**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Identificação e caracterização de componentes da via de transdução
de sinais do peptídeo hormonal RALF**

Celso Spada Fiori

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

**Piracicaba
2010**

Celso Spada Fiori
Engenheiro Agrônomo

**Identificação e caracterização de componentes da via de transdução
de sinais do peptídeo hormonal RALF**

Orientador:
Prof. Dr. **DANIEL SCHERER DE MOURA**

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

Piracicaba
2010

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

Fiori, Celso Spada

Identificação e caracterização de componentes da via de transdução de sinais do
peptídeo hormonal RALF / Celso Spada Fiori. - - Piracicaba, 2010.
110 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Biologia celular 2. Biologia vegetal 3. Cálcio 4. Enzimas - Processamento 5. Hormônios
peptídicos 6. Peptídeos I. Título

CDD 581.1927
F519i

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

**DEDICO AOS MEUS PAIS,
PELO AMOR INCONDICIONAL**

AGRADECIMENTOS

Agradeço enfaticamente o meu orientador, Professor Daniel Scherer de Moura, pelos inúmeros e valiosos ensinamentos científicos, profissionais e pessoais. Hoje estes ensinamentos fazem toda a diferença em minha nova realidade. Agradeço também pela amizade e excelente companhia, seja no trabalho, reuniões, viagens ou nos momentos de descontração. Por fim, agradeço muito por todo incentivo que recebi do seu enorme entusiasmo científico, que sem dúvida me motivou a trabalhar intensamente sem perceber o tempo passar.

Um especial agradecimento ao Professor Marcio de Castro Silva Filho, que não só me acolheu no laboratório como me mostrou pela primeira vez a grandeza e o brilho da ciência. Sempre com a palavra certa na hora certa, me sinto privilegiado de ter convivido por quase 10 anos com o Professor Marcio. Continuará sendo um dos meus maiores exemplos pessoais e profissionais.

Agradeço de coração ao grande amigo, Professor Phellippe Arthur Santos Marbach, com quem tive a honra de ter as primeiras e muitas lições de como se faz ciência. Pelos muitos e inesquecíveis momentos de trabalho e lazer. Agradeço por me mostrar que o mundo é um grande laboratório, e que o trabalho pode ser sério e divertido ao mesmo tempo.

Ao tutor e conselheiro Professor Flávio Cesar de Almeida Tavares, um muito obrigado. Pelos ensinamentos, conselhos e exemplos de vida durante os 5 anos de PET Biotecnologia. Também agradeço pela pronta disponibilização de equipamentos do seu laboratório para extração microssomal.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo importante suporte financeiro indispensável à realização deste trabalho.

Aos queridos colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas de 2001 a 2009, Reinaldo Barata, Sabrina Chabregas, Marcia Ometto, Phellippe Marbach, Carol Morgante, Aninha, Juliana Almeida, Claudio, Camila Borgonovi, Christine Stock, Ane Medeiros, Marcela Scarso, Daniele Bononi, Fabiana Mingossi, Juliana Matos, Ricardo Rodrigues, Luíza Dantas, Marcelo Brandão e Lígia Hansen, por todo aprendizado, amizade e ótimo convívio em tantos momentos.

Ao colega e amigo Marcelo Brandão pela colaboração e ajuda nos trabalhos de filogenia dos peptídeos RALF.

A colega Christine Stock, pela amizade sincera e pelos agradáveis momentos em supermercados, shoppings, bancos, aeroporto, centro e no laboratório, com a qual tive o prazer de aprender muitas coisas, entre elas o Y2H e a língua inglesa.

Um agradecimento muito especial à minha família. Aos meus irmãos Julio, André e Nádia, e aos meus queridos pais Norberto Fiori e Eunice Spada Fiori, por todo amor, e confiança em todos os anos da minha vida.

A querida Sula. Pelo carinho, compreensão e ajuda fundamentais no momento mais difícil desse trabalho.

Ao amigo Rafael Colombi, por toda ajuda e suporte no laboratório, mas principalmente pela ótima companhia em muitos momentos de trabalho durante todos estes anos.

Aos amigos e quase irmãos moradores da Vila Estudantil, em especial ao Big Mec, Don Ruã, Tilacoid, Xiq-10, Marvadeza, Azulão, Frango, Genérico, Sorriso, Duk, Bravo, Misob, Locutor e Madruga, que fizeram estes anos inesquecíveis e muito valiosos na minha memória.

Aos fiéis e eternos amigos de São José dos Campos, especialmente Tiago (primo), Felipe, Pipoca e Sérgio, sempre dispostos a ajudar e a continuar crescendo junto comigo.

A todos os colegas da Dow AgroSciences neste último ano, em especial ao meu chefe Mario Von Zuben pela compreensão e amizade, e ao meu tutor Professor William Silva, pelas sábias e diárias lições de vida.

Ao fiel e incomparável companheiro Matchucão. Como a maior válvula de escape nos momentos difíceis, trazendo sempre a melhor pureza, inocência e alegria incondicional.

Enfim, gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho e para minha formação pessoal e profissional.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Peptídeos hormonais.....	21
2.2 O peptídeo RALF.....	26
2.3 Percepção e transdução de sinais.....	30
2.4 Cálcio e calmodulina na sinalização celular.....	33
2.5 Os estudos de interações proteína-proteína.....	36
2.5.1 O sistema duplo-híbrido de leveduras.....	37
2.5.2 <i>Pull Down</i>	38
2.5.3 Coimunoprecipitação.....	39
2.5.4 Métodos de estudo de interações baseados em fluorescência.....	40
2.6 O processamento de peptídeos hormonais.....	42
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1 Sistema duplo-híbrido de leveduras.....	45
3.2 Confirmação <i>in vitro</i> da interação AtRALF1-CML38.....	46
3.2.1 Coimunoprecipitação.....	46
3.2.2 <i>Pull Down</i>	47
3.3 Confirmação <i>in vivo</i> da interação AtRALF1 - CML38.....	47
3.4 Localização subcelular de CML38.....	48
3.4.1 Transformação de epitélios de cebola por biobalística.....	48
3.4.2 Transformação de folhas de tabaco por agro-infiltração.....	49
3.5 Síntese <i>in vitro</i> de AtRALF1 e extração da fração microsomal de Arabidopsis.....	49
3.6 Reconstrução filogenética.....	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1 Construções gênicas para o sistema duplo híbrido de leveduras.....	51

4.2 Identificação da proteína de interação com AtRALF1.....	51
4.3 Confirmação da interação de AtRALF1 com CML38.....	55
4.3.1 Duplo-híbrido de leveduras.....	55
4.3.2 <i>In vitro</i>	57
4.4 Localização subcelular de CML38.....	58
4.4.1 Localização subcelular de CML38 em epitélio de cebola.....	59
4.4.2 Localização subcelular de CML38 em epiderme de tabaco.....	61
4.5 Teste de interação entre CML38 e AtRALF34.....	62
4.6 Busca por proteínas de interação com AtRALF34 e CML38.....	65
4.7 Estudo do processamento do peptídeo AtRALF1.....	68
4.8 Análise filogenética da família RALF.....	71
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
REFERÊNCIAS.....	87
APÊNDICE.....	105

RESUMO

Identificação e caracterização de componentes da via de transdução de sinais do peptídeo hormonal RALF

As pesquisas com os peptídeos hormonais de plantas se iniciaram na década de noventa com a descoberta da sistemina. Hoje existem diversos peptídeos identificados, e alguns deles já em avançado estágio de caracterização. O envolvimento desta classe de moléculas em diversas funções básicas e específicas da biologia dos vegetais despertou o interesse da comunidade científica. Dentre os peptídeos em fase de caracterização, destacam-se os representantes da família RALF. Os peptídeos RALF estão presentes em basicamente todo o reino vegetal, desde o musgo *Physcomitrella patens* até as plantas superiores mono e dicotiledôneas. A conservação destes peptídeos no reino vegetal sugere um importante papel na fisiologia vegetal, e evidências recentes indicam a participação de RALF em processos básicos do desenvolvimento das plantas. O mecanismo pelo qual o peptídeo RALF atua e é percebido pela célula constitui etapa fundamental para sua caracterização funcional. Para tanto, no presente trabalho foram empregadas técnicas para identificação de proteínas de interação com RALF. Os resultados indicam que este peptídeo possivelmente tem sua atividade regulada pelo íon cálcio, através da interação com uma proteína de ligação a cálcio que, assim como o RALF, é secretada para o apoplasto. Estes dados colocam RALF em um cenário até o momento inédito no mecanismo de ação hormonal em plantas. A exemplo de animais e leveduras, observou-se também que o processamento de RALF ocorre em um sítio dibásico. A mutação de um dos aminoácidos deste sítio foi suficiente para impedir processamento do peptídeo *in vivo* e *in vitro*. A utilização de extratos protéicos da fração microsomal de *Arabidopsis* no ensaio *in vitro* indica que esta atividade é desempenhada por uma protease presente no sistema de endomembranas celular, provavelmente da classe das convertases. Os resultados publicados marcam o início dos estudos de caracterização do processamento de prohormônios em plantas.

Palavras-chave: Peptídeos hormonais; Sinalização celular; Cálcio; Processamento enzimático

ABSTRACT

Identification and characterization of components of the peptide hormone RALF signaling transduction pathway

The peptide hormone research has begun during the 90's decade with the systemin discovery. Nowadays several peptides have already been identified, and some of them are further characterized. The involvement of these molecules with a range of basic and specific biological functions has raised the scientific community's interest. Among the peptides being studied, the RALF family is particularly intriguing. The RALF peptides can be found throughout the plant kingdom, from the moss *Physcomitrella patens* to the mono and dicot plant groups. The conserved occurrence of these peptides along the plant kingdom suggests an important role in the plant physiology field. Recent evidences indicate that RALF plays a role in basic mechanisms of plant development. The RALF mechanism of action and it's perception by the cell are fundamental information in order to characterize this peptide function. In the present work experiments to identify RALF interacting proteins were employed. The results indicate that RALF peptide's activity is possibly regulated by the calcium ion. This regulation is mediated by the interaction with a calcium binding protein. This calcium binding protein was found to be secreted to the apoplast. Presented data suggests that RALF is regulated by a mechanism never described before in the plant hormone research field. As previously described in animals and yeast the RALF propeptide processing takes place in a dibasic site. A single amino acid site specific mutation disrupted peptide processing *in vivo* and *in vitro*. The correct processing is mediated by proteases of the Arabidopsis microsomal fraction. This processing seems to occur at the endomembrane system, possibly catalized by a convertase class enzyme. The published results points the beginning of the peptide processing studies in plants.

Keywords: Peptide hormones; Cell signaling; Calcium; Enzymatic processing

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Esquema da estrutura primária e domínios protéicos de CaM1 (calmodulina 1) e CML 38.....	53
Figura 2-	Interação entre as construções do peptídeo AtRALF1 (At1g02900) com CML38.....	53
Figura 3-	Confirmação da interação de AtRALF1 com CML38 completa no duplo-híbrido de leveduras.....	55
Figura 4-	Confirmação da interação entre AtRALF1 e CML38 pela inversão presa-isca isca –presa.....	56
Figura 5-	Localização subcelular de CML38.....	60
Figura 6-	Localização subcelular de CML38 fusionada a GFP em célula da epiderme de <i>Nicotiana tabacum</i>	61
Figura 7-	Localização subcelular de CML38 fusionada a GFP em célula da epiderme de <i>Nicotiana tabacum</i>	62
Figura 8-	Cladograma da reconstrução filogenética das nove isoformas do gene RALF em <i>Arabidopsis</i> mais próximas ao gene originalmente isolado de tabaco (At1g02900).....	64
Figura 9-	CML38 interage especificamente com AtRALF1 e não com AtRALF34.	65
Figura 10-	Localização subcelular de CML38.....	70
Figura 11-	Árvore filogenética da família RALF.....	72
Figura 12-	Ramo A da árvore filogenética (Figura 11).	74
Figura 13-	Ramos da análise filogenética compostos apenas por sequências de espécies vegetais da família <i>Poaceae</i> (gramíneas).....	76
Figura 14-	Ramo M da árvore filogenética (Figura 11). Este ramo representa o grupo externo utilizado no enraizamento da árvore filogenética de RALF.	76
Figura 15-	Ramo I da análise filogenética (Figura 11) composto apenas por sequências de espécies vegetais da família <i>Poaceae</i> (gramíneas).....	77
Figura 16-	Ramos da análise filogenética majoritariamente compostos por sequências de <i>Arabidopsis thaliana</i>	79
Figura 17-	Ramo F da árvore filogenética (Figura 11).....	79

Figura 18-	Ramo L da árvore filogenética (Figura 11).....	79
Figura 19-	Ramo J da árvore filogenética (Figura 11).....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Número de colônias isoladas no duplo-híbrido de leveduras com as iscas AtRALF35 e CML38.....	61
Tabela 2-	Lista das proteínas identificadas como potenciais interagentes.....	62
Tabela 3-	Espécies, número de isoformas de famílias contempladas na análise filogenética.....	67
Tabela 4-	Lista de famílias contempladas na análise filogenética, número de espécies por família e total de sequências por família.....	69
Tabela 5-	Número de isoformas de RALF das espécies cujo genôma foi completamente sequenciado.....	72

1 INTRODUÇÃO

Os peptídeos hormonais passaram a integrar a biologia vegetal no início da década de noventa e estão envolvidos em processos fisiológicos fundamentais que vão desde a defesa contra herbívoros até a diferenciação celular e desenvolvimento vegetal. Dentre eles, muitos mostram-se direcionados a via secretória, desempenhando funções de sinalização celular e comunicação célula-célula (MOURA; SILVA-FILHO, 2006; MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006).

O mecanismo pelo qual estas moléculas são percebidas pelas células, bem como as modificações celulares subsequentes a esta percepção, são de grande importância para a elucidação das funções desta classe de moléculas no reino vegetal. Até o momento, alguns destes peptídeos foram relacionados a receptores do tipo quinase presentes na superfície celular (BAHYRYCZ; KONOPINSKA, 2007, OGAWA et al., 2008, BLECKMAN et al., 2010), entretanto pouco se conhece sobre a via de sinalização da maioria desta classe de peptídeos.

Dentre os peptídeos hormonais recentemente descobertos, RALF destaca-se como sendo um peptídeo ubíquo, provavelmente associado a importantes mecanismos básicos do desenvolvimento das plantas (PEARCE et al., 2001). Evidências sugerem que RALF desempenha um papel no controle da expansão de tecidos vegetais, no desenvolvimento de pêlos radiculares e alongação do tubo polínico (WU et al., 2007; MINGOSSO et al., 2010; COVEY et al., 2010). A produção do peptídeo ativo de RALF depende de seu processamento. O processamento da proproteína ocorre especificamente em um sítio dibásico, que é bastante conservado em membros desta família. Após a interação com a superfície celular, RALF induz um rápido influxo de cálcio, mostrando que este íon está envolvido na via de sinalização do peptídeo (HARUTA et al., 2008).

O envolvimento de RALF com o íon cálcio, a expressão localizada do peptídeo, e seu processamento sugerem que RALF tem sua atividade especificamente regulada pela célula. A elucidação de etapas destes mecanismos de regulação, seja pelo processamento no interior celular, ou por interações com proteínas do apoplasto, representam informações relevantes para a compreensão de sua natureza funcional nas células vegetais, e foram investigadas neste trabalho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Peptídeos hormonais

Estudos direcionados a elucidação do mecanismo de resposta das plantas contra insetos herbívoros, levou à descoberta do primeiro peptídeo hormonal em plantas, a sistemina. Desde então, diversos outros peptídeos foram descobertos, relacionando esta classe de moléculas a processos celulares que vão da resposta à herbivoria até os mecanismos de auto-incompatibilidade e diferenciação de células meristemáticas (MOURA; SILVA-FILHO, 2006; MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006; RYAN et al., 2002).

As plantas possuem uma variedade de moléculas de defesa, que são produzidas no momento em que são atacadas por insetos herbívoros. Estas moléculas podem ser enzimas, proteínas, pequenas moléculas orgânicas e compostos químicos, e tem a capacidade de tornar o material ingerido menos palatável e nutritivo, bem como dificultar a digestão do inseto pela ação de inibidores de proteases (THALER et al., 1999; BENNETT; WALLSGROVE, 2006). O primeiro componente da cascata de sinalização em resposta a ferimentos é o peptídeo de 18 aminoácidos chamado sistemina, encontrado em solanáceas. O peptídeo é liberado no local do ferimento e é capaz de transmitir um sinal a longa distância, sendo um potente ativador gênico em concentrações extremamente baixas da ordem de fmols/planta (PEARCE et al., 1991).

O peptídeo sistemina marcado radioativamente, quando adicionado ao local do ferimento, pode ser encontrado em seguida no floema do pecíolo, mostrando que este peptídeo apresenta mobilidade no tecido vegetal (NARVÀEZ-VAZQUÈZ; PEARCE; RYAN, 1995). Em plantas não danificadas é possível encontrar a prosistemina, peptídeo de 200 aminoácidos precursor da sistemina, que é processado para dar origem ao peptídeo ativo. A presença da forma precursora existe provavelmente para tornar mais rápida a resposta a um eventual ataque, quando a concentração do peptídeo é aumentada em diversas vezes (McGURL et al., 1992). Mais tarde mostrou-se que a sistemina age nos tecidos vasculares ativando a cascata de sinalização do ácido jasmônico, provocando uma reação sistêmica de defesa na planta (STRATMANN, 2003). Plantas de tomateiro expressando constitutivamente o gene da prosistemina em orientação antisenso se mostraram deficientes na produção de inibidores de protease

do tipo I e II. Estas plantas também tiveram comprometida sua capacidade de se defender do ataque de larvas de *Manduca sexta* (OROZCO-CARDENAS; MCGURL; RYAN, 1993).

Scheer e Ryan (2002), trabalhando com suspensões celulares de *Lycopersicon peruvianum* mostraram que a sistemina de tomate se liga na superfície da célula a um receptor de membrana de 160 kDa, que foi chamado de SR160. Em seguida observou-se que tratava-se do mesmo receptor do hormônio brassinosteróide BRI1. Holton e colaboradores (2007) demonstraram que plantas de tomate mutantes para o receptor BRI1 continuavam a responder a ferimentos como as plantas selvagens, indicando que a percepção deste peptídeo era possivelmente desempenhada por outro receptor. Recentemente outros trabalhos tem reafirmado a capacidade do peptídeo sistemina de interagir com o receptor BRI1, e que esta interação não é suficiente para indução da resposta de defesa vegetal típica deste peptídeo. Especula-se que a interação de BRI1 com sistemina seja um artefato da superexpressão do peptídeo em locais onde ele naturalmente não ocorre (MALINOWSKI et al., 2009, HIND et al., 2010).

Similar a sistemina, glicopeptídeos ricos em hidroxiprolina são os produtos proteolíticos do processamento da proteína precursora chamada preproHypSys (*prepro hydroxyproline-rich systemin-like*) (NARVÀEZ-VAZQUÈZ; PEARCE; RYAN, 2005). As proteínas precursoras de tomate, tabaco e petúnia possuem 146, 165 e 214 aminoácidos respectivamente (PEARCE et al., 2001a; PEARCE et al., 2007; PEARCE; RYAN, 2003). Os peptídeos precursores possuem um domínio GR conservado na porção N-terminal, possivelmente relacionado ao processamento enzimático (PEARCE et al., 2007). A ocorrência de ferimento nas plantas é suficiente para induzir a produção da proteína precursora nas células parenquimais do floema, que em seguida é secretada para a matriz extracelular e possivelmente processada (NARVÀEZ-VAZQUÈZ; PEARCE; RYAN, 2005). Alguns dos resíduos de prolina são convertidos em 4-hidroxiprolina para produção do glicopeptídeo rico em hidroxiprolina maduro (HypSys) (MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006).

Estudos com bioquímica de proteínas mostraram a existência de 3 glicopeptídeos HypSys em tomate, chamados de TomHypSys I, II e III, com 20, 18 e 15 aminoácidos, respectivamente, e de 2 em tabaco (TobHypSys I e II) ambos com 18

aminoácidos (PEARCE et al., 2001a; PEARCE; RYAN, 2003). Os estudos demonstraram que a proteína precursora preproHypSys de tomate tem expressão induzida por ferimento, mas também pelo tratamento com sistemina e metil jasmonato. Os peptídeos TomHypSys, a exemplo da sistemina, transmitem um sinal capaz de induzir a produção de inibidores de protease. Por este motivo assume-se que os peptídeos hormonais sistemina e HypSys são os responsáveis pela sinalização de resposta a ferimento em plantas (NARVÀEZ-VAZQUÈZ; PEARCE; RYAN, 2005).

