**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**

**Identificação e caracterização do papel da glutamil-tRNA sintetase na
localização de proteínas cloroplásticas**

Marcela Emanuele Scarso

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de
Plantas

**Piracicaba
2011**

Marcela Emanuele Scarso
Cientista de Alimentos

**Identificação e caracterização do papel da glutamil-tRNA sintetase na localização
de proteínas cloroplásticas**

Orientador:
Prof. Dr. **MARCIO DE CASTRO SILVA FILHO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Scarso, Marcela Emanuele

Identificação e caracterização do papel da glutamil-tRNA sintetase na localização de proteínas cloroplásticas / Marcela Emanuele Scarso. - - Piracicaba, 2011.
68 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Aminoacil RNA sintetases 2. Glutamina 3. Leveduras 4. Proteínas - localização
I. Título

CDD 581.19245
S287i

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*Dedico aos meus pais
Ivan R. Scarso e Elide S. Simões Scarso*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pela saúde.

Agradeço meu orientador, Marcio de Castro Silva Filho, de quem ouvi a história primeiro e me encantei pela biologia molecular, que me recebeu tão gentilmente e transmitiu todo o entusiasmo pela pesquisa. Agradeço pela confiança, atenção, compreensão, conselhos e portas que me abriu, pela excelente infra-estrutura e recursos proporcionados ao laboratório. Obrigada.

Agradecimentos inestimáveis ao professor Daniel Scherer de Moura pela porta sempre aberta em sua sala, pela ajuda com os experimentos e solução de muitas dúvidas, pelos conselhos para pesquisa e para a vida e por me tornar mais criteriosa e argumentadora.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Agradecimentos especiais para amiga Larissa Spoladore, que me ensinou a "não chorar pelo leite derramado" e que a vida tem muitas coisas boas. Obrigada pelos bons momentos, pelas conversas, risadas e ajuda no laboratório. Quero ser sua amiga sempre.

A Luiza Lane Barros Dantas, pela ajuda no trabalho, pelo entusiasmo e confiança que teve em ter ao seu lado uma aluna de iniciação científica para compartilhar um projeto. Suas contribuições foram inestimáveis para o trabalho, sua ajuda e companheirismo.

A Christine Petrina Stock, pós-doutoranda do laboratório, pela convivência e pela paciência em me ensinar a trabalhar com leveduras, principalmente com os ensaios de duplo híbrido.

Ao Marcelo Brandão pela ajuda, conselhos e confiança. Os experimentos de bioinformática foram essenciais para os resultados obtidos neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular: Flávia, Elaine, Wiliane, Renata, Wellington, Ricardo, Lígia, Fabiana, Thaís, Eveline, Joze, Larissa N. pela troca de experiências, informações, convivência e pelos bons momentos que passei com vocês.

Agradecimentos especiais a Camila Motta Borgonove e Celso Spada Fiori que me acolheram e me ensinaram tudo desde o início no laboratório.

As colegas que já saíram do laboratório Ane Medeiros e Juliana Matos pelos momentos de convivência, pela troca de experiências e ajuda no laboratório.

Ao técnico Rafael Colombi que maravilhosamente organiza o laboratório e deixa tudo pronto para que possamos dedicar o máximo de nosso tempo com o projeto, pela disponibilidade em nos ajudar e pela convivência.

Aos meus pais Ivan e Elide que acreditaram em mim desde o começo e que dedicaram a vida para dar educação de qualidade e um futuro melhor para minha irmã e eu.

A minha irmã Isis Sabrina Scarso Ximenes e meu cunhado Rodrigo Carrara Ximenes por escutarem minhas histórias sobre o laboratório e ouvirem todos os problemas e angústias sobre experimentos que deram errado e por estar sempre ao meu lado.

Ao meu querido noivo Lucas Fernando Joaquim que sempre apoiou minhas decisões, esteve sempre ao meu lado dando forças e carinho, por me ouvir e sempre tornar tudo mais bonito.

*"I am enough of an artist to draw freely upon my imagination.
Imagination is more important than knowledge.
Knowledge is limited.
Imagination encircles the world"*

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 DESENVOLVIMENTO	17
2.1 Origem dos cloroplastos.....	17
2.2 Direcionamento de proteínas aos cloroplastos.....	18
2.3 Fatores citosólicos que auxiliam no direcionamento de proteínas a diferentes compartimentos celulares	21
2.4 As aminoacil-t-RNA sintetases	22
2.5 A glutamil-tRNA sintetase.....	24
2.6 A HMPPK/TMPPase	25
2.7 A Glutamina sintetase (GS) II.....	25
2.8 Interação proteína-proteína	26
2.9 RNA de interferência	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Material Biológico	29
3.2 Extração de RNA total e síntese de cDNA	29
3.3 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	29
3.4 Clonagem nos vetores de duplo híbrido transformação de leveduras.....	30
3.5 Clonagem dos genes em estudo em vetor binário	31
3.6 Clonagem em vetores específicos para técnica de BiFC	31
3.7 Transformação estável de <i>Nicotiana tabacum</i>	32
3.8 Transformação transiente de <i>N. tabacum</i> por agroinfiltração.....	32
3.9 Visualização das plantas em microscópio confocal.....	33
3.10 Silenciamento utilizando RNAi através de agroinfiltração	34
4 RESULTADOS	35

4.1 Interações proteína-proteína <i>in vivo</i>	35
4.2 Interação proteína-proteína <i>in planta</i>	36
4.3 Transformação de <i>Nicotiana tabacum</i> e infiltração de RNAi.....	37
4.4 Alinhamento das GluRS citosólica e da proteína homóloga de duplo-direcionamento	44
5 DISCUSSÃO.....	45
6 CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS	51
ANEXOS.....	61

RESUMO

Identificação e caracterização do papel da glutamil-tRNA sintetase na localização de proteínas cloroplásticas

A regulação da localização de proteínas é um dos aspectos fundamentais na biologia celular vegetal. Os cloroplastos importam mais de 90% de suas proteínas do citosol, portanto, é importante caracterizar os fatores citosólicos que podem estar envolvidos no direcionamento de proteínas para as organelas. Um ensaio de duplo-híbrido em leveduras com as proteínas cloroplastidiais HMPPK/TMPPase (TH1) e Glutamina Sintetase (GS) II usados como iscas revelou que a forma citosólica da glutamil-tRNA sintetase - GluRS (At5g26710) de *Arabidopsis thaliana* interagiu com ambas as proteínas. Estudos de Complementação da Fluorescência Bimolecular (BiFC) confirmaram tais interações *in planta*. Estudos com deleções na região N-terminal da GluRS mostraram que esta região é responsável pelas interações com HMPPK/TMPPase e GSII. Além disso, seis resíduos de aminoácidos parecem ser cruciais para a interação entre as proteínas. Curiosamente, foi mostrado que a GluRS está envolvida na localização de proteínas em leveduras. A fim de obter mais informações sobre o envolvimento da GluRS na localização de proteínas nos cloroplastos, foram produzidas plantas de tabaco transgênicas expressando uma proteína quimérica, feita pela fusão do gene codificador da HMPPK/TMPPase, TH1-GFP, e GSII-GFP e posteriormente usados em ensaios de agroinfiltração com RNA de interferência (RNAi) para GluRS. Análises em microscópio confocal mostraram que TH1-GFP e GSII-GFP acumulam no citosol em vez de serem direcionados aos cloroplastos. Neste trabalho, mostramos pela primeira vez que a GluRS está envolvida na localização de proteínas cloroplastidiais em plantas e esse mecanismo é também conservado em *Saccharomyces cerevisiae*.

Palavras-chave: Localização subcelular; Glutamil-tRNA sintetase; RNA de interferência

ABSTRACT

Identification and characterization of the role of glutamyl-tRNA synthetase on the localization of chloroplastic proteins

Regulation of protein localization is one of the key aspects in plant cell biology. Chloroplasts import more than 90% of their proteins from the cytosol, therefore, it is important to identify and characterize cytosolic factors that might be involved in protein delivery to the organelar envelope. A yeast two-hybrid screen with a chloroplast-localized HMPPK/TMPPase protein and glutamine synthetase (GS), used as baits, revealed that the cytosolic form of the glutamyl-tRNA synthetase (GluRS) (At5g26710) from *Arabidopsis thaliana* interacted with both proteins. Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) studies confirmed such interactions *in planta*. Deletion studies of GluRS showed that the N-terminal region of the protein is responsible for protein-protein interactions (PPI) with TH1 and GS. In addition, six amino acid residues appeared to be crucial for PPI. Interestingly, GluRS has been also shown to be involved in regulating protein localization in yeast. In order to gain more information about the involvement of GluRS on protein localization in chloroplasts, we produced transgenic tobacco plants expressing a chimeric protein made by the fusion of TH1- GFP and GSII-GFP and agroinfiltrated with a RNA interference (RNAi) construct against GluRS. Confocal analysis showed that TH1-GFP and GSII-GFP accumulated in the cytosol instead of being targeted to chloroplasts. Here, we show for the same time that GluRS is involved in protein localization in plants and this mechanism is also conserved in *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: Protein localization; Glutamyl-tRNA synthetase; RNAi

1 INTRODUÇÃO

Independente da origem evolutiva, a maioria das proteínas mitocondriais e cloroplastidiais são codificadas pelo núcleo, traduzidas em ribossomos citossólicos e direcionadas para a organela correta a partir de um sofisticado e específico sistema de transporte de proteínas (CARRIE, 2010). A maioria das pesquisas sobre a importação de proteínas pelos plastídios são realizadas utilizando cloroplasto como modelo em função de serem o tipo mais abundante de plastídios. Propõe-se que outros tipos de plastídios possuem um aparato semelhante de importação de proteínas (DAVILA-APONTE; INOUE; KEEGSTRA, 2003). Uma via geral de importação para a membrana dos cloroplastos tem sido descrita que constituem um translocon da membrana externa e interna do cloroplasto (TOC e TIC), respectivamente (BALSERA; SOLL; BOLTER, 2009). A maioria das proteínas cloroplastidiais codificadas por genes nucleares apresentam um sinal na região N-terminal que é clivado na importação pela peptidase encontrada no estroma (BRUCE, 2001). Contrariamente à sequência de direcionamento mitocondrial, o sinal de direcionamento cloroplastidial não apresenta estrutura secundária característica em solução aquosa (KRIMM et al., 1999). Uma das hipóteses que suporta esta observação é que a ausência de estrutura secundária deve-se provavelmente ao recrutamento de fatores citosólicos seguindo o processo de tradução da proteína (ZANG; GLASER, 2002).

Além do complexo de importação das proteínas para os cloroplastos envolvendo o peptídeo sinal e o translocon, existem fatores citosólicos envolvidos no direcionamento de proteínas aos cloroplastos através de ligação às proteínas sinalizadoras funcionalmente diversas como quinases, fosfatases e receptores transmembrana (FORD et al., 1994). As proteínas 14-3-3 podem interferir na localização de proteínas, provavelmente devido à exposição da sequência de direcionamento, ou peptídeo sinal, que é omitida quando a proteína alvo está ligada a proteína 14-3-3 (JIANG et al., 2003).

Outro tipo de mecanismo de controle da localização de proteínas foi mostrado por Galani (2001) em leveduras. Um complexo formado entre o fator Arc1p, a metionil-tRNA sintetase (MetRS) e glutamil-tRNA sintetase (GluRS) funciona como uma espécie de âncora citoplasmática. Quando o complexo é formado as proteínas permanecem no citosol. A partir de uma modificação pós-traducional (fosforilação), o complexo é

desfeito e as proteínas são endereçadas ao núcleo ou para mitocôndria. Esta interação ocorre na região N-terminal das proteínas. A GluRS que forma o complexo multienzimático em levedura descrito acima, faz parte da família de aminoacil-tRNA sintetases, que além de desempenhar sua função canônica na participação do processo de tradução de proteínas no citosol, também exerce outras funções como participação indireta na biossíntese de compostos tetrapirrólicos através da via do C₅ em plantas (JAHN; VERKAMP; SOLL, 1992).

