvolvimento da semente.**

As figuras “A” a “E” mostram a expressão relativa de NF-YA1, 2, 3, 4 e 6 em cada uma das fases de desenvolvimento da semente de mamona (S1 a S5). Os experimentos de RT-qPCR foram normalizados por EF1 $\alpha$  e UBI NE calculados pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Para cada transcrito analisado, as médias foram comparadas com o estágio S5. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via, seguido de teste de Dunnett, com  $p < 0,05$ . \* indica  $p < 0,05$  e \*\*\* indica  $p < 0,01$ .



Os nossos dados de expressão de NF-YA são consistentes com os dados de transcriptoma de mamona descritos por BROWN *et al.* (2012). Nesse trabalho, os autores realizaram a análise do transcriptoma de endosperma comparando as fases iniciais e finais do desenvolvimento da semente de mamona e, com exceção do gene NF-YA5, todos os genes são expressos nessas fases.

No mesmo trabalho, os autores analisaram a expressão gênica a partes como plântulas, folhas e flores masculinas, e, em nenhum deles foi detectada a expressão de NF-YA5, o que sugere que, ou NF-YA5 é um pseudo-gene, ou ele é expresso em níveis muito baixos. Ainda, se ele for expresso em algum outro órgão, provavelmente não é parceiro molecular de LEC1 e L1L, já que não é expresso em sementes.

Além disso, nossos dados estão de acordo com dados prévios de expressão em outras espécies de plantas: YAZAWA & KAMADA (2007) analisaram a expressão de NF-YA1 e 2 em cenoura e constataram que eles são expressos durante todo o desenvolvimento da semente; e, em *A.thaliana*, nove dos dez membros de NF-YA são expressos em duas fases testadas do desenvolvimento da semente (MU *et al.*, 2013).

#### **4.2. Interações entre NF-YA e LEC1 ou L1L**

A capacidade de formação de dímeros entre os cinco membros de NF-YA expressos em sementes e LEC1 ou L1L foi testada por ensaio de duplo-híbrido em levedura, utilizando as cepas AH-109 e PJ-694a. No entanto, não foram observadas interações entre essas subunidades por essa técnica.

Esses resultados estão de acordo com o modelo pré estabelecido e com dados prévios em plantas: em cenoura, YAZAWA & KAMADA (2007) não encontraram interações entre LEC1 e um membro de NF-YA (HAP2B) em experimentos de imunoprecipitação; em *A.thaliana*, também não foram observadas interações entre quaisquer dos membros de NF-YA com LEC1 ou L1L por meio de duplo-híbrido em levedura (HACKENBERG *et al.* 2012). Por outro lado, em arroz, apesar de não terem sido demonstradas interações entre dois membros de NF-YA (HAP2F e HAP2G) por ensaios de *pull-down*, essas interações foram positivas pelo duplo-híbrido em levedura (THIRUMURUGAM *et al.* 2008).

Esses resultados permitiram concluir que a interação entre dois membros de subunidades diferentes de NF-Y não se dá somente por coexpressão em um determinado tecido, ela ocorre de maneira específica, já que os genes testados são coexpressos em semente e não interagiram nos testes realizados.

### 4.3. Interações entre NF-YA e NF-YC

As interações entre cinco membros de NF-YA com seis membros de NF-YC expressos em sementes foram testadas através de duplo-híbrido em levedura, utilizando a cepa PJ-694a. O gene NF-YC7 foi retirado das análises porque a transcrição do gene em sementes produziu um cDNA que corresponde a uma isoforma que não possui o domínio NF-YC (CAGLIARI, 2013).

Os resultados dessas análises mostram que membros de NF-YA e de NF-YC têm capacidade de dimerização. Foram observadas interações entre NF-YC1 e NF-YA2 e 3. Os membros NF-YC2, NF-YC3 e NF-YC4 foram capazes de interagir com NF-YA1, NF-YA2 e NF-YA3. NF-YA6 foi capaz de interagir com NF-YC2, NF-YC3, NF-YC4 e NF-YC5, pelo menos em um sentido do duplo-híbrido (Tabela 1, Tabela 2, Figura 9, Figura 10).

AD / BD	NF-YC1	NF-YC2	NF-YC3	NF-YC4	NF-YC5	NF-YC6
NF-YA1						
NF-YA2						
NF-YA3						
NF-YA4						
NF-YA6						

**Tabela 1 – Interações entre NF-YA e NF-YC**




























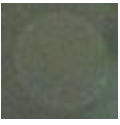


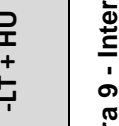

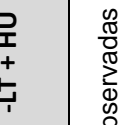
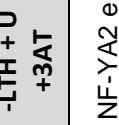

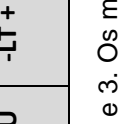
Nesse sentido do duplo-híbrido em levedura, NF-YA está fusionada ao domínio de ativação da transcrição (AD) e NF-YC está fusionada ao domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição Gal4 (BD). Em cinza são representadas as interações entre NF-YA e NF-YC. Em branco, as interações que não ocorreram nesse sentido.

BD / AD	NF-YC1	NF-YC2	NF-YC3	NF-YC4	NF-YC5	NF-YC6
NF-YA1						
NF-YA2						
NF-YA3						
NF-YA4						
NF-YA6						

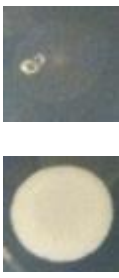



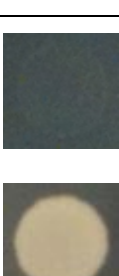
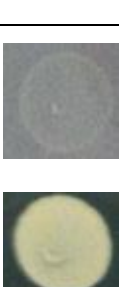



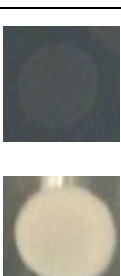
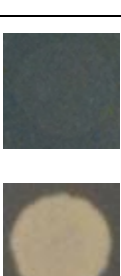
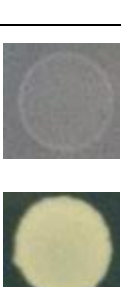
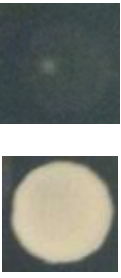



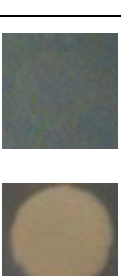
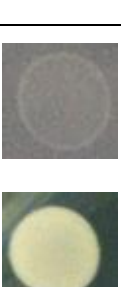
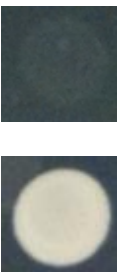
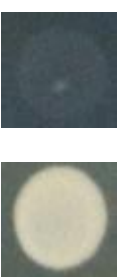
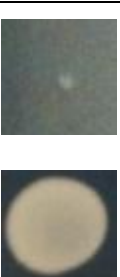
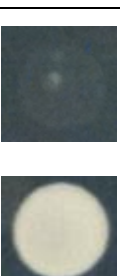
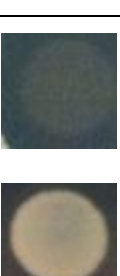
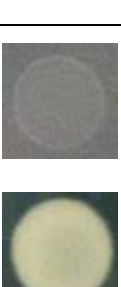
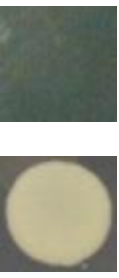




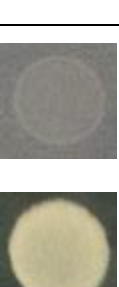
**Tabela 2 – Interações entre NF-YA e NF-YC**

Nesse sentido do duplo-híbrido em levedura, NF-YC está fusionada ao domínio de ativação da transcrição (AD) e NF-YA está fusionada ao domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição Gal4 (BD). Em cinza são representadas as interações entre NF-YA e NF-YC. Em branco, as interações que não ocorreram nesse sentido.

Além da co expressão em semente, dados da literatura indicam que NF-YA e NF-YC possuem a mesma localização subcelular. Já foi demonstrado que, em *A.thaliana*, NF-YA2 e 4 e NF-YC2 apresentam localização nuclear e NF-YC9 é encontrada tanto no citoplasma quanto no núcleo. Já os membros de NF-YB apresentam localização citoplasmática e NF-YB10 é transportada ao núcleo quando co-expresso com NF-YC2 (HACKENBERG *et al.*, 2012). Nesse mesmo estudo, foram avaliadas as interações entre todos os membros de NF-Y em *A.thaliana* e de 130 interações possíveis, ou seja, 260 combinações entre NF-YA e NF-YC, foram encontradas 39 interações positivas em um sentido, e duas interações positivas em ambos os sentidos (entre NF-YA3 e NF-YC 1 e 4). Apesar disso, esses dados precisam ser analisados com muita cautela e devem ser confirmados por outras técnicas, como BiFC e *pull-down*.