A taxa de multiplicação de células vegetais presentes em culturas de suspensão é dependente da densidade celular. Quando em densidade celular reduzida a taxa de divisão celular é baixa, porém se esta cultura é transferida a um meio onde originalmente existia uma cultura de alta densidade, a taxa de divisão celular aumenta rapidamente, independente da densidade de células. Este meio de cultura retirado de uma suspensão de alta densidade ficou conhecido como meio condicionado (CM). A suspeita de que alguma molécula produzida pelas células em alta densidade presente no meio seja responsável pela ativação da divisão celular levou os pesquisadores Matsubayashi e Sakagami a estudar este assunto. Os pesquisadores trabalharam com culturas de células em suspensão de aspargo, das quais isolaram dois pequenos polipeptídeos mitogênicos. Estudos estruturais revelaram que ambos os peptídeos eram modificados com a adição de grupamentos sulfato, e por este motivo receberam o nome de fitosulfoquinas alfa e beta (PSK- α e PSK- β). A PSK- β é uma forma truncada do peptídeo e de menor atividade em relação a PSK- α (MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 1996; YANG et al., 1999).

As fitosulfoquinas são produzidas através da modificação pós-traducional sulfatação e do processamento proteolítico das proteínas precursoras com 80 aminoácidos em média. Em arabidopsis cinco genes parálogos às PSKs foram identificados, e são expressos em vários tecidos (MATSUBAYASHI et al., 2006). A PSK se liga especificamente a um receptor kinase de membrana do tipo LRR (*leucine-rich repeat*), denominado PSKR1 (MATSUBAYASHI et al., 2002). Plantas de arabidopsis mutantes ou superexpressando o ortólogo de PSRK1, denominado AtPSRK1, tiveram a longevidade celular e o potencial de crescimento alterados (MATSUBAYASHI et al., 2006).

Estudos indicam que as PSKs tem participação em diferentes processos biológicos vegetais, como a indução da síntese de clorofila em plântulas estioladas ou cultivadas em dias curtos (YAMAKAWA et al., 1998a; YAMAKAWA et al., 1999), indução do crescimento de raízes adventícias (YAMAKAWA et al., 1998b), estímulo a diferenciação de elementos traqueários (MATSUBAYASHI et al., 1999) e embriogênese somática (HANAI et al., 2000). Entretanto, até o momento não se sabe a função específica desta classe de peptídeos no desenvolvimento vegetal.

O meristema apical da parte aérea (*shoot apical meristem* – SAM) é responsável pela manutenção das células que darão origem aos padrões da parte aérea. A zona central do meristema é composta por células não diferenciadas em estado permanente de divisão. Na zona periférica do SAM encontram-se as células em estado de diferenciação que irão formar os tecidos. Ao longo de todo o desenvolvimento da planta, o balanço entre os dois tipos de células deve ser mantido para garantir o suprimento de células e a formação dos padrões. Os genes *clavata* 1, 2 e 3 (CLV1, 2 e 3) foram identificados como prováveis responsáveis pela manutenção e balanço dos diferentes tipos celulares presentes no SAM (CLARK; RUNNING; MEYEROWITZ, 1993; CLARK; RUNNING; MEYEROWITZ, 1995). Plantas mutantes para os genes CLV1 e 3 tem fenótipo idêntico, representado por um meristema apical e floral aumentado, com maior número de células.

Em *arabidopsis*, a diferenciação das células que tem origem no meristema apical é controlada pelo fator transcricional WUSCHEL (WUS). Este fator é produzido pelas células periféricas do meristema e ativa o processo de diferenciação celular (MAYER et al., 1998). O gene CLV3 codifica uma proteína precursora que, após processada, dá origem ao peptídeo ativo CLV3 composto por 12 aminoácidos (KONDO et al., 2006). Este peptídeo é produzido pelas células meristemáticas, e tem a função de controlar negativamente a expressão de WUS nas células centrais, desta forma garantindo a manutenção e o suprimento das células em estado indiferenciado na região central do meristema (FLETCHER et al., 1999).

Um screening de mutantes por inserção de T-DNA e análises moleculares levaram a identificação do receptor do tipo quinase CLV1 e do receptor CLV2. O receptor CLV1 possui um domínio extracelular do tipo LRR (*leucine-rich repeat*), um

domínio transmembrana e um domínio quinase intracelular do tipo serino-treonino quinase. O receptor CLV2 se assemelha ao CLV, com a excessão do domínio quinase intracelular (CLARK; RUNNING; MEYEROWITZ, 1993; JEONG; TROTOCHAUD; CLARK, 1999). Observou-se que em plantas mutantes para os genes CLV1, 2 e 3 o fator transcricional WUS tem expressão aumentada. De modo condizente, plantas superexpressando CLV3 tem a expressão de WUS suprimida em todas as células do meristema, ocasionando uma paralisação do meristema, cujas células da periferia não mais se diferenciam (BRAND et al., 2000; SCHOOFF et al., 2000). Mais recentemente Müller e colaboradores (2008) identificaram o receptor CORYNE (CRN), necessário para a sinalização do peptídeo CLV3. CRN é um receptor de membrana que possui apenas um domínio intracelular serino-treonino quinase. Os autores especulam que os receptores CLV2 e CRN se associem na região transmembrana para formação de um receptor funcional.

O modelo atual sugere que o peptídeo hormonal CLV3, expresso nas células centrais do meristema, interaje com o complexo receptor CLV1 CLV2/CRN para transmitir o sinal que leva a repressão da expressão de WUS (OGAWA et al., 2008). Desta forma o peptídeo CLV3 é responsável pela manutenção do grupo de células indiferenciadas na região central do meristema apical da parte aérea.

O peptídeo *cysteine-rich S-locus protein* ou *S-locus protein 11* (SCR/SP11), quando reconhecido pelo receptor quinase SRK (*S-locus receptor quinase*) é responsável pela rejeição polínica em brássicas. Ambas as proteínas são codificadas por genes presentes no locus S, e são os determinantes masculino e feminino, respectivamente, da auto-incompatibilidade esporofítica. O gene codificador do peptídeo SCR/SP11 é expresso nas anteras, no momento em que os grãos de pólen são produzidos. O receptor SRK é especificamente expresso nas células do tapete do estigma. No momento em que um pólen da própria planta entra em contato com o estigma, o peptídeo que o recobre interaje especificamente com o receptor SRK. Após a interação o receptor tem seu domínio quinase ativado iniciando a cascata de sinalização para rejeição polínica. A resposta celular consiste na degradação de diversas proteínas relacionadas a elongação do tubo polínico. Desta forma a planta é

capaz de reconhecer e rejeitar seu próprio pólen (SCHOPFER; NASRALLAH; NASRALLAH, 1999; TAKAYAMA et al., 2000; NASRALLAH, 2002).

O número de peptídeos hormonais descritos continua crescendo, e estudos indicam que o genoma de *Arabidopsis* contém mais de 1000 genes potencialmente codificadores de pequenos polipeptídeos secretados (LEASE; WALKER, 2006; HANADA et al., 2007). Entre eles estão os peptídeos IDA (*inflorescence deficient in abscission*) relacionado ao processo de abscisão floral (BUTENKO et al., 2009), os peptídeos ROT4/DVL1 (*rotundifolia4/devil1*) de 53 e 51 aminoácidos, respectivamente, associados a proliferação celular (NARITA et al., 2004; WEN; LEASE; WALKER, 2004) e o peptídeo POLARIS (PLS), envolvido na vascularização e expansão longitudinal de células vegetais (TOPPING; LINDSEY, 1997). Estes e outros peptídeos continuam sobre intensa investigação, e a determinação de suas respectivas funções biológicas específicas tem despertado interesse da comunidade científica.

2.2 O peptídeo RALF

O peptídeo RALF foi descoberto em extratos protéicos de folhas de tabaco, caracterizado como potente alcalinizador do meio de suspensão celular. Além da alcalinização do meio de cultivo, os peptídeos RALF induzem rapidamente uma enzima quinase ativada por mitógeno - MAPK (PEARCE et al., 2001a). Scheer e colaboradores (2005) identificaram duas proteínas de membrana que se ligam fortemente ao peptídeo com uma constante de dissociação igual a $0,8 \times 10^{-9}$ M. Esta observação é condizente com interações hormônio-receptor já relatadas em plantas e animais. Peptídeos RALF não induzem a síntese de proteínas de defesa em tomateiro e tabaco a exemplo do efeito dos peptídeos da família da sistemina (PEARCE et al., 2001a, 2001b). Estudos de expressão gênica em álamo mostraram que os genes RALF não são induzidos por conhecidos elicitores da defesa vegetal (HARUTA; CONSTABEL, 2003). Os peptídeos RALF, em ensaios de alcalinização, apresentam comportamento diferente das sisteminas. Todos estes resultados sugerem que os peptídeos RALF não estão envolvidos com defesa vegetal.

Com a intenção de descobrir a função dos peptídeos RALF, plântulas de tomateiro e *Arabidopsis* foram incubadas em presença do peptídeo. O crescimento e o

desenvolvimento das raízes dessas 2 espécies vegetais, foram totalmente inibidos após 48 horas de contato com meio de cultivo contendo 10 μ M de RALF (PEARCE et al., 2001a). Tanto as plântulas de *arabidopsis* quanto as de tomateiro retomaram o crescimento normal das raízes quando colocadas em meio livre do peptídeo. Investigações posteriores dos efeitos dos peptídeos RALF na fisiologia celular sugerem que RALF inibe a divisão e a elongação celular (MOURA; PEARCE; RYAN, 2006).

O isolamento do cDNA de tabaco que codifica o peptídeo RALF mostrou que este é derivado de uma preproteína composta de uma sequência de direcionamento para a via secretória na porção N-terminal, uma região C-terminal altamente conservada que contém o peptídeo ativo, e uma terceira região de baixa conservação localizada entre as duas primeiras (PEARCE et al., 2001a). A análise da estrutura primária do precursor indica que os peptídeos RALF são secretados e processados. Assim como os peptídeos das famílias da sistemina e clavata, os peptídeos RALF possuem resíduos dibásicos conservados imediatamente antes do peptídeo ativo. Tais evidências sugerem o processamento da proproteína por convertases, como ocorre em animais e leveduras, para maturação da porção ativa.

A superexpressão da isoforma At1g02900 gerou plantas de *arabidopsis* com fenótipo semi-anão (MOURA; PEARCE; RYAN, 2006). Plantas de *arabidopsis* superexpressando o gene At1g02900 mutado, de forma a substituir a segunda arginina do sítio dibásico por uma alanina, não apresentaram o mesmo fenótipo semi-anão. Plantas expressando ambas as formas mutada e não mutada de RALF foram analisadas para o acúmulo do peptídeo ativo, que pôde ser identificado apenas nas plantas expressando a forma nativa do gene. Nas plantas expressando a forma mutada observou-se o acúmulo da proproteína, reafirmando que esta mutação no sítio dibásico constitui um impedimento ao correto processamento do peptídeo *in vivo*. Além disso, preproRALF mutado e não mutado foram sintetizados *in vitro* marcados com metionina radioativa, e em seguida incubados com frações microsomais de suspensão celular de *arabidopsis*. Observou-se que apenas a proteína não mutada foi alvo do processamento *in vitro* por proteínas presentes na fração microsomal de *arabidopsis* (MATOS et al., 2008). Os resultados deste trabalho indicam que, como já descrito em animais e

leveduras, sítios dibásicos estão envolvidos no processamento de prohormônios, possivelmente promovido por convertases.

Plantas de tabaco expressando o gene precursor de RALF fusionado a proteína marcadora GFP mostraram que o peptídeo é localizado, primeiramente, no retículo endoplasmático e, posteriormente, na parede celular (ESCOBAR et al., 2003). Em uma tentativa de mapear os genes expressos em raízes de arábida, foi mostrado que o gene que codifica o peptídeo AtRALF1 (locus At1g02900) é expresso nas zonas de alongação e diferenciação celulares e é ausente na zona de divisão (BIRNBAUM et al., 2003).

Embora sua função específica e o mecanismo de ação dos peptídeos RALF sejam ainda desconhecidos, as evidências sugerem o seu envolvimento com funções celulares básicas, tais como divisão e alongação celular.

Em arábida, foi identificada uma família contendo 34 potenciais parálogos ao gene RALF originalmente isolado de tabaco, com níveis variados de identidade na estrutura primária (OLSEN; MUNDY; SKRIVER, 2002). Destes 34 parálogos, nove agrupam-se em um clado de maior identidade ao RALF de tabaco. A análise global da expressão gênica das plantas semi-anãs superexpressando At1g02900, através de microarranjos de alta densidade, revelou alterações em um grupo de genes envolvidos com rearranjo de parede celular (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo, amostras GSM9916 a 9919).

Wu e colaboradores (2007) geraram linhagens transgênicas de *Nicotiana attenuata* com o gene NaRALF (homólogo ao gene RALF de tabaco) 90% silenciado. Nesta espécie foi identificado somente um único gene que codifique o peptídeo RALF, ao contrário do encontrado em arábida, álamo e *Solanum chacoense* (PEARCE et al., 2001b; HARUTA; CONSTABEL 2003; GERMAIN et al., 2005). O silenciamento do gene NaRALF não provocou alterações na parte aérea da planta, porém foi observado um maior crescimento radicular, bem como anormalidades no desenvolvimento dos pêlos radiculares. Segundo os autores, as plantas expressando o gene RALF em orientação anti-senso se mostraram deficientes no processo de acidificação do apoplasto e rizosfera, possivelmente prejudicando o processo de crescimento polarizado dos pêlos radiculares.

O desenvolvimento dos pêlos radiculares, nos tricoblastos, e a elongação do tubo polínico, são os dois exemplos clássicos do crescimento celular polarizado, o chamado *tip growth*. Este tipo de crescimento celular é dependente da exocitose polarizada de vesículas do Golgi em um ponto específico da célula. Em termos gerais, em ambos os casos (pêlos radiculares e tubo polínico) observa-se a formação de um apêndice, que passa por um processo de elongação celular direcionado e regulado (YANG, 1998).

Recentemente Covey e colaboradores (2010) identificaram uma isoforma de RALF em *Solanum lycopersicum* (S/PRALF), cuja expressão é especificamente localizada no pólen. Os autores mostram que a presença de S/PRALF não afeta a hidratação e germinação do pólen, entretanto, quando aplicado de forma exógena em baixas concentrações (10 nM) é capaz de inibir o crescimento do tubo polínico. Esta inibição promovida pelo peptídeo mostrou-se eficiente em tubos polínicos de até 40 a 60 μ M, quando então este passa a ser insensível ao peptídeo. Observou-se também que, com até 15 minutos de exposição, a inibição é reversível, quando o crescimento do tubo polínico é retomado após retirada do peptídeo. Observando o fenótipo obtido pelo silenciamento do gene RALF em *N. Attenuata*, nas quais os pêlos radiculares tinham o crescimento polarizado comprometido (WU et al., 2007), os autores discutem a possível atuação de RALF no controle da elongação celular em pontos específicos, possibilitando o desenvolvimento cilíndrico e direcionado tanto do pêlo radicular quanto do tubo polínico, e assim caracterizando o crescimento polarizado.

Para que ocorra o crescimento polarizado é necessária a formação de um gradiente do íon cálcio, formando um pico de acúmulo do íon no local onde ocorre a elongação (YANG, 1998). Íons cálcio são essenciais para a célula e são utilizados como mensageiros secundários na transdução de sinais (WHITE & BROADLEY, 2003).

A participação do cálcio na transdução de sinais envolvendo peptídeos hormonais foi estudada com a sistemina (BERGEY; RYAN, 1999). O contato da sistemina com a superfície celular provoca um rápido influxo de cálcio, além disso, a abundância deste cátion no local do ferimento torna bastante reduzida a necessidade do peptídeo para ativação e acúmulo de inibidores de proteinase. Do mesmo modo, a utilização de antagonistas do transporte de cálcio foi suficiente para impedir a síntese

de inibidores de protease em resposta a ferimentos (MOYEN et al., 1998; DOMBROWSKI; BERGEY, 2006).

Haruta e colaboradores (2008) desenvolveram um ensaio com plântulas de *arabidopsis* expressando a proteína indicadora de cálcio aequorina, com o intuito de isolar componentes protéicos capazes de induzir alterações na concentração de cálcio intracelular. Dentre as proteínas isoladas, destacou-se o peptídeo AtRALF1, que em concentrações nanomolares levou apenas 40 segundos de tratamento para induzir a concentração de cálcio intracelular ao seu máximo. Utilizando outra abordagem os autores puderam visualizar que a presença de RALF provocava um aumento drástico da concentração de cálcio na superfície das células da raiz, e especulam sobre a provável influência deste elemento na interação do peptídeo com seu receptor em resposta a estresses e/ou para modulação do desenvolvimento vegetal.

Mudanças na concentração de cálcio das células provocam alterações na atividade de enzimas, em estruturas celulares e expressão gênica (WHITE & BROADLEY, 2003). Para que as alterações na concentração de cálcio tenham estes efeitos, as células contam com componentes protéicos que se ligam ao cálcio, como as calmodulinas (CaM) (BOUCHÉ et al., 2005). Estudos recentes com a utilização de antagonistas de calmodulina aplicados de forma exógena, tem mostrado que o impedimento da sinalização de Ca^{2+} -CaM no exterior celular acarreta alterações fisiológicas e morfológicas. A aplicação destes inibidores provocou inicialmente um rápido influxo de cálcio na célula, semelhante ao observado por Haruta e colaboradores (2008) nos trabalhos com AtRALF1. Outras alterações observadas incluem a indução da depolimerização dos filamentos de actina, remodelamento da parede celular e impedimento da extensão do tubo polínico (CHEN et al., 2009).

2.3 Percepção e transdução de sinais

A todo momento os organismos vegetais estão expostos a uma grande diversidade de estímulos. Dentre estes estímulos destacam-se os de origem ambiental e os endógenos, sendo ambos os grupos representados por sinais de natureza química ou física. Ao contrário dos animais, as plantas apresentam caráter sésstil, e por não serem capazes de se movimentar elas tiveram que, durante a evolução, desenvolver

mecanismos para perceber e responder de forma eficiente às diversas variações ambientais, além das pragas e microorganismos patogênicos e benéficos. Atualmente sabe-se que as plantas não só tem estruturas especializadas para perceber uma vasta gama de sinais, como também condições apropriadas para responder a eles de forma bastante específica.

Os estímulos aos quais as plantas estão expostas podem ser bastante diferentes entre si, variando da natureza física, como a luz ou o dano provocado por uma lagarta, até química, representados por hormônios ou moléculas presentes na superfície celular de uma bactéria. Desta forma, componentes vegetais responsáveis por reconhecer estes estímulos tiveram que ser adaptados, tanto em sua estrutura e composição bioquímica, quanto em sua distribuição nos tecidos da planta e localização celular.

As proteínas responsáveis pela percepção e pelos primeiros passos da transdução de um sinal são chamadas de receptores. A grande maioria dos receptores identificados estão dispostos na superfície celular, mas são conhecidos receptores localizados no citosol e em outros compartimentos celulares (TICHTINSKY et al., 2003, CHANG et al., 1993). Os estudos relacionados às vias de percepção de sinais levaram ao conhecimento de três principais classes de receptores de membrana em plantas. Estes receptores podem ser do tipo acoplado a proteínas interagentes de guanina (proteína G heterotrimérica), ligado a canais iônicos ou enzimático.

Os receptores acoplados a proteína G representam um dos mais conservados mecanismos de sinalização presentes na membrana celular, e a proteína G heterotrimérica é um dos componentes principais deste sistema, atuando no interior da célula. O modo de ação desta classe de receptores já vem sendo descrito em animais a certo tempo (VASSILATIS et al., 2003), porém evidências mais recentes tem mostrado a utilização deste mecanismo pelas plantas (ASSMAN, 2010). Imunoensaios demonstraram que frações microsomais e de membrana plasmática apresentam afinidade a guanina (GTP) (MA, 1994), demonstrando a provável existência de ortólogos da proteína G em plantas. O isolamento de cDNAs codificadores de proteínas com similaridade aos componentes da proteína G heterotrimérica confirmaram esta hipótese (WEISS et al., 1994, KIM et al., 1995). Mais recentemente, a identificação de mutantes de arroz e arabidopsis para estas proteínas vem tornando possível um melhor

entendimento do funcionamento desta classe de receptores em plantas (ASSMAN 2002, PERFUS-BARBEOCH; JONES; ASSMANN, 2004).