Na tentativa de encontrar proteínas que regulem a localização de proteínas cloroplásticas foi empregada a técnica do duplo híbrido em levedura com duas proteínas usadas como isca: HMPPK/TMPPase e Glutamina Sintetase II (GS) de *Arabidopsis thaliana*. Surpreendentemente, dentre as proteínas isoladas encontrou-se a forma citosólica da GluRS (DANTAS, 2010).

Assim, neste estudo teve-se como objetivo caracterizar em detalhes a interação observada in levedura. Para tal, foi realizado um estudo sobre as regiões de interação proteína-proteína e o impacto do silenciamento da proteína GluRS, através de RNA de interferência, na localização subcelular das duas proteínas interagentes. Este estudo é importante para elucidação de novos tipos de mecanismos de controle de distribuição de proteínas aos cloroplastos e também para conhecimento de novas funções que possam ser atribuídas a GluRS citosólica de *Arabidopsis thaliana*.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Origem dos cloroplastos

Segundo a teoria de Lynn Magulis (1981) as mitocôndrias e cloroplastos originaram-se de eventos endossimbiontes nos quais bactérias de vida livre como as α -proteobactérias e cianobactérias passaram a viver dentro das células precursoras eucarióticas. A teoria postula que as mitocôndrias evoluíram a partir de bactérias aeróbias (provavelmente proteobactérias) e que os cloroplastos evoluíram de cianobactérias endossimbiótica (procariontes autotróficos).

O sucesso da evolução da endossimbiose foi baseado em uma ação coordenada entre os três genomas distintos (nuclear, mitocondrial e cloroplastidial), de modo a garantir uma repartição das funções que envolvem a distribuição de proteínas e da partição na biossíntese de metabólitos entre as organelas (WEBER; LINKA; BHATTACHARYA, 2006; REYES-PRIETO; WEBER; BHHATTACHARYA, 2007). Outra característica comum entre os diferentes eventos endossimbiontes é que a maioria dos genes dos genomas endossimbionte foram perdido ou transferidos para o núcleo, um evento denominado transferência de genes endossimbiontes (*endosymbiotic gene transfer* - EGT) (MARTIN et al., 1998). Para que a transferência dos genes fosse eficiente era necessário que a inserção ocorresse perto de promotores ativos já utilizados pela célula hospedeira ou readquirir novos promotores. Assim, os genes existiriam em duplicidade até que o sistema desenvolvesse um mecanismo para mudar o local do produto do gene para a proto-organela (GABALDON; HUYNEN, 2003).

A transferência de genes do cloroplasto para o núcleo normalmente exige a passagem de retorno do produto do gene ao seu local de função. Este mecanismo é fundamental para o estabelecimento da endossimbiose. O primeiro gene a ser estudado foi o que codifica a pequena subunidade da Rubisco (RbcS). No início, uma forma precursora protéica foi produzida no citosol e direcionada aos cloroplastos. Posteriormente, foi constatado que o precursor apresentava uma extensão N-terminal denominado de "peptídeo de trânsito", que é responsável pelo transporte das proteínas aos cloroplastos. Dobberstein et al. (1977) mostraram em um trabalho pioneiro que a RbcS inicialmente possuía uma forma precursora com uma pequena extensão N-

terminal (3,5 kD) que era proteoliticamente retirada dentro do cloroplasto antes da montagem da holoenzima.

A biogênese da organela endossimbiótica envolve portanto dois eventos críticos: a divisão e a translocação das proteínas precursoras. Ambos os processos são movidos por uma combinação do simbionte e de proteínas derivadas da célula hospedeira. A proteína FtsZ, de origem endossimbionte, é uma proteína essencial para divisão eubacteriana e é encontrada na maioria dos cloroplastos, mas parece ser limitada as mitocôndrias de certos eucariontes unicelulares (OSTERYOUNG; NUNNARI, 2003). A importação de proteínas codificadas por genes nucleares foi um segundo pré-requisito para a biogênese da organela. Extensos estudos sobre os complexos de translocação mitocondrial (TRUSCOTT; BRANDNER; PFANNER, 2003) e plastidal (SOLL, 2002; ROBINSON; THOMPSON; WOOLHEAD, 2001) de proteínas revelaram algumas semelhanças. Estas observações de certa forma suportam a origem procariótica das organelas e a montagem de complexos protéicos no envelope das mesmas de forma a interagir com as sequências de direcionamento distintas, bem como de permitir a passagem das proteínas precursoras através do envelope.

2.2 Direcionamento de proteínas aos cloroplastos

A grande maioria das aproximadamente 3.000 diferentes proteínas necessárias para construir um cloroplasto totalmente funcional são codificadas pelo genoma nuclear e traduzidas nos ribossomos citosólicos. Como os cloroplastos possuem um sistema de membrana dupla, mecanismos sofisticados são necessários para mediar a importação dessas proteínas codificadas no núcleo para os cloroplastos (JARVIS; ROBINSON, 2004). Este processo pode ser visualizado como uma cascata de proteínas alvo e eventos de montagem que resultam na localização de proteínas para executar sua função adequada dentro da organela (CLINE; HENRY, 1996).

Existem ainda proteínas que são codificadas por genes nucleares mas podem ser direcionadas não somente para o cloroplastos ou mitocôndrias, e sim para os dois compartimentos, são as chamadas proteínas de duplo-direcionamento (SILVA-FILHO, 2003).

A importação de proteínas aos cloroplastos é dependente da presença de um sinal amino-terminal ou peptídeo de trânsito que varia em tamanho de 20 a > 100 resíduos, não apresentando estrutura secundária conservada entre as sequências (BRUCE, 2001). Observa-se uma maior frequência de resíduos hidroxilados e uma escassez de resíduos ácidos, dando-lhes um saldo de carga positiva. A este respeito, peptídeos de trânsito têm alguma semelhança com as pré-sequências que mediam a importação de proteínas para dentro das mitocôndrias (TRUSCOTT; BRANDNER; PFANNER, 2003). Algumas pré-proteínas possuem duplo-direcionamento para ambos os cloroplastos e mitocôndrias, indicando grau de semelhanças funcionais entre os dois tipos de sinais (PEETERS; SMALL, 2001).

As proteínas cloroplásticas podem ser transportadas para seis subcompartimentos: o envelope externo, o envelope interno, o espaço intermembranar, o estroma, a membrana do tilacóide e o lúmen.

O transporte através das membranas pode ser dividido em pelo menos três etapas. Na primeira, os precursores se associam reversivelmente com os plastídios. Essa interação é mediada por interações proteína-proteína e em parte por proteína-lipídeos. Os peptídeos de trânsito interagem especificamente com os lipídios da membrana (PINNADUWAGE; BRUCE, 1996) e estudos com mutantes deficientes em galactolipídeos apresentaram uma menor capacidade de importação de precursores (CHEN; LI, 1998). As próximas duas etapas na importação são distinguidas por suas diferentes necessidades de energia. A incubação de cloroplastos com proteínas precursoras na presença de GTP ou baixas concentrações de ATP (<100mM) resulta em uma associação estável entre precursores e o complexo de importação, mas deixa os precursores em um estado que pode ser degradado por proteases exógenas (OLSEN; KEEGSTRA, 1992). Esta associação tem sido frequentemente chamada de ligação, mas é bem descrita como um dos primeiros intermediários de translocação. Quando níveis adequados de ATP estão presentes no meio ocorre translocação completa dos precursores. O ATP necessário para translocação completa dos precursores é hidrolisado dentro do cloroplasto, presumivelmente por proteínas chaperonas que puxam os precursores para a organela. Diferentemente das mitocôndrias, onde uma força próton-motriz muitas vezes é necessária para a

importação de proteínas, um potencial não é necessário para o transporte de proteínas através da membrana cloroplastidial (THEG et al., 1989; PFANNER et al., 1997).

O processo de importação das proteínas aos cloroplastos é mediado por complexos moleculares presentes na membrana exterior e na interior, denominada "*Translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts" (Toc) e "*Translocon at the innner envelope membrane of chloroplasts" (Tic), respectivamente (KEEGSTRA; CLINE, 1999 ; JARVIS; SOLL, 2002). Após a chegada ao estroma, o peptídeo de trânsito é removido e a proteína assume sua conformação final ou é direcionada para um dos vários compartimentos internos separados em uma segmentação do processo de direcionamento (KEEGSTRA; CLINE, 1999).**

Três proteínas da membrana externa do cloroplasto foram identificadas como parte do complexo Toc: Toc86, Toc75 e Toc34. Estas três proteínas interagem umas com as outras na membrana externa para formar um complexo, mesmo na ausência de pré-proteínas que estão no processo de translocação (MA et al., 1996; NIELSEN et al., 1997). A Toc86 é uma proteína de ligação ao GTP que é destinada a funcionar como um receptor de importação (HIRSCH et al., 1992; PERRY ; KEEGSTRA, 1994).

A Toc34 também é uma proteína de ligação ao GTP, possui sequência semelhante a N-terminal da Toc86 (KESSLER et al., 1994). A Toc33 é uma proteína de ligação a GTP com sequencia semelhante a Toc34, que foi identificada em *Arabidopsis* por Jarvis et al. (1998). Os autores demonstraram que mutantes sem o gene codificador da Toc33, possuem defeitos no sistema de importação de proteínas, tanto *in vivo* e *in vitro*. A Toc75, a proteína mais abundante da membrana externa, forma o canal através do qual as proteínas precursoras são transportadas através da membrana externa (SCHNELL et al., 1994; TRANEL et al., 1995). A Toc75 é profundamente ancorada na membrana e é altamente resistente à proteólise da superfície externa (TRANEL et al., 1995).

Estudos identificaram uma forte atividade ligada ao desdobramento da proteína associada com a membrana externa que pode servir para induzir ou estabilizar a importação e a correta conformação do precursor (GUERÁ et al., 1993; WALKER et al., 1996). A natureza desta atividade de desdobramento é desconhecida, mas junto com moléculas chaperonas citoplasmáticas (homólogos hsp70) acredita-se que venham

garantir o sucesso da importação da proteína precursora do citoplasma *in vivo* (WAEAGEMANN; PAULSEN; SOLL, 1990).

Proteínas direcionadas a membrana interna possuem um peptídeo de trânsito que consiste em um domínio de direcionamento para o estroma (LI; SULLIVAN; KEEGSTRA, 1992; BRINK et al., 1995). No entanto, as informações que direcionam estas proteínas para a membrana interna estão contidas dentro da proteína madura (BRINK et al., 1995; KNIGHT; GRAY, 1995; LUBECK; HEINS; SOLL, 1997). Estas informações, segmentos, podem funcionar de maneira a promover a inserção da proteína importada para o estroma. Este mecanismo foi proposto para localização da Tic110 (LUBECK et al., 1997). Alternativamente, os segmentos hidrofóbicos dentro da proteína precursora podem funcionar como uma interrupção na transferência da sequência e induzir a liberação prematura no complexo de transporte para membrana interna. Ambos os mecanismos, ou seja, interromper a transferência e entrega à membrana interna posterior a importação ocorrem em mitocôndrias (HARTL; NEUPERT, 1990; GLICK et al., 1992). Independentemente de qual mecanismo é utilizado, a questão interessante surge sobre a forma específica de como as proteínas são direcionadas às membranas dos tilacóides. Muitas proteínas dos tilacóides possuem segmentos hidrofóbicos que devem contornar qualquer mecanismo de transferência putativa. Por outro lado, os domínios hidrofóbicos de proteínas dos tilacóides funcionam como sinais para a inserção na membrana (KEEGSTRA; CLINE, 1999).