BD	AD	NF-YC1	NF-YC2	NF-YC3	NF-YC4	NF-YC5	NF-YC6
NF-YA1							
NF-YA2							
NF-YA3							
NF-YA4							
NF-YA6							
							

**Figura 9 - Interação entre NF-YA (AD) e NF-YC (BD).** Nesse sentido, foram observadas interações entre NF-YC1 e NF-YA2 e 3. Os membros NF-YC2, NF-YC3 e NF-YC4 foram capazes de interagir com NF-YA1, 2 e 3.

AD BD	NF-YC1	NF-YC2	NF-YC3	NF-YC4	NF-YC5	NF-YC6
NF-YA1						
NF-YA2						
NF-YA3						
NF-YA4						
NF-YA6						
	-LT + HU	-LT + HU	-LT + HU	-LT + HU	-LT + HU	-LT + HU
	-LTH + U +3AT	-LTH + U +3AT	-LTH + U +3AT	-LTH + U +3AT	-LTH + U +3AT	-LTH + U +3AT

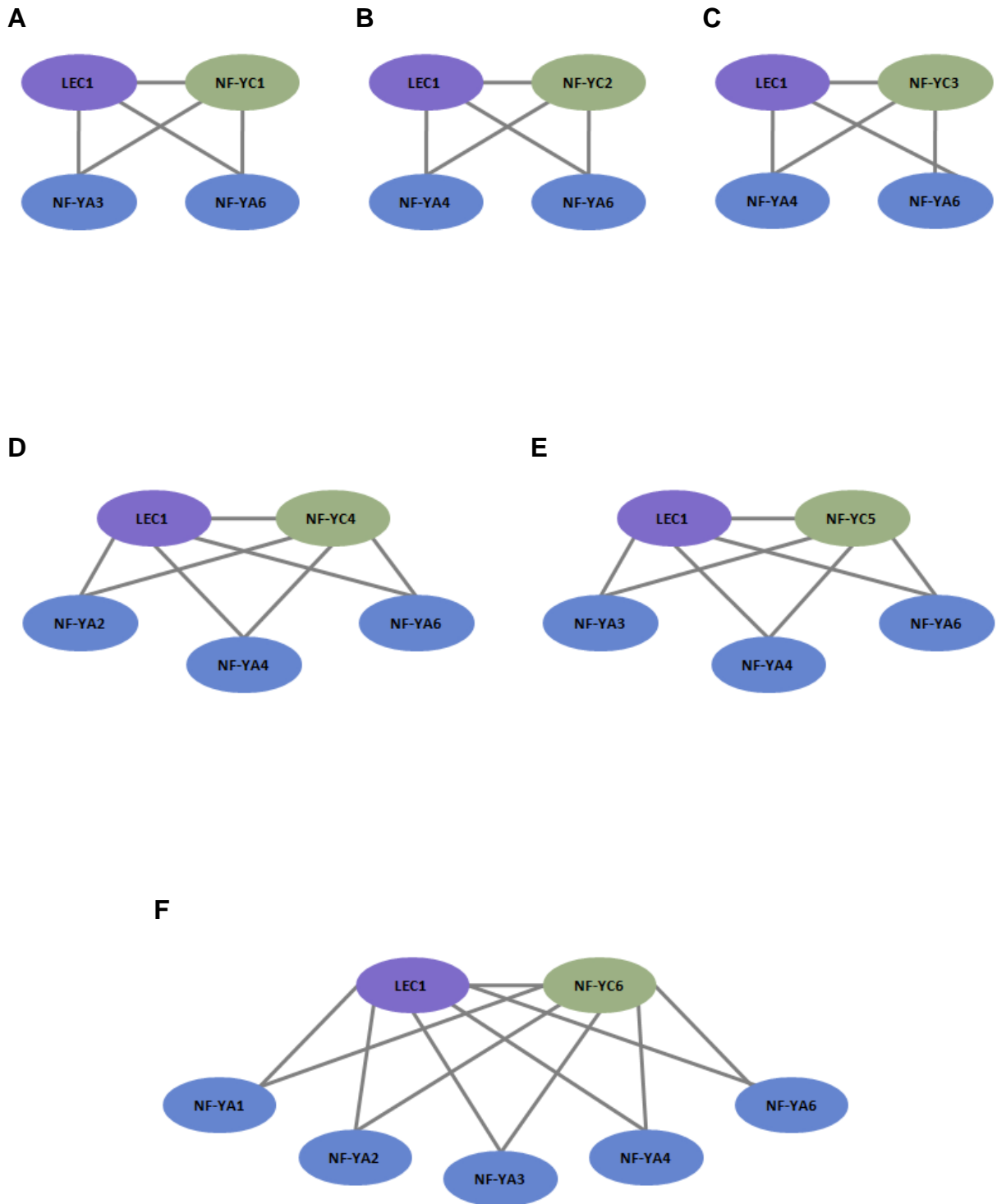
**Figura 10 - Interações entre NF-YA (BD) e NF-YC (AD).** Nesse sentido do duplo-híbrido, foram observadas interações entre NF-YC1 e NF-YA2. Os membros NF-YC2 e NF-YC3 foram capazes de interagir com NF-YA1, 2 e 3. NF-YC4 interage com NF-YA1 e 3. NF-YA6 interage com NF-YC2, 3, 4 e 5.

#### 4.4. Formação de trímeros entre NF-YA, NF-YC e LEC1 ou L1L

Devido ao grande número de complexos NF-Y que podem ser formados em plantas, pode-se concluir que as diferentes combinações possivelmente regulam uma diversidade de alvos, assim como devem existir combinações redundantes, atuando em um mesmo promotor (HACKENBERG *et al.*, 2012). Por isso, uma das questões mais interessantes acerca dos fatores NF-Y em plantas é como a expressão diferencial e a montagem dos trímeros assegura suas diferentes funções no controle transcricional.

Se todos os membros de NF-Y de mamona pudessem interagir e fossem coexpressos, teoricamente seriam formados 504 diferentes fatores de transcrição e, levando em conta somente as interações envolvendo os genes do tipo LEC1, seriam mais de 80 diferentes combinações. Os genes do tipo LEC1 vêm sendo extensivamente caracterizados, mas não se sabe quais são seus parceiros moleculares. Isso pode ser devido à complexidade dos processos envolvendo o desenvolvimento dos embriões (SIEFERS *et al.*, 2009) e, também, pela possibilidade de redundância entre as subunidades NF-Y (KUMIMOTO *et al.*, 2008 e 2010; MU *et al.*, 2013).

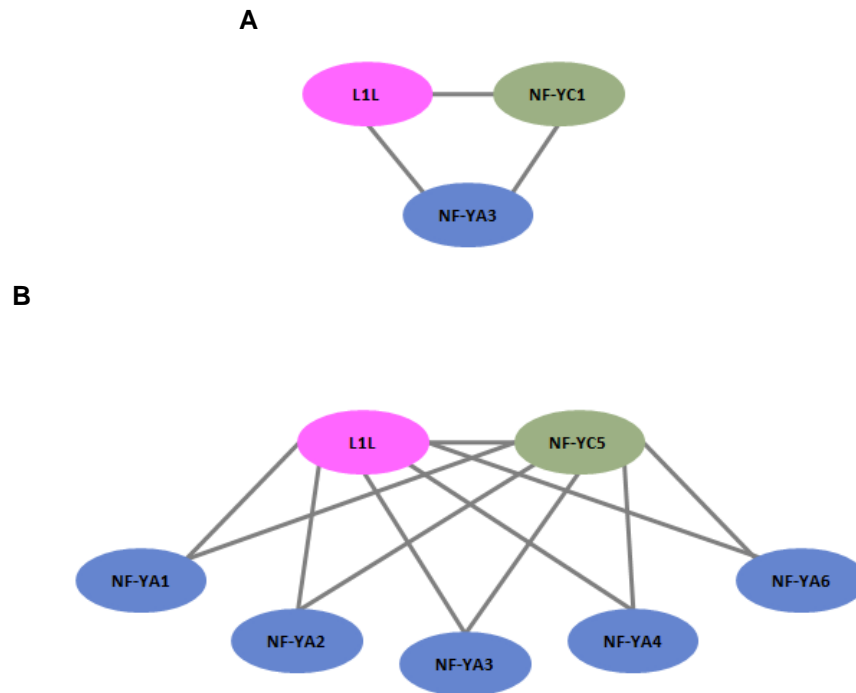
Por meio de um ensaio de duplo-híbrido modificado, visualizamos a formação de diversos trímeros entre as subunidades NF-Y que não apresentaram interação por duplo-híbrido convencional. NF-YC1 e LEC1 formaram trímeros com NF-YA3 e 6; NF-YC2 e LEC1 formaram trímeros com NF-YA4 e 6, assim como NF-YC3 e LEC1; NF-YC4 e LEC1 formaram trímeros com NF-YA2, 4 e 6; NF-YC5 e LEC1 formaram trímeros com NF-YA3, 4 e 6 e NF-YC6 e LEC1 formaram trímeros com NF-YA1, 2, 3, 4 e 6 (Figura 11, Figura 13, Figura 14). Já L1L forma trímeros com NF-YC1 e NF-YA3 e também com NF-YC5 e NF-YA1, 2, 3, 4 e 6 (Figura 12, Figura 15, Figura 16).