As proteínas G heterotriméricas são mensageiros secundários compostos de três subunidades: $G\alpha$, $G\beta$ e $G\gamma$. As duas últimas formam o componente indissociável $G\beta\gamma$, que é oligomerizado com a $G\alpha$. Este grupo de três proteínas, na ausência do sinal, permanece ligado ao receptor transmembrana. Na ocorrência do estímulo, o heterotrímero é modificado, e a unidade $G\alpha$ se dissocia e passa a interagir com GTP tornando-se ativa. Nesta conformação, a $G\alpha$ -GTP atua ativando enzimas intracelulares que, através de modificações protéicas, dão continuidade à cascata de sinalização, culminando com a resposta celular específica. Até o momento, este complexo receptor tem sido associado a processos de divisão celular, regulação de canais iônicos e resposta a doenças (ULLAH et al., 2001, ULLAH et al., 2003).

Os receptores ligados a canais iônicos podem estar presentes tanto na membrana plasmática quanto em membranas intracelulares, como a do retículo endoplasmático e tonoplasto. Nesta classe de receptores, o mais conhecido e caracterizado é o responsável pela identificação do mensageiro secundário inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). Este complexo receptor é composto por quatro subunidades. No momento da interação com o sinal, ocorre uma mudança conformacional que resulta na movimentação de duas das quatro subunidades. A redistribuição de cargas das moléculas estabiliza a nova conformação de canal aberto, permitindo a entrada de cálcio no citosol (KRINKE et al., 2007). Alterações nas concentrações de cálcio intracelular são relacionadas a importantes mecanismos de sinalização celular, o que será discutido em maiores detalhes no tópico seguinte.

Os receptores do tipo quinase (RLK) constituem a maior família de receptores do reino vegetal, sendo representados por mais de 400 genes em *Arabidopsis* (SHIU; BLEECKER, 2001). Com seus diversos representantes, esta classe de receptores participa de processos fundamentais de sinalização, controlando a regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal. De modo geral são compostos de um único domínio transmembrana, com um domínio amino-terminal extracelular responsável pela interação com o sinal, e um domínio intracelular quinase na porção carboxi-terminal.

Os receptores quinase do tipo “*Leucine-rich repeat*” (LRR) constituem a maior parte do grupo de receptores do tipo quinase. Nesta subfamília estão os receptores CLAVATA1 (CLV1), controlando a manutenção/diferenciação de células do meristema apical em resposta ao peptídeo hormonal CLAVATA3 (CLV3) (CLARK, 2001), o “*Brassinosteroid-insensitive 1*” (BRI1) responsável pela resposta celular aos hormônios brassinosteróides (LI et al., 2002), e o “*flagellin-sensing 2*” (FLS2), mediador da resposta inata a patógenos bacterianos (GOMEZ-GOMEZ; BOLLER, 2000). Além destes exemplos, merece destaque o receptor quinase do locus S (SRK), capaz de garantir a rejeição polínica no processo de auto-incompatibilidade esporofítica em brássicas, tendo como ligante o peptídeo hormonal SCR/SP11, cujo gene está presente no mesmo locus (TAKASAKI et al., 2000).

Dentre os componentes ligantes destes receptores, merece destaque a classe de moléculas representada pelos peptídeos hormonais. Além do CLV3, SCR/SP11 e FLS2 mencionados anteriormente, existem evidências relacionando os receptores do tipo quinase a outros peptídeos, como a sistemina, fitosulfoquina e o AtPep1 (SCHEER; RYAN, 2002, MATSUBAYASHI et al., 2002, YAMAGUCHI; PEARCE; RYAN, 2006).

A identificação e caracterização de receptores dos diversos sinais vegetais constitui etapa fundamental no entendimento de suas funções e mecanismos de ação. A aplicação de estudos e técnicas de biologia molecular e bioquímica tem resultado em grandes avanços no entendimento dos mecanismos que controlam a expressão gênica e na identificação de componentes das vias de transdução de sinais de muitos organismos. Atualmente os estudos de sinalização contribuem com muitos trabalhos de genética vegetal, promovendo a conexão entre diversos campos do conhecimento da biologia vegetal.

2.4 Cálcio e calmodulina na sinalização celular

O cátion cálcio é um elemento fundamental para basicamente todos os organismos. Em plantas este íon possui uma variedade de funções, que vão desde a função estrutural na parede celular e membranas, como cátion de troca em organelas, até a função de mensageiro secundário intracelular. O termo mensageiro secundário é frequentemente empregado para descrever moléculas de rápida difusão no citosol, com

capacidade de promover uma resposta expressiva a estímulos do meio extracelular envolvendo a modificação de enzimas e outros componentes citosólicos. Para tanto, sua concentração no citosol deve ser mantida bastante inferior a concentração presente na parede celular e outros compartimentos celulares, como vacúolo e retículo endoplasmático.

A concentração de cálcio no citosol mostra-se bastante variável, e o aumento de sua concentração é associado a processos iniciais de diversas respostas celulares. Entre elas podemos destacar o fechamento estomático promovido pelas células guarda, a reorientação do crescimento do tubo polínico e o enrijecimento da parede celular de plântulas em resposta ao vento (RUDD; FRANKLIN-TONG, 1999). Este sistema de sinalização deve ser preservado pela célula, para tanto, existem componentes específicos responsáveis pela manutenção das baixas concentrações de cálcio no interior da célula. A remoção de cálcio do citosol para o apoplasto ou organelas ocorre contra o gradiente eletroquímico, necessitando de gasto energético para ocorrer. Este transporte de cálcio é catalizado pelas Ca^{2+} -ATPases e pelos $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -*antiporters*. Esta atividade faz com que as respectivas enzimas tenham funções indiretas cruciais para a célula. Com a manutenção da baixa concentração de cálcio citosólico, as enzimas garantem que a célula permaneça em estado não estimulado, além de abastecer os locais de armazenamento de cálcio, tornando a célula apta a responder rapidamente a um estímulo.

A universalidade da utilização de cálcio como mensageiro secundário nos seres vivos demonstra a importância deste íon, e mostra quão importante deve ser o entendimento de como a simples variação da concentração citosólica pode ser específica a uma série de respostas distintas. Um exemplo interessante é demonstrado pela ação das células guarda controlando abertura e fechamento estomático em resposta aos hormônios ácido abscísico e auxina. Estes dois hormônios são responsáveis por respostas opostas do comportamento estomático, porém ambos utilizam do aumento na concentração de cálcio intracelular para indução das respectivas respostas de abertura ou fechamento dos estômatos (McAINSH; BROWNLEE; HETHERINGTON, 1990; IRVING; GEHRING; PARISH, 1992). Especula-se que cada estímulo que utiliza este mensageiro secundário seja responsável pela

indução de uma concentração específica de cálcio, referida como “assinatura de cálcio”, capaz de regular de forma precisa a ativação de enzimas e proteínas celulares (McAINSH; HETHERINGTON 1998; RINCON-ZACHARY et al., 2010; KUDLA; BATISTIC; HASHIMOTO, 2010). Corroborando essa hipótese, atualmente são conhecidas pelo menos três classes de proteínas de ligação a cálcio, chamadas de sensores de cálcio. Estas proteínas pertencem a classe das calmodulinas (CaM), das calcineurinas tipo B (CBL) e das proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs) (KUDLA; BATISTIC; HASHIMOTO, 2010).

A determinação da sequência genômica de diversos organismos tem tornado possível a identificação de numerosas famílias de proteínas de ligação a cálcio. A análise do genoma de *Arabidopsis thaliana* permitiu a identificação de cerca de 250 proteínas com pelo menos um domínio de ligação a cálcio (*EF-hands*) (DAY et al., 2002). Sete destes genes foram identificados como codificadores de isoformas de calmodulinas (CaMs), com 97 a 99% de identidade de aminoácidos umas com as outras. Estas proteínas são chamadas de “calmodulinas verdadeiras” devido a sua alta similaridade com calmodulinas anteriormente identificadas em vertebrados e insetos. Além das CaMs, as plantas possuem diversas proteínas de ligação a cálcio com certa similaridade as CaMs, estas são chamadas de *calmodulin-like proteins* (CMLs). As CMLs podem apresentar de 2 a 6 *EF-hands*, e cerca de 15% de identidade com as CaMs (McCORMACK; BRAAM, 2003). É possível encontrar 50 CMLs no genoma de *arabidopsis* que reúnem estas características e, com a evolução do sequenciamento de genomas vegetais, observa-se que esta variedade é presente em todo reino vegetal (McCORMACK; TSAI; BRAAM, 2005).

A capacidade do peptídeo AtRALF1 de induzir um rápido e intenso influxo de cálcio corrobora a hipótese de que este peptídeo possui típica atividade de um sinal. No presente trabalho identificou-se a possível interação de RALF com uma proteína do tipo *calmodulin-like*. Experimentos determinaram que, assim como RALF, esta proteína é secretada, localizando-se majoritariamente no apoplasto. Os estudos também apontam uma especificidade de interação desta *calmodulin-like* com uma isoforma da família RALF de *arabidopsis*. Estes e outros resultados são discutidos a seguir. As informações obtidas no decorrer deste trabalho vem contribuindo significativamente para a

elucidação do mecanismo pelo qual esta classe de peptídeos desempenha sua atividade, bem como auxiliando no entendimento de sua função específica em plantas.

2.5 O estudo das interações proteína-proteína

As interações entre proteínas são a base para grande parte dos processos biológicos dos seres vivos. A ocorrência destes eventos são fundamentais à manutenção da vida dos organismos mais primitivos até os mais evoluídos existentes no planeta. Dentre os inúmeros processos celulares para os quais as interações entre proteínas são fundamentais, destacam-se os mecanismos de percepção e transdução de sinais, síntese, transporte e degradação de metabólitos e proteínas, defesa, desenvolvimento e diferenciação.

Conforme mencionado anteriormente, o processo de desenvolvimento vegetal é mediado pela ação de hormônios e peptídeos hormonais. A percepção e reconhecimento destas moléculas se dá devido a interação com receptores específicos. A resposta celular é ativada por uma cascata de sinalização toda baseada em sucessivas interações e modificações de proteínas (SANTNER; ESTELLE, 2009). A defesa vegetal é possível devido a capacidade das células de reconhecer estímulos químicos que, através de interações entre proteínas, levam à ativação e/ou silenciamento gênico e resposta (BOLLER; HE, 2009). O transporte de proteínas para dentro das organelas celulares ocorre pelo reconhecimento da respectiva sequência de direcionamento pelos componentes da maquinaria de translocação (AGNE; KESSLER, 2009; STRITTMATTER; SOLL; BÖLTER, 2010). Do mesmo modo, as proteases são capazes de reconhecer seus alvos de degradação e sítios específicos de clivagem através da interação com o domínio de reconhecimento (BARKAN et al., 2010).

O estudo dos mecanismos de interação proteína-proteína é muito importante para a compreensão dos mais variados processos celulares. Atualmente existem diversos métodos desenvolvidos para a identificação e caracterização dos eventos de interação entre proteínas. Alguns destes métodos serão discutidos a seguir.

2.5.1 O sistema duplo-híbrido de leveduras

Field e Songs (1989), observando a maquinaria de ativação gênica, criaram o sistema duplo-híbrido de leveduras (Y2H). Os autores utilizaram o sistema GAL4 de ativação de genes do metabolismo da lactose em *Saccharomyces cerevisiae* para criar um sistema quimérico com a utilização de genes repórteres.

A separação dos dois domínios funcionais do fator transcricional GAL4, o domínio de ligação ao DNA (N-terminal) e o domínio de ativação da polimerase (C-terminal), tornou possível a obtenção das duas proteínas quiméricas, chamadas de “isca” e “presa”, respectivamente. A proteína isca consiste de uma proteína X qualquer fusionada ao domínio GAL4 de ligação ao DNA, e a proteína presa é uma proteína Y fusionada ao domínio GAL4 de ativação da polimerase. Expressas ao mesmo tempo em células de levedura, uma vez que as proteínas X e Y mostrem interação, o fator transcricional GAL4 é reconstituído, e condiciona a ativação específica do gene repórter, que por sua vez tem a expressão controlada pelo promotor GAL4.

Hoje existe no mercado à disposição dos pesquisadores bibliotecas gênicas, onde uma população representativa de cDNAs é clonada em vetores otimizados para o sistema Y2H, fusionados ao domínio de ativação da polimerase GAL4. Estes são os vetores que codificam as proteínas “presas”. Uma vez que se tem um gene de interesse fusionado ao domínio GAL4 de ligação ao DNA (proteína “isca”), é possível fazer uma transformação de levedura em larga escala para identificação de eventos de interação com a proteína de interesse. Esta metodologia foi empregada no presente trabalho, e será discutida em maiores detalhes em itens subsequentes.

O sistema duplo-híbrido de leveduras é passível da ocorrência de artefatos. Os cDNAs clonados nos vetores “presa” são oriundos de bibliotecas de EST, e por este motivo muitas vezes representam segmentos dos genes, que clonados em fase de leitura incorreta podem codificar a produção de proteínas truncadas e/ou inexistentes. Estas proteínas podem eventualmente interagir de forma inespecífica com as proteínas em estudo. Além disso, este sistema condiciona o direcionamento das proteínas para o núcleo da célula de levedura, onde deve ocorrer a interação seguida de ativação gênica, portanto colocando as proteínas em condições diferentes àquelas em que

naturalmente ocorrem. Estas e outras questões podem eventualmente levar a ocorrência de artefatos.

O Y2H vem sendo bastante utilizado em pesquisas com muitos organismos para a identificação de prováveis eventos de interação com uma ou mais proteínas de interesse, bem como para validar supostas interações. Uma vez identificados estes possíveis eventos de interação, é necessário confirmar se são genuínos. Para isso existem outros métodos específicos que testam a interação entre duas proteínas conhecidas.

A inversão “isca-presa” no Y2H é apontada como um método adicional de confirmação de uma interação genuína. Conhecendo-se ambas as proteínas, é possível inverter as posições através da troca de vetores. Ou seja, a proteína que antes era fusionada ao domínio de ligação ao DNA (isca) passa a ser fusionada ao domínio de ativação da polimerase (presa), e vice-versa. A ocorrência de interação após esta inversão é frequentemente associada a eventos genuínos (MACKAY et al., 2007).

2.5.2 Pull Down

O sistema *Pull Down* permite testar *in vitro* a ocorrência de interação entre duas ou mais proteínas. Este método permite a confirmação da interação entre duas proteínas conhecidas ou também a busca por novas proteínas que mostrem interação com uma determinada isca.

No primeiro caso, ambas as proteínas são produzidas em sistema heterólogo, e uma delas fusionada a um *tag*. Este *tag* geralmente é uma cauda de histidina ou a proteína glutatona S-transferase (GST), entre outros. A fusão com *tags* específicos permite a imobilização da proteína de interesse, ou proteína isca, em resinas comerciais. Hoje no mercado existem diversas resinas e *beads* de agarose imobilizadas com a proteína glutatona ou com anticorpos específicos, e também a resina de níquel para interação com a cauda de histidina. Após imobilizada a proteína isca na resina, procede-se a incubação com a adição da proteína presa, seguida por sucessivas lavagens. A confirmação da interação entre as proteínas em estudo é feita pela eluição das proteínas da resina e observação em SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). A presença de ambas as proteínas após as

lavagens e eluição mostra que as proteínas permaneceram interagindo durante o processo.

O sistema do *Pull Down* também permite a busca em um extrato total por proteínas de interação com a proteína isca. Neste segundo caso, assim como no primeiro, a proteína isca fusionada ao *tag* é imobilizada na resina. Em seguida o extrato bruto total é adicionado ao sistema, que passa por um período de incubação em condições específicas. Do mesmo modo, sucessivas lavagens eliminam todos os componente protéicos presentes no sistema, com exceção da proteína isca imobilizada na resina e de eventuais proteínas que interajam com ela. Após a eluição as proteínas são analisadas em SDS-PAGE, e as eventuais proteínas interagentes podem ser isoladas e identificadas com a ajuda de outros métodos, como a espectrometria de massa e sequenciamento de fragmentos tripticos.

2.5.3 Coimunoprecipitação

A conformação molecular nativa das proteínas e componentes celulares presentes no ambiente original são frequentemente necessárias para que ocorra a interação entre proteínas. O método da coimunoprecipitação (CoIP) se assemelha ao *Pull Down*, com a diferença de geralmente utilizar um sistema homólogo de produção das proteínas de interesse, e de proceder a incubação com a presença de componentes do extrato bruto preparado sob condições não desnaturantes.

Neste sistema as proteínas podem ser produzidas através de expressão transiente em células do próprio organismo, ou in vitro em extratos totais de organismos da mesma ordem taxonômica (ex. *TNT Coupled Wheat Germ Extract System*. Promega). Após a incubação, um anticorpo específico é adicionado ao sistema formando um novo complexo de interação. Este complexo é então imobilizado pela adição de *beads* associados a proteína A ou G. As proteínas que não estejam participando deste complexo de interação são eliminadas após sucessivas precipitações e lavagens. Assim como no método anterior, o produto dessa reação é eluído sob condições desnaturantes e analisado em SDS-PAGE seguido por *Western blotting* com anticorpos específicos.

2.5.4 Métodos de estudo de interações baseado em fluorescência

A importância do estudo das interações proteína-proteína gerou uma demanda na comunidade científica por novos métodos para confirmação de possíveis interações. Os métodos até pouco tempo disponíveis ofereciam sistemas heterólogos (Y2H) e/ou *in vitro* (*Pull Down*, ColP) para testar interações, e por este motivo, apesar de serem bastante informativos, traziam consigo as dúvidas e limitações de um procedimento “artificial”.

Recentemente foram desenvolvidos novos métodos não invasivos para o estudo *in vivo* das interações proteína-proteína com o auxílio das proteínas fluorescentes (FPs) (HU; CHINENOV; KERPPOLA, 2002; HU; KERPPOLA, 2003). Os métodos de estudo de interações com a utilização de FPs, além de permitirem a confirmação *in vivo* e não invasiva, permitem observação da localização celular e da dinâmica das interações em tempo real, agregando dados importantes aos estudos (KERPPOLA, 2006; MACKAY et al., 2007; CIRUELA, 2008). Os métodos que utilizam a fluorescência se apoiam basicamente na capacidade de transferência de energia por ressonância (RET) entre as moléculas fluorescentes (FRET), e na complementação molecular de fragmentos destas proteínas (BIFC) (KERPPOLA, 2006a).

O princípio básico do método FRET consiste na transferência de energia entre uma proteína fluorescente (fluoróforo doador) em estado excitado a uma proteína fluorescente aceptora. O alcance da energia emitida pelo fluoróforo em estado excitado é limitado, portanto a molécula aceptora deve estar bastante próxima para receber a energia liberada (HINK; BISSELIN; VISSER, 2002). Neste contexto, a disponibilidade de diversas proteínas fluorescentes amplia as possibilidades de utilização do sistema FRET. Uma vez que existe uma sobreposição entre os espectros de emissão de uma FP e o de excitação de outra, é possível utilizá-las em conjunto. Em outras palavras, uma proteína fluorescente X, quando excitada com laser específico, passa a emitir luz, que por sua vez coincide com o comprimento de onda específico para excitação de uma proteína fluorescente Y. Deste modo pode-se testar a interação entre duas proteínas de interesse que encontram-se fusionadas respectivamente às FPs X e Y.

Na biologia vegetal, o método em questão consiste na coexpressão em células vegetais, transiente ou estável, de duas proteínas de interesse fusionadas a diferentes

FPs. O tecido é observado em microscópio equipado com lasers específicos, utilizando-se a emissão de um comprimento de onda determinado para excitação de uma das FPs. A confirmação da interação pode ser feita por diversos métodos, de acordo com a capacidade do equipamento, mas a simples detecção de emissão pela molécula aceptora em filtro específico é prova suficiente da proximidade de ambas FPs e, portanto, da interação entre as proteínas de interesse (DIXIT; CYR; GILROY, 2006). Em relação aos demais métodos, o FRET possui a vantagem de permitir a observação da dinâmica da interação, uma vez que as FPs não participam e não interferem no processo de interação entre as proteínas de interesse (KERPOLLA, 2006b).