2.3 Fatores citosólicos que auxiliam no direcionamento de proteínas a diferentes compartimentos celulares

O papel dos fatores citosólicos pode se estender além da simples manutenção da importação. Muitos peptídeos de trânsito contêm um sítio putativo de ligação para proteínas 14-3-3, cada um localizado em torno de um resíduo de fosfoserina ou fosfotreonina. Em um trabalho controverso, foi sugerido que a ligação da proteína 14-3-3, juntamente com fatores Hsp70 e outros, neste local aumenta a eficiência de importação da proteína ao cloroplasto (MAY; SOLL, 2000). Proteínas 14-3-3

citoplasmáticas podem formar um complexo com pré-proteínas cloroplastidiais que guiam e facilitam a sua importação para a organela (SEHNKE; FERL, 2000). Várias proteínas 14-3-3 possuem sua localização atribuída aos cloroplastos, pois poderiam estar associadas com o processo de direcionamento e inserção das pré-proteínas nos tilacóides (FULGOSI et al., 2002).

As plantas necessitam de uma maquinaria regulatória para lidar com um ambiente complexo e mudanças em seu desenvolvimento (DELILLE; SEHNKE; FERL, 2000). Neste contexto, as proteínas 14-3-3 desempenham papéis chave em muitas rotas fisiológicas críticas que são reguladas por fosforilação. Seu papel é completar a transdução de sinal através da ligação ao alvo fosforilado, que completa uma mudança na sua estrutura regulando, assim, sua atividade (SEHNKE; FERL, 2000).

2.4 As aminoacil-t-RNA sintetases

A tradução é o processo pelo qual a informação genética, na forma de mRNA, é utilizada para sintetizar a sequência correspondente de aminoácidos encontrados nas proteínas (IBBA; SOLL, 1999). Um aminoácido específico inserido em uma posição particular durante a síntese de proteínas é determinada pelo pareamento de um códon do mRNA com uma aminoacil-tRNA sintetase. A fidelidade da síntese de proteínas é dependente de dois processos, reconhecimento do códon pelo anti-códon e síntese de aminoacil-tRNA (IBBA; CURNOW; SOLL, 1997). Os aminoacil-tRNAs são sintetizados através da esterificação do tRNA com os aminoácidos apropriados. Para maioria dos aminoacil-tRNA isso é feito por aminoacilação direta de um determinado tRNA com o aminoácido correspondente em uma reação de duas etapas:

onde, AA é um aminoácido e o AARS é a correspondente aminoacil-tRNA sintetase. A aminoacilação direta de tRNAs com os respectivos aminoácidos é catalizada por uma família de enzimas conhecidas como aminoacil-tRNA sintetases (aaRS) (IBBA; SOLL, 2000).

Apesar de possuírem os mecanismos de catálise conservados, as aminoacil-tRNA sintetases são divididas em duas classes (I e II), com base nos motivos mutuamente exclusivos de suas sequências que refletem em distintos sítios ativos (ERIANI et al., 1990; CUSACK; HARTLEIN; LEBERMAN, 1991; BURBAUM; SCHIMMEL, 1991). Outra diferença entre as duas classes de aaRS, foi sugerido após estudos estruturais. As enzimas da classe I reconhecem o tRNA a partir do sulco menor do seu braço aceptor, via aminocilação da adenosina terminal da molécula de tRNA no carbono de posição 2'-OH, enquanto, que as da classe II reconhecem o tRNA a partir do sulco maior, carregando no carbono de posição 3'-OH da adenosina terminal (SANKARANARAYANAN et al., 1997).

Um dos mais interessantes exemplos de duplo-direcionamento de proteínas às mitocôndrias e cloroplastos vem do grupo de proteínas das aminoacil-tRNA sintetases (aaRSs). Nas plantas, a síntese protéica ocorre em três compartimentos subcelulares: citoplasma, mitocôndria e cloroplasto, o que gera demanda pelo transporte subcelular de aaRS para estas organelas, já que todos os genes que codificam aaRS estão no núcleo. Aparentemente, o duplo direcionamento é bastante comum nesta família protéica em *Arabidopsis*, já que de 23 proteínas deste grupo importadas para as organelas, 16 possuem duplo-direcionamento (DUCHENE et al., 2005). Muito provavelmente, o mesmo acontece em outras espécies vegetais (CREISSEN et al., 1995; ROKOV-PLAVEC et al., 2008). A fim de estudar a origem evolutiva do duplo direcionamento (DD) das aaRS em plantas, nosso grupo mostrou que os genes que codificam as aaRS são resultado de transferência horizontal das bactérias endossimbiontes que deram origem às mitocôndrias e cloroplastos (proteobactérias e cianobactérias, respectivamente). Além disso, a origem dos genes que codificam proteínas de DD não é restrita à um endossimbionte, podendo ser derivadas tanto das cianobactérias quanto de proteobactérias. Duas classes de genes puderam ser estabelecidas e foram denominadas de Parálogos e Homólogos no que se refere à origem dos genes que codificam as formas mitocôndriais e cloroplásticas com as formas citossólicas. No caso dos Parálogos, a origem dos genes que codificam proteínas de DD com a forma citossólica é a mesma, ou seja, do mesmo endossimbionte. Por outro lado, os homólogos apresentam uma origem distinta dos

genes de DD com o gene que codifica a forma citossólica (BRANDÃO; SILVA-FILHO, 2011).

Um número crescente de estudos têm mostrado associações entre as aaRSs e outras proteínas formando complexos multienzimáticos. Embora a atividade canônica de aaRS seja sua função de carregar o tRNA com o aminoácido correspondente, vários estudos têm relatado que estas proteínas são versáteis e multifuncionais (HAUSMANN; IBBA, 2008). Em eucariotos superiores, uma série de aaRSs foram identificadas como componentes de complexos multienzimáticos (KERJAN et al., 1994). Exemplos destes complexos são entre ValRS e o fator de alongação da tradução EF-1H, onde a associação entre as duas proteínas é mediada pela extensão N-terminal da aaRS (KERJAN; WALLER, 1994). Um papel adicional das aaRS em processos celulares importantes já foi reportado há mais de uma década (KUMAR et al., 1996).

Outro papel adicional das aaRS foi reportado por Galani et al. (2001). Os autores mostraram que em leveduras a proteína GluRS é capaz de associar-se a outras duas proteínas: metionil-tRNA sintetase (MetRS) e um cofator das aaRS chamado de Arc1p. A formação de um complexo MetRS-Arc1p-GluRS controla a distribuição de Arc1p entre o citoplasma e o núcleo. Ou seja, quando associada à GluRS e a MetRS a proteína Arc1p permanece no citosol, não sendo transportada ao núcleo para participar da distribuição dos tRNAs às aaRS. A formação deste complexo ocorre através da região N-terminal de cada componente, podendo, então, ser retidos no citoplasma ou alternativamente serem transportados para o núcleo. Estes resultados mostraram que a formação do complexo MetRS-Arcp1-GluRS controla a distribuição subcelular das componentes.

2.5 A glutamil-tRNA sintetase

Glutamil-tRNA sintetase (GluRS) pertence à classe tipo I de aminoacil-tRNA sintetases. GluRS transfere ácido glutâmico para tRNA^{Glu} em um processo de duas etapas em que há uma formação de um aminoacil adenilato e depois uma reação de troca de ATP/PPi (FREIST et al., 1997). Em bactérias Gram-positivas, arqueobactérias e organelas, a GluRS também está envolvida na transferência do tRNA^{Gln} (FREIST et al., 1997; SCHON; DIETER, 1988). tRNA^{Gln} é convertido em glutamato e depois em glutamina por um processo de amidotransferase. Glu-tRNA^{Glu} também é um

intermediário na síntese de porfirinas (FREIST et al., 1997). Nas plantas, o número de genes dentro das famílias da GluRS é variado. Morgante e cols. mostraram que enquanto em *Arabidopsis thaliana* existem 2 isoformas de GluRS em arroz são encontradas três isoformas (MORGANTE et al., 2009). No caso de *Arabidopsis*, uma das proteínas é direcionada tanto para as mitocôndrias quanto para os cloroplastos (DUCHENE et al., 2005). Por outro lado, a isoforma de arroz que forma um ramo específico com a sequência de *Arabidopsis* também é transportada para as duas organelas, sendo, portanto, uma proteína de duplo direcionamento. Estes autores concluíram que apesar dos genomas de arroz e *Arabidopsis* terem evoluído de forma diferente o duplo direcionamento foi conservado ao longo da evolução (MORGANTE et al., 2009). No caso específico de *Arabidopsis*, a origem do gene que codifica a proteína de duplo direcionamento é distinta da origem do gene que codifica a forma citossólica (BRANDÃO et al., 2011).

2.6 A HMPPK/TMPPase

A enzima 2-metil-4-amino-5-hidroximetilpirimidina fosfato quinase/tiamina monofosfato pirofosforilase (HMPPK/TMPPase), codificada pelo gene TH1 (At5g22940) de *Arabidopsis thaliana*, possui um papel chave na biossíntese da tiamina e é caracterizada por atividade bifuncional em plantas. A HMPPK/TMPPase possui três atividades distintas, HMP quinase, HMP-P quinase e TMPPase. A HMPP quinase é responsável pela fosforilação da 2-metil-4-amino-5- hidroximetilpirimidina (HMP) em 2-metil-4-amino-5-hidroximetilpirimidina fosfato (HMP-P). A HMP-P quinase fosforila a HMP-P em 2-metil-4-amino-5-hidroximetilpirimidina pirofosfato (HMP-PP). A TMPPase cataliza a condensação da HMP-PP e 4-metil-5-(beta-hidroxietil) tiazol fosfato (HET-P) em tiamina monofosfato (TMP) (Figura 1) (AJJAWI; TSEGAYE; SHINTANI, 2007).

2.7 A Glutamina sintetase (GS) II

A superfamília de genes GS inclui três classes distintas, GSI, GSII e GSIII, cada uma difere em peso molecular e no número de subunidades na holoenzima (BROWN et al., 1994; EISENBERG et al., 2000). A distribuição das três classes é variável dentro dos três domínios da vida e os casos de múltiplas isoenzimas GS de diferentes famílias em funcionamento no mesmo organismo são comuns em eubactéria e eucariontes

(BROWN et al., 1994; GARCIA-DOMINGUEZ; REYES; FLORENCIO, 1997). Estas observações sugerem que a família de genes surgiu antes da divergência de procariotos e eucariotos (BROWN; DOOLITTLE, 1997; ROBERTSON; DOOLITTLE, 1997). A história evolutiva da superfamília GS é complexa e a ocorrência de eventos de transferência de genes é uma entre muitas forças que moldaram a história desses genes. Em procariontes, há evidências filogenéticas de transferência horizontal de genes GSI entre membros Archaea e Eubactéria (BROWN; DOOLITTLE, 1997). Há ainda evidências de transferência do gene GSII na endossimbiose secundária de algas vermelhas para heterokonta (ROBERTSON; DOOLITTLE, 1997).