**Figura 11 – Formação de trímeros envolvendo LEC1**

Esquemas das interações observadas utilizando o sistema de duplo híbrido em levedura modificada. A) NF-YC1 e LEC1 formaram trímeros com NF-YA3 e 6. B) NF-YC2 e LEC1 formaram trímeros com NF-YA4 e 6. C) NF-YC3 e LEC1 formam trímeros com NF-YA4 e 6. D) NF-YC4 e LEC1 formaram trímeros com NF-YA2, 4 e 6; E)

NF-YC5 e LEC1 formaram trímeros com NF-YA3, 4 e 6. F) NF-YC6 e LEC1 formaram trímeros com NF-YA1, 2, 3, 4 e 6.



**Figura 12 – Formação de trímeros envolvendo L1L**

Esquemas das interações observadas utilizando o sistema de duplo híbrido em levedura modificada. A) Trímero formado entre L1L, NF-YC1 e NF-YA3. B) Trímeros formados entre L1L, NF-YC5 e NF-YA1, 2, 3, 4 e 6.




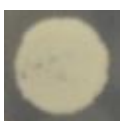









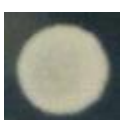










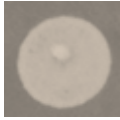






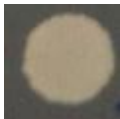






















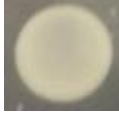
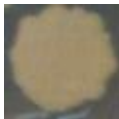




O foco deste trabalho foi estudar o potencial de interação proteína-proteína entre os membros de NF-Y em mamona. Por meio de um duplo-híbrido modificado, identificamos uma série de trímeros que podem estar atuando na transcrição dos genes-alvo de LEC1 e L1L. Utilizando essa mesma metodologia, foi identificado somente um trímero entre NF-YA4, NF-YB2 e NF-YC3 em *A. thaliana* (HACKENBERG *et al.*, 2012).

As diferenças na formação de trímeros observadas neste trabalho com LEC1 e L1L tendo parceiros moleculares diferentes corrobora com a hipótese de que suas atividades não sejam totalmente redundantes (KWONG *et al.*, 2003), já que a formação de diferentes fatores de transcrição pode estar regulando diferentes alvos transcricionais.



BD AD	NF-YC1	NF-YC2	NF-YC3	NF-YC4	NF-YC5	NF-YC6
NF-YA1						
NF-YA2						
NF-YA3						
NF-YA4						
NF-YA6						

**Figura 13 - Formação de trímeros entre LEC1, NF-YA (AD) e NF-YC (BD).** Nesse sentido, a formação de trímeros foi observada entre LEC1, NF-YC6 e NF-YA1, 2, 3, 4 e 6; entre LEC1, NF-YA4 e NF-YC2, 3, 4, e 5 e entre LEC1, NF-YA6 e NF-YC2, 3, 4 e 5.

AD BD	NF-YC1	NF-YC2	NF-YC3	NF-YC4	NF-YC5	NF-YC6
NF-YA1	 	 	 	 	 	 
NF-YA2	 	 	 	 	 	 
NF-YA3	 	 	 	 	 	 
NF-YA4	 	 	 	 	 	 
NF-YA6	 	 	 	 	 	 

**Figura 14 - Formação de trímeros entre LEC1, NF-YA (BD) e NF-YC (AD).** Nesse sentido, a formação de trímeros foi observada entre LEC1, NF-YA2 e NF-YC4; entre LEC1, NF-YA6 e NF-YC1 e entre LEC1, NF-YC6 e NF-YA2, 3, 4 e 6.

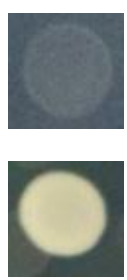




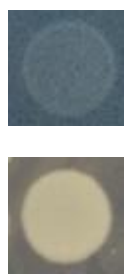











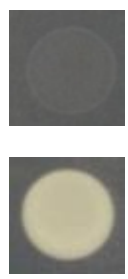
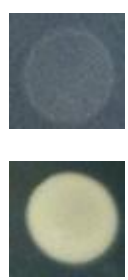
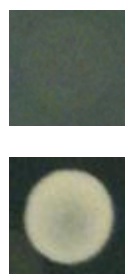
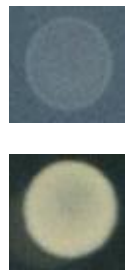


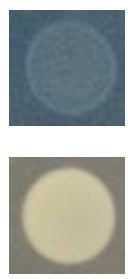

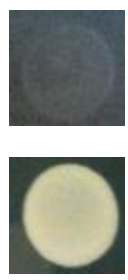
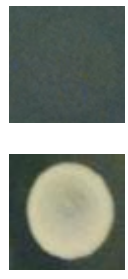

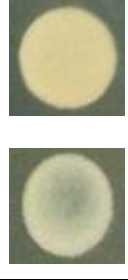
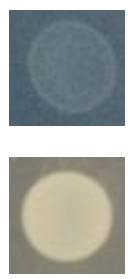
BD AD	NF-YC1	NF-YC2	NF-YC3	NF-YC4	NF-YC5	NF-YC6
NF-YA1						
NF-YA2						
NF-YA3						
NF-YA4						
NF-YA6						
	-LTU + H	-LTU + H	-LTU + H	-LTU + H	-LTU + H	-LTU + H
	-LTUH +3AT	-LTUH +3AT	-LTUH +3AT	-LTUH +3AT	-LTUH +3AT	-LTUH +3AT

Figura 15 - Formação de trímeros entre L1L, NF-YA (AD) e NF-YC (BD). Nesse sentido, a formação de trímeros foi observada entre L1L, NF-YC5 e NFYA1, 2, 3, 4 e 6.

AD BD	NF-YC1	NF-YC2	NF-YC3	NF-YC4	NF-YC5	NF-YC6
NF-YA1						
NF-YA2						
NF-YA3						
NF-YA4						
NF-YA6						

**Figura 16 - Formação de trímeros entre L1L, NF-YA (BD) e NF-YC (AD).** Nesse sentido, a formação de trímeros foi observada entre L1L, NF-YC1 e NF-YA3 e entre L1L, NF-YC5 e NF-YA2 e 3.

## 5. Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho, observou-se que a maior parte dos membros de NF-YA é expressa em sementes, assim como LEC1 e L1L, mas não é capaz de interagir com os mesmos conforme demonstrado por ensaios de duplo-híbrido em levedura, indicando que a interação não ocorre somente por coexpressão em um mesmo tecido. No entanto, NF-YA possui a capacidade de interação com NF-YC. Essas interações contrariam o modelo atualmente aceito. Por isso, devem ser observadas com cautela, visto que são necessários outros testes para verificar a validade dessas interações.

Apesar de alguns membros de NF-YA e NF-YC terem interagido por ensaios de duplo-híbrido e inviabilizado a visualização da formação de trímeros pelo duplo-híbrido modificado, os dados obtidos são suficientes para guiar futuras investigações sobre quem são os alvos transcricionais de LEC1 e L1L.