A complementação fluorescente bimolecular (BiFC) consiste na emissão de um sinal fluorescente após união de dois fragmentos não fluorescentes, e se baseia na possibilidade de separação e reconstituição de uma proteína, no caso uma FP (HU; CHINENOV; KERPPOLA, 2002). Neste método dois genes de interesse X e Y são clonados na mesma fase de leitura das duas metades de uma FP, respectivamente. Uma vez que estas proteínas interajam, as duas metades da FP se ligam reconstituindo a proteína fluorescente original (HU; CHINENOV; KERPPOLA, 2002; KERPPOLA, 2006b, OHAD; SHICHRUR; YALOVSKY, 2007). A observação de fluorescência, com o auxílio de equipamento apropriado, indica interação entre as proteínas X e Y. (BRACHA-DORI et al., 2004).

A utilização de proteínas fluorescentes para estudo de interações proteína-proteína trouxe novas possibilidades experimentais, e atualmente diferentes adaptações e modificações da técnica vem surgindo. Entre as novidades, a utilização de diferentes FPs e a possibilidade de utilizar mais de uma FP ao mesmo tempo em um experimento, o chamado *multicolor* BiFC, tem destaque (JACH et al., 2006; LEE et al., 2008). Mais recentemente, o emprego conjunto dos métodos BiFC e FRET se mostrou útil para a observação de multiplas interações e complexos ternários (KWAAITAAL et al., 2010).

2.6 O processamento de peptídeos hormonais

Os peptídeos hormonais tem funções de sinalização em animais, leveduras e plantas, nos quais participam de funções biológicas cruciais que vão da defesa ao desenvolvimento e diferenciação (NIAL, 1982; BENDER; SPRAGUE, 1986; MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006). Além da capacidade de transmitir um sinal, estas moléculas possuem outras similaridades nos respectivos organismos. Os peptídeos hormonais são tipicamente produzidos na forma de proteínas precursoras, que por sua vez são especificamente clivados para liberação da porção ativa com função sinalizadora (CANAFF; BENNETT; HENDY, 1999).

Em animais e leveduras os pró-hormônios são processados por enzimas do tipo serino-proteases da família das subtilisinas. Entre elas destacam-se as kexinas, furinas e outras convertases do tipo PC2, PC1/PC3, PC4, PACE4, PC5/6 e PC7, responsáveis pelo reconhecimento e clivagem dos pró-peptídeos em sítios dibásicos específicos (SEIDAH; CHRETIEN, 1999; ROCKWELL et al, 2002). Em plantas, inicialmente, observou-se a atividade de processamento típica das kexinas ao expressar toxina fúngica KP6 em células de tabaco. Os autores observaram que a proteína isolada de folhas de tabaco expressando o gene da KP6 de *Ustilago maydis* apresentava o mesmo padrão de processamento da proteína extraída do fungo. Este resultado indicou a provável existência de convertases do tipo subtilisina em plantas (KINAL et al., 1995).

Rautengarten e colaboradores observaram que o número de genes codificadores de enzimas do tipo subtilase em plantas supera o equivalente em mamíferos. Em *Arabidopsis thaliana* foram identificados 56 genes codificadores de proteínas do tipo subtilisinas. A identificação foi feita *in silico* utilizando como base as subtilases já caracterizadas de arabidopsis, observando a presença da típica tríade catalítica composta pelos aminoácidos aspartato, histidina e serina (RAUTENGARTEN et al., 2005). Os autores demonstram que as subtilisinas de arabidopsis são distribuídas em 6 subfamílias, de acordo com sua similaridade entre as sequências completas e também quando analisado somente o domínio peptidase S8.

Apesar do grande número de genes codificadores de subtilases em arabidopsis, pouco se conhece sobre a função desta classe de enzimas em plantas. Recentemente alguns trabalhos tem demonstrado que, semelhante as subtilases de animais e

leveduras, estas enzimas em plantas utilizam um sítio dibásico como local específico de processamento, bem como são fundamentais para o processamento de peptídeos precursores.

Srivastava e colaboradores (2008), de modo quase concomitante ao estudo do processamento de AtRALF1 descrito neste trabalho, determinaram o mecanismo de processamento do peptídeo AtPSK4 da família das PSKs (*Phytosulfokines*) em arabidopsis. Analisando plantas transgênicas expressando uma forma quimérica do gene da AtPSK4 fusionado ao epitopo *c-myc*, perceberam que a indução do processamento ocorre quando explantes de raízes são colocados em meio de cultura. Os autores também identificaram que este processamento é dependente de AtSBT1.1, uma serino-protease da família das subtilisinas, que coincidentemente tem sua expressão gênica aumentada nos tecidos dispostos em meio de cultura.

Em outro trabalho, os mesmos autores obtiveram plantas de arabidopsis superexpressando a isoforma AtRALF23, as quais apresentaram fenótipo semi-anão, bem como impediram a típica elongação do hipocótilo induzida por brasinolídeos. Esta isoforma nativa também foi expressa em plantas de arabidopsis mutantes para a subtilase AtS1P (*site-1 protease*), não gerando o fenótipo esperado de superexpressão. Quando uma forma mutada do peptídeo, com o sítio de reconhecimento de AtS1P (RRIL) alterado (RR – GG), foi expressa em plantas selvagens de arabidopsis, a proteína precursora não foi clivada, não gerando o fenótipo semi-anão típico da superexpressão de RALF (SRIVASTAVA et al., 2009). Com estes resultados os autores mostram que o processamento de AtRALF23 ocorre em um sítio dibásico específico, e é promovido pela protease AtS1P.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Sistema duplo-híbrido de leveduras

O sistema duplo híbrido de leveduras detecta proteínas que interagem com uma proteína específica de interesse (proteína isca), através da dupla transformação de células de levedura com duas construções gênicas distintas: uma representada pela fusão do gene de interesse com um domínio de ligação ao DNA (BD), e outra pela fusão de uma biblioteca de cDNA com um domínio de ativação de um gene repórter (AD). As duas proteínas quiméricas, uma vez expressas e interagindo na levedura, reconstituem o fator transcricional, ativando a expressão de genes repórteres, possibilitando assim a identificação da colônia em meio seletivo.

A transformação e crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* foram feitos conforme descrito por Gietz e Woods (2002) e Spillane e colaboradores (2000). A seleção de clones positivos no duplo-híbrido foi feita com o sistema “Matchmaker Two-Hybrid System 3” (Clontech Laboratories). O cDNA completo dos genes At1g02900 e At5g67070, duas construções parciais dos mesmos genes representadas pelo propeptídeo (aminoácidos 27 a 120 para At1g02900 e 24 a 129 para At5g67070) e somente o peptídeo ativo (aminoácidos 72 a 120 para At1g02900 e 78 a 129 para At5g67070) serviram de isca. Além dos genes RALF, foi também clonado no vetor da isca o gene At1g76650 referente a *calmodulin-like 38* (CML38). Os fragmentos de DNA codificadores das proteínas descritas acima foram clonados no vetor pGBKT7 nos sítios *NdeI* e *BamHI*. Os iniciadores específicos (02BamR: TTGGGATCC GTCTAACTCCTGCAACGAGCAAT, PrePro02F: ATACATATGGGCTTCGCCAACG ACCTCGGTGGTGTA, PreRalf02F: ACCATGGACAAGTCCTTTACTCTGTT, RalfAtivo02F: GGGCATATGATATTGGCGACCACAAAATACAT para a isoforma AT1G02900, e 67BamR: TTAGGATCCCTTCATCTATCTCCGGCA, PrePro67F: CTACCATGGCAGCTTCGTCTCTCAAT, PreRalf67F: GCCATATGTCTCTTTC CGATAATCCATCT, RalfAtivo67F: CGCCATGGGTATTACATATCGTACGG TGCATT para a isoforma At5g67070, e CMLY2HFwd: CCGCATATGAAGAATAATACTCAACC, CMLY2HRev: CTGGATCCGCGCATCATAAGAGCAAAC para o gene At1g76650), contendo os sítios de restrição destas enzimas, e DNA genômico de *Arabidopsis thaliana* foram utilizados em reações padrão de PCR para a obtenção dos fragmentos

clonados. Todas as construções foram sequenciadas para confirmação das fusões e da integridade da sequência original. A biblioteca de duplo-híbrido CD4-10, feita a partir de mRNA extraído de toda a planta e transcrito reversamente com iniciadores aleatórios, foi utilizada como fonte de potenciais proteínas interagentes. Esta biblioteca foi adquirida junto ao TAIR (www.arabidopsis.org). Clones positivos para a ativação dos genes repórteres foram isolados e sequenciados.

A biblioteca utilizada é construída através da clonagem de fragmentos de um *pool* de mRNA de Arabidopsis, tornando possível a inserção de sequências em fase de leitura incorreta, levando à produção de proteínas truncadas e/ou inexistentes pelas leveduras. Por este motivo, ao invés de submeter diretamente a sequência de DNA obtida no sequenciamento aos bancos de dados de identificação, faz-se a tradução *in silico* do clone obtido e utiliza-se esta sequência protéica nos bancos de dados de proteínas para obter a identificação. Proteínas interagentes do tipo *Polycomb* foram utilizadas como controle positivo (CHANVIVATTANA et al., 2004).

3.2 Confirmação *in vitro* da interação AtRALF1 – CML38

3.2.1 Coimunoprecipitação

Para confirmação da interação de RALF com a proteína isolada (CML38) pelo método da coimunoprecipitação de proteínas marcadas radioativamente, procedeu-se da seguinte forma: ambas as proteínas foram produzidas *in vitro* com o utilização do Kit TNT Coupled Wheat Germ Extract (Promega), possuindo as metioninas marcadas com enxofre radioativo (^{35}S). Para síntese *in vitro* das proteínas marcadas, foram utilizadas as mesmas construções gênicas do duplo-híbrido de leveduras, já que no sistema *in vitro* elas são produzidas fusionadas ao epitopo *c-myc* utilizado na imunoprecipitação.

As proteínas foram incubadas em tampão PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,4 mM KH_2PO_4) por uma hora sob leve agitação a 25°C. Foi adicionado 50 μL do conjugado Anti-*c-myc*-agarose (Sigma) seguido de nova incubação por mais uma hora sob as mesmas condições. Em seguida as reações foram submetidas a leve centrifugação descartando-se o sobrenadante e acrescentando 1 ml do tampão PBS. Este processo foi repetido por 5 vezes. Por fim, o precipitado foi ressuspendido em tampão de carregamento e submetido a separação por eletroforese

(SDS-PAGE). O gel de poliacrilamida foi seco e colocado em contato com o filme Kodak (*Scientific Imagin Film, X-OMAT*) por 2 a 7 dias, quando o filme foi revelado para observação do resultado.

3.2.2 Pull Down

Para confirmação *in vitro* da interação pelo método de *Pull Down*, ambas as proteínas são sintetizadas em sistema heterólogo de bactérias. As regiões codificadoras dos genes At1g76650 e At1g02900 foram clonadas no vetor pDEST15 e pDEST24 (*Gateway technology*, Invitrogen®) *in-frame* com o gene codificador da proteína GST e sob expressão do promotor T7. Para produção das proteínas *in-vitro*, as estirpes de *E. coli* *Roseta* e *BL21 Codon Plus* foram transformadas com as construções acima. As bactérias foram cultivadas em meio LB suplementado com 100 mg/L de ampicilina e cultivadas sob agitação até atingirem a OD₆₀₀ 0,6. Em seguida procedeu-se a indução da expressão dos genes de interesse com 10 mM de IPTG, levando novamente as culturas a agitação por mais 4 horas. Após este período, as células foram precipitadas por centrifugação e os precipitados congelados.

Para avaliação inicial da produção das proteínas, 1 ml de cada cultura é precipitado em tubo eppendorf de 1,5 ml e ressuspendido em tampão de corrida. As amostras são fervidas em banho maria por 10 minutos e aplicadas em SDS-PAGE.

3.3 Confirmação *in vivo* da interação AtRALF1 – CML38

Os genes At1g02900 e At1g76650 foram amplificados por PCR com iniciadores específicos (02BiFCFwd: TCTGGATCCATGGACAAGTCCTTTACTCTGTTC, 02BiFCRev: TGTGGATCCACTCCTGCAACGAGCAATTTT para At1g02900 e CMLBiFCFwd: CCGGATCCATGAAGAATAATACTCAACC, CMLBiFCRev: CTGGATCCGCGCATCATAAGAGCAAAC para At1g76650) e clonados nos vetores *pSpyne* e *pSpyce* no sítio de *Bam*HI, fusionados *in frame* com as metades codificadoras das porções amino e carboxi-terminal da YFP, respectivamente. Estas construções gênicas foram utilizadas para transformação de *Agrobacterium* por eletroporação.

Folhas de *N. tabacum* e *N. benthamiana* com 4 a 5 semanas são infiltradas com as soluções bacterianas contendo ambas as construções gênicas, e adicionalmente

com um clone codificador da proteína viral P19, responsável por impedir o mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional da célula vegetal. Os tecidos vegetais foram observados em microscópio confocal FV1000 Olympus® de 2 a 5 dias após a infiltração.

3.4 Localização subcelular de CML38

3.4.1 Transformação de epitélios de cebola por biobalística

Para observação da localização subcelular da proteína interagente, o gene da CML38 foi clonado nos sítios *Bam*HI e *Eco*RI do vetor pCAMBIA 1301 fusionado ao gene da GFP sob a regulação do promotor 35S. Os primers utilizados para esta clonagem foram: CML38Fwd: CCGGATCCATGAAGAATAATACTCAACC e CML38Rev: CTGAATTCGCGCATCATAAGAGCAAAC.

Para testar se CML38 é secretada via retículo endoplasmático, foi utilizada a construção *mgfp4-ER* cedida pelo Dr. Jim Haseloff (*Department of Plant Sciences, University of Cambridge*). Nesta construção o gene At1g76650 (CML38) foi clonado fusionado à GFP nos sítios *Xho*I e *Bam*HI, de modo a excluir o peptídeo sinal presente no vetor, porém conservando o sinal de retenção do retículo (HDEL) na porção carboxi-terminal da GFP. Os primers utilizados para esta clonagem foram CML HDEL Fwd: CCCTCGAGCCATGAAGAATAATACTCAACC e CML HDEL Rev: CTGGATCCGCGCATCATAAGAGCAAAC.

Epitélios de cebola foram transformados com as construções acima por bombardeamento de micropartículas de tungstênio (1 µm) recobertas com os plasmídeos. Cerca de 50 mg de micropartículas e 100 µl de espermidina 0,05 M foram agitadas em vortex por 5 minutos e em seguida sonicadas por 10 segundos em sonicador 50D (VWR International®) para desfazer agregados. De um a cinco microgramas dos plasmídios foram adicionados junto a 100 µl de solução 1 M CaCl₂, e novamente agitadas em vortex por 10 segundos. As partículas recobertas com DNA são então precipitadas por breve centrifugação (15 segundos a 14.000 rpm) e lavadas três vezes com 100 µl de etanol absoluto. Após a última lavagem, as partículas são ressuspensas em 25 µl de etanol e distribuídas nas membranas carreadoras (5 µl por membrana).

Para aceleração das partículas, utilizou-se o bombardeador PDS1000/He (*Particle Delivery System*. Bio-Rad®) com pressão de gás hélio de 1100 psi, dispondo os explantes 5 cm distantes da tela de retenção. A observação foi feita em microscópio confocal LSM 510 Meta (*Carl Zeiss*®) de 14 a 36 horas após a transformação.

Para observação da GFP no apoplasto foi feita uma incubação dos epitélios por cerca de 4 horas com tampão PIPES (pH 7,0) anterior a visualização (SCOTT et al., 1999), além disso as células foram plasmolisadas através da imersão em solução 0,8 M de manitol por 10 minutos.

3.4.2 Transformação de folhas de tabaco por agro-infiltração

Para observação da localização subcelular de CML38 em folhas de *N. tabacum* e *N. benthamiana*, foram utilizadas as mesmas construções CML38:GFP descritas acima.

Agrobacterium estirpe GV3101 foi transformada com a construção mencionada e utilizada para transformação transiente de *N. tabacum* e *N. benthamiana* pelo método da infiltração. Para tanto, as bactérias foram cultivadas *overnight* em meio LB suplementado com 50 mg/ml de gentamicina e 50 mg/ml de canamicina. Na manhã seguinte as células foram precipitadas em tubos de 1,5 ml e ressuspensas em tampão 10 mM MES e 10 mM MgCl₂. Ajustou-se a OD₆₀₀ para 0,2 através de diluição com o mesmo tampão e acrescentou-se acetoseringona na concentração de 10 µM, seguido da incubação por duas horas a 28° C, obtendo-se a solução de infiltração. Plantas de *N. tabacum* e *N. benthamiana* com 4 a 5 semanas tiveram suas folhas superiores infiltradas na face abaxial com a solução de infiltração. As folhas infiltradas foram observadas após dois a cinco dias em microscópio confocal FV1000 Olympus®. Para excitação dos fluoróforos foi empregado o laser 488 nm, específico para GFP.

3.5 Síntese *in vitro* de AtRALF1 e extração da fração microssomal de arábida

O gene At1g02900 selvagem e sua forma mutada foram clonados no vetor pGBKT7 (Clontech) sob expressão do promotor T7. Os precursores de RALF mutado e selvagem foram produzidos utilizando o kit *TNT Coupled Wheat Germ Extract System* (Promega®) de acordo com as instruções do fabricante. A reação de tradução foi conduzida na presença de Redivue® [³⁵S] Methionine (GE Healthcare Biosciences).

Extratos microsossomais foram obtidos conforme descrito anteriormente por Benghezal e colaboradores (2000) com algumas modificações. Células em suspensão de arabidopsis com 7 dias após o último subcultivo, foram coletadas e pulverizadas na presença de nitrogênio líquido. O lisado foi ressuspensionado em tampão 50 mM Tris-HCL, 5 mM EDTA, pH 8,5 gelado, e filtrado em duas camadas de miracloth (Clontech). A fração aquosa foi coletada e centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos a 4° C, em seguida o sobrenadante foi centrifugado a 100.000 x g por 1 hora a 4° C. O precipitado resultante da centrifugação foi ressuspensionado em solução 1% Triton X-100 gelada, obtendo-se uma concentração final protéica de 1,25 µg/µL. A concentração protéica total foi determinada com a utilização do reagente Bradford (Sigma) e visualizada por SDS-PAGE.

O ensaio de processamento de proRALF consistiu em reação com volume final de 200 µL, onde foram misturados 5 µL das proteínas marcadas e 10 µL do extrato total da fração microsossomal em tampão de reação Kex2p (JULIUS et al., 1984). A reação foi incubada por 1 hora a 30° C seguida de precipitação com TCA. O precipitado foi lavado com 200 µL de acetona e ressuspensionado em tampão de corrida (*Laemmli Sample Buffer*). As proteínas foram separadas em SDS-PAGE, que após seco foi exposto em filme de raio-x Kodak (*Scientific Imagin Film, X-OMAT*) por 2 a 7 dias, quando este foi revelado e analisado.

3.6 Reconstrução filogenética

A proposta filogenética foi baseada no teorema de Bayes utilizando-se os algoritmos presentes no programa MrBayes versão CVS (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001). As análises Bayesianas foram aplicadas ao conjunto de dados utilizando-se o modo misto de modelos de substituição onde todos os modelos presentes no MrBayes são testados, otimizando cada variável para cada modelo. Foram conduzidas quinze cadeias simultâneas por 5.0×10^6 gerações, amostrando árvores a cada 500 ciclos. As primeiras 2500 árvores foram descartadas como “burn in”. Para todas as análises, as isoformas do musgo *Physcomitrella patens* foram utilizadas como o grupo externo para enraizamento da árvore. Os trabalhos de filogenia foram conduzidos com a colaboração e ajuda do Dr. Marcelo Brandão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Construções gênicas para o sistema duplo-híbrido de leveduras

Foram feitas sete construções gênicas utilizando-se o vetor de leveduras pGBKT7 no sistema *Matchmaker Two-Hybrid System 3* (Clontech Laboratories). Três das construções referem-se à isoforma At1g02900 (AtRALF1), três à isoforma At5g67070 (AtRALF34) e uma à At1g76650 (CML38). As construções dos genes RALF compreendem a preproteína, proproteína e peptídeo ativo de cada uma das isoformas, enquanto CML38 teve toda sua fase aberta de leitura (ORF) clonada. Todas as construções foram checadas e confirmadas por reações de sequenciamento. Todas as construções foram testadas quanto a capacidade de auto-ativação dos genes repórteres, garantindo a inexistência de falso-positivos desta natureza. Os experimentos do duplo-híbrido de leveduras foram conduzidos com a estirpe AH109 de *Saccharomyces cerevisiae*.