A assimilação de nitrogênio inorgânico em plantas superiores é um dos fatores determinantes no crescimento e produtividade da planta. Em solos bem arejados, o nitrato é a importante fonte de nitrogênio para as plantas. Ele é convertido em amônio durante a redução de nitrato (OAKS, 1992). Amônio é o único componente N inorgânico que pode ser usado diretamente como precursor da biossíntese de produtos N orgânicos (LEA, 1997). Portanto, enzimas envolvidas na assimilação de amônio são de particular interesse com respeito à qualidade de colheita e produção (LAM et al., 1996). A principal via de assimilação de amônio pelas folhas das plantas envolve duas reações com a participação das enzimas glutamina sintetase (GS) e ciclo do glutamato sintase (TEMPLE et al., 1996). A glutamina sintetase pode ser a enzima limitante durante a incorporação de nitrogênio em proteína porque catalisa o maior e principal passo convertendo nitrogênio inorgânico em orgânico (LAM et al., 1995).

Em relação a localização subcelular da GS, em folhas de plantas, é representada por dois grupos de proteínas, sendo um deles localizado no estroma dos cloroplastos (GSII) e outra (GSI) no citosol das células (HIREL; MIAO; VERMA, 1993).

2.8 Interação proteína-proteína

Associações proteína-proteína ocorrem em uma ampla variedade de contextos funcionais e são a base dos sistemas biológicos. Estas associações incluem a estrutura quaternária das proteínas individuais, bem como complexos funcionais entre sítios diferentes da proteína, como inibidor da enzima e antígeno-anticorpo. O ganho em energia livre que ocorre quando as proteínas estão associadas são dependentes uma combinação de propriedades físicas e químicas. Estudos estruturais têm mostrado que

a presença de ligações de hidrogênio, pontes de moléculas de água, pontes de sal e interações hidrofóbicas contribuem para a energia de ligação da associação (KORTEMME; BAKER, 2002; MONECKE et al., 2006).

A interação proteína-proteína pode ser classificada como permanente ou transitória dependendo da natureza desta associação (NOOREN; THORNTON, 2003).

Cada vez mais trabalhos são publicados sobre novas interações de proteínas descobertas, bem como redes de interações em determinados processos metabólicos. Existem diferentes metodologias de estudo de interações de proteínas, podendo ser *in silico*, através de programas de bioinformática que predizem estas possíveis interações, como por exemplo o programa AtPIN (*Arabidopsis thaliana Protein Interaction Network*) (BRANDÃO et al., 2009); *in vivo*, através da técnica de duplo-híbrido em leveduras; *in vivo in planta*, através da técnica de fluorescência complementar BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*) (WALTER et al., 2004)) e também *in vitro* através de ensaios de *pull-down* (EINARSON, 2001).

2.9 RNA de interferência

O RNA de Interferência (RNAi) foi inesperadamente descoberto durante tentativas de manipulação experimental da expressão de genes específicos (FIRE et al., 1998). Os pesquisadores tentavam inibir a expressão de um gene do *C. elegans* microinjetando um RNA fita-simples complementar que poderia se hibridizar com o mRNA codificado e inibir a tradução, uma metodologia denominada inibição antisense. No entanto, nos experimentos controle, um RNA dupla-fita de algumas centenas de bases de comprimento, perfeitamente pareadas, foi muito mais eficiente do que a fita antisense na inibição da expressão desse gene. Logo a seguir uma inibição similar da expressão gênica através da introdução de RNA dupla-fita foi observada em plantas. Em ambos os casos, o RNA dupla-fita induziu a degradação de todos os RNAs celulares que continham uma sequência exatamente igual a uma das fitas de RNA fita-dupla. O RNA de interferência se tornou uma ferramenta experimental eficaz para o estudo da função de genes devido à sua especificidade na marcação dos mRNAs-alvo que devem ser degradados (KUSABA, 2004).

O RNAi é uma ampla classe de RNAs que causam fenômenos de silenciamento e são encontrados em plantas, animais e fungos. A descoberta do RNAi mudou o

entendimento de como as células guardam seus genômas e levou ao desenvolvimento de novas estratégias para bloquear a função de um gene (ZAMORE, 2001).

O mecanismo de silenciamento através de RNA funciona através do silenciamento pelo dsRNA, resultando na clivagem do mRNA endógeno, no qual o mRNA é silenciado pelos micro-RNAs (miRNAs), que regulam negativamente a expressão do gene por base no emparelhamento com os mRNAs específicos, resultando em clivagem do mRNA ou bloqueio da tradução da proteína, o chamado silenciamento gênico pós-transcricional (*post-transcriptional gene silencing* - PTGS). O RNA de silenciamento está associado a sequências específicas de metilação do DNA e consequente supressão da transcrição, o chamado silenciamento gênico transcricional (*transcriptional gene silencing* - TGS) (MANSOOR et al., 2006).

Estudos bioquímicos mostraram que um longo RNA dupla-fita que medeia a interferência é inicialmente processado, dando origem a um intermediário dupla-fita conhecido como pequeno RNA de interferência (siRNA). As fitas do siRNA contêm de 21 a 23 nucleotídeos hibridizados entre si de tal modo que as duas bases na extremidade 3' de cada fita encontram-se de forma simples. A descoberta de que a ribonuclease Dicer é necessária para a formação dos siRNAs sugeriu que o RNA de interferência e a repressão traducional mediada por miRNA são processos relacionados. Os siRNAs fita-dupla e os miRNAs são processados em complexos multiprotéicos que contêm apenas uma das fitas de RNA. Este complexo silenciador induzido por RNA (RISC) cliva, então, os RNAs-alvo que pareiam exatamente à fita-simples siRNA correspondente. O complexo RISC tem duas funções distintas: a) uma função siRNA (ou seja, RNA de interferência) que leva à clivagem de mRNAs exatamente complementares e; b) uma função miRNA que leva à repressão da tradução de mRNAs com uns poucos pareamentos de bases não complementares (KUSABA, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Biológico

Sementes de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia, foram semeadas em vasos plásticos contendo iguais proporções de substrato organomineral (Plantamax) e vermiculita e mantidas em câmara de crescimento (Conviron ATC26) sob condições controladas de fotoperíodo (16 horas claro e 8 horas escuro), aproximadamente 300 μ E de intensidade luminosa e temperatura constante (25 °C).

3.2 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Folhas da roseta de *Arabidopsis thaliana* foram maceradas em nitrogênio líquido e a extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente Trizol (Invitrogen®), seguindo instruções do fabricante. As amostras foram tratadas com 1 unidade de DNase (Fermentas®, EN0521), para remoção de DNA, por 20 minutos a 37 °C e o RNA total foi novamente extraído com Trizol para remover traços de DNA e DNase. O RNA total foi quantificado por leitura no espectrofotômetro a 260nm. A síntese de cDNA de primeira fita foi feita utilizando a enzima transcriptase reversa Impron-II™ Reverse Transcriptase, Promega®, segundo instruções do fabricante. A reação foi realizada utilizando 1 μ g de RNA total, 2,5 μ M de primer Oligo dTe 1 μ L de transcriptase reversa.

3.3 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

As sequências codificadoras para as proteínas GluRS (At5g26710), GSII (At5g35630) e HMPPK/TMPPase (At1g22940) foram obtidas com o auxílio do banco de dados TAIR (*The Arabidopsis Information Resource* – www.arabidopsis.org) e então utilizadas para o desenho de iniciadores (primers) específicos. Nas extremidades 5' dos iniciadores foram adicionados sítios para enzimas de restrição para que fosse possível a realização da reação de recombinação nos vetores de interesse. Para reação de PCR foi utilizada a enzima *True Start Hot Start* (Fermentas®) segundo especificações do fabricante.

3.4 Clonagem nos vetores de duplo híbrido transformação de leveduras

A sequência de cDNA do gene TH1 (At1g22940) foi clonado no vetor pGBKT7 e pGADT7 a partir de PCR realizados com primers descritos (ANEXO A). As deleções na região codificadora da região N-terminal da proteína GluRS já se encontravam clonadas no vetor pGBKT7, feitas por Dantas (2010). A deleção dos aminoácidos encontrados como suposto motivo de interação e a respectiva troca por aminoácido alanina foram clonados no vetor pGBKT7 com primers descritos (ANEXO A).

A transformação de leveduras foi realizada utilizando a espécie *Saccharomyces cerevisiae* cepa AH109 que foram transformadas com o gene de interesse ligado ao domínio de ligação ao DNA e domínio de ativação da transcrição (vetor pGBKT7 e pGADT7, respectivamente) (ANEXO B) utilizando o protocolo descrito por Gietz e Woods (2002) modificado. As leveduras foram incubadas em 5mL meio YPDA líquido a 30°C, sob agitação a 180rpm por 16 horas. As células foram observadas em microscópio ótico para verificar se não houve contaminação do inóculo. Da cultura, retirou-se 1mL para obtenção do pellet através de centrifugação em microtubo de 1,5 mL estéril a 5.000 rpm por 30 segundos, descartou-se o sobrenadante.

Ao precipitado foi adicionada a mistura de transformação (Tabela 1) na ordem descrita e homogeneizado no vortex vigorosamente até a suspensão total das células.

Tabela 1 - Reagentes utilizados para transformação de leveduras

Mistura de transformação	
Polietileno glicol - PEG 50%	2,4mL
LiAc 1M	360µL
DNA de esperma de salmão (2mg/mL)	500µL
Plasmídio com a construção de interesse	AµL
Água deionizada	340µ – AµL

A transformação foi realizada através de tratamento com calor (*heat shock*) a 42°C por 40 minutos no banho-maria. O tubo foi agitado por inversão durante 15 segundos a cada 5 minutos, para manter a temperatura homogênea em toda mistura.

Os tubos foram centrifugados para obtenção do precipitado e ressuspensos em 200µL de água deionizada estéril. A cultura foi inoculada em Placas de Petri contendo meio *drop out* (*USBiological*[®]) sem os aminoácidos desejados de acordo com os vetores que eram inseridos e também dos ensaios para os genes repórteres que eram realizados. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C por 48 horas.

3.5 Clonagem dos genes em estudo em vetor binário

Os genes de *Arabidopsis thaliana* At1g22940 e At5g35630 codificadores das proteínas HMPPK/TMPPase e GSII, respectivamente, foram amplificados através de reação de PCR com iniciadores específicos (ANEXO C) e clonados no vetor binário pK7FWG2,0 (ANEXO D). Primeiramente foram clonados no vetor de entrada pENTR - D-TOPO (Invitrogen[®]), para que posteriormente fosse realizada a recombinação para o vetor de destino através da tecnologia *Gateway* (Invitrogen[®]). O vetor pK7FWG2,0 possui o promotor 35S e a proteína fluorescente verde GFP (*green fluorescence protein*). Estas construções gênicas foram utilizadas para transformação estável de plantas *Nicotiana tabacum* SRI.

3.6 Clonagem em vetores específicos para técnica de BiFC

Os produtos de amplificação de PCR contendo os sítios para enzimas de restrição para clonagem nos vetores específicos para técnica de BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*) pSPYNE-35S e pSPYCE-35S (ANEXO E) e os próprios vetores foram digeridos com as enzimas de restrição durante 2 horas a 37°C para adquirirem extremidades coesivas. Posteriormente, foi realizada a ligação com o kit *Rapid DNA Ligation* (Fermentas[®]), conforme instruções do fabricante. As reações foram incubadas durante 1 hora a 22°C, depois por 16 horas a 16°C. 2 µL das reações de ligação foram utilizados na eletroporação de 70 µL de células de *Escherichia coli* (DH5α) eletrocompetentes. As bactérias transformadas foram incubadas a 37°C por 1 hora em meio SOC e, em seguida, plaqueadas em LB sólido contendo 50 µg/mL de canamicina e incubadas durante 16 horas a 37°C. As bactérias transformadas foram selecionadas e transferidas para o meio LB líquido contendo 50 µg/mL de canamicina e incubadas por 16 horas a 37°C sob agitação a 200 rpm. A extração do DNA plasmidial foi realizada de acordo com protocolo clássico de minipreparação plasmidial descrito

em Sambrook e Russell (2001). A confirmação das transformações foi feita através de PCR. Os plasmídios extraídos foram sequenciados, seguidos por verificação no programa BLAST.