Já existem alguns trabalhos demonstrando que a superexpressão de *LEC1* em *A. thaliana* causa um aumento global na expressão de genes envolvidos com a síntese e com o acúmulo de ácidos graxos (MU *et al.*, 2008; JUNKER *et al.*, 2012b). Os dados deste trabalho podem ser úteis na investigação da ativação da transcrição de genes-alvos de LEC1 e da possibilidade de NF-YA regular negativamente a transcrição. Assim, como perspectiva imediata deste trabalho, está a determinação da funcionalidade dos diferentes trímeros na ativação e na repressão da transcrição desses genes-alvo, por meio de ensaios de transativação em protoplastos.

## 6. Referências Bibliográficas

ALBANI, D. & ROBERT, L. S. Cloning and characterization of a *Brassica napus* gene encoding a homologue of the B subunit of a heteromeric CCAAT-binding factor. *Gene*, 167: 209-213, 1995.

ALEMANNI, L.; DEVIC, M.; NIEMENAK, N.; SANIER, C.; GUILLEMINOT, J.; RIO, M.; VERDEIL, J. & MONTORO, P. Characterization of leafy cotyledon1-like during embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Planta*, 277: 853-866, 2008.

BALLIF, J.; ENDO, S.; KOTANI, M.; MACADAM, J. & WU, Y. Over-expression of HAP3b enhances primary root elongation in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 579-583, 2011.

BAXEVANIS, A. D.; ARENTS, G.; MOUDRIANAKIS, E. N.; LANDSMAN, D. A variety of DNA-binding and multimeric proteins contain the histone fold motif. *Nucleic Acids Research*, 23(14): 2685-2691, 1995.

BEN-NAIM, O.; ESHED, R.; PARNIS, A.; TEPER-BAMNOLKER, P.; SHALIT, A.; COUPLAND, G.; SAMACH, A. & LIFSCHITZ, E. The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. *Plant Journal*, 46(3): 462-76, 2006.

BENOIST, C.; O'HARE, K.; BREATHNACH, R. & CHAMBON, P. The ovalbumin gene - sequence of putative control regions. *Nucleic Acids Research*, 8(1): 127-142, 1980.

BERRY, M.; GROSVELD, F. & DILLON, N. A single point mutation is the cause of the Greek form of hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Nature*, 358: 499-502, 1992.

BROCARD-GIFFORD, I.M.; LYNCH, T.J. & FINKELSTEIN, R.R. Regulatory Networks in Seeds Integrating Developmental, Abscisic Acid, Sugar, and Light Signaling. *Plant Physiology*, 131: 78-92, 2003.

BROWN, A. P.; KROON, J. T. M.; SWARBRECK, D.; FEBRER, M.; LARSON, T. R. GRAHAM, I. A.; CACCAMO, M. & SLABAS, A. R. Tissue-Specific Whole Transcriptome Sequencing in Castor, Directed at Understanding Triacylglycerol Lipid Biosynthetic Pathways. *PLoS ONE*, 7(2): e30100, 2012.

BUCHER, F. Weight Matrix Descriptions of Four Eukaryotic RNA Polymerase II Promoter Elements Derived from 502 Unrelated Promoter Sequences. *Journal of Molecular Biology*, 212:563-578, 1990.

CAGLIARI, A. História evolutiva do fator de transcrição NF-Y (Nuclear Factor of Y Box) em plantas e seu papel na regulação do desenvolvimento e acúmulo de lipídeos em oleaginosas. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em

Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

CAI X.; BALLIF J.; ENDO S.; DAVIS E.; LIANG M.; CHEN D.; DEWALD D.; KREPS J.; ZHU T. & WU, Y. A putative CCAAT-binding transcription factor is a regulator of flowering timing in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 145(1): 98-105, 2007.

CALVENZANI, V.; TESTONI, B.; GUSMAROLI, G.; LORENZO, M.; GNESUTTA, N.; PETRONI, K.; MANTOVANI, R.; TONELLI, C. Interactions and CCAAT-Binding of *Arabidopsis thaliana* NF-Y Subunits. *PLoS One*, 7(8): 442902, 2012.

CAO S.; KUMIMOTO R. W.; SIRIWARDANA C. L.; RISINGER J. R. & HOLT B. F. III. Identification and characterization of NF-Y transcription factor families in the monocot model plant *Brachypodium distachyon*. *PLoS One*, 6(6): e21805, 2007.

CAO, S.; KUMIMOTO, R. W.; SIRIWARDANA, C. L.; RISINGER, J. R. & HOLT, B. F. 3<sup>RD</sup>. Identification and characterization of NF-Y transcription factor families in the monocot model plant *Brachypodium distachyon*. *PLoS One*, 6(6):e21805, 2011.

CHEN, G. Q, HE, X.; LIAO L. P. & MCKEON, T.A. 2S Albumin Gene Expression in Castor Plant (*Ricinus communis* L.). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(9): 867-872, 2004.

CHEN, K.; RAJEWSKY, N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nature*, 8:93-103, 2007.

COMBIER, J. F.; FRUGIER, F.; DE BILLY, F.; BOUALEM, A.; EL-YAHYAOU, F.; MOREAU, S.; VERNIÉ, T.; OTT, T.; GAMAS, T.; CRESPI, T. & NIEBEL, A. MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes & Development*, 20: 3084-3088, 2006.

COUSTRY, F.; SINHA, S.; MAITY, S. N. & de CROMBRUGGHE, B. The two activation domains of the CCAAT-binding factor CBF interact with the dTAF<sub>II</sub>110 component of the Drosophila TFIID complex. *Biochemistry Journal*, 331: 291-297, 1998.

DE RISI, J. L.; IYER, V. R.; & BROWN, P. O. Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale. *Science*, 278(5338): 680-686, 1997.

DOLFINI, D.; GATTA, R. & MANTOVANI, R. NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 47(1): 29-49, 2012.

DOOLEY, K. A.; MILLINDER, S.; OSBORNE, F. T. Sterol regulation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-coenzyme A Synthase gene through a direct interaction between Sterol Regulatory Element Binding Protein and the trimeric CCAAT-binding factor/Nuclear factor Y. *Journal of Biological. Chemistry*, 273: 1349–1356, 1998.

DORN, A.; BOLLEKENS, J.; STAUB, A.; BENOIST, C. & MATHIS, D. A multiplicity of CCAAT Box-Binding Proteins. *Cell*, 50: 863-872, 1987.

EFSTRADIATIS, A.; POSAKONY, J.W.; MANIATIS, T.; LAWN, R.M.; O'CONNEL, C.; SPRITZ, R.A.; DERIEL, J.K.; FORGET, B.G.; WEISSMAN, S.M.; SLIGHTOM, J.L.; BLECHL, A.E.; SMITHIES, O.; BARALLE, F.E.; SHOULDERS, C.C. AND PROUDFOOT, N.J. The Structure of the Human  $\beta$ -Globin gene Family. *Cell*, 21: 653–668, 1980.

FAMBRINI, M.; DURANTE, C.; CIONINI, G.; GERI, C.; GIORGETTI, L.; MICHELOTTI, V.; SALVINI, M. & PUGLIESI, C. Characterization of LEAFY COTYLEDON1-LIKE gene in *Helianthus annuus* and its relationship with zygotic and somatic embryogenesis.. *Development Genes and Evolution*, 216: 253-264, 2006.

FORSBURG, S.L. & GUARENTE, L. Mutational analysis of upstream activation sequence 2 of the CYC1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: a HAP2-HAP3-responsive site. *Molecular and Cell Biology*, 8(2): 647-654, 1988.

FORSBURG, S.L. & GUARENTE, L. Identification and characterization of HAP4: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *Genes & Development*, 3: 1166-1178, 1989.

FRONTINI, M.; IMBRIANO, C.; MANNI, I. & MANTOVANI, R. Cell cycle regulation of NF-YC nuclear localization. *Cell Cycle* 3, 217–222, 2004.

GIETZ, R.D.; WOODS, R. A. Yeast Transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method. *Methods in Molecular Biology*, 313: 107-120, 2005.

GOODRUM J. W. & GELLER D. P. Influence of fatty acid methyl esters from hydroxylated vegetable oils on diesel fuel lubricity. *Bioresource Technology*, 96(7): 851-855, 2005.