A utilização de três diferentes construções para cada um dos dois genes RALF em estudo, representando deleções da preproteína, foram importantes para a busca de proteínas de ligação específicas aos diferentes momentos em que o peptídeo se apresenta na célula (síntese, transporte e sinalização). As construções também contribuíram para determinar qual porção de AtRALF1 é suficiente para interação com a proteína identificada, além de informar que as sequências que precedem o peptídeo ativo (peptídeo sinal e pré-sequência) não interferem positiva ou negativamente nesta interação.

4.2 Identificação da proteína de interação com AtRALF1

Os estudos de interação se iniciaram com a isoforma At1g02900. Foram feitos 15 *screenings* para cada uma das três construções, atingindo-se uma margem de mais de 150 placas, com aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células transformadas com clones da biblioteca CD4-10 de arabidopsis, além da construção contendo o peptídeo como isca. Os *screenings* foram suficientes para cobrir o genoma de arabidopsis cerca de 10 vezes.

Nas condições criadas pelo sistema duplo-híbrido de leveduras, o produto gênico da construção de interesse pode apresentar características tóxicas à levedura, tornando possível o desenvolvimento de certa adaptação por parte das células. Neste caso esta adaptação pode ser representada pela capacidade de degradação contínua desta proteína quimérica, ou até mesmo de silenciamento gênico ou impedimento do direcionamento nuclear. Buscando evitar tais ocorrências, foram feitas alterações no método de transformação de leveduras, podendo assim explorar o potencial desta técnica de identificar eventos de interação. Além da transformação convencional feita em duas etapas, também testou-se a eficiência da dupla transformação, onde partindo de uma cultura de 50 ml de células desarmadas procede-se a dupla transformação com ambos os grupos de plasmídeos (biblioteca e construção isca) ao mesmo tempo. Desta maneira as células de levedura iniciam simultaneamente a produção de ambas as proteínas, não havendo tempo para possíveis adaptações e/ou degradação por parte das células. Neste último caso pôde-se perceber um acréscimo na eficiência da transformação.

Em cada um dos *screenings* com transformações independentes, recuperou-se em média 2 a 5 colônias transformantes com potenciais eventos de interação. Esta média foi aumentada para 9 a 12 colônias com a introdução do sistema de dupla transformação. Estes eventos foram recuperados e as células utilizadas em testes de ativação dos demais genes repórteres. Uma vez confirmados, procedeu-se a extração de plasmídeos de levedura, para posterior clonagem em *E. coli* (multiplicação). Os plasmídeos obtidos de bactéria são checados por reações de sequenciamento para identificação do respectivo gene.

Um dos eventos de dupla transformação, utilizando o peptídeo ativo como isca, mostrou interação positiva com RALF de uma proteína codificada por um clone com 61,6% do mRNA do gene At1g76650. A proteína codificada pelo gene At1g76650, ou *calmodulin-like 38* (CML38), é uma proteína de ligação a cálcio semelhante a outras calmodulinas de arabidopsis já caracterizadas (McCORMAK et al., 2005). CML38 possui três domínios de ligação a cálcio (*EF-hands*) verdadeiros e um quarto incompleto. A proteína deduzida é composta por 177 aminoácidos, sendo que os primeiros 109 estavam presentes no clone isolado (Figura 1).

Figura 1 - Esquema da estrutura primária e domínios protéicos de CaM1 (calmodulina 1) e CML38. Domínios protéicos de ligação a cálcio (*EF-Hands*) das calmodulinas agrupados dois a dois (caixas vermelhas). O asterisco indica o produto gênico do clone isolado da biblioteca através do sistema de duplo-híbrido de leveduras. Imagens obtidas no banco de dados do NCBI (*Blast – Conserved Domains*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure>)

Este clone foi utilizado na transformação com as três construções do gene At1g02900, e foram submetidos ao teste de ativação dos genes repórteres em meio seletivo (Figura 2). A CML38 mostrou interação positiva com todas as construções de AtRALF1 no sistema de duplo-híbrido de leveduras. Os resultados confirmam que a presença do peptídeo ativo é suficiente para a interação com a porção isolada de CML38, e que as demais regiões da preproteína não interferem nesta interação.

Figura 2 - Interação entre as construções do peptídeo AtRALF1 (At1g02900) com CML38. As duplas-transformações foram plaquedas em meio *DROP OUT* deficiente para os aminoácidos triptofano, leucina e histidina, tornando-se seletivo apenas às células onde ocorrem os eventos de interação

Arabidopsis possui 7 calmodulinas verdadeiras e 50 proteínas do tipo *calmodulin-like* (McCORMACK; TSAI; BRAAM, 2005). Estudos da sinalização por cálcio colocam estas proteínas como componentes fundamentais da sinalização celular em resposta a uma ampla variedade de estímulos. Mesmo constituindo uma ampla família gênica, percebe-se uma baixa conservação de sequência protéica, mesmo entre os domínios de ligação ao cálcio (*EF-hands*). Esta característica leva a acreditar que estes genes foram selecionados de modo a ir contra a redundância funcional, provavelmente desenvolvendo funções específicas, uma vez que muitos são os processos celulares descritos em que o elemento cálcio está envolvido (McCORMACK; TSAI; BRAAM, 2005). A grande quantidade de eventos celulares a que estas proteínas são relacionadas e, mais ainda, a essencialidade do cálcio para o sistema celular dos organismos em geral, corroboram esta hipótese. Apesar da importância destas moléculas, os processos em que proteínas *calmodulin-like* (CML) estão envolvidos ainda são pouco investigados. Apesar de relatos de sua identificação no apoplasto (CUI et al., 2005), o envolvimento de uma proteína desta classe interagindo com um peptídeo hormonal ainda não foi descrito.

A CML38 possui expressão localizada em plântulas de arabidopsis. Nas raízes, esta proteína tem um interessante padrão de expressão nos trichoblastos, que darão origem aos pêlos radiculares, e nos primórdios de raízes laterais (VANDERBELD; SNEDDEN, 2007). Em conformidade com AtRALF1, CML38 possui expressão reduzida ou até ausente em tecidos maduros.

Durante os experimentos com o duplo-híbrido de leveduras, cerca de 90% dos clones obtidos nos *screenings* foram oriundos de um gene pouco caracterizado, cuja predição nos bancos de dados disponíveis apontava sua presença nos genomas nuclear, mitocondrial e cloroplastidial. Trata-se de uma proteína inexistente resultante da clonagem de um segmento do mRNA do gene At2g07707 em fase de leitura incorreta. Durante a realização dos *screenings*, outros artefatos desta natureza foram encontrados e descartados.

4.3 Confirmação da interação de AtRALF1 com CML38

4.3.1 Duplo-híbrido de leveduras

Conforme mencionado anteriormente, o clone isolado no sistema duplo híbrido de leveduras, correspondia a 109 dos 177 aminoácidos da proteína CML38. O cDNA completo da CML38 foi clonado no vetor pGADT7 (isca) e utilizado em duplas transformações com as três construções de AtRALF1, buscando-se a confirmação da interação do peptídeo com a proteína nativa completa. Observou-se que a utilização de CML38 completa confirmou a interação positiva com as três construções de AtRALF1 no sistema de duplo-híbrido de leveduras (Figura 3) e, mais uma vez, que a porção correspondente ao peptídeo ativo é suficiente para que esta interação ocorra. Este resultado também indica que a porção da proteína CML38 representada pelo clone isolado é suficiente para interação com RALF, e que ambas as proteínas completas mostram interação no sistema duplo-híbrido de leveduras.

Figura 3 - Confirmação da interação de AtRALF1 com CML38 completa no duplo-híbrido de leveduras. A) meio seletivo –L-W para a presença de ambos os plasmídeos (isca e presa), B) meio seletivo –L-W-H para a ocorrência de interação entre as proteínas. Em ambos, linhas horizontais de cima para baixo, colônias de levedura transformadas com: PreproAtRALF1 + CML38; PreproAtRALF1 + vetor; ProAtRALF1 + CML38; ProAtRALF1 + vetor; AtRALF1 ativo + CML38; AtRALF1 ativo + vetor

As construções empregadas no sistema duplo-híbrido de leveduras são representadas pela formação de proteínas quiméricas, onde uma das proteínas é fusionada ao domínio de ligação ao DNA (*Binding domain*, BD) e a outra ao domínio de ativação da polimerase (*Activation domain*, AD). A ligação a estes domínios obviamente altera características bioquímicas originais de ambas as proteínas, podendo levá-las a

um comportamento químico diferente de seu original. Estas alterações bioquímicas podem, em alguns casos, influenciar a interação entre as proteínas, eventualmente gerando um tipo de artefato da técnica. A inversão isca-presa e presa-isca, ou seja, a clonagem do gene referente à presa no vetor da isca e vice-versa foi sugerida como uma forma de se contornar este problema, colocando as proteínas associadas a diferentes domínios.

A confirmação da interação após esta inversão isca-presa tem se mostrado frequentemente associada a eventos de interação verdadeiros, posteriormente confirmados por outras abordagens (MACKAY et al., 2007). A fusão de ambas as proteínas em estudo com os diferentes domínios (BD e AD) mostrou que AtRALF1 e CML38 continuam a interagir independente de sua posição de isca ou presa. Este resultado demonstra que a interação observada entre CML38 e AtRALF1 não é influenciada pela condição de ligação ao DNA e, mais ainda, que os domínios de fusão não interferem nesta interação (Figura 4).

Figura 4 - Confirmação da interação entre AtRALF1 e CML38 pela inversão presa-isca isca –presa. A) Controle positivo; Meio drop-out deficiente em triptofano e leucina, seletivo apenas para a transformação com ambos os plasmídeos. De cima para baixo, linhas 1) AtRALF1 isca + CML38 presa, 2) CML38 isca + AtRALF1 presa, 3) vetores vazios pGBKT7 + pGADT7. B) Meio drop-out deficiente em triptofano, leucina e histidina, seletivo para a interação entre proteínas. Linhas 1) AtRALF1 isca + CML38 presa, 2) CML38 isca + AtRALF1 presa, 3) vetores vazios pGBKT7 + pGADT7

4.3.2 *In vitro*

Para confirmação da interação observada com o sistema duplo-híbrido de leveduras foram empregados dois sistemas, a coimunoprecipitação (CoIP) com proteínas marcadas radioativamente e o *Pull Down* com uma das proteínas fusionadas a GST. Ambos os sistemas se baseiam na incubação *in vitro* das proteínas seguido da precipitação com a utilização de anticorpos específicos.

Inicialmente as imunoprecipitações foram feitas com peptídeo AtRALF1 fusionado ao epitopo c-myc. Esta construção não produziu resultados satisfatórios. A seguir, passou-se a empregar a CML38 fusionada ao epitopo c-myc. As condições de reação foram testadas com alterações na concentração do tampão PBS, nas concentrações de cálcio, na concentração das proteínas, no tempo e na temperatura das incubações. As precipitações da proteína quimérica com o anticorpo conjugado a agarose ocorreram, porém não foram obtidos resultados satisfatórios para a precipitação conjunta das proteínas por este método.

A coprecipitação das proteínas AtRALF1 e CML38 marcadas radioativamente não trouxe resultados satisfatórios, e após muitas tentativas optou-se por alterar o método de confirmação da interação *in vitro*.

Neste novo método, o gene At1g76650 (CML38) foi clonado nos vetores pDEST15 e pDEST25 (Gateway®, Invitrogen), de modo a fusionar a CML38 em fase de leitura com a proteína GST nas posições amino- e carboxi-terminal respectivamente. Alterações na mobilidade das proteínas recombinantes produzidas em SDS-PAGE indicaram que possivelmente as proteínas estavam sendo produzidas de forma incorreta. O sequenciamento dos clones foi repetido três vezes, do mesmo clone e de clones independentes. Os arquivos de sequenciamento foram detalhadamente checados inúmeras vezes, de modo a garantir com segurança que o clone estava correto. Analisando as regiões flanqueadoras presentes no vetor foi possível observar que uma sequência de 13 bases havia sido incluída antes do início do inserto, em região correspondente ao vetor. Esta inserção de bases foi suficiente para uma tradução em fase de leitura incorreta, produzindo uma proteína truncada.

Outros estudantes do laboratório trabalhando com o mesmo sistema mostraram resultados semelhantes com clones diversos. A companhia foi notificada, e somente

após alguns meses reconheceram que o lote apresentava problemas, quando fizeram a substituição do material.

No período correspondente a este doutorado não foi possível obter resultados positivos referentes a interação *in vitro* das proteínas em questão. Experimentos desta natureza nunca antes haviam sido feitos no laboratório, portanto, ao final dos experimentos considero que ambas as técnicas (*CoIP* e *Pull Down*) foram introduzidas e inicialmente otimizadas no Laboratório. No momento outros estudantes estão repetindo estes experimentos como parte de seus projetos, utilizando do sistema estabelecido neste doutorado, obtendo seus respectivos resultados com mais eficiência e rapidez, sem a necessidade de enfrentar os obstáculos iniciais resolvidos durante o desenvolvimento desta tese.

4.4 Localização subcelular de CML38

As calmodulinas são importantes sensores de cálcio celular, responsáveis por uma série de interações, especialmente com peptídeos, que levam a ativação ou repressão de proteínas e enzimas (BOUCHÉ et al., 2005).

Os eventos de interação com calmodulinas descritos até o momento ocorrem no interior celular. Uma vez que AtRALF1 é comprovadamente secretado para o apoplasto celular, a interação com CML38 deve também ocorrer fora da célula, sugerindo que esta proteína deva ser também secretada. A predição de localização subcelular de CML38 com diferentes programas disponíveis na web indica localização citoplasmática (LOCtree. NAIR; ROST, 2005), nuclear (RI=6. SubLoc. HUA; SUN, 2001) e cloroplastidial (Score=0,347. TargetP. EMANUELSSON et al., 2000), sendo portanto inconclusiva. Apesar do que sugere a predição *in silico* da localização celular da CML38, desde a década de 80 alguns autores relatam a ocorrência de calmodulinas encontradas no apoplasto (BIRO et al., 1984; ZIELINSKI, 1998; MA et al., 1999; YANG; POOVAIAH, 2003) e, mais ainda, a provável interação com proteínas na superfície celular, afirmando a possibilidade destas proteínas apresentarem funções de sinal (CUI et al., 2005). Buscando responder esta questão, ensaios para determinar a localização subcelular de CML38 foram conduzidos.

4.4.1 Localização subcelular de CML38 em epitélio de cebola

A região codificadora do gene At1g76650 desprovida do códon de terminação foi fusionada à proteína verde fluorescente (GFP) sob controle do promotor 35S (CML38-GFP). Esta construção foi utilizada para transformação direta de epitélios de cebola via biobalística, juntamente com os controles apropriados.

A proteína GFP foi inicialmente observada no interior e no contorno das células epiteliais de cebola que receberam a construção gênica. Para observação da GFP no apoplasto tornou-se necessário proceder a plasmólise das células epiteliais com solução 0,8 M de manitol, além da incubação dos tecidos por cerca de 2-4 horas em tampão PIPES ou MOPS (pH 7,0). A região do apoplasto de células vegetais é frequentemente mais ácida (pH<6,5) em relação ao interior celular (SCHULTE et al., 2006). Por este motivo a incubação dos tecidos em tampão pH 7,0 é necessária para a montagem correta da proteína GFP e observação da fluorescência nas condições do apoplasto (SCOTT, 1999).

A via de secreção desta proteína não é ainda conhecida, pois CML38 não possui peptídeo sinal. Portanto, o processo pode ser dependente do acúmulo protéico e/ou modificações pós traducionais (YANG; POOVAIAH, 2003; NICKEL; RABOUILLE, 2009). A extensão do tempo entre a transformação dos epitélios até sua observação de 16 para 24 e 36 horas resultou na detecção de GFP no apoplasto. Vinte e quatro horas após a transformação pôde-se perceber um acúmulo da proteína GFP dentro e fora da célula (Figura 5 A e B), e após 36 horas observou-se GFP majoritariamente próxima à parede celular (Figura 5 C e D).

As proteínas direcionadas a via secretória celular possuem uma típica região amino-terminal chamada de peptídeo sinal. O peptídeo sinal é especificamente reconhecido pela maquinaria de importação do retículo endoplasmático, que direciona a proteína para o interior desta organela. Uma vez dentro do retículo, as proteínas são transferidas ao Golgi por um sistema de vesículas, e de lá seguem para fora da célula. Com a finalidade de testar se CML38 estaria seguindo esta via de forma independente de peptídeo sinal, foi feita uma construção adicional com a adição dos aminoácidos HDEL na porção carboxi-terminal da GFP. Os aminoácidos HDEL ou KDEL constituem um sinal de retenção do retículo, pois são reconhecidos por componentes internos da

organela e responsáveis pela retenção no interior. Com esta construção não foi observada a presença de GFP no retículo, mas sim o mesmo padrão obtido com a construção CML38-GFP. Se a via de secreção de CML38 fosse dependente do retículo, a adição dos aminoácidos HDEL faria com que a proteína ficasse retida na organela. Estes resultados indicam que CML38 é secretada para fora da célula, e possivelmente possui uma via de secreção alternativa, independente do retículo endoplasmático.

Figura 5 - Localização subcelular de CML38. Células epiteliais de cebola expressando a construção CML38-GFP vistas ao microscópio confocal. As células foram observadas 24 horas (A e B) e 36 horas (C e D) após a transformação, e foram incubadas por 4 horas em tampão MOPS pH 7,0 para visualização de GFP no apoplasto. Em A e C: sobreposição das imagens obtidas com luz transmitida e com filtro para GFP. B e D: Imagens obtidas com a utilização do filtro para GFP. As setas indicam a posição da membrana plasmática das células do epitélio de cebola, que estão plasmolisadas pela solução 0,8 M de manitol

4.4.2 Localização subcelular de CML38 em epiderme de tabaco

Buscando uma nova confirmação desta localização subcelular, particularmente em espécies dicotiledôneas, folhas de *Nicotiana tabacum* e *Nicotiana benthamiana* foram infiltradas com agrobacterium contendo as construções CML38:GFP e P19. A utilização da construção contendo o gene viral codificador da proteína P19 tem como objetivo impedir o silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), e dessa forma garantir a expressão do gene de interesse pelo tempo desejado. Após três dias, estas folhas foram observadas em microscópio confocal, permitindo a observação da GFP na periferia das células transformadas (Figura 6). Induzindo a plasmólise das células da epiderme com solução 0,8 M de manitol foi possível observar claramente a presença de CML38 majoritariamente no apoplasto de todas as células transformadas (Figura 7). Mais uma vez mostrou-se a ocorrência de CML38 fora do citosol celular, apesar do mecanismo de secreção permanecer desconhecido.

Figura 6 - Localização subcelular de CML38 fusionada a GFP em célula da epiderme de *Nicotiana tabacum*. O gene da CML38 foi clonado no vetor pCAMBIA 1302 fusionado ao gene da proteína verde fluorescente (GFP). Esta construção foi utilizada para transformação transiente de células da epiderme de tabaco pelo método da infiltração de *Agrobacterium*. O tecido foi observado em microscópio confocal FV1000 Olympus®, utilizando lasers específicos para excitação da GFP (A) e da clorofila (B). Em (C) a sobreposição das imagens

Figura 7 - Localização subcelular de CML38 fusionada a GFP em célula da epiderme de *Nicotiana tabacum*. O gene da CML38 foi clonado no vetor pCAMBIA 1302 fusionado ao gene da proteína verde fluorescente (GFP). Esta construção foi utilizada para transformação transiente de células da epiderme de tabaco pelo método da infiltração de *Agrobacterium*. O tecido foi submetido a plasmólise e observado em microscópio confocal para visualização da GFP (A), GFP + clorofila (B) e luz transmitida (C). As setas indicam a retração da membrana plasmática provocada pela plasmólise. Nota-se a presença dos cloroplastos desta célula restrita a esta região em B

Os dados experimentais mostram a ocorrência de CML38 fora da célula. Esta observação é de grande importância, visto que esta *calmodulin-like* é então colocada na mesma localização celular em que se encontra o peptídeo AtRALF1, conhecidamente secretado. A parede celular vegetal possui alta concentração de cálcio em sua composição. Esta estrutura celular constitui um importante depósito de cálcio, que é utilizado pela célula nos processos de sinalização. Por este motivo, o apoplasto apresenta-se como um ambiente propício a atuação de proteínas reguladas pelo íon cálcio, como a CML38.