3.7 Transformação estável de *Nicotiana tabacum*

A transformação de *Nicotiana tabacum*, variedade SRI, foi realizada via *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101. Primeiramente, as plantas não transformadas foram crescidas em cultura *in vitro* em meio Murashine & Skoog acrescidos de 30g de sacarose por litro de meio de cultura.

As folhas foram cortadas em cima de papel filtro autoclavado e umedecido com água destilada estéril em tamanhos aproximadamente de 1X1 cm, incluindo tecido vascular, apenas a nervura central da folha foi removida. Os explantes foram incubados com agrobactéria contendo o plasmídio com o gene de interesse, durante 15 minutos sob leve agitação. Estes foram secos em papel filtro estéril e incubados por 48 horas a 30°C, no escuro em meio MS acrescido de hormônio BAP 1mg/L.

Após, os explantes foram transferidos para o meio de crescimento de parte aérea contendo MS, sacarose, BAP 2mg/L e antibiótico canamicina 100mg/L e deixados em sala de cultura *in vitro* com exposição a luz (foto período 16 horas claro e 8 horas escuro). Os explantes foram trocados de meio a cada 15 dias. Os calos regenerados foram transferidos para meio de enraizamento contendo hormônio AIA 0,1mg/L e canamicina e deixados nas mesmas condições de foto período. As plantas regeneradas foram transferidas para vasos com substrato e vermiculita e levados para casa de vegetação. As plantas foram observadas em microscópio confocal FV1000 (Olympus®), laser 488nm, para realizar a seleção das plantas transgênicas que possuíam melhor expressão da proteína fusionada a GFP.

3.8 Transformação transiente de *N. tabacum* por agroinfiltração

A técnica de agroinfiltração foi utilizada para realização dos experimentos de BiFC e para o silenciamento através de RNA de interferência (RNAi).

Plantas de tabaco com aproximadamente 8 semanas foram utilizadas para transformação transiente mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. As colônias de agrobactéria contendo as construções gênicas de interesse foram transferidas para 5

mL de meio MGL líquido (2,5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de triptona, 5 g/L de NaCl, 5 g/L de manitol, 1,16 g/L de glutamato monossódico, 0,25 g/L de KH₂PO₄, 0,1 g/L de MgSO₄.7H₂O e 0,1 g/L de biotina, ajustado pH 7) contendo 50 µg/mL de canamicina, 50 µg/mL de rifampicina e 50 µg/mL de gentamicina e incubadas durante 16 horas a 28°C sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, 1 mL de cada cultura foi centrifugada por 5 minutos a 5000 rpm a temperatura ambiente e ressuspensas em 1 mL do tampão de infiltração (500 mM de MES (pH 5.6), 2 mM de fosfato trissódico, 0,5% de glicose e 50 µL de acetosiringona a 100µM). Em seguida, as células foram novamente precipitadas por centrifugação por 5 minutos a 5000 rpm e novamente ressuspensas em 1mL de tampão de infiltração. A suspensão bacteriana foi diluída com tampão de infiltração para ajustar o inóculo em uma concentração que fornece a densidade ótica (D.O.) 600 de aproximadamente 0,1.

Para realizar a infiltração nas folhas foram utilizadas lâminas de bisturi para gerar 5 pequenas injúrias na face abaxial de folhas de tabaco, totalizando 2 folhas por planta, e, com o auxílio de uma seringa de 1 mL, foi infiltrada com ligeira pressão as culturas de agrobactérias diluídas em tampão de infiltração. As plantas foram incubadas sob as mesmas condições de cultivo de tabaco não transformado (veja descrição acima) durante três dias, quando seguiram para observação em microscópio confocal FV1000. Para observação de plantas infiltradas com os vetores pSPYCE-35S e pSPYNE-35S, para o ensaio de BiFC, foi utilizado o laser 512nm específico para observação da proteína fluorescente amarela YFP (*yellow fluorescence protein*), e para as plantas infiltradas com RNAi para GluRS, o laser 488nm (específico para observação da proteína fluorescente verde GFP (*green fluorescence protein*)).

3.9 Visualização das plantas em microscópio confocal

Para a visualização das folhas infiltradas com agrobactéria e do tabaco transgênico estável, foram feitas lâminas com pequenos cortes de folhas. Os cortes na epiderme abaxial voltada para cima foram hidratados com água destilada. Estas lâminas foram observadas em microscópio confocal a laser FV 1000 em comprimento de onda escolhido de acordo com o fluoróforo observado (GFP ou YFP). As imagens foram analisadas no programa Olympus Fluoview FV10 – ASW.

3.10 Silenciamento utilizando RNAi através de agroinfiltração

A proteína GluRS foi silenciada através da técnica de RNA de interferência. Foi clonado um fragmento de 616pb da região 5' do gene que codifica a GluRS (At5g26710), esta sequência é exclusiva da GluRS citosólica, sendo assim, haverá silenciamento apenas deste gene e não da GluRS de duplo-direcionamento também presente em plantas. A sequência foi clonada primeiramente em um vetor de entrada p-ENTR-D-TOPO (Invitrogen®) e transferido para o vetor de destino pK7GWIWG2(I) (ANEXO F).

As plantas transgênicas expressando as proteínas GSII e HMPK/TMPPa fusionadas a GFP foram utilizadas para agroinfiltração contendo o vetor específico para o silenciamento da GluRS. A infiltração foi realizada conforme protocolo já descrito e observado em microscópio confocal FV1000.

4 RESULTADOS

4.1 Interações proteína-proteína *in vivo*

Resultados obtidos no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas por Dantas (2010) mostraram a partir do alinhamento da GluRS de vários organismos, que o domínio de interação entre a GluRS e GSII poderia estar na região N-terminal da proteína GluRS, mais especificamente em seis aminoácidos conservados (PEAEIG), visto que este motivo é conservado desde fungos até plantas. Com base nesta hipótese, foi realizado duplo-híbrido em levedura com a proteína GSII e HMPPK/TMPase inteiras e uma deleção dos 6 aminoácidos da GluRS para verificar se na ausência deste motivo a interação deixaria de ocorrer.

A figura abaixo (Figura 1) mostra que, quando os aminoácidos são removidos, a interação entre a GSII e HMPPK/TMPase com a proteína GluRS não ocorre.

Figura 1 - Quadro C. G. Ausência de crescimento da levedura em meio seletivo sem os aminoácidos leucina (L), triptofano (W), histidina (H) e adenina (A), demonstrando que as proteínas não interagem sem o aminoácidos. Quadro D. H. Crescimento da levedura em meio seletivo somente para os vetores inseridos, comprovando que as leveduras estão em condições adequadas de crescimento; Quadros A. B. E. F. Controle positivo, sem a remoção dos aminoácidos

Foi realizado também teste de duplo-híbrido em levedura trocando-se os 6 aminoácidos do motivo conservado da GluRS por alaninas, chamado de varredura com alaninas (Figura 2). A alanina é um aminoácido pouco reativo, devido a limitada reatividade do grupo metila em situações fisiológicas. Por este motivo, é uma opção quando se efetuam estudos de mutagênese dirigida com o objetivo de revelar a função de um aminoácido. A substituição por alaninas possibilita a existência de um aminoácido na cadeia polipeptídica mas sem função reativa.

Figura 2 - Quadro A. C. Ausência de crescimento da levedura em meio seletivo sem os aminoácidos leucina (L), triptofano (W), histidina (H) e adenina (A), demonstrando que as proteínas não interagem quando o motivo é substituído por alaninas. Quadro B. D. Crescimento da levedura em meio seletivo somente para os vetores inseridos, comprovando que as leveduras estão em condições adequadas de crescimento

4.2 Interação proteína-proteína *in planta*

A interação entre GluRS e GSII através de BiFC, foi mostrada por Dantas (2010). Sendo assim, este trabalho apresenta os resultados referentes a interação entre a GluRS e HMPPK/TMPPase codificada pelo gene TH1 de *A. thaliana* a partir do ensaio de Complementação de Fluorescência Bifuncional (Figura 3).

Figura 3 - Célula de *Nicotiana tabacum* agroinfiltrada com vetores TH1-pSPYNE-35S e GluRS-pSPYCE-35S, contendo a região C-terminal e N-terminal da YFP, respectivamente. Quadro A. Imagem da célula obtida através de excitação com laser 512nm. Quadro B. Autofluorescência da clorofila nos cloroplastos. Quadro C. Sobreposição das imagens A e B. Quadro D. Sobreposição da imagem A com a imagem de luz transmitida

Através da figura acima, podemos observar que a proteína YFP foi reconstruída, emitindo fluorescência, pois houve interação entre as proteínas HMPPK/TMPase e GluRS. Nota-se que a interação é citoplasmática, apresentando fluorescência interna difusa e contorno celular.

Os controles negativos realizados foram agroinfiltração das combinações: TH1-pSPYNE-35S / pSPYCE-35S vazio / P19; pSPYNE-35S vazio/ GluRS-pSPYCE-35S/ P19; e pSPYNE-35S vazio/ pSPYCE-35S vazio/ P19. Todas as infiltrações foram realizadas sob mesmas condições e não apresentaram fluorescência da YFP (dados não mostrados).

4.3 Transformação de *Nicotiana tabacum* e infiltração de RNAi

Foram obtidas plantas transgênicas contendo a construção 35S-TH1-GFP e 35S-GSII-GFP. Folhas das plantas foram observadas em microscópio confocal para avaliar

a expressão das proteínas fusionadas a GFP. Como esperado (Figura 4) as folhas observadas apresentaram seus cloroplastos fluorescentes, já que as duas proteínas possuem direcionamento cloroplastidial.

Como controle, foram utilizadas plantas transgênicas (*N. tabacum*), com a construção 35S-FtsH5-GFP obtidas por Rodrigues (2011), para verificar se o silenciamento era específico ou não para as duas proteínas em estudo.

Pode-se observar na Figura 5, que quando a célula é infectada pela agrobactéria contendo RNAi para GluRS, a mesma é silenciada. Com isso, ocorre um acúmulo das proteínas HMPPK/TMPPase, codificada pelo gene TH1, e GSII no citosol.

As plantas transgênicas 35S-FtsH5-GFP, quando infiltradas com RNA para GluRS não apresentaram mudança na localização da proteína cloroplastidial, demonstrando que a interação é específica para as proteínas HMPPK/TMPPase e GSII. Uma outra forma de demonstrar a alteração na localização das proteínas após o silenciamento da GluRS é através do gráfico de intensidade de fluorescência da GFP por micrômetro de célula. As figuras 6,7,8,9 e 10 mostram os gráficos com os perfis de fluorescência de uma célula de folha de uma planta transgênica 35S-GFP, TH1-GFP, GSII-GFP, TH1-GFP infiltrada com RNAi e GSII-GFP infiltrada com RNAi.