GRAVES, B.J.; JOHNSON, P.F. & MCKNIGHT, S.L. Homologous Recognition of a Promoter Domain Common to the MSV LTR and the HSV tk Gene. *Cell*, 44: 565-576, 1986.

GREENWOOD J. S. & BEWLEY J. D. Seed development in *Ricinus communis* (castor bean). I. Descriptive morphology. *Canadian Journal of Botany*, 60: 1751-1760, 1982.

GUARENTE, L. Yeast Promoters: Positive and Negative Elements. *Cell*, 36:799-800, 1984.



- GUSMAROLI, G.; TONELLI, C.; MANTOVANI, R. Regulation of novel members of the Arabidopsis thaliana CCAAT-binding nuclear factor Y subunits. *Gene*, 283: 41-48, 2002.
- HARADA, J. J. Signaling in plant embryogenesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 23-27, 1999.
- HATAMOCHI, A.; GOLUMBEK, P.T.; VAN SCHAFTINGENS, E. & DE CROMBRUGGHE, B. *The Journal of Biological Chemistry*. 263(12): 5940-5947, 1988.
- HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN, R.A.M.; BOLLEKENS, J.; DORN, A.; BENOIST, C. & MATHIS, D. Properties of a CCAAT box-binding protein. *Nucleic Acids Research*, 15(18): 7265-7286, 1987.
- HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN, R.; LI, X. Y.; BLACK, D.; MATTHES, H.; BENOIST, C. & MATHIS, D. Co-evolution from yeast to mouse: cDNA cloning of the two NF-Y (CP-1/CBF) subunits. *EMBO Journal*, 9(10):3119-3127, 1990.
- INOUE, H.; NOJIMA, H. & OKAYAMA, H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, 96(1): 23-28, 1990.
- JAMES, P.; HALLADAY, J. & CRAIG, E. A. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 144:1425-1436, 1996.
- JONES, K.A.; YAMAMOTO, K.R. & TIJAN, R. Two distinct Transcription factors bind to the HSV Thymidine Kinase promoter *in vitro*. *Cell*, 42: 559-572, 1985.
- JUNKER, A.; MÖNKE, G.; RUTTEN, T.; KEILWAGEN, J.; SEIFERT, M.; THI, T.M.N.; RENOUE, J.P.; BALZERGUE, S.; VIEHÖVER, P.; HAÄHNEL, U.; LUDWIG-MÜLLER, J.; ALTSCHMIED, L.; CONRAD, U.; WEISSHAAR, B. & BÄUMLEIN, H. Elongation-related functions of LEAFY COTYLEDON1 during the development of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 71: 427-442, 2012a.
- JUNKER, A.; BÄUMLEIN, H. Multifunctionality of the LEC1 transcription factor during plant development. *Plant Signaling & Behavior*, 7(12): 1718-1720, 2012b.
- KAGAYA, Y.; TOYOSHIMA, R.; OKUDA, R.; USUI, H.; YAMAMOTO, A.; HATTORI, T. LEAFY COTYLEDON1 controls seed storage protein genes through its regulation of FUSCA3 and ABSCISIC ACID INSENSITIVE3. *Plant Cell Physiology*, 46: 399-406, 2005.
- KIM, C.G. & SHEFFERY, M. Physical Characterization of the Purified CCAAT Transcription Factor,  $\alpha$ -CPI\*. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(22): 13362-13369, 1990.

KIM, I. S.; SINHA, S.; DE CROMBRUGGHE, B. & MAITY, S. N. Determination of functional domains in the C subunit of the CCAAT-binding factor (CBF) necessary for formation of a CBF-DNA complex: CBF-B interacts simultaneously with both the CBF-A and CBF-C subunits to form a heterotrimeric CBF molecule. *Molecular and Cell Biology*, 16(8): 4003-4013, 1996.

KUMIMOTO, R. W.; ADAM, L. , HYMUS, G. J.; REPETTI, P. P.; REUBER, T. L.; MARION, C. M.; HEMPEL, F. D. RATCLIFFE, O. J. The Nuclear Factor Y subunits NF-YB2 and NF-YB3 play additive roles in the promotion of Flowering by inductive long-day photoperiods in Arabidopsis. *Planta*, 228:709–723 2008.

KUMIMOTO, R. W.; ZHANG, Y.; SIEFERS, N. & HOLT III, B. F. NF-YC3, NF-YC4 and NF-YC9 are required for CONSTANS-mediated, photoperiod-dependent flowering in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 63: 379-391, 2010.

KUSNETSOV, V.; LANDSBERGER, M.; MEURER, J. & OELMÜLLER, R. The Assembly of the CAAT-box Binding Complex at a Photosynthesis Gene Promoter is Regulated by Light, Cytokinin, and the Stage of the Plastids. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(50): 36009-36014, 1999.

KUSNETSOV, V.; LANDSBERGER, M.; MEURER, J. & OELMÜLLER, R. The assembly of the CAAT-box binding complex at a photosynthesis gene promoter is regulated by light, cytokinin, and the stage of the plastids. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 36009–36014, 1999.

KWONG, R.W.; BUI, A.Q.; LEE, H.; KWONG, L. W. FISCHER, R. L. GOLDBERG, R.B. & HARADA, J.J. LEAFY COTYLEDON1-LIKE Defines a Class of Regulators Essential for Embryo Development. *The Plant Cell*, 15: 5-18, 2003.

LALOUM, T.; DE MITA, S.; GAMAS, G.; BAUDIN, M. & NIEBEL, A. CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? *Trends in Plant Science*, 18(3): 157-166, 2013.

LANDSCHULZ, W.H.; JOHNSON, P.F.; ADASHI, E.Y.; GRAVES, B.J. & MCKNIGHT, S.L. Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP. *Genes & Development*, 2:786-800, 1988.

LE, B.H.; CHENG, C.; BUI,A.Q.; WAGMAISTER, J.A.; HENRY, K.F.; PELLETIER, J.; KWONG, L.; BELMONTE, M.; KIRKBRIDE, R.; HORVATH, S.; DREWS, G.N.; FISCHER, R.L.; OKAMURO, J.K.; HARADA, J.J. & GOLDBERG, R. Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(18): 8063-8070, 2010.

LÉVESQUE-LEMAY, M.; ALBANI, D.; ALDCORN, D.; HAMMERLINDL, J.; KELLER, W.; ROBERT, L. S. Expression of CCAAT-binding factor antisense transcripts in reproductive tissues affects plant fertility. *Plant Cell Reports*, 21(8): 804–808, 2003.

LI, C.; DISTELFELD, A.; COMIS, A. & DUBCOVSKY, J. Wheat flowering repressor VRN2 and promoter CO2 compete for interactions with NUCLEAR FACTOR-Y complexes. *Plant Journal*, 67(5):763-73, 2011.

LI, W.; OONO, Y.; ZHU, J.; HE, X.; WU, J.; IIDA, K.; LU, X.; CUI, X.; JIN, H. & ZHUB, J. The Arabidopsis NFYA5 Transcription Factor Is Regulated Transcriptionally and Posttranscriptionally to Promote Drought Resistance. *The Plant Cell*, 20: 2238-2251, 2008.

LI, Y.; FANG, Y.; FU, Y.; HUANG, J.; WU, C. & ZHENG, CC. NFYA1 Is Involved in Regulation of Postgermination Growth Arrest Under Salt Stress in Arabidopsis. *PLOS One*, 8(4): e61289, 2013.

LIANG, M.; HOLE, D.; WU, J.; BLAKE, T. & WU, Y. et al. Expression and functional analysis of NUCLEAR FACTOR-Y, subunit B genes in barley. *Planta* 235, 779–791, 2012.

LITTLEJOHN, T.G. & HINES, M. J. Analysis of the site of action of the amdR product for regulation of the amdS gene of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Genetics and Genomics*, 235(1): 81-88, 1992.

LITZKA, O.; THEN BERGH, K. & BRAKHAGE, A. A. The *Aspergillus nidulans* penicillin-biosynthesis gene *aat* (*penDE*) is controlled by a CCAAT-containing DNA element. *European Journal of Biochemistry*, 238(3): 675-682, 1996.

LIU, J. & HOWELL, S.H. bZIP28 and NF-Y transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 22: 782–796, 2010.

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4):402-408, 2001.

LOTAN, T.; OHTO, M.; YEE, K.M.; WEST, M.A.L.; LO, R.; KWONG, R.W.; YAMAGISHI, K.; FISCHER, R.J.; GOLDBERG, R.B. & HARADA, J.J. Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 Is Sufficient to Induce Embryo Development in Vegetative Cells. *Cell*, 93:1195-1205, 1998.