A informação da localização subcelular de CML38 corrobora a hipótese de interação entre ambas as proteínas, além de levantar uma nova questão biológica a respeito do mecanismo pelo qual essa proteína é secretada.

4.5 Teste de interação entre CML38 e AtRALF34

As calmodulinas são proteínas essencialmente de interação em todos os organismos em que ocorrem, e observa-se alta especificidade nos eventos de interação com seus alvos.

Dentre as isoformas de RALF em *arabidopsis* que possuem o peptídeo sinal, as duas pontes de enxofre no peptídeo ativo e a região de ligação entre o peptído sinal e o peptídeo ativo, a isoforma At1g67070 (AtRALF34) é a mais distante filogeneticamente da isoforma At1g02900 (Figura 8), sendo também a única isoforma da família que não possui ortólogo no grupo das gramíneas (ver análise filogenética). Ainda assim, o peptídeo ativo derivado de At5g67070 apresenta 54% de identidade com o derivado de At1g02900.

Com o objetivo de estudar a possível especificidade da interação de At1g02900 com CML38, as três construções gênicas da isoforma At5g67070 empregadas como isca no sistema duplo híbrido de leveduras, foram utilizadas em duplas transformações em conjunto com a construção contendo CML38 completa, clonada no vetor da presa, em células de levedura. Submetidas a testes para ativação dos genes repórteres, pôde-se constatar que esta isoforma de RALF não mostra sinais de interação com CML38 neste sistema (Figura 9).

A aparente não interação de CML38 com AtRALF34, apesar da similaridade desta isoforma com AtRALF1, indica uma provável especificidade deste evento de interação. O grande número de representantes das *calmodulin-like* em *arabidopsis* sugere uma possível especificação funcional, que iria contra a redundância frequentemente observada em famílias gênicas. A superexpressão de AtRALF1 e AtRALF34 gerou plantas de *arabidopsis* com diferentes fenótipos (dados não publicados). Aliado a especificidade de interação com CML38, encontra-se subsídios para especular sobre a provável divergência funcional entre estes dois peptídeos da família RALF.

Figura 8 - Cladograma da reconstrução filogenética das nove isoformas do gene RALF em Arabidopsis mais próximas ao gene originalmente isolado de tabaco (At1g02900). Para o alinhamento foram utilizadas as seqüências dos prepropeptídeos. As isoformas estão identificadas pelo número do locus. A análise foi feita utilizando-se o programa ClustalX, matrix protéica de Gonnet com valores padronizados para os demais parâmetros (THOMPSON et al., 1997). Valores de bootstrap superiores a 80 são mostrados

Figura 9 - CML38 interage especificamente com AtRALF1 e não com AtRALF34. A) Leveduras transformadas com as construções RALF e CML38 e plaqueadas em meio seletivo deficiente em histidina. De cima para baixo, linha 1: controle positivo, linha 2: AtRALF1 + CML38, linha 3: AtRALF34 + CML38. B) Teste de ativação do gene repórter que codifica a enzima beta-galactosidase. A esquerda leveduras transformadas com AtRALF34 e CML38, a direita AtRALF1 e CML38

4.6 Busca por proteínas de interação com AtRALF34 e CML38

Paralelo aos trabalhos de confirmação da interação já mencionados, novos *screenings* foram feitos com o intuito de buscar outras proteínas que interagem com a isoforma AtRALF34 e, adicionalmente, com CML38. Assim como os genes RALF, o gene At1g76650 foi clonado no vetor pGBKT7, e esta construção também foi utilizada como isca no sistema duplo-híbrido de leveduras. O gene da CML38 é composto por um único exon, permitindo a clonagem de sua sequência codificadora utilizando como molde o DNA genômico.

Nos *screenings* realizados, novas colônias representando possíveis eventos de interação foram recuperadas das placas com meio seletivo deficiente em histidina (Tabela 1). Estas colônias foram testadas em meio deficiente em adenina, cuja ativação do gene repórter representa maior estringência em relação aos demais genes. As colônias que se desenvolveram no meio seletivo deficiente em adenina foram isoladas e tiveram o plasmídeo sequenciado para identificação do gene responsável pela interação (Tabela 2).

Tabela 1 - Número de colônias isoladas no duplo-híbrido de leveduras com as iscas AtRALF35 e CML38

Construções Isca	Número de colônias recuperadas nos <i>screenings</i>
AtRALF34 Ativo	36
AtRALF34 Proproteína	21
AtRALF34 Preproproteína	29
CML38	27
Total	112

Dentre as proteínas identificadas, percebe-se um número considerável de interações improváveis, representados por proteínas plastidiais (ex. *LHCA 1*) ou proteínas de ligação ao DNA como os fatores transcricionais (ex. *CCAAT-Box binding e Related to vernalization 1*). A natureza funcional destas proteínas, aliada a sua localização subcelular nos permite excluir completamente a possibilidade de interação com RALF.

Entre os artefatos encontrados, merece destaque a identificação de um gene não caracterizado codificado por genoma cloroplastidial, que de alguma forma é suficiente para a ativação dos genes repórteres, acabando por ser isolado diversas vezes independente da isca utilizada. A ocorrência deste artefato é comum a diversos pesquisadores que utilizam esta biblioteca de duplo-híbrido de leveduras. Para tornar possível a identificação deste gene antes de todas as etapas de isolamento e sequenciamento do clone, foi construído um primer específico que nos permite, com uma reação de PCR direto da colônia de levedura, identificá-lo e descartá-lo. Desta forma, o artefato que representou o maior problema nos *screenings* pode ser evitado no início do processo de isolamento e identificação.

Alguns dos clones isolados quando se utilizou AtRALF34 e CML38 como isca representam potenciais interações genuínas. A confirmação destes eventos isolados deve ser objeto de estudos futuros, quando se buscará também o significado biológico destas ocorrências no contexto celular vegetal.

Tabela 2 - Lista das proteínas identificadas como potenciais interagentes

Proteína Isca	Proteína Presa Identificada	ID
AtRALF34 Ativo	LHCA1 - Chlorophyl Binding Protein	At3g54890
AtRALF34 Ativo	Hypotetical Protein	At4g28760
AtRALF34 Ativo	CTR1 – Constitutive Triple Response 1	At5g03730
AtRALF34 Ativo	CCAAT-Box Binding Transcription Factor	At1g54830
AtRALF34 Ativo	Chloroplast Genome	-
AtRALF34 Ativo	Chloroplast Genome	-
AtRALF34 Ativo	PETC – Photosynthetic Eletron Transfer	At4g03280
AtRALF34 Ativo	Chloroplast Genome	-
AtRALF34 Proproteína	NAD(P)H:Plastoquinone Dehydrogenase	At1g74880
AtRALF34 Proproteína	Related to Vernalizaton 1 – DNA Binding	At1g49480
AtRALF34 Proproteína	RGLG1 – Ring Domain Ligase – Protein Binding	At3g01650
	ATBCAT2 – Branched-chain-amino-acid	
AtRALF34 Proproteína	transaminase	At1g10070
AtRALF34 Proproteína	ATHM1 – Thioredoxin M-type 1	At1g03680
AtRALF34 Proproteína	Chloroplast Genome	-
AtRALF34 Preproproteína	Hypotetical Protein	At1g79090
AtRALF34 Preproproteína	OEE33 – Oxygen-evolving Enhancer 33	At5g66570
AtRALF34 Preproproteína	OEE33 – Oxygen-evolving Enhancer 33	At5g66570
AtRALF34 Preproproteína	Disease Resistance Protein. CC-NBS-LRR Class	At3g50950
AtRALF34 Preproproteína	Hypotetical Protein	At3g57990
AtRALF34 Preproproteína	PRK – Phosphoribulokinase : ATP binding	At1g32060
AtRALF34 Preproproteína	Chloroplast genome	-
AtRALF34 Preproproteína	OEE33 – Oxygen-evolving Enhancer 33	At5g66570
CML38	Ubiquitin thiolesterase	At4g22290
CML38	Chloroplast genome	-
CML38	Chloroplast genome	-
CML38	Cysteine Proteinase, putative	At4g16190
CML38	Chloroplast Genome	-

A tabela 2 mostra algumas proteínas identificadas como potenciais interagentes. As colônias recuperadas no *screening* foram testadas para a ativação do segundo gene repórter em meio deficiente em adenina. As colônias positivas tiveram seu plasmídeo extraído e sequenciado para identificação da proteína.

4.7 Estudo do processamento do peptídeo AtRALF1

O processamento de prohormônios em animais e leveduras é tipicamente realizado por enzimas específicas, que atuam em sítios dibásicos no momento da clivagem. Proteases como as kexinas, furinas e convertases PC2, PC1/PC3, PC4, PACE4, PC5/6 e PC7, do tipo serino-proteases pertencendo a família das subtilisinas, são responsáveis pelo reconhecimento e processamento dos prohormônios em sítios dibásicos (RYAN et al., 2002; ROCKWELL et al., 2002).

Diversas proteínas similares às subtilisinas animais já foram identificadas em espécies vegetais. Em *Arabidopsis* 56 proteínas similares às subtilisinas foram identificadas por similaridade às animais (RAUTENGARTEN et al., 2005), sendo duas delas bastante similares às proteases do tipo kexinas de mamíferos. Além disso, a atividade proteásica similar àquela desempenhada pelas subtilisinas no processamento de próhormônios já foi anteriormente observada em folhas e frações microsomais de plantas (KINAL et al., 1995; JIANG; ROGERS, 1999; POPOVIC; PUIZDAR; BRZIN, 2002).

Prohormônios já foram anteriormente descritos em plantas, porém faltam informações a respeito de como e por quem estas moléculas são processadas para que possam desempenhar suas atividades na célula. Até a conclusão do presente trabalho nenhuma evidência havia sido apresentada de que os sítios díbasicos presentes nos propeptídeos são necessários ao correto processamento destas moléculas.

As estruturas primárias das proteínas precursoras de RALF apresentam um sítio dibásico bastante conservado entre os representantes da família de RALF, representado por duas argininas, imediatamente antes da região correspondente ao peptídeo ativo. Entretanto, até o momento nenhuma evidência havia sido apresentada de que o sítio dibásico em prohormônios vegetais era necessário ao seu correto processamento. Além do sítio específico de clivagem do peptídeo, o local onde ocorre o processamento dentro da célula era até então desconhecido, e esta informação contribui para a elucidação deste mecanismo em plantas.

O processamento das próproteínas animais pode ocorrer no interior da célula, na superfície celular ou até mesmo na matriz extracelular (SEIDAH; CHRÉTIEN, 1999). Uma vez que o direcionamento de proteínas ao sistema de endomembranas celular e

secreção pode ser identificado pela presença de um peptídeo sinal, a determinação do local celular onde o propeptídeo RALF é processado fornece subsídios para facilitar a identificação da protease que cataliza o processo.

Um sistema *in vitro* foi montado com a finalidade de se obter respostas quanto a participação da referida dupla arginina no processamento de AtRALF1 e ao local onde possivelmente ocorre o processamento. Tendo adquirido experiência com a produção *in vitro* de proteínas marcadas radioativamente durante os testes de coimunoprecipitação de AtRALF1 e CML38, surgiu a idéia de se fazer um teste de processamento *in vitro* de preproRALF. Para tanto, versões do gene At1g02900 mutado e não mutado foram clonadas no vetor pGBKT7 sob expressão do promotor T7, e estes clones foram utilizados para síntese das proteínas marcadas com metionina radioativa (GE Healthcare Bio-sciences) *in vitro* utilizando o sistema *TNT Wheat Germ Extract* (Promega) de transcrição e tradução acoplados em extratos celulares de germe de trigo.

O gene AtRALF1 mutado codifica o propeptídeo com uma alteração na arginina 69, que neste caso é substituída por uma alanina, passando a ser chamado de AtRALF1(R69A). As proteínas marcadas radioativamente foram incubadas com extratos de frações microsomais (retículo endoplasmático e Golgi) extraídas de células em suspensão de arabidopsis. A proteína nativa se mostrou alvo de clivagem *in vitro* por proteases presentes no extrato. O produto protéico de RALF identificado no gel de SDS-PAGE após a incubação apresenta peso molecular correspondente a região que antecede o peptídeo ativo. A forma mutada se manteve intacta na presença do extrato (Figura 10 A e B). Ambas as proteínas foram totalmente degradadas por tripsina no ensaio controle.

Os resultados obtidos confirmam que a simples alteração de uma arginina do sítio dibásico, substituída por uma alanina, é suficiente para comprometer o correto processamento de proRALF. Ainda, observou-se que a enzima capaz de promover a clivagem no peptídeo RALF está presente no sistema de endomembranas das células de arabidopsis, local onde provavelmente ocorre o processamento.

Figura 10 - Síntese e processamento *in vitro* de AtRALF1 marcado. Eletroforese (SDS-PAGE) de amostras das proteínas sintetizadas com o Kit de transcrição e tradução *TNT Coupled Wheat Germ Extract* (Promega). Canaletas 1 (A), 6 e 7 (B) representam o peptídeo não processado, canaletas 2 (A), 4 e 5 (B) preproRALF menos o peptídeo ativo, e canaletas 3 (A) e 1 a 3 (B) a CML38

Os dados apresentados foram parte do artigo publicado por Matos e colaboradores (2008). Neste trabalho, os autores obtiveram plantas transgênicas de *arabidopsis* superexpressando o gene At1g02900 nativo e a forma mutada, onde uma arginina do sítio conservado foi substituída por uma alanina. As plantas expressando o gene original sem alterações mostraram fenótipo semi-anão, enquanto aquelas expressando a forma mutada não apresentaram qualquer fenótipo. Sabe-se que as plantas superexpressando alguns genes RALF mostram alterações fenotípicas. Plantas de *arabidopsis* superexpressando AtRALF1 e AtRALF23 apresentaram fenótipo semi-anão (MATOS et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2009). As plantas de *arabidopsis* superexpressando a forma mutada de AtRALF1 não mostraram qualquer alteração no

fenótipo. Este resultado mostra que o impedimento do processamento pela alteração no sítio dibásico é suficiente para tornar o peptídeo inativo.

As plantas de *arabidopsis* superexpressando AtRALF1 e AtRALF1(R69A) foram utilizadas para extração de proteínas e purificação por cromatografia. Extratos protéicos brutos e purificados separados em SDS-PAGE mostraram que as plantas expressando o gene nativo acumulavam a forma processada de AtRALF1, e as plantas transformadas com a forma mutada acumulavam uma proteína de peso molecular correspondente a proproteína (~10 kDa).

Os resultados descritos mostram a importância do sítio dibásico (RR) para o processamento do peptídeo AtRALF1, indicam que este processo de clivagem ocorre no sistema de endomembranas celular, possivelmente catalizado por convertases e, mais ainda, que o processamento enzimático do peptídeo é determinante para o exercício de sua função. As informações obtidas com este trabalho contribuem significativamente para a elucidação do mecanismo pelo qual as próproteínas de plantas são processadas e, portanto, ilustra um passo central do mecanismo de ação de peptídeos hormonais. O trabalho foi publicado no periódico FEBS Letters (IF 3.263), e marca o início de novos estudos que buscam a elucidação dos mecanismos de processamento hormonal em plantas, além de suas semelhanças e diferenças com processos que ocorrem em animais e leveduras.

4.8 Análise filogenética da família RALF

A análise filogenética da família RALF teve como objetivo obter informações sobre a possível origem destes peptídeos em plantas e sua distribuição em diversas espécies vegetais. Dentre as 39 espécies representadas nesta análise (Tabela 3), o musgo *Physcomitrella patens* aparece como o organismo mais ancestral. *P. Patens* possui 3 isoformas de RALF, que foram utilizadas no enraizamento da árvore filogenética devido à posição de ancestralidade deste grupo vegetal (Figuras 11).

Observa-se na árvore filogenética a formação de diversos ramos, onde se distribuem os 231 ortólogos de RALF representando 39 espécies, pertencentes a 22 famílias do reino vegetal (Figura 11; Tabela 4).

Figura 11 - Árvore filogenética da família RALF. Topologia

Tabela 3 - Espécies, número de isoformas de famílias contempladas na análise filogenética

Espécie	Numero de Isoformas	Família
<i>Arabidopsis thaliana</i>	31	Brassicaceae
<i>Populus trichocarpa</i>	20	Salicaceae
<i>Ricinus communis</i>	16	Euphorbiaceae
<i>Oriza sativa</i>	14	Poaceae
<i>Zea mays</i>	13	Poaceae
<i>Mimulus guttatus</i>	11	Phrymaceae
<i>Sorghum bicolor</i>	10	Poaceae
<i>Glicine max</i>	9	Fabaceae
<i>Vitis vinifera</i>	8	Vitaceae
<i>Brachypodium distachyon</i>	8	Poaceae
<i>Manihot esculenta</i>	8	Euphorbiaceae
<i>Malus domestica</i>	8	Rosaceae
<i>Theobroma cacao</i>	6	Malvaceae
<i>Lotus japonicus</i>	5	Fabaceae
<i>Gossypium hirsutum</i>	5	Malvaceae
<i>Saccharum officinarum</i>	5	Poaceae
<i>Panicum virgatum</i>	5	Poaceae
<i>Triticum aestivum</i>	5	Poaceae
<i>Carica papaya</i>	4	Caricaceae
<i>Selaginella moellendorffii</i>	4	Selaginellaceae
<i>Lactuca sativa</i>	4	Asteraceae
<i>Citrus cinensis</i>	4	Rutaceae
<i>Solanum chacoense</i>	3	Solanaceae
<i>Physcomitrella patens</i>	3	Funariaceae
<i>Picea sitchensis</i>	3	Pinaceae
<i>Coffea canephora</i>	3	Rubiaceae
<i>Medicago truncatula</i>	2	Fabaceae
<i>Euphorbia esula</i>	2	Euphorbiaceae
<i>Triphysaria</i>	2	Scrophulariaceae
<i>Nicotiana tabacum</i>	1	Solanaceae
<i>Nicotiana attenuata</i>	1	Solanaceae
<i>Livisona chinensis</i>	1	Arecaceae
<i>Brassica oleracea</i>	1	Brassicaceae
<i>Phaseolus vulgaris</i>	1	Fabaceae
<i>Aquilegia</i>	1	Ranunculaceae
<i>Beta vulgaris</i>	1	Amaranthaceae
<i>Citrus clementina</i>	1	Rutaceae
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	1	Aizoaceae
<i>Petunia hybrida</i>	1	Solanaceae
Total	231	-

O ramo A observado na Figura 12 é composto por 19 membros da família RALF, pertencentes a 13 diferentes famílias de plantas. Este ramo forma um grupo isolado das demais isoformas de RALF, aproximando-se mais das isoformas ancestrais de musgo (*P. patens*). Observa-se que nesse grupo não existem representantes da família

Poaceae (gramíneas). A família das gramíneas (*Poaceae*) conta com o maior número de espécies representantes nesta análise (Tabela 4), que juntas correspondem a 26% das 231 unidades que compõe esta análise. As isoformas de gramíneas se agrupam em ramos que compõe o principal conjunto da árvore filogenética, com exceção do ramo discutido anteriormente.