Figura 4 - Quadro A. D. Fluorescência da GFP; Quadro B. E. Autofluorescência da clorofila. Quadro C. F. Sobreposição as imagens referentes a fluorescência da GFP e clorofila. A sobreposição das imagens revela a co-localização das duas fluorescências, provando que a fluorescência vista é correspondente aos cloroplastos. Os Quadros A. B. C. são referentes às plantas transgênicas 35S-TH1-GFP; os Quadros D. E. F. são referentes às plantas transgênicas 35S-GSII-GFP

Figura 5 - Folhas transgênicas de *N. tabacum* agroinfiltradas com RNAi para GluRS. Quadros A. D. Fluorescência da GFP; Quadros B. E. Autofluorescência da clorofila; Quadros C. F. Sobreposição das imagens da fluorescência da GFP e clorofila. Os Quadros A, B e C são referentes as plantas transgênicas 35S-GSII-GFP; os Quadros D. E. F. são referentes as plantas transgênicas 35S-TH1-GFP

Figura 6 - Intensidade de fluorescência da GFP (verde) e Clorofila (vermelho) de uma célula de folha de uma planta transgênica 35S-GFP

Figura 7 - Intensidade de fluorescência da GFP (verde) e Clorofila (vermelho) de uma célula de folha de uma planta transgênica TH1-GFP

Figura 8 - Intensidade de fluorescência da GFP (verde) e Clorofila (vermelho) de uma célula de folha de uma planta transgênica GSII-GFP

Figura 9 - Intensidade de fluorescência da GFP (verde) e Clorofila (vermelho) de uma célula de folha de uma planta transgênica TH1-GFP infiltrada com RNAi

Figura 10 - Intensidade de fluorescência da GFP (verde) e Clorofila (vermelho) de uma célula de folha de uma planta transgênica GSII-GFP infiltrada com RNAi

Pode-se observar a variação no padrão de intensidade das fluorescências da GFP e clorofila de acordo com a construção que as plantas foram transformadas e também aquelas que sofreram silenciamento da GluRS.

A planta transgênica 35S-GFP (controle) possui intensidade de fluorescência da GFP contínua ao longo da célula e não coincide com autofluorescência da clorofila, pois estão em compartimentos diferentes, GFP no citosol e clorofila nos cloroplastos. As plantas transgênicas TH1-GFP e GSII-GFP possuem picos de fluorescência da GFP e clorofila ao longo da célula e os picos coincidem já que os dois fluoróforos se encontram nos cloroplastos. A planta transgênica TH1-GFP que possui a GluRS silenciada através de RNAi possui picos de fluorescência, mas também é contínua ao longo da célula, mostrando praticamente uma mistura dos gráficos contidos nas Figuras 6 e 7. Estas observações sugerem que além de possuir fluorescência cloroplastidial nota-se também fluorescência no citosol, efeito causado pelo silenciamento da GluRS na célula infectada pela agrobactéria. A planta transgênica GSII-GFP possui um gráfico semelhante ao da planta controle que possui a GluRS silenciada através de RNAi. A célula infectada pela agrobactéria deixa de apresentar um perfil de picos, característico

da fluorescência cloroplastidial e apresenta um perfil de fluorescência contínuo, característico do citosol, efeito este causado pelo silenciamento da GluRS.

4.4 Alinhamento das GluRS citosólica e da proteína homóloga de duplo-direcionamento

Realizou-se o alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas GluRS citosólica (At5g26710) e de duplo-direcionamento (At5g64050), a fim de mostrar a diferença existente na região N-terminal entre as proteínas (Figura 11). Podemos observar uma região N-terminal maior na GluRS citosólica que não encontramos na GluRS de duplo direcionamento. Também é possível observar que não há grande semelhança entre as proteínas como um todo, assim como ocorre com as demais aminoacil-tRNA sintetases.

Figura 11 - Alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas GluRS citosólica e de duplo-direcionamento, de *Arabidopsis thaliana*

5 DISCUSSÃO

A partir do alinhamento de sequências da glutamil-tRNA sintetase de vários organismos, incluindo bactérias, fungos e plantas, foi identificado um motivo conservado de 6 aminoácidos PEAEIG localizado na porção N-terminal da proteína. Estes resíduos fazem parte de uma longa extensão ausente em Eubactérias mas presente em Archea, fungos e plantas. A deleção deste motivo presente na GluRS de *Arabidopsis* bloqueia a interação desta proteína com as duas proteínas interagentes HMPPK/TMPPase e Glutamina Sintetase II caracterizadas neste trabalho e em trabalho anterior (DANTAS, 2010). Os resultados se baseiam não somente ensaios com a deleção destes aminoácidos mas também na substituição destes por aminoácidos por alaninas, o que reforça o papel desta região na interação proteína-proteína. Interessante observar que estes resultados mostram-se coerentes com os obtidos por Galani et al. (2001), onde foi demonstrado que a região N-terminal das proteínas GluRS e MetRS é essencial para interação destas proteínas com o fator Arc1p em *Saccharomyces cerevisiae*.

Os resultados *in planta* para a interação das proteínas HMPPK/TMPPase e GluRS, através de BiFC, reforçam os resultados obtidos pelos ensaios de duplo híbrido. A interação foi confirmada quando ocorreu a reconstituição da proteína fluorescente amarela (*Yellow Fluorescence Protein* - YFP) e consequente emissão da fluorescência após excitação com laser, o que só foi possível porque as proteínas interagem entre si. Os resultados de interação *in planta* para as proteínas GSII e GluRS já foram mostrados por Dantas (2010) pela mesma metodologia. Galani et al., (2001) mostrou que o complexo ternário formado por MetRS-Arc1p-GluRS, exclui estas proteínas do núcleo, restando-as no citosol, revelando um simples mecanismo de controle subcelular de proteínas. Dantas (2010) levantou a hipótese de que a formação de complexo entre a GluRS citosólica de *A. thaliana* com proteínas cloroplastidiais e/ou duplo direcionamento poderia ser um mecanismo de controle de distribuição destas proteínas para suas organelas. Os resultados apresentados neste trabalho utilizando RNA de interferência (RNAi) para GluRS citosólica confirmam a hipótese. Plantas de *Nicotiana tabacum* (SRI) transformadas com TH1-GFP e GS-GFP estável, quando agroinfiltradas com vetor específico para RNAi para GluRS tiveram a fluorescência da GFP presente

no citosol, mostrando que as proteínas deixam de ir para os cloroplastos. As plantas da geração T1 foram utilizadas para fazer a infiltração de agrobactéria contendo a construção GluRS em vetor específico para silenciamento. Não houve necessidade de fazer o ensaio com plantas transgênicas vindas de eventos diferentes, já que o objetivo era estudar o silenciamento da proteína. Estes resultados sugerem que estas duas proteínas necessitam da GluRS para realização de seu transporte para os cloroplastos, ou seja, a presença do peptídeo de trânsito não é suficiente para assegurar o transporte das proteínas HMPPK/TMPPase e GSII para os cloroplastos. Algumas perguntas decorrentes deste trabalho são: 1) por que a GluRS estaria envolvida na localização de proteínas cloroplásticas de funções distintas?; 2) seria esse um mecanismo amplo de controle da distribuição das proteínas? Pode-se especular que a GluRS poderia regular o transporte das proteínas HMPPK/TMPPase e GSII em função uma demanda seletiva destas proteínas no interior da organela, resultado, portanto, de uma complexa rede regulatória.

No caso da formação do complexo com Arc1p em leveduras os resultados mostram que Arc1p funciona como uma espécie de "âncora citoplasmática", impedindo o transporte para as organelas. Frenchin et al. (2009) mostraram que a glutamil-tRNA sintetase citosólica em *Saccharomyces cerevisiae* é importada para dentro da mitocôndria. Quando importada pela organela, uma Glu-tRNA^{Gln} sofre o processo de transaminação pelo complexo GatFAB AdT, um novo tipo de complexo trimérico de AdT em mitocôndria de leveduras, para formar Gln-tRNA^{Gln}. Neste mesmo trabalho, foi demonstrado que a expressão de Arc1p é regulada negativamente, quando células de levedura trocam o metabolismo de fermentação pela respiração, fazendo com que aumente a importação da GluRS para dentro da mitocôndria para atender a demanda da síntese proteica mitocondrial. Esta nova estratégia que permite que uma única proteína possa ser localizada tanto na mitocôndria quanto no citosol fornece um novo paradigma para a regulação da distribuição subcelular dinâmica de proteínas para diferentes compartimentos dentro da célula. Esta nova perspectiva sobre a distribuição de proteínas para as organelas sendo controladas por formação de multicomplexos, faz surgir novas perguntas sobre regulação de vias metabólicas através da formação de complexos múltiplos envolvendo proteínas que não necessariamente estejam

envolvidas diretamente em uma mesma via metabólica. Os resultados apresentados neste trabalho também abrem portas para elucidação de mais uma função não-canônica de uma das aminoacil-tRNA sintetases.

A glutamil-tRNA sintetase parece auxiliar as proteínas no transporte destas aos cloroplastos de maneira diferente ao que encontramos na literatura em relação a outra proteína que também possui funções regulatórias no direcionamento, as proteínas 14-3-3. Estas proteínas 14-3-3 geralmente são responsáveis pelo sequestro das proteínas das organelas, muitas vezes ocultando a suas sequencias de direcionamento, o que não é o caso da glutamil-tRNA sintetase (JIANG et al., 2003). A GluRS poderia atuar como uma proteína chaperona, auxiliando no transporte das proteínas aos cloroplastos.

As chaperonas possuem como função ligarem-se especificamente à superfície interativas de proteínas que são expostas transitóriamente durante muitos processos celulares e assim, impedi-los de sofrerem interações incorretas que possam produzir estruturas não funcionais (ELLIS, 1990). Neste caso, a GluRS pode estar atuando de maneira impedir a formação tridimensional das proteínas para que as mesmas possam entrar nos cloroplastos. Os peptídeos de trânsito presente nas proteínas direcionadas aos cloroplastos possuem sítios de ligação as chaperonas Hsp70, especialmente aquelas que se encontram dobradas e necessitam serem desdobradas durante o processo de importação para a organela (RIAL; ARAKAKI; CECCARELLI, 2000). Análises estatísticas realizadas por Zhang et al. (1999) sugerem que as sequencias na região N-terminal são as principais responsáveis pela interação com as Hsp70, assim como observado com a GluRS e as proteínas cloroplastidiais GSII e HMPPK/TMPPase. O interessante seria realizar a modelagem destas proteínas para melhor estudar a interação entre elas, porém, o que se encontra na literatura até o momento é a estrutura tridimensional da GluRS de eubactérias, que é muito distinta da proteína que se encontra em plantas (ITO et al., 2010). Este trabalho também levanta questões a serem estudadas posteriormente como verificar se a MetRS faz parte do complexo que regula a localização das proteínas cloroplastídias em estudo, ou seja, se estas duas aminoacil tRNA sintetases (MetRS e GluRS) também formam complexos em plantas, assim como ocorre em leveduras. Estes resultados serão explorados na continuidade deste trabalho.

6 CONCLUSÕES

- A proteína GluRS citosólica de *Arabidopsis thaliana* interage com as proteínas HMPPK/TMPPase e GSII *in vivo* e *in planta*.
- O motivo composto por 6 aminoácidos na região N-terminal da GluRS é fundamental para que ocorra interação da mesma com as proteínas HMPPK/TMPPase e GSII.
- A GluRS citosólica auxilia de alguma forma o transporte das proteínas cloroplastidiais HMPPK/TMPPase e GSII para a organela, visto que, quando a síntese da proteína GluRS é interrompida, ocorre acúmulo das proteínas interagentes no citosol da célula.
- A extensão N-terminal diferenciada presente na GluRS citosólica pode estar relacionada ao ganho de função desta proteína não relacionada com sua atividade canônica na síntese de proteínas, mas sim, com a formação de outros complexos protéicos para realizar outras funções como por exemplo o auxílio no transporte de proteínas aos cloroplastos em plantas.