MAILLOT P, LEBEL S, SCHELLENBAUM P, JACQUES A, & WALTER B. Differential regulation of SERK, LEC1-like and pathogenesis-related genes during indirect secondary somatic embryogenesis in grapevine. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(8): 743-752, 2009.

MANTOVANI, R. A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic Acids Research*, 26(5): 1135-1143, 1998.

- MANTOVANI, R. The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene*, 239: 15-27, 1999.
- MARZIALI, G.; PERROTTI, E.; ILARI, R.; TESTA, U.; COCCIA, E. M. & BATTISTINI, A. Transcriptional regulation of the ferritin heavy-chain gene: the activity of the CCAAT binding factor NF-Y is modulated in heme-treated Friend leukemia cells and during monocyte-to-macrophage differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 17(3): 1387-1395, 1997.
- MASIERO, S.; IMBRIANO, C.; RAVASIO, F.; FAVARO, R.; PELUCCHI, N.; GORLA, M. S.; MANTOVANI, R.; COLOMBO, L. & KATER M. M. Ternary complex formation between MADS-box transcription factors and the histone fold protein NF-YB. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(29): 26429-26435, 2002.
- MEINKE, D.W. A Homoeotic Mutant of *Arabidopsis thaliana* with Leafy Cotyledons. *Science*, 258: 1647-1650, 1992.
- MIYOSHI, K.; ITO, Y.; SERIZAWA, A. & KURATA, N. OsHAP3 genes regulate chloroplast biogenesis in rice. *Plant Journal*. 36, 532–540, 2003.
- MU, J.; TAN, H.; HONG, S.; LIANG, Y. & ZUO, J. Arabidopsis Transcription Factor Genes NF-YA1, 5, 6, and 9 Play Redundant Roles in Male Gametogenesis, Embryogenesis, and Seed Development. *Molecular Plant*, 6(1): 188-201, 2013.
- MU, J.; TAN, H.; ZHENG, Q.; FU, F.; LIANG, Y.; ZHANG, J.; YANG, X.; WANG, T.; CHONG, K.; WANG, X. & ZUO, J. LEAFY COTYLEDON1 Is a Key Regulator of Fatty Acid Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 148: 1042-1054, 2008.
- NELSON, D. E.; REPETTI, P. P.; ADAMS, T. R.; CREELMAN, R. A.; WU, J.; WARNER, D. C.; ANSTROM, D. C.; BENSON, R. J.; CASTIGLIONI, P. P.; DONNARUMMO, M. G.; HINCHEY, B. S.; KUMIMOTO, R. W.; MASZLE, D. R.; CANALES, R. D.; KROLIKOWSKI, K. A.; DOTSON, S. B.; GUTTERSON, N.; RATCLIFFE, O. J. & HEARD, J. E. Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(42): 16450–16455, 2007.
- OSADA, S.; DAIMON, S.; IKEDA, T.; NISHIHARA, T.; YANO, K.; YAMASAKI, M, IMAGAWA, M. Nuclear factor 1 family proteins bind to the silencer element in the rat glutathione transferase P gene. *Journal of Biochemistry*, 121(2): 355-363, 1997.
- PETRONI, K.; KUMIMOTO, R.W.; GNESUTTA, N.; CALVENZANI, V.; FORNARI, M.; TONELLI, C.; HOLT, B.F.; MANTOVANI, R. The Promiscuous Life of Plant NUCLEAR FACTOR Y Transcription Factors. *The Plant Cell*, 24: 4777-4792, 2012.

ROMIER, C.; COCCHIARELLA, F.; MANTOVANI, R. & MORAS, D. The NF-YB/NF-YC Structure Gives Insight into DNA Binding and Transcription Regulation by CCAAT Factor NF-Y. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(2): 1336-1345, 2003.

RONCHI, A.; BELLORINI, M.; MONGELLI, N.; Mantovani, R. CCAAT-box binding protein NF-Y (CBF, CP1) recognizes the minor groove and distorts DNA. *Nucleic Acids Research*, 23(22): 4565-4572, 1995.

ROY, B. & LEE, A. S. Transduction of Calcium Stress through Interaction of the Human Transcription Factor CBF with the Proximal CCAAT Regulatory Element of the grp78/BiP Promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 15(4): 2263-2274, 1995.

SALVINI, M.; SANI, E.; FAMBRINI, M.; PISTELLI, L.; PUCCIARIELLO, C. & PUGLIESI, C. Molecular analysis of a sunflower gene encoding an homologous of the B subunit of a CAAT binding factor. *Molecular Biology Reports*, 39(6): 6494-6465, 2012.

SCHELLENBAUM, P.; JACQUES, A.; MAILLOT, P.; BERTSCH, C.; MAZET, F.; FARINE, S. & WALTER, B. Characterization of VvSERK1, VvSERK2, VvSERK3 and VvL1L genes and their expression during somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Reports*, 27(12): 1799-1809, 2008.

SHEN, B.; ALLEN, W.B.; ZHENG, P.; LI, C.; GLASSMAN, K.; RANCH, J.; NUBEL, D. & TARCZYNSKI, M.C. Expression of ZmLEC1 and ZmWRI1 Increases Seed Oil Production in Maize. *Plant Physiology*, 153: 980-987, 2010.

SIEFERS, N.; DANG, K.K.; KUMIMOTO, R.W.; BYNUM IV.; TAYROSE, G. & HOLT, B.F. Tissue-Specific Expression Patterns of Arabidopsis NF-Y Transcription Factors Suggest Potential for Extensive Combinatorial Complexity. *Plant Physiology*, 149: 625-641, 2009.

SINHA, S.; MAITY, S. N.; LU, J. & DE CROMBRUGGHE, B. Recombinant rat CBF-C, the third subunit of CBF/NFY, allows formation of a protein-DNA complex with CBF-A and CBF-B and with yeast HAP2 and HAP3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 1624-1628, 1995.

STEPHENSON, T. J.; MCINTYRE, C. L.; COLLET, C. & XUE, G. TaNF-YB3 is involved in the regulation of photosynthesis genes in *Triticum aestivum*. *Functional and Integrative Genomics*, 11: 327-340, 2011.

TAN, H.; YANG, X.; ZHANG, F.; ZHENG, X.; QU, C.; MU, J.; FU, F.; LI, J.; GUAN, R.; ZHANG, H.; WANG & ZUO, J. Enhanced Seed Oil Production in Canola by Conditional Expression of *Brassica napus* LEAFY COTYLEDON1 and LEC1-LIKE in Developing Seeds. *Plant Physiology*, 156: 1577-1588, 2011.

THIRUMURUGAN, T.; ITO Y.; KUBO, T.; SERIZAWA A.; KURATA, N. Identification, characterization and interaction of HAP family genes in rice. *Molecular Genetics and Genomics*, 279: 279–289, 2008.

TIJAN R. & MANIATIS, T. Transcriptional Activation: A Complex Puzzle with Few Easy Pieces. *Cell*, 77:5-8, 1994. *Plant Physiology*, 131: 78-92, 2003.

TURCOTTE, B.; LIANG, X.B.; ROBERT, F. & SOONTORNGUN, S. Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Research*, 10:2-13, 2010.

UDDENBERG, D.; VALLADARES. S.; ABRAHAMSSON, M.; SUNDSTRÖM, J. F.; SUNDÅS-LARSSON, A. & VON ARNOLD, S. Embryogenic potential and expression of embryogenesis-related genes in conifers are affected by treatment with a histone deacetylase inhibitor. *Planta*, 234(4): 527-539, 2011.

VERNET, T.; DIGNARD, D. & THOMAS, D. Y. A family of yeast expression vectors containing the phage fl intergenic region. *Gene*, 52: 225-233, 1987.

WARPEHA, K. M.; UPADHYAY, S.; YEH, J.; ADAMIAK, J.; HAWKINS, S. I.; LAPIK, Y. R.; ANDERSON, M. B.; & KAUFMAN LS. The GCR1, GPA1, PRN1, NF-Y signal chain mediates both blue light and abscisic acid responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 143, 1590–1600, 2007.

WENKEL, S.; TURCK, F.; SINGER, K.; GISSOT, L.; LE GOURRIEREC, J.; SAMACH, A.; & COUPLANDA, G. CONSTANS and the CCAAT Box Binding Complex Share a Functionally Important Domain and Interact to Regulate Flowering of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 18: 2971-2984, 2006.