Figura 12 - Ramo A da árvore filogenética (Figura 11). Este ramo contém 19 sequências de 13 espécies diferentes, dentre as quais não se encontra nenhuma espécie da família *Poaceae*

A isoforma AtRALF34 de arabidopsis está presente neste grupo (Figura 12). Estas observações sugerem que esta pode ter sido a isoforma ancestral da família RALF de arabidopsis, que sofreu uma duplicação anterior a divergência dos grandes grupos de mono e dicotiledôneas, dando origem a dois grandes grupos. Aparentemente as monocotiledôneas não conservaram esta isoforma, o que pode estar relacionado à natureza de sua função específica. Dados preliminares mostraram que, diferente das isoformas AtRALF1 e AtRALF23 (MATOS et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2009), plantas superexpressando AtRALF34 não apresentam fenótipo semi-anão, sugerindo uma divergência funcional entre esta e as demais isoformas de RALF em Arabidopsis.

Esta informação é condizente com a separação filogenética do grupo onde encontra-se a isoforma AtRALF34 com relação as demais.

Os grupos E, G, H e I (Figura 11), melhor visualizados nas Figuras 13 e 14, apresentam apenas isoformas de RALF de espécies monocotiledôneas (gramíneas). As diversas isoformas que compõe cada um destes grupos possivelmente possuem ancestrais em comum, que sofreram sucessivos eventos de duplicação após o surgimento desta família de plantas. Desde as primeiras duplicações até o surgimento das isoformas que existem hoje, estes genes sofreram modificações, dando origem a uma família extensa de peptídeos que foram mantidos durante a evolução. Fenômenos como este que mostram a conservação de múltiplos genes são eventualmente associados a ocorrência de divergência funcional da proteína.

Tabela 4 - Lista de famílias vegetais contempladas na análise filogenética, número de espécies por família e total de sequências por família

Famílias	Número de espécies	Total de sequências (%)
Poaceae	7	60 (26,0%)
Fabaceae	4	17 (7,3%)
Solanaceae	4	6 (2,6%)
Euphorbiaceae	3	26 (11,2%)
Rutaceae	2	5 (2,2%)
Malvaceae	2	11 (4,8%)
Brassicaceae	2	32 (13,8%)
Salicaceae	1	20 (8,6%)
Phrymaceae	1	11 (4,8%)
Vitaceae	1	8 (3,5%)
Rosaceae	1	8 (3,5%)
Caricaceae	1	4 (1,7%)
Selaginellaceae	1	4 (1,7%)
Rutaceae	1	4 (1,7%)
Funariaceae	1	3 (1,3%)
Pinaceae	1	3 (1,3%)
Rubiaceae	1	3 (1,3%)
Scrophulariaceae	1	2 (0,8%)
Arecaceae	1	1 (0,4%)
Ranunculaceae	1	1 (0,4%)
Amaranthaceae	1	1 (0,4%)
Aizoaceae	1	1 (0,4%)
Total	39	231 (100,0%)

Figura 13 - Ramos da análise filogenética compostos apenas por sequências de espécies vegetais da família *Poaceae* (gramíneas). Os itens A, B e C da Figura representam respectivamente os ramos E, G e H da árvore filogenética, cuja topologia é mostrada na Figura 11

Figura 14 - Ramo M da árvore filogenética (Figura 11). Este ramo representa o grupo externo utilizado no enraizamento da árvore filogenética de RALF

Figura 15 - Ramo I da análise filogenética (Figura 11) composto apenas por seqüências de espécies vegetais da família *Poaceae* (gramíneas)

Arabidopsis thaliana é a espécie analisada com o maior número de representantes da família RALF dentre as espécies com genoma completo sequenciado (Tabela 5). Estudos observaram que algumas isoformas apresentam padrão tecido específico de expressão (PEARCE et al., 2001a; COVEY et al., 2010). Uma avaliação preliminar mostrou que mutantes por inserção de T-DNA de genes RALF em *arabidopsis* não apresentam alterações fenotípicas evidentes.

Na árvore filogenética apresentada observa-se principalmente os ramos B, C e D (Figura 11) majoritariamente formados por isoformas de RALF de *Arabidopsis thaliana* (Figura 13). Estes peptídeos RALF agrupados são provavelmente oriundos de eventos de duplicação genômica que ocorreram em *arabidopsis*, e por algum motivo foram mantidos durante o processo evolutivo.

A ocorrência relativamente recente da duplicação genômica de *arabidopsis*, ou o simples relaxamento da pressão de seleção sobre estes genes pode explicar a manutenção deste número de isoformas. Estas observações sugerem que muito provavelmente existe redundância funcional entre alguns membros da família RALF. Por este motivo, a planta modelo *Arabidopsis thaliana* pode não ser o melhor sistema para o estudo e caracterização funcional dos peptídeos RALF em plantas.

Tabela 5 - Número de isoformas de RALF das espécies cujo genoma foi completamente sequenciado

Espécie Vegetal	Número de isoformas	Família
<i>Arabidopsis thaliana</i>	34	Brassicaceae
<i>Oriza sativa</i>	26	Poaceae
<i>Populus trichocarpa</i>	20	Salicaceae
<i>Zea mays</i>	13	Poaceae
<i>Sorghum bicolor</i>	10	Poaceae
<i>Vitis vinifera</i>	9	Vitaceae
<i>Glicine max</i>	9	Fabaceae
<i>Brachypodium distachion</i>	8	Poaceae
<i>Medicago truncatula</i>	7	Fabaceae
<i>Lotus japonicus</i>	5	Fabaceae
<i>Physcomitrella patens</i>	3	Funariaceae

Figura 19 - Ramo J da árvore filogenética (Figura 11)

Por fim, através desta análise, observa-se que a distribuição de RALF no reino vegetal apresenta alguns padrões. Entre eles destaca-se a formação de dois principais grupos, onde um, com menor número de representantes, não contém isoformas da família *Poaceae*, e se aproxima mais das isoformas ancestrais de musgo. Observa-se também que diversas isoformas das gramíneas se agrupam em clados exclusivos desta família, indicando que a origem destes genes ocorreu após a divergência entre as mono

e as dicotiledôneas. *Arabidopsis thaliana* desponta como a espécie com maior número de isoformas de RALF, que em alguns casos se agrupam, indicando que tiveram origem em eventos de duplicação genômica da espécie.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No ano de 2001 ingressei no curso de graduação em Engenharia Agrônômica da ESALQ, e neste mesmo ano iniciei minhas atividades como estudante de iniciação científica no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, sob orientação do Professor Marcio de Castro Silva Filho. Durante toda a graduação estive envolvido em projetos de pesquisa, atuando principalmente em trabalhos relacionados ao estudo dos mecanismos de regulação da expressão gênica e localização subcelular de proteínas.

Pouco antes da formatura tive a oportunidade de começar a trabalhar com o peptídeo hormonal RALF, sobre a orientação do Professor Daniel Scherer de Moura. Comecei a trabalhar com RALF buscando uma resposta para uma pergunta simples, porém intrigante: porque o mRNA de AtRALF1 é tão abundante quando comparado a baixa quantidade do peptídeo? Com experimentos *in vitro* encontramos indícios de que a expressão deste gene era possivelmente controlada por elementos presentes na longa região 3'UTR de seu mRNA, que de alguma forma impedem a tradução. Este trabalho deu início ao meu interesse pelo peptídeo hormonal e, portanto, ao curso de doutorado apresentado neste documento.

Considero o meu período correspondente ao doutorado como extremamente intenso e cheio de surpresas, sendo muitas delas agradáveis e outras nem tanto. Durante este tempo cursei 12 disciplinas, que foram oferecidas pelo Departamento de Genética e por outros Departamentos. Nas disciplinas cursadas adquiri conhecimentos de genética clássica e molecular, melhoramento de plantas, citogenética, bioquímica, entre outros. Entretanto, como é esperado, meu maior aprendizado se deu nas atividades relacionadas ao meu projeto de pesquisa.

Com o sistema duplo-híbrido de leveduras identificou-se uma proteína que possivelmente interage com AtRALF1, a CML38. Uma preocupação inicial era apontada pela predição de localização intracelular de CML38, uma vez que o peptídeo RALF é secretado. Experimentos de transformação de plantas com a utilização da proteína GFP foram suficientes para mostrar a ocorrência majoritária desta proteína na região extracelular, local para onde o peptídeo RALF é direcionado. A utilização de 3 diferentes construções gênicas no Y2H mostrou que a região correspondente ao peptídeo ativo é suficiente para interação com CML38, e mostrou ainda que as demais

regiões não interferem na interação. O resultado positivo após inversão das posições de isca-presa entre AtRALF1 e CML38 é mais uma evidência desta interação.

Ainda utilizando o sistema duplo-híbrido de levedura, observou-se que CML38 não mostra sinais de interação com o peptídeo AtRALF34, seja apenas com a porção referente ao peptídeo ativo ou com a proteína precursora completa. Esta informação indica uma possível especificidade de interação entre AtRALF1 e CML38, principalmente quando se observa a similaridade entre estes dois peptídeos da família RALF.

Naquela ocasião, o estudo de interação entre proteínas era algo incipiente no Laboratório. Por este motivo, foi necessário um esforço para buscar na literatura, aprender e implantar no Laboratório alguns experimentos direcionados à confirmação da interação entre proteínas. Os métodos da coimunoprecipitação com proteínas marcadas radioativamente, *Pull Down*, e BiFC foram pela primeira vez trazidos ao laboratório. Durante o curso fui responsável por trabalhar desde o planejamento dos experimentos, compra e solicitação dos materiais e execução das reações, e por fim otimizando e adaptando estas técnicas de interação entre proteínas no Laboratório. Hoje vários outros alunos tem obtido resultados em seus respectivos projetos utilizando exatamente as mesmas técnicas e protocolos otimizados durante o desenvolvimento desta tese, levando muito menos tempo. Considero esta uma das etapas mais enriquecedoras desta tese, uma vez que a introdução e estabelecimento destas 3 técnicas no laboratório forneceram um aprendizado teórico e científico único.

Um projeto visando compreender o mecanismo de processamento de RALF em *arabidopsis* foi desenvolvido em paralelo a esta tese, conduzido pela aluna de iniciação científica Juliana Matos sob orientação do Professor Daniel Scherer de Moura. Com a experiência adquirida nos trabalhos mencionados anteriormente, pude participar deste projeto. Utilizando um sistema *in vitro* mostramos que o processamento do propeptídeo RALF depende de um sítio dibásico, assim como observado em peptídeos em animais e leveduras. Este trabalho publicado encontra-se anexado a esta tese, e representa o início dos estudos de processamento de peptídeos em plantas.

Finalmente, considero que o trabalho de doutorado que originou esta tese trouxe resultados relevantes sobre o mecanismo de atuação do peptídeo hormonal RALF em

plantas, e principalmente trouxe novas perguntas importantes a serem respondidas em projetos subsequentes. Afirmando também que o crescimento pessoal e profissional proporcionado por estes anos de doutorado me habilitaram para o pleno exercício de minha atual função profissional na Empresa Dow AgroSciences com muita qualidade e eficiência.

REFERÊNCIAS

- AGNE, B.; KESSLER, F. Protein transport in organelles: The Toc complex way of protein import. **FEBS Journal**, Heidelberg, v. 276, n. 5, p. 1156 – 1165, 2009.
- ALONSO, J.M.; STEPANOVA, A.N.; LEISSE, T.J.; KIM, C.J., et al. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. **Science**, Washington, v. 301, p. 653-657, 2003.
- ASSMAN, S. Heterotrimeric and unconventional GTP binding proteins in plant cell signaling. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14 (Suppl.), p. S355-S373, 2002.
- ASSMAN, S. Hope for humpty-dumpty: Systems biology of cellular signaling. **Plant Physiology**, Rockville, v. 152, p. 470-479, 2010.
- BARKAN, D.T.; HOSTETTER, D.R.; MAHRUS, S.; PIEPER, U.; WELLS, J.A.; CRAIK, C.S.; SALI, A. Prediction of protease substrates using sequence and structure features. **Bioinformatics**. Oxford, *in press*, 2010.
- BENDER, A.; SPRAGUE, G.F.JR. Yeast peptide pheromones, a-factor and alpha-factor, activate a common response mechanism in their target cells. **Cell**, Cambridge, v. 47, p. 929-937, 1986.
- BENGHEZAL M.; WASTENEYS G.O.; JONES, D.A. The C-terminal dilysine motif confers endoplasmic reticulum localization to type I membrane proteins in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 1179-1201, 2000.
- BENNETT, R. N., AND WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytologist**, Lancaster, v. 127, p. 617 – 633, 2006.
- BERGEY, D.R.; RYAN, C.A. Wound- and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, p. 815-823, 1999.
- BIRNBAUM, K.; SHASHA, D.E.; WANG, J.Y.; JUNG, J.W.; LAMBERT, G.M.; GALBRAITH, D.W.; BENFEY, P.N. A gene expression map of the *Arabidopsis* root. **Science**, Washington, v. 302, p. 1956-1960, 2003.

BIRO, R.L.; DAYE S.; SERLIN, B.S.; TERRY, M.E.; DATTA, N.; SOPORY, S.K.; ROUX, S.J. Characterization of oat calmodulin and radioimmunoassay of its subcellular distribution. **Plant Physiology**, Rockville, v. 75, p. 382-386, 1984.

BLECKMANN, A.; WEIDTKAMP-PETERS, S.; SEIDEL, C.A.M.; SIMON, R. Stem cell signaling in Arabidopsis requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane. **Plant Physiology**, Rockville, v. 152, p. 166-176, 2010.

BOLLER, T.; HE, S.Y. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. **Science**, Washington, v.324, p. 742-744. 2009.

BOUCHÉ, N.; YELLIN, A.; SNEDDEN, W.A.; FROMM H. Plant-specific calmodulin-binding proteins. **Annual Review in Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 435-466, 2005.

BRACHA_DORI, K.; SHICHRUR, K.; KATZ, A.; OLIVA, M.; ANGELOVICI, R.; YALAOVSKY, S.; OHAD, N. Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. **The Plant Journal**, Oxford, v. 40, p. 419-427, 2004.

BRAND, U.; FLETCHER, J.C.; HOBE, M.; MEYEROWITZ, E.M.; SIMON, R. Dependence of stem cell fate in Arabidopsis on a feedback loop regulated by CLV3 activity. **Science**, Washington, v. 289, p. 617–619, 2000.

BUTENKO, M.A.; VIE, A.K.; BREMBU, T.; AALEN, R.B.; BONES, A.M. Plant peptides in signaling: looking for new partners. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 14, p. 255-263, 2009.

CANAFF, L.; BENNETT, H. P.; HENDY, G.N. Peptide hormone precursor processing: getting sorted? **Molecular and Cellular Endocrinology**, Maryland, v. 25, p. 1-6, 1999.

CHANVIVATTANA, Y.; BISHOPP, A.; SCHUBERT, D.; STOCK, C.; MOON, Y.H.; SUNG, Z.R.; GOODRICH, J. Interaction of polycomb-group proteins controlling flowering in Arabidopsis. **Development**, Cambridge, v. 131, n. 21, p. 5263-5276, 2004.

CHANG, C.; KWOK, S.F.; BLEECKER, A.B.; MEYEROWITZ, E.M. *Arabidopsis* ethylene-response gene *ETR1*: Similarity of product to twp-component regulators. **Science**, Washington, v. 262, p. 539-544, 1993.

CHEN T.; WU, X.; CHEN, Y.; LI, X.; HUANG, M.; ZHENG, M.; BALISKA, F.; SAMAJ, J.; LIN, J. Combined proteomic and cytological analysis of Ca^{2+} -calmodulin regulation in *Picea meyeri* pollen tube growth. **Plant Physiology**, Rockville, v. 149, p. 1111-1126, 2009.

CIRUELA, F. Fluorescence-based methods in the study of protein-protein interactions in living cells. **Current Opinion in Biotechnology**, Maryland, v. 19, p. 338-43, 2008.

CLARK, S.E. Cell signalling at the shoot meristem. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 2, p. 276-284, 2001.

CLARK, S.E.; RUNNING, M.P.; MEYEROWITZ, E.M. *CLAVATA1*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. **Development**, Cambridge, v. 119, p. 397-418, 1993.

CLARK, S.E.; RUNNING, M.P.; MEYEROWITZ, E.M. *CLAVATA3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1*. **Development**, Cambridge, v. 121, p. 2057-2067, 1995.

COVEY, P.A.; SUBBAIAH, C.C.; PARSONS, R. L; PEARCE, G; LAY F.T; ANDERSON, M. A; RYAN, C.A; BEDINGER, P. A. A pollen-specific RALF from tomato that regulates pollen tube elongation. **Plant Physiology**, Rockville v.153, p. 703-715, 2010

CUI, S.; GUO, X.; CHANG, F.; CUI, Y.; MA, L.; SUN, Y.; SUN, D. Apoplastic calmodulin receptor-like binding proteins in suspension-cultures cells of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 280, p. 31420-31427, 2005.

DAY, I.S.; REDDY, V.S.; ALI, G.S.; REDDY, A.S.N. Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*. **Genome Biology**, London, v. 3, p. 1-24, 2002.

DIXIT, R.; CYR, R.; GILROY, S. Using intrinsically fluorescent proteins for plant cell imaging. **Plant Journal**, Oxford, v. 45, p. 599-615, 2006.

DOMBROWSKI, J.E.; BERGEY, D.R. Calcium ions enhance systemin activity and play an integral role in the wound response. **Plant Science**, Amsterdam, v. 172, p. 335-344, 2006.

EMANUELSSON, O.; NIELSEN, H.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 300, p. 1005-1016, 2000.

ESCOBAR, N.M.; HAUPT, S.; THOW, G.; BOEVINK, P.; CHAPMAN, S.; OPARKA, K. High-throughput viral expression of cDNA–green fluorescent protein fusions reveals novel subcellular addresses and identifies unique proteins that interact with plasmodesmata. **The Plant Cell**, Rockville v. 15, p. 1507-1523, 2003.

FIELDS, S.; SONGS, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. **Nature**, London, v.340, p. 245-256, 1989.

FLETCHER, J.C.; BRAND, U.; RUNNING, M.P.; SIMON, R.; MEYEROWITZ, E.M. Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems. **Science**, Washington, v. 283, p. 1911–1914, 1999.

GERMAIN, H.; CHEVALIER, E.; CARON, S.; MATTON, D.P. Characterization of five RALF-like genes from *Solanum chacoense* provides support for a developmental role in plants. **Planta**, Berlin, v. 220, p. 447-454, 2005.

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

GÓMEZ-GÓMEZ, L.; BOLLER, T. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. **Molecular Cell**, Cambridge, vol. 5, p. 1003-1011, 2000.

HANADA, K.; ZHANG, X.; BOREVITZ, J.O.; LI, W.; SHIU, S. A large number of novel coding small open reading frames in the intergenic regions of the *Arabidopsis thaliana* genome are transcribed and/or under purifying selection. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 17. p. 1-9, 2007.

HANAI, H.; MATSUNO, T.; YAMAMOTO, M.; MATSUBAYASHI, Y.; KAMADA, H.; SAKAGAMI, Y. A secreted peptide growth factor, phytosulfokine, acting as a stimulatory factor of carrot somatic embryo formation. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 41, p. 27–32, 2000.

HARUTA, M.; CONSTABEL, C.P. Rapid alkalinization factors in poplar cell cultures. Peptide isolation, cDNA cloning, and differential expression in leaves and methyl jasmonate-treated cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, p. 814-823, 2003.

HARUTA, M.; MONSHAUSEN, G.; GILROY, S.; SUSSMAN, M.R. A cytoplasmic Ca²⁺ functional assay for identifying and purifying endogenous cell signaling peptides in *Arabidopsis* seedlings: Identification of AtRALF1 peptide. **Biochemistry**, Washington, v. 47, p. 6311-6321, 2008.

HIND, S.R.; MALINOWSKI, R.; YALAMANCHILI, R.; STRATMANN, J.W. Tissue-type specific systemin perception and the elusive systemin receptor. **Plant Signaling and Behavior**, Austin, v. 5, 2010

HINK, M.A.; BISSELIN, T.; VISSER, A.J. Imaging protein-protein interactions in living cells. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 871-883, 2002.

HOLTON, N.; CAÑO-DELGADO, A.; HARRISON, K.; MONTOYA, T.; CHORY, J.; BISHOP, G.J. Tomato BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 is required for systemin-induced root elongation in *Solanum pimpinellifolium* but is not essential for wound signalling. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 1709–17, 2007.

HU, C.D.; CHINENOV, Y.; KERPPOLA, T.K. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. **Molecular Cell**, Cambridge, v.9, p. 789-798. 2002.

HU, C.D, KERPPOLA, T.K. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. **Nature Biotechnology**, London, v. 21, p.539-545, 2003.