REFERÊNCIAS

- AJJAWI, I.; TSEGAYE, Y.; SHINTANI, D. Determination of the genetic, molecular, and biochemical basis of the *Arabidopsis thaliana* thiamin auxotroph *th1*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 459, p.107-114, 2007.
- BALSERA, M.; SOLL, J.; BOLTER, B. Protein import machineries in endosymbiotic organelles. **Cell and Molecular Life Science**, Switzerland, v. 66, p. 1903-1923, 2009.
- BRANDÃO, M.M.; DANTAS, L.L.; SILVA-FILHO, M.C. AtPIN: Arabidopsis thaliana protein interaction network. **BMC Bioinformatics**, London, v. 10, p. 454, 2009.
- BRINK, S.; FISCHER, K.; KLÖSGEN, R.B.; FLÜGGE, U.I. Sorting of nuclear encoded chloroplast membrane proteins to the envelope and the thylakoid membrane. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, p. 20808–20815, 1995.
- BROWN, J.R.; DOOLITTLE, W.F. Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. **Microbiology and Molecular Biology Review**, Washington, v. 61, p. 456-502, 1997.
- BROWN, J.R.; MASUCHI, Y.; ROBB, F.T.; DOOLITTLE, W.F. Evolutionary relationships of bacterial and archaeal glutamine synthetase genes. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 38, p. 566-576, 1994.
- BRUCE, B.D. The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. **Biochemistry et Biophysic Acta**, Amsterdam, v. 1541, p. 2-21, 2001.
- BURBAUM, J.J.; SCHIMMEL, P. Aminoacylation of alanine minihelices." Discriminator" base modulates transition state of single turnover reaction. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 266, p. 16965–16968, 1991.
- CARRIE, C. **Characterization of protein dual target to energy organelles in *Arabidopsis thaliana***. 2010. 139 p. Thesis (Doctor of Philosophy in Biomedical, Biomolecular and Chemical Sciences) - ARC Centre of Excellence in Plant Energy Biology, University of Western Australia, Perth, 2010.
- CHEN, L.J.; LI, H.M. A mutant deficient in the plastid lipid DGD is defective in protein import into chloroplasts. **The Plant Journal**, New York, v. 16, p. 33–39, 1998.
- CLINE, K.; HENRY, R. Import and routing of nucleus-encoded chloroplast proteins. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 12, p. 1-26, 1996.

CREISSEN, G.; REYNOLDS, H.; XUE, Y.; MULLINEAUX, P. Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. **The Plant Journal**, New York, v. 8, p. 167-175, 1995.

CUSACK, S.; HÄRTLEIN, M.; LEBERMAN, R. Sequence, structural and evolutionary relationships between class 2 aminoacyl-tRNA synthetases. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, p. 3489–3498, 1991.

DANTAS, L.L.B. **Caracterização do papel da glutamyl-tRNA sintetase na localização subcelular de proteínas**. 2010. 112 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

DAVILA-APONTE, J.A.; INOUE, K.; KEEGSTRA, K. Two chloroplastic protein translocation components, Tic110 and Toc75, are conserved in different plastid types from multiple plant species. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 51, p. 175-181, 2003.

DELILLE, J.M.; SEHNKE, P.C.; FERL, R. J. The Arabidopsis 14-3-3 family of signaling regulators. **Plant Physiology**, Washington, v. 126, p. 35–38, 2001.

DOBBERSTEIN, B.; BLOBEL, G.; CHUA, N-H. In vitro synthesis and processing of a putative precursor for the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, p. 1082-1085, 1977.

DUCHENE, A.M.; GIRITCH, A.; HOFFMANN, B.; COGNAT, V.; LANCELIN, D.; PEETERS, N.M.; ZAEPFEL, M.; MARECHAL-DROUARD, L.; SMALL, I.D. Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, p. 16484-16489, 2005.

EINARSON, M.B. Detection of protein-protein interactions using the GST fusion protein pulldown technique. In: SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. (Ed.). **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p.18.55-18.59.

EISENBERG, D.; GILL, H.S.; PFLUEGL, G.M.U.; ROTSTEIN, S.H. Review: structure function relationships of glutamine synthetases. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1477, p. 122-145, 2000.

ELLIS, R.J. Molecular chaperones: the plant connection. **Science**, Washington, v. 250, p. 954-959, 1990.

ERIANI, G.; DELARUE, M.; POCH, O.; GANGLOFF, J.; MORAS, D. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. **Nature**, New York, v. 347, p. 203–206, 1990.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.; KOSTAS, S.; DRIVER, S.; MELLO, C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, London, v. 391, p. 806-811, 1998.

FORD, J.C.; AL-KHODAIRY, F.; FOTOU, E.; SHELDRIK, K.S.; GRIFFITHS, D.J. 14-3-3 protein homologs required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. **Science**, Washington, v. 265, p. 533-535, 1994.

FRECHIN, M.; SENGER, B.; BRAYÉ, M.; KERN, D.; MARTIN, R.P.; BECKER, H. D. Yeast mitochondrial Gln-tRNA^{Gln} is generated by a GatFAB-mediated transamidation pathway involving Arc1p-controlled subcellular sorting of cytosolic GluRS. **Genes & Development**, New York, v. 23, p. 1119-1130, 2009.

FREIST, W.; GAUSS, D.H.; SOLL, D.; LAPOINTE, J. Glutamyl-tRNA synthetase. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 378, p. 1313-1329, 1997.

FULGOSI, H.; SOLL, J.; MARASCHIN, S.F.; KORTHOUT, H.A.A.J.; WANG, M.; TESTERINK, C. 14-3-3 proteins and plant development. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 50, p. 1019-1029, 2002.

GABALDON, T.; HUYNEN, M.A. Reconstruction of the protomitochondrial metabolism. **Science**, Washington, v. 301, p. 609, 2003.

GALANI, K.; GROBHANS, H.; DEINERT, K.; HURT, E.C.; SIMOS, G. The intracellular locations of two aminoacyl-tRNA synthetases depends on a complex formation with Arc1p. **The EMBO Journal**, London, v. 20, p. 6889-6898, 2001.

GARCIA-DOMINGUEZ, M.; REYES, J.C.; FLORENCIO, F.J. Purification and characterization of a new type of glutamine synthetase from cyanobacteria. **European Journal of Biochemistry**, Cambridge, v. 244, p. 258-264, 1997.

GIETZ, R.D.; WOODS, R.A. Transformation of yeast by the LiAc/ss carrier DNA/PEG method. **Methods in Enzymology**, Pasadena, v. 350, p. 87-96, 2002.

GLICK, B.S.; BRANDT, A.; CUNNINGHAM, K.; MULLER, S.; HALLBERG, R.L.; SCHATZ, G. Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. **Cell**, Cambridge, v. 69, p. 809-822, 1992.

GUÉRA, A.; AMERICA, T.; van WASS, M.; WEISBEEK, P.J. A strong protein unfolding activity is associated with the binding of precursor chloroplast proteins to chloroplast envelopes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 23, p. 309-324, 1993.

HARTL, F.-U.; NEUPERT, W. Protein sorting to mitochondria: evolutionary conservation of folding and assembly. **Science**, Washington, v. 247, p. 930-938, 1990.

HAUSMANN, C.D.; IBBA, M. Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: molecular multitasking revealed. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 32, p. 705-721, 2008.

HIREL, B.; MIAO, G.H.; VERMA, D.P.S. Metabolic and developmental control of glutamine synthetase genes in legume and non-legume plants. In: VERMA, D.P.S. (Ed.). **Control of gene plant expression**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 443-458.

HIRSCH, S.; MUCKEL, E.; HEEMEYER, F.; VON HEIJNE, G.; SOLL, J. A receptor component of the chloroplast protein translocation machinery. **Science**, Washington, v. 266, p. 1989–1992, 1994.

IBBA, M.; SÖLL, D. Quality control mechanisms during translation. **Science**, Washington, v. 287, p. 479–482, 1999.

_____. Aminoacyl-tRNA synthesis. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 69, p. 617-650, 2000.

IBBA, M.; CURNOW, A.W.; SÖLL, D. Aminoacyl-tRNA synthesis: divergent routes to a common goal. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 22, p. 39–42, 1997.

ITO, T.; KIAYSU, N.; MATSUNAGA, R.; TAKAHASHI, S.; YOKOYAMA, S. Structure of nondiscriminating glutamyl-tRNA synthetase from *Termoga maritima*. **Biological Crystallography**, Singapore, v. 66, p. 813-820, 2010)

JAHN, D.; VERKAMP, E.; SÖLL, D. Glutamyl-transfer RNA: a precursor of heme and chlorophyll biosynthesis. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 17, p. 215-218, 1992.

JARVIS, P.; ROBINSON, C. Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. **Current Biology**, Cambridge, v. 14, p. 1064-1077, 2004.

JARVIS, P.; SOLL, J. Toc, Tic, and chloroplast protein import. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1590, p. 177-189, 2002.

JARVIS, P.; CHEN, L.J.; LI, H.M.; PETE, C.A.; FANKHAUSER, C.; CHORY, J. An *Arabidopsis* mutant defective in the plastid general protein import apparatus. **Science**, Washington, v. 282, p. 100–103, 1998.

JIANG, K.; PEREIRA, E.; MAXFIELD, M.; RUSSELL, B.; GOUDELOCK, D.M.; SANCHEZ, Y. Regulation of Chk1 includes chromatin association and 14-3-3 binding following phosphorylation on Ser-345. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, p. 25207-25217, 2003.

KEEGSTRA, K.; CLINE, K. Protein import and routing systems of chloroplasts. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 11, p. 557-570, 1999.

KERJAN, P.; CERINI, C.; SEMERIVA, M.; MIRANDE, M. The multienzyme complex containing nine aminoacyl-tRNA synthetases is ubiquitous from *Drosophila* to mammals. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1199, p. 293–297, 1994.

KESSLER, F.; BLOBEL, G.; PATEL, H.A.; SCHNELL, D.J. Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery. **Science**, Washington, v. 266, p. 1035–1039, 1994.

KNIGHT, J.S.; GRAY, J.C. The N-terminal hydrophobic region of the mature phosphate translocator is sufficient for targeting to the chloroplast inner envelope membrane. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 1421–1432, 1995.

KORTEMME, T.; BAKER, D. A simple physical model for binding energy hot spots in protein-protein complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, p. 14116–14121, 2002.

KRIMM, I.; GANS, P.; HERNANDEZ, J.F.; ARLAUD, G.J.; LANCELIN, J.M. A coil-helix instead of a helix-coil motif can be induced in a chloroplast transit peptide from *Chlamydomonas reinhardtii*. **European Journal of Biochemistry**, Cambridge, v. 265, p. 171–180, 1999.

KUMAR, A.M.; SCHAUB, U.; SÖLL, D.; UJWAL, M.L. Glutamyl-transfer RNA: at the crossroad between chlorophyll and protein biosynthesis. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 1, p. 371–376, 1996.

KUSABA, M. RNA interference in crop plants. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 15, p. 139–143, 2004.

LAM, H-M.; COSHIGANO, K.T.; OLIVEIRA, I.; MELO-OLIVEIRA, R.; CORUZZI, G.M. The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 569–593, 1996.

LAM, H-M.; COSHIGANO, K.; SCHULTZ, C.; MELO-OLIVEIRA, R.; TJADEN, G.; OLIVEIRA, I.; NGAI, N.; HSIEH, M-H.; CORUZZI, G.M. Use of Arabidopsis mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 7, p. 887–898, 1995.

LEA, P.J. Primary nitrogen metabolism. In: DEY, P.M.; HARBONE, J.B. **Plant biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 273–313.