XING, Y. FIKES, J.D & GUARENTE, L. Mutations in yeast HAP2/HAP3 define a hybrid CCAAT box-binding domain. *The EMBO Journal* 12(12): 4647–4655, 1993.

XING, Y.; ZHANG, S.; OLESEN, J.T.; RICH, A.; & GUARENTE, L. Subunit interaction in the CCAAT-binding heteromeric complex is mediated by a very short alpha-helix in HAP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 3009–3013, 1994.

YAMAMOTO A.; KAGAYA, Y.; TOYOSHIMA, R., KAGAYA, M.; TAKEDA, S. & HATTORI, T. Arabidopsis NF-YB subunits LEC1 and LEC1-LIKE activate transcription by interacting with seed-specific ABRE-binding factors. *The Plant Journal*, 58: 843-856, 2009.

YAZAWA, K.; TAKAHATA, K. & KAMADA, H. Isolation of the gene encoding Carrot leafy cotyledon1 and expression analysis during somatic and zygotic embryogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 215-223, 2004.

YAZAWA, K. & KAMAD, H. Identification and characterization of carrot HAP factors that form a complex with the embryo-specific transcription factor C-LEC1. *Journal of Experimental Botany*. 58(13): 3819–3828, 2007.

ZANETTI, M. E.; BLANCO, F. A.; BEKER, M. P.; BATTAGLIA, M & AGUILAR, O. M. A C Subunit of the Plant Nuclear Factor NF-Y Required for Rhizobial Infection and Nodule Development Affects Partner Selection in the Common Bean–*Rhizobium etli* Symbiosis. *The Plant Cell*, 22: 4142-4157, 2010.

ZHANG, J. & LAUTAR, S. A Yeast Three-Hybrid Method to Clone Ternary Protein Complex Components. *Analytical Biochemistry*, 242: 68-72, 1996.

ZORBAS, H.; REIN, T.; KRAUSE, A.; HOFFMANN, K. & WINNACKER, E. L. Nuclear factor I (NF I) binds to an NF I-type site but not to the CCAAT site in the human alpha-globin gene promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, 267: 8478-8484, 1992.

## APÊNDICE



## 1. Tabela com os primers utilizados

Gene	Primers para RT-qPCR	Primers para clonagem
NF-YA1 29706-m001307	5'F TGC AAA ACA GTA TGC TGC AA 5'R TCC TCA AGC TTT TTC GCA TT	5'F CAC CAT GTT TAT GAA AAT GCA CAA CT 5'R TCA CAG AGG GAC TGA GAC ATG AT
NF-YA2 30075-m001182	5'F ATT TTG AGA CGT CGA CAA TCC 5'R TTG TCA CCT GAT GCC ATT TC	5'F CAC CAT GAC TTC TTC CGT GCA TGA T 5'RTCA AGA CTT CCC ATC TGA GGA
NF-YA3 29864.-m001503	5'F TGA ATG CAA AGC AGT TTA ATG G 5'R GAC ATC GTT ATC TGA TGC AGG A	5'F CAC CAT GCC GGC GAA GCT TGA 5'R TTA ATT TAT GGG CAG AGC CCC
NF-YA4 29912-m005288	5'F CTT AGG AGG AGG CAA TCA CG 5'R ATC TGA GAC GCC TTG TCT GC	5'F CAC CAT GGC TGT CCG AAT TCA GAA 5'R CTA GGT TCC ACT GTA CAT ATG ACC C
NF-YA5 29333-m001059	5'F CAA CAG ATG ATG ATG CAG CAA 5'R CTT TCC CAT TTC CCG AGT TC	-
NF-YA6 30169-m006445	5'F TAG ACA GGC ACG TGC AAA AG 5'R TGA GTC GCC AGA CTG AGA TG	5'F CAC CAT GCA GTC AAA GTC TGA AAG TG 5'R TCA CTG GAT GGC AAG AGG C
LEC1 29629.m001369	-	5'F GAG CTC ATG GAA CGT GCA GCT A 5'R CTG CAG TCA CTT AAA CTG AGC A
L1L 57991.m000014	-	5'F GAG CTC ATG AAC ATG AGA CTA G 5'R CTG CAG CAT CCC TCA TGT ATC C

## 2. Protocolo de PCR para confirmação dos clones

Mix	Programa padrão	
Água deionizada autoclavada	6µl	1.Desnaturação inicial: 94°C por 3 minutos
10x PCR Buffer	2µl	2.35 ciclos: 94°C por 45 segundos
Primers 10µM	1µl	55-65°C por 30 segundos
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0,6µl	72°C por 90 segundos / 1kb
dNTPs 10mM	0,4µl	3. Extensão final: 72°C por 10 minutos
Taq Polimerase	0,2µl	
Colônia isolada de bactéria	-	

### 3. Protocolo de PCR para posterior ligação em pENTR

Mix		Programa padrão
Água deionizada autoclavada	5µl	1.Desnaturação inicial: 98°C por 3 minutos
5x HF Buffer	2 µl	2.35 ciclos: 98°C por 10 segundos
dNTPs 10µM	1µl	55-65°C por 20 segundos
Primer10µM	0,6µl	72°C por 30 segundos / 1kb
Phusion	0,4µl	3. Extensão final: 72°C por 5 minutos
cDNA (1:10)	3 µl	

### 4.. Protocolo de Ligação em pENTR

Reação	
Água deionizada autoclavada	0-1 µl
Produto de PCR	0-2 µl
Salt solution	0,5 µl
TOPO vector	0,5µl
Volume final	4 µl

As reações foram incubadas no gelo por 5 minutos antes da transformação da bactéria

### 5. Preparo de células termocompetentes (baseado em: INOUE *et al.*, 1990).

#### Preparo de células competentes

Inocular uma colônia em 10ml de meio SOB em um erlenmeyer de 100ml e crescer a 37°C overnight.

Diluir 1,5ml da cultura em 250ml de meio SOB em um erlenmeyer de 1l e crescer a 18°C e 250rpm até a cultura atingir a DO<sub>600</sub>: 0,4 a 0,6.

Transferir a cultura para tubos falcon estéreis e centrifugar a 4500 rpm por 5 minutos a 4°C

Ressuspender o pellet em 1/3 do volume original de TB gelado.

Incubar no gelo por 10 minutos

Centrifugar a 4500 rpm por 5 minutos a 4°C

Ressuspender o pellet em 1/12 do volume original de TB gelado

Adicionar DMSO em uma concentração final de 7°C

Aliquotar as células em porções de 200µl em tubos eppendorf gelados, congelar com N<sub>2</sub> líquido e estocar a -80°C

SOB	Concentração final
Triptona bacteriológica	2%
Extrato de levedura	0,5%
NaCl	10mM
KCl	2,5mM
MgCl <sub>2</sub>	10mM
MgSO <sub>4</sub>	10mM

TB	Concentração final
KCl	250mM
PIPES	10mM
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	15mM
MnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	55mM

Ajustar o pH para 6,7 com KOH, adicionar o MnCl<sub>2</sub> e filtrar com filtro 0,2 µm e estocar a 4°C.

## 6. Transformação de bactérias por choque térmico

Transformação

Descongelar a alíquota de bactéria no gelo

Adicionar as bactérias ao mix

Incubar no gelo por 5 minutos

Incubar a 42°C por 30 segundos

Incubar no gelo

Adicionar 250µl de meio SOC à temperatura ambiente

Incubar a 37°C com agitação por 1 hora

Plaquear em meio LB contendo o antibiótico adequado

## 7. Transformação de levedura

### Transformação

Inocular uma colônia em 10ml de meio YPDA (ou SD-LT no triplo híbrido em um erlenmeyer de 50ml e crescer a 30°C e 230rpm por 16 horas.

Diluir a cultura em 50ml de meio YPDA (ou SDLT) até  $DO_{600}:0,2$  e crescer a 30°C até  $DO_{600}:0,4$  a  $0,6$ .

Transferir a cultura para tubos falcon estéreis e centrifugar a 4500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.

Ressuspender o pellet em 50ml de água deionizada estéril.

Centrifugar a 4500rpm por 5 minutos à temperatura ambiente.