HUA, S.; SUN, Z. Support vector machine approach for protein subcellular localization prediction. **Bioinformatics**, Oxford, v. 17, p. 721-728, 2001.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, Oxford, v. 17, p. 754-755, 2001.

IRVING, H.R.; GEHRING, C.A.; PARISH, R.W. Changes in cytosol pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, p. 1790-1794, 1992.

JACH, G.; PESCH, M.; RICHTER, K.; FRINGS, S.; UHRIG, J.F. An improved mRFP1 adds red to bimolecular fluorescence complementation. **Nature Methods**, London, v. 3, p. 597 – 600, 2006.

JEONG, S.; TROTOCHAUD, A.E.; CLARK, S.E. The Arabidopsis CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 1925–1934, 1999.

JIANG, L; ROGERS, J.C; Functional analysis of a Golgi-localized Kex2p-like protease in tobacco suspension culture cells. **Plant Journal**, Oxford, v.18, p. 23-32, 1999.

JULIUS, D.; BRAKE, A.; BLAIR, L.; KUNISAWA, R.; THORNER, J. Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro- α -factor. **Cell**, Cambridge, v. 37, p. 1075-1089, 1984.

KERPPOLA, T.K. Complementary methods for studies of protein interactions in living cells. **Nature Methods**, London, v. 3, p. 969-971, 2006a.

KERPPOLA, T.K. Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London v. 7, p. 449-456, 2006b.

KIM, W.Y.; CHEONG, N.A.; LEE, D.C.; JE, D.Y.; BAHK, J.D.; CHO, M.J.; LEE, S.Y. Cloning and sequencing analysis of a full-length cDNA encoding a G protein α subunit, SGA1, from soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 1315-1316, 1995.

KINAL, H.; PARK, C.M.; BERRY, J.O.; KOLTIN, Y. BRUENN, J.A. Processing and secretion of a virally encoded antifungal toxin in transgenic tobacco plants: evidence for a Kex2p pathway in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 677-688, 1995.

KONDO, T.; SAWA, S.; KINOSHITA, A.; MIZUNO, S.; KAKIMOTO, T.; FUKUDA, H.; SAKAGAMI, Y. A **plant** peptide encoded by **CLV3** identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. **Science**, Washington, v. 313, p. 845–848, 1996.

KRINKE, O.; NOVOTNÁ, Z.; VALENTOVÁ, O.; MARTINEC, J. Inositol triphosphate receptor in higher plants: is it real? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.58, p. 361-376, 2007.

KUDLA, J.; BATISTIC, O.; HASHIMOTO, M. Calcium signals: The lead currency of plant information processing. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 541-563, 2010.

KWAAITAAL, M.; KEINATH, N.F.; PAJONK, S.; BISKUP, C.; PANSTRUGA, R. Combined bimolecular fluorescence complementation and forster resonance energy transfer reveals ternary SNARE complex formation in living plant cells. **Plant Physiology**, Rockville, v.152, p.1135-1147, 2010.

LEASE, K.A.; WALKER, J.C. The Arabidopsis unannotated secreted peptide database, a resource for plant peptidomics. **Plant Physiology**, Rockville, v. 142, p. 831-838, 2006.

LEE, L.Y.; FANG, M.J.; KUANG, L.Y.; GELVIN, S.B. Vectors for multi-color bimolecular fluorescence complementation to investigate protein-protein interactions in living plant cells. **Plant Methods**, London, v.4, p. 24, 2008.

LI, J; WEN, J; LEASE, K. A; DOKE, J.T; TAX, F.E; WALKER, J.C. BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. **Cell**, Cambridge, v.110, p. 213–222, 2002.

MA, H. GTP-Binding proteins in plants: new members of an old family. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 26, p. 1611-1636, 1994.

MA, L.; XU, X.; CUI, S.; SUN, D. The presence of heterotrimeric G protein and its role in signal transduction of extracellular calmodulin in pollen germination and tube growth. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 1351-1363, 1999.

MACKAY, J.P.; SUNDE, M.; LOWRY, J.A.; CROSSELEY, M.; MATTHEWS, J.M. Protein interactions: Is seeing believing? **Trends in Biochemical Sciences**, Cambridge, v. 32, p. 530-531, 2007.

MALINOWSKI, R.; HIGGINS, R.; LUO, Y.; PIPER, L.; NAZIR, A.; BAJWA, V.S.; CLOUSE, S.D.; THOMPSON, P.R.; STRATMANN, J.W. The tomato brassinosteroid receptor BRI1 increases binding of systemin to tobacco plasma membranes, but is not involved in systemin signaling. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 70, p. 603-616, 2009.

MATOS, J.L.; FIORI, C.S.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. A conserved dibasic site is essential for correct processing of the peptide hormone AtRALF1 in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 582, p. 3343-3347, 2008.

MATSUBAYASHI, Y.; OGAWA, M.; KIHARA, H.; NIWA, M.; SAKAGAMI, Y. Disruption and overexpression of Arabidopsis phytosulfokine receptor gene affects cellular longevity and potential for growth. **Plant Physiology**, Rockville, v. 142, p. 45-53, 2006.

MATSUBAYASHI, Y.; OGAWA, M.; MORITA, A.; SAKAGAMI, Y. An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine. **Science**, Washington, v. 296, p. 1470-1472, 2002.

MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y. Peptide hormones in plants. **Annual Review in Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 649-74, 2006.

MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y. Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 7623-7627. 1996.

MATSUBAYASHI, Y.; TAKAGI, L.; OMURA, N.; MORITA, A.; SAKAGAMI, Y. The endogenous sulfated pentapeptide phytosulfokine- α stimulates tracheary element differentiation of isolated mesophyll cells of zinnia. **Plant Physiology**, Rockville, v.120, p. 1043-1048. 1999.

MAYER, K.F.; SCHOOF, H.; HAECKER, A.; LENHARD, M.; JURGENS, G.; LAUX, T. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. **Cell**, Cambridge, v. 95, p. 805–815, 1998.

McAINSH, M.R.; BROWNLEE, C.; HETHERINGTON, A.M. Absciscic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca^{2+} precedes stomatal closure. **Nature**, London, v. 343, p. 186-188, 1990.

McAINSH, M.R.; HETHERINGTON, A.M. Encoding specificity in Ca^{2+} signalling systems. **Trends in Plant Sciences**, Cambridge, v. 3, p. 32-36, 1998.

McCORMACK, E.; BRAAM, J. Calmodulins and related potential calcium sensors of Arabidopsis. **New Phytologist**, Lancaster, v. 159, p. 585-598, 2003.

McCORMACK, E.; TSAI, Y.; BRAAM, J. Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs e CMLs. **Trends in Plant Sciences**, Cambridge, v. 10, p. 383-389, 2005.

MCGURL, B.; PEARCE, G.; OROZCO-CARDENAS, M.; RYAN, C.A. Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. **Science**, Washington, v. 255, p.1570–1573, 1992.

MINGOSSI, F.B.; MATOS, J.L.; RIZZATO, A.P.; MEDEIROS, A.H.; FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. SacRALF1, a peptide signal from the grass sugarcane (*Saccharum* spp.), is potentially involved in the regulation of tissue expansion. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 73, p. 271-281, 2010.

MOURA, D.S.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. RALF peptides. In: KASTIN, A.J. **The Handbook of Biologically Active Peptides**. San Diego: Academic Press, 2006, p. 33-36.

MOURA, D.S.; SILVA-FILHO, M.C.S. Plant peptide hormones, from defense to pollen self-incompatibility, cell fate and development: small peptides as signaling molecules in plants. In: SILVA, J.A.T. **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: advances and topical issue**. London: Global Science Books, 2006, p. 203-209.

MOYEN, C.; HAMMOND-KOSAC, K.E.; JONES, J.; KNIGHT, M.R.; JOHANNES, E. Systemin triggers an increase of cytoplasmic calcium in tomato mesophyll cells: Ca²⁺ mobilization from intra- and extracellular compartments. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 21, p. 1101-1111, 1998.

MÜLLER, R.; BLECKMANN, A; SIMON, R. The receptor kinase CORYNE of Arabidopsis transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1. **Plant Cell**, Rockville, v.20, p.934-946, 2008.

NAIR, R.; ROST, B. Mimicking cellular sorting improves prediction of subcellular localization. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 348, p. 85-100, 2005.

NARITA, N.N.; MOORE, S.; HORIGUCHI, G.; KUBO, M.; DEMURA, T.; FUKUDA, H.; GOODRICH, J.; TSUKAYA, H. Overexpression of a novel small peptide ROTUNDIFOLIA4 decreases cell proliferation and alters leaf shape in Arabidopsis thaliana. **Plant Journal**, Oxford, v. 38, p. 699–713, 2004.

NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J.; PEARCE, G.; ORZOCO-CÁRDENAS, M.L.; FRANCESCHI, V.R.; RYAN, C.A. Autoradiographic and biochemical evidence for the systemic translocation of systemin in tomato plants. **Planta**, Berlin, v. 195, p. 593 – 600, 1995.

NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. The plant cell wall matrix harbors a precursor of defense signaling peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 36, p. 12974-12977, 2005.

NASRALLAH, J.B. Recognition and rejection of self in plant reproduction. **Science**, Washington, v. 296, p. 305-308, 2002.

NICKEL, W.; RABOUILLE, C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 10, p. 148-155, 2009.

NIALL, H.D. The evolution of peptide hormones. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 44, p. 615-624, 1982.

OGAWA, M.; SHINOHARA, H.; SAKAGAMI, Y.; MATSUBAYASHI, Y. Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. **Science**, Washington, v. 319, p. 294, 2008.

OHAD, N.; SHICHRUR, K.; YALOVSKY, S. The analysis of protein-protein interactions in plants by bimolecular fluorescence complementation. **Plant Physiology**, Rockville, v.145, p.1090-1099, 2007.

OLSEN, A.N.; MUNDY, J.; SKRIVER, K. Peptomics, identification of novel cationic Arabidopsis peptides with conserved sequence motifs. **In Silico Biology**, Goettingen, v. 2, p. 441-451, 2002.

OROZCO-CARDENAS, M.; MCGURL, B.; RYAN, C.A. Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 8273-8276, 1993.

PERFUS-BARBEOCH, L.; JONES, A.M.; ASSMANN, S.M. Plant heterotrimeric G protein function: insights from *Arabidopsis* and rice mutants. **Current Opinion in Plant Biology**, Maryland, v. 7, p. 719-731, 2004.

PEARCE, G.; MOURA, D.S.; STRATMANN, J.; RYAN, C.A. RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 12843-12847, 2001a.

PEARCE, G.; MOURA, D.S.; STRATMANN, J.; RYAN, C.A. Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor. **Nature**, London, v. 411, p. 817-820, 2001b.

PEARCE, G.; STRYDOM, D.; JOHNSON, S.; RYAN, C.A. A Polypeptide from Tomato Leaves Induces Wound-Inducible Proteinase Inhibitor Proteins. **Science**, Washington, v.253, p.895-897, 1991.

PEARCE, G.; SIEMS, W.F.; BHATTACHARYA, R.; CHEN, Y.C.; RYAN, C.A. Three hydroxyproline-rich glycopeptides derived from a single petunia polyprotein precursor activate defensin I, a pathogen defense response gene. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 282, p. 17777-17784, 2007.

PEARCE, G.; RYAN, C.A. Systemic signaling in tomato plants for defense against herbivores. Isolation and characterization of three novel defense-signaling glycopeptide hormones coded in a single precursor gene. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, p. 30044-30050, 2003.

POPOVIC, T; PUIZDAR, V; BRZIN, J. A novel subtilase from common bean leaves. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 23, p. 163-168, 2002.

RAUTENGARTEN, C.; STEINHAUSER, D.; BUSSIS, D.; STINTZI, A.; SCHALLER, A.; KOPKA, J.; ALTMANN, T. Inferring hypotheses on functional relationships of genes: analysis of the Arabidopsis thaliana subtilase gene family. **PLoS Computacional Biology**, San Francisco, v. 1, p. 297-312, 2005.

RINCON-ZACHARY, M.; TEASTER, N.D.; SPARKS, J.A.; VALSTER, A.H.; MOTES, C.M.; BLANCAFLOR, E.B. Fluorescence resonance energy transfer sensitized emission of yellowameleon 3.60 reveals root-zone-specific calcium signatures in Arabidopsis in response to aluminium and other trivalent cations. **Plant Physiology**, Rockville, *in press*, 2010.

ROCKWELL, N.C.; KRYSAN, D.J.; KOMIYAMA, T.; FULLER, R.S. Precursor processing by Kex2/furin proteases. **Chemical Reviews**, Washington, v. 102, p. 4525-4548, 2002.

RUDD, J. J.; FRANKLIN-TONG, E. Calcium signaling in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 55, p. 214-232, 1999.

RYAN, C.A.; PEARCE, G.; SCHEER, J.M.; MOURA, D.S. Polypeptide hormones. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 251-264, 2002.

SANTNER, A.; ESTELLE, M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. **Nature**, London, v.459, p.1071-1078. 2009.

SCHEER, J.M.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. *LeRALF*, a plant peptide that regulates root growth and development, specifically binds to 25 and 120 kDa cell surface membrane proteins of *Lycopersicon peruvianum*. **Planta**, Berlin, v. 221, p. 667-674, 2005.

SCHEER, J.M.; RYAN, C.A. The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, p. 9585-9590, 2002.

SCHOOOF, H.; LENHARD, M.; HAECKER, A.; MAYER, K.F.; JURGENS, G.; LAUX, T. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. **Cell**, Cambridge, v. 100, p. 635–644, 2000.

SCHOPFER, C.R.; NASRALLAH, M.E.; NASRALLAH, J.B. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. **Science**, Washington, v. 286, p. 1697–700, 1999.

SCHULTE, A.; LORENZEN, I.; BOTTCHE, M.; PLIETH, C. A novel fluorescent pH probe for expression in plants. **Plant Methods**, London, v.2:7, p. 1-13, 2006.

SCOTT, A.; WYATT, S.; TSOU, P.L.; ROBERTSON, D.; ALLEN, N.S. Model system for plant cell biology: GFP imaging in living onion epidermal cells. **Biotechniques**, New York, v. 26, p. 1128-1132, 1999.

SEIDAH, N. G.; CHRETIEN, M. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. **Brain Research**, Maryland, v. 848, p. A14 – A15, 1999.

SHIU, S.H.; BLEECKER, A.B. Receptor-like kinase from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 10763-10768, 2001.

SPILLANE, C.; McDOUGALL, C.; STOCK, C.; KOHLER, C.; VIELLE-CALZADA, J.P.; NUNES, S.M.; GROSSNIKLAUS, U.; GOODRICH, J. Interaction of the *Arabidopsis* polycomb group proteins FIE and MEA mediates their common phenotypes. **Current Biology**, Cambridge, v. 10, p. 1535-1538, 2000.

SRIVASTAVA, R.; LIU, J.X.; HOWELL, S.H. Proteolytic processing of a precursor protein for a growth-promoting peptide by a subtilisin serine protease in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 56, n. 2, p. 219-227, 2008.

SRIVASTAVA, R.; LIU, J.X.; GUO, H.; YIN, Y.; HOWELL, S.H. Regulation and processing of a plant peptide hormone, AtRALF23, in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 59(6), p. 930-939, 2009.

STRATMANN, J.W. Long distance run in the wound response--jasmonic acid is pulling ahead. **Trends in Plant Science**. V.8, p. 247-250, 2003.

STRITTMATTER, P.; SOLL, J.; BÖLTER. The chloroplast protein import machinery: a review. **Methods in Molecular Biology**, New York, v.619, p.307-321, 2010.

TAKASAKI, T.; HATAKEYAMA, K.; SUZUKI, G.; WATANABE, M.; ISOGAI, A.; HINATA, K. The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. **Nature**, London, v. 403, p. 913-916, 2000.

TAKAYAMA, S.; SHIBA, H.; IWANO, M.; SHIMOSATO, H.; CHE, F.S.; KAI, N.; WATANABE, M.; SUZUKI, G.; HINATA, K.; ISOGAI, A. The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 1920–1925, 2000.

THALER, J. S., FIDANTSEF A. L.; DUFFEY S. S.; BOSTOCK R. M. Tradeoffs in plant defense against pathogens and herbivores? A field demonstration using chemical elicitors of induced resistance. **Journal of Chemical Ecology**, Amsterdam, v. 25, p. 1597-1609, 1999.

TICHTINSKY, G.; VANOOSTHUYSE, V.; COCK, J.M.; GAUDE, T. Making inroads into plant receptor kinase signalling pathways. **Trends in Plant Sciences**, Cambridge, v. 8, p. 231-237, 2003.

THOMPSON, J. D; GIBSON, T. J; PLEWNIAC, F; JEANMOUGIN, F; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 15, p. 4876-4882, 1997.

TOPPING, J.F.; LINDSEY, K. Promoter trap markers differentiate structural and positional components of polar development in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1713–25, 1997.

ULLAH, H.; CHEN, J.G.; TEMPLE, B.; BOYES, D.C.; ALONSO, J.M.; DAVIS, K.R.; ECKER, J.R.; JONES, A.M. The β -subunit of the *Arabidopsis* G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 393-409, 2003.

ULLAH, H.; CHEN, J.G.; YOUNG, J.C.; IM, K.H.; SUSSMAN, M.R.; JONES, A.M. Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in *Arabidopsis*. **Science**, Washington, v. 292, p. 2066-2069, 2001.

VANDERBELD, B.; SNEDDEN, W.A. Developmental and stimulus-induced expression patterns of *Arabidopsis* calmodulin-like genes *CML37*, *CML38* e *CML39*. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 64, p. 683-697, 2007.

VASSILATIS, D.K.; HOHMANN, J.G.; ZENG, H.; LI, F.; RANCHALIS, J.E.; MORTTRUD, M.T.; BROWN, A.; RODRIGUEZ, S.S.; WELLER, J.R.; WRIGHT, A.C.; BERGMANN, J.E.; GAITANARIS, G.A. The G-protein coupled receptor repertoires of human and mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 4903-4908, 2003.

ZIELINSKI, R.E. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 697-725, 1998.

WEISS, C.A.; GARNAAT, C.W.; MUKAI, K.; HU, Y.; MA, H. Isolation of cDNAs encoding guanine nucleotide-binding protein β -subunit homologues from maize (ZGB1) and *Arabidopsis* (AGB1). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 9554-9558, 1994.

WEN, J.; LEASE, K.A.; WALKER, J.C. DVL, a novel class of small polypeptides: overexpression alters *Arabidopsis* development. **Plant Journal**, Oxford, v. 37, p. 668–677, 2004.

WHITE, P.J.; BROADLEY, M.R. Calcium in plants. **Annals of Botany**, London, v. 92, p. 487-511, 2003.

WU, J.; KURTEN, E.L.; MONSHAUSEN, G.; HUMMEL, G.M.; GILROY, S.; BALDWIN, I.T. NaRALF, a peptide signal essential for the regulation of the root hair tip apoplastic pH in *Nicotiana attenuata*, is required for root hair development and plant growth in native soils. **The Plant Journal**, Oxford v. 52, p. 877-890, 2007.

YAMAGUCHI, Y.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. The cell surface leucine-rich repeat receptor for *AtPep1*, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 10104-10109, 2006.

YAMAKAWA, S.; MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y.; KAMADA, H.; SATOH, S. Promotion by a peptidyl plant growth factor, phytosulfokine- α , of chlorophyll formation in etiolated cotyledons of cucumber. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 62, p. 2441–2443, 1998a.

YAMAKAWA, S.; MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y.; KAMADA, H.; SATOH, S. Promotive effects of the peptidyl plant growth factor, phytosulfokine- α , on the growth and chlorophyll content of *Arabidopsis* seedlings under high night-time temperature conditions. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 63, p. 2240–2243, 1999.

YAMAKAWA, S.; SAKURAI, C.; MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y.; KAMADA, H.; SATOH, S. The promotive effects of a peptidyl plant growth factor, phytosulfokine, on the formation of adventitious roots and expression of a gene for a root-specific cystatin in cucumber hypocotyls. **Journal of Plant Research**, Amsterdam, v. 111, p. 453–458, 1998b.

YANG, H.; MATSUBAYASHI, Y.; NAKAMURA, K.; SAKAGAMI, Y. *Oryza sativa* PSK encodes a precursor