LI, H.M.; SULLIVAN, T.D.; KEEGSTRA, K. Information for targeting to the chloroplastic inner envelope membrane is contained in the mature region of the maize *Bt1*-encoded protein. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 267, p. 18999–19004, 1992.

LÜBECK, J.; HEINS, L.; SOLL, J. Protein import into chloroplasts. **Plant Physiology**, Washington, v. 100, p. 53–64, 1997.

MA, Y.K.; KOURANOV, A.; LASALA, S.E.; SCHNELL, D.J. Two components of the chloroplast protein import apparatus, IAP86 and IAP75, interact with the transit sequence during the recognition and translocation of precursor proteins at the outer envelope. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 134, p. 315–327, 1996.

MANSOOR, S.; HUSSAIN, M.; ZAFAR, Y.; BRIDDON, R. W. Engineering novel traits in plants through RNA interference. **Trends in Plant Science**, Killington, v. 11, p. 559-565, 2006.

MARTIN, W.; STOEBE, B.; GOREMYKIN, V.; HANSMANN, S.; HASEGAWA, M.; KOWALLIK, K. V. Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. **Nature**, London, v. 393, p. 162-165, 1998.

MAY, T.; SOLL, J. 14–3–3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 12, p. 53-64, 2000.

MONECKE, P.; BOROSCH, T.; BRICKMANN, J.; KAST, S.M. Determination of the interfacial water content in protein-protein complexes from free energy simulations. **Biophysical Journal**, St. Louis, v. 90, p. 841–850, 2006.

NIELSEN, E.; AKITA, M.; DAVILA-APONTE, J.; KEEGSTRA, K. Stable association of chloroplastic precursors with protein translocation complexes that contain proteins from both envelope membranes and a stromal hsp100 molecular chaperone. **The EMBO Journal**, London, v. 16, p. 935–946, 1997.

NOOREN, I.M.A.; THORNTON, J.M. Diversity of protein-protein interactions. **The EMBO Journal**, London, v. 22, p. 3486-3492, 2003.

OAKS, A. A re-evaluation of nitrogen assimilation in roots. **Bioscience**, Berkeley, v. 42, p. 103-110, 1992.

OLSEN, L.J.; KEEGSTRA, K. The binding of precursor proteins to chloroplasts requires nucleoside triphosphates in the intermembrane space. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 267, p. 433–439, 1992.

OSTERYOUNG, K. W.; NUNNARI, J. The division of endosymbiotic organelles. **Science**, Washington, v. 302, p. 1698-1704, 2003.

PEETERS, N.; SMALL, I. Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1541, p. 54–63, 2001.

PERRY, S.E.; KEEGSTRA, K. Envelope membrane proteins that interact with chloroplastic precursor proteins. **The Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 93–105, 1994.

PFANNER, N.; CRAIG, E.A.; HÖNLINGER, A. Mitochondrial preprotein translocase. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 13, p. 25–51, 1997.

PINNADUWAGE, P.; BRUCE, B.D. *In vitro* interaction between a chloroplast transit peptide and chloroplast outer envelope lipids is sequence-specific and lipid class-dependent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 271, p. 32907–32915, 1996.

RATINAUD, M.H.; THOMES, J.C.; JULIEN, R. Dimeric glutamyl-tRNA synthetases from wheat: Kinetic properties and functional structures. **European Journal of Biochemistry**, Cambridge, v. 135, p. 471-477, 1988.

REYES-PRIETO, A.; WEBER, A.P.M.; BHHATTACHARYA, D. The origin and establishment of the plastid in algae and plants. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 41, p. 147-168, 2007.

RIAL, D.V.; ARAKAKI, A.K.; CECCARELLI, E.A. Interaction of the targeting sequence of chloroplast precursors with Hsp70 molecular chaperones. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 267, p. 6239-6248, 2000.

ROBINSON, C.; THOMPSON, S.J.; WOOLHEAD, C. Multiple pathways used for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts. **Traffic**, La Jolla, v. 2, p. 245-251, 2001.

RODRIGUES, R.A.O. **Estudo do direcionamento das proteases FtsH plastidiais às membranas dos tilacóides**. 2011. 125 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

ROKOV-PLAVEC, J.; DULIC, M.; DUCHENE, A.M.; WEYGAND-DURASEVIC, I. Dual targeting of organellar seryl-tRNA synthetase to maize mitochondria and chloroplasts. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 1157-1168, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 3 v.

SANKARANARAYANAN, R.; DOCK-BREGEON, A.C.; ROMBY, P.; CAILLET, J.; SPRINGER, M.; REES, B.; EHRESMANN, C.; EHRESMANN, B.; MORAS, D. The structure of threonyl-tRNA synthetase-tRNA^{Thr} complex enlightens its repressor activity and reveals an essential zinc ion in the active site. **Cell**, Cambridge, v. 97, p. 371–381, 1997.

SCHNELL, D.J.; KESSLER, F.; BLOBEL, G. Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. **Science**, Washington, v. 266, p. 1007–1012, 1994.

SCHON, A.; DIETER, S. tRNA specificity of a mischarging aminoacyl-tRNA synthetase: Glutamyl-tRNA synthetase from barley chloroplasts. **FEBS Letters**, Cambridge, v. 228, p. 241-244, 1988.

SEHNKE, P.C.; FERL, R.J. **Plant 14-3-3s**: omnipotent metabolic phosphopartners? Science's STKE. Disponível em: <<http://www.stke.org/cgi/content/full/OCsigtrans;2000/56/pe1,2000>>. Acesso em: 10 out. 2011.

SIATECKA, M.; ROZEK, M.; IGNACAK, J.; BARCISZEWSKI, J. Cloning and sequencing of the first plant GlnRS and GluRS genes. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 33, p. 160-162, 1995.

SILVA-FILHO, M.C. One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. **Current Opinion in Plant Biology**, New York, v. 6, p. 589-595, 2003.

SOLL, J. Protein import into chloroplasts. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 529-535, 2002.

TEMPLE, S.J.; KUNJIBETTU, S.; ROCHE, D.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Total glutamine synthetase activity during soybean nodule development is controlled at the level of transcription and holoprotein turnover. **Plant Physiology**, Washington, v. 112, p. 1723-1733, 1996.

THEG, S.; BAUERLE, C.; OLSEN, L.; SELMAN, B.; KEEGSTRA, K. Internal ATP is the only energy requirement for the translocation of precursor. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 264, p. 6730-6736, 1989.

TRANEL, P.J.; FROELICH, J.; GOYAL, A.; KEEGSTRA, K. A component of the chloroplastic protein import apparatus is targeted to the outer envelope membrane via a novel pathway. **EMBO Journal**, London, v. 14, p. 2436-2446, 1995.

TRUSCOTT, K.N.; BANDNER, K.; PFANNER, N. Mechanisms of protein import into mitochondria. **Current Biology**, Cambridge, v. 13, p. 326-337, 2003.

WAEGEMANN, K.; PAULSEN, H.; SOLL, J. Translocation of proteins into isolated chloroplasts requires cytosolic factors to obtain import competence. **FEBS Letters**, Cambridge, v. 261, p. 89-92, 1990.

WALKER, D.; CHADDOCK, A.M.; CHADDOCK, J.A.; ROBERTS, L.M.; LORD, J.M.; ROBINSON, C. Ricin A chain fused to a chloroplast-targeting signal is unfolded on the chloroplast surface prior to import across the envelope membranes. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 271, p. 4082-4085, 1996.

WALTER, M.; CHABAN, C.; SCHÜTZE, K.; BATISTIC, O.; WECKERMANN, K.; NÄKE, C.; BLAZEVIC, D.; GREFFEN, C.; SCHUMACHER, K.; OECKING, C.; HARTER, K.; KUDLA, J. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. **The Plant Journal**, New York, v. 40, p. 428-438, 2004.

WEBER, A.P.M.; LINKA, M.; BHATTACHARYA, D. Single, ancient origin of a plastid metabolite translocator family in Plantae from an endomembrane-derived ancestor. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 5, p. 609-612, 2006.

ZAMORE, P.D. RNA interference:listening to the sound of silence. **Nature Structural Biology**, New York, v. 8, n. 9, p. 746-750, 2001.

ZHANG, X.P.; GLASER, E. Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal with the Hsp70 molecular chaperone. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, p. 14-21, 2002.

ZHANG, X.P.; ELOFSSON, A.; ANDREU, D.; GLASER, E. Interaction of mitochondrial presequences with Dnak and mitochondrial Hsp70. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 288, p. 177-190, 1999.

ANEXOS

ANEXO A - Primers utilizados para clonagem dos genes de interesse nos vetores pGBKT7 e pGADT7 para os ensaios de duplo híbrido em levedura

Gene TH1 (At1g22940)

Forward – 5' CAT ATG AAT AGC TTA GGA GGA AT 3'

Reverse – 3' CAA CAT TTT GTA AGC ACC TA 5'

Gene codificador da proteína GluRS (At5g26710)

Construção gênica com remoção do motivo de interação

Forward - 5' GGG ATC CGA AAG GTT AAA CTC CGG TTT GCT 3'

Reverse - 5' CAT GTC GAC TTC TGC ATC TGC TCC CTC 3'

Construção gênica para a varredura com alaninas

Forward - 5' TT GAA TTC GCG GCG GCG GCG GCG GCG AAG GTT AAA CTC
CGG TTT GCT 3'

Reverse - 5' CAT GTC GAC TTC TGC ATC TGC TCC CTC 3'

ANEXO B - Vetores utilizados para o ensaio de duplo-híbrido em levedura

ANEXO C - Primers utilizados para clonagem no vetor de entrada pENTR-D-TOPO e posterior recombinação para os vetores de destino pK7FWG2,0.

Gene TH1 , codificador da proteína HMPPK/TMPPase (At1g22940)

Forward - 5´ - CAC CAT GAA TAG CTT AGG AGG AAT - 3´

Reverse - 5´ - AAT TCC CCT TTT GCT CTC TTT AAG CG - 3´

Gene codificador da proteína GSII (At5g35630)

Forward - 5´ - CAC CAT GGC TCA GAT CTT AGC AGC TT - 3´

Reverse - 5´ - AAC ATT CAA AGA AAG CTT T - 3´

ANEXO D - Vetor de entrada pENTR/D-TOPO e vetores de destino pK7FWG2,0 (usado para transformação estável de *Nicotiana tabacum*) e pK7GWIWG2,0 (usado para silenciamento da GluRS).

ANEXO E - Vetores pSPYNE-35S e pSPYCE-35S utilizados no ensaio de BiFC.

Primers utilizados para clonagem dos genes de interesse nos vetores pSPYNE-35S e pSPYCE-35S.

Gene TH1, codificador da proteína HMPPK/TMPPase (At1g22940)

Forward - 5' - TCT GTC GAC ATG AAT AGC TTA GGA GGA AT - 3'

Reverse - 5' - TCT CCC GGG AAT TCC CCT TTT GCT CTC TT - 3'

Gene codificador da proteína GluRS (At5g26710)

Forward - 5' - TCT ACT AGT ATG GAT GGG ATG AAG CTT TC - 3'

Reverse - 5' - TCT GTC GAC CTT AGC GGC TCT TCC ATC TG - 3'

ANEXO F - Primers utilizados par amplificação da GluRS e clonagem no vetor de silenciamento pK7GWIWG2(I),0.

Gene codificador da proteína GluRS (At5g26710)

Forward - 5'- CAC CAT GGA TGG GAT GAA GCT TTC - 3'

Reverse - 5'- CAT GTC GAC AAG TCC ACT TCA GGC TTA CCT - 3'