Ressuspender as células em 500 $\mu$ l de 0,1M TE e 0,1M LiAc

Adicionar 50 $\mu$ l de células ao mix de transformação, agitando gentilmente

Mix de transformação:

ssDNA fervido por 5 minutos	6 $\mu$ l
PEG 50%	240 $\mu$ l
LiAc 1M	30 $\mu$ l
TE 1M	30 $\mu$ l
Plasmídeos contendo as construções	2 $\mu$ g

Incubar a 30°C por 30 minutos sob agitação leve

Incubar a 42°C por 20 minutos sem agitação

Incubar no gelo e centrifugar a 250 rpm por 15 segundos

Ressuspender em 100  $\mu$ l de TE 0,1M

Plaquarem no meio seletivo apropriado

Meio YPDA	Em 100ml
Peptona	2g
Extrato de levedura	1g
Glicose	2g
Hemissulfato de adenina	0,02g
pH	5,8 (HCl)
Ágar	1,8g

Meio SD	Em 100ml
---------	----------

Difco yeast nitrogen base w/w aa	0,67g
Glicose	2g
Sinthetic dropout mix (-LTUH) Contém: 2g arginina, 2g isoleucina, 2g lisina, 2g metionina, 3g fenilalanina, 2g serina, 2g treonina, 2g tirosina, 2g valina, homogeneizado.	0,083g
Hemissulfato de adenina	0,02g
Aminoácidos / Nucleotídeos apropriados	1ml
pH	5,7 (NaOH)
Ágar	1,67g

Fenótipos das cepas utilizadas:

AH109: MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2::GAL1, UAS-GAL1TATA, -HIS3,GAL2 UAS-GAL2 TATA -ADE2, URA3::MEL1 UAS -MEL1 TATA -lacZ"

PJ-694a: "MATa trp1-901 leu2-3 leu2-112 ura3-52 his3-200 ade2 gal4 $\Delta$  gal80 $\Delta$  LYS2::GAL-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ",

## 8. Extração de plasmídeo por lise alcalina: preparação média

Extração de plasmídeo

Inocular uma colônia em 10ml de meio LB contendo o antibiótico específico em erlenmeyer de 50ml e crescer a 37°C e 250rpm overnight.

Transferir a cultura para um tubo falcon de 15ml e centrifugar a 4000rpm por 10 minutos a 4°C.

Remover o meio cuidadosamente, deixando o pellet o mais seco possível

Ressuspender em 200 $\mu$ l de Solução I gelada e agitar vigorosamente.

Transferir para um tubo de 1,5ml, adicionar 400 $\mu$ l de Solução II recém preparada e inverter os tubos 5 vezes cuidadosamente. Incubar no gelo.

Adicionar 300  $\mu$ l de Solução III gelada. Inverter os tubos 5 vezes e incubar no gelo por 3 minutos.

Centrifugar o lisado a 12000g por 5 minutos a 4°C.

Transferir 600  $\mu$ l do sobrenadante em um tubo contendo 600  $\mu$ l de isopropanol à temperatura ambiente, agitar vigorosamente e deixar à temperatura ambiente por 2 minutos.

---

Centrifugar a 14000g por 5 minutos à temperatura ambiente.

Remover o sobrenadante e adicionar 1 ml de etanol 70%

Centrifugar a 14000g por 2 minutos à temperatura ambiente.

Remover o etanol do tubo e secar o precipitado

Suspender o DNA em 100µl de água destilada deionizada autoclavada

Solução I: 50mM Glicose; 25mM Tris-Cl (pH 8,0); 10mMEDTA (pH 8,0)

Solução II: 0,2N NaOH; 1% (w/v) SDS

Solução III: 60ml de Acetato de potássio 5M; 11,5ml de ácido acético glacial

28,45ml de água.

---

## CURRICULUM VITÆ resumido

### SPAGNOLO FONINI, L.

#### 1. DADOS PESSOAIS

**Nome:** Leila Spagnolo Fonini

**Local e data de nascimento:** Bento Gonçalves, RS, Brasil, 01/03/1087.

**Endereço profissional:** Avenida Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, CEP: 91501-970. Prédio 43312, segundo andar.

**Telefone profissional:** (51) 3308-9830 **E-mail:** leila.fonini@gmail.com

#### 2. FORMAÇÃO

Graduação em Biomedicina pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2008-2011).

Mestrado em andamento em Biologia Celular e Molecular (03/2012 a 10/2013).

Doutorado em andamento em Biologia Celular e Molecular (08/2013 a 07/2017).

#### 3. ESTÁGIOS

06/2009 a 12/2009: Estágio voluntário como aluna de Iniciação científica no Laboratório de Genética Vegetal sob orientação da professora Márcia Margis. Atuação em projeto de estudo funcional das enzimas Glutathione peroxidase em arroz.

01/2010 a 12/2011: Estágio como aluna de Iniciação científica com bolsa do CNPq no Laboratório de Genética Vegetal sob orientação da professora Márcia Margis. Atuação em projeto de estudo funcional das enzimas Glutathione peroxidase em arroz, que deu origem ao trabalho de conclusão de curso.

06/2011 a 12/2011: Estágio curricular em Análises Clínicas no Laboratório Endocrinometria de Análises Clínicas sob a responsabilidade da Dra. Sandra Locatelli. Atuação nos setores de urinálise, parasitologia, microbiologia, imunologia, bioquímica e hematologia.

#### 4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

Destaque do XXIII Salão de Iniciação Científica, com indicação ao Prêmio Jovem Pesquisador, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2011).

#### 5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

PASSAIA, G.; SPAGNOLO FONINI, L.; CAVERZAN, A.; JARDIM-MESSEDER, D.; CHRISTOFF, A.P.; GAETA, M. L.; DE ARAUJO MARIATH, J. E.; MARGIS, R. e MARGIS-PINHEIRO, M. The mitochondrial glutathione peroxidase GPX3 is essential for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> homeostasis and root and shoot development in rice. *Plant Science*, 208:93-101, 2013.

## 6. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

CASTILHOS, G.; BÜCKER-NETO, L.; CAMPOS, L. L.; FONINI, L. S.; RECHENMACHER, C.; CABREIRA, C.; WIEBKE-STROHM, B.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; MARGIS-PINHEIRO, M. Characterization of the PPR\_2 gene in response to the *Phakopsora pachyrizi* infection in soybean. Em: 6th International Crop Science Congress, 2012, Bento Gonçalves. Annals of the 6th International Crop Science Congress.

FONINI, L. S.; KÖRBES, A. P.; CAGLIARI, A.; MARGIS, R.; MARGIS-PINHEIRO, M. Analysis of the interaction between transcription factors NF-YA and LEC1-type of castor bean (*Ricinus communis* L.). Em: IV Simpósio de Genética Molecular de Plantas, 2013, Bento Gonçalves. Anais do IV Simpósio de Genética Molecular de Plantas, 2013.

FONINI, L. S.; PASSAIA, G.; MARGIS-PINHEIRO, M. Gene expression profile of Glutathione peroxidase of rice (*Oryza sativa*) during plant development. Em: 57º Congresso Brasileiro de Genética, 2011, Águas de Lindóia. Resumos do 57º Congresso Brasileiro de Genética, 2011.

PASSAIA, G.; Caverzan, A.; FONINI, L. S.; MARGIS-PINHEIRO, M. Avaliação da expressão dos genes de Glutathione peroxidase de arroz sob diferentes estresses abióticos e localização subcelular dos produtos gênicos. Em: XXVIII Reunión Argentina de Fisiologia Vegetal, 2010, La Plata. Libro de Resúmenes, 2010.

PASSAIA, G.; Caverzan, A.; FONINI, L. S.; MARGIS-PINHEIRO, M. Functional characterization of Glutathione peroxidase gene family in rice (*Oryza sativa*). Em: 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants, 2011, Budapeste. Abstracts of 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants, 2011.

PASSAIA, G.; Caverzan, A.; FONINI, L. S.; MARGIS-PINHEIRO, M. Functional characterization of Glutathione peroxidase gene family in rice (*Oryza sativa*). Em: 8th International Symposium on Rice Functional Genomics, 2010, Bento Gonçalves. Complete program, 2010.

PASSAIA, G.; Caverzan, A.; FONINI, L. S.; MARGIS-PINHEIRO, M. Functional characterization of Glutathione peroxidase gene family in rice (*Oryza sativa*). Em: 57º Congresso Brasileiro de Genética, 2011, Águas de Lindóia. Resumos do 57º Congresso Brasileiro de Genética, 2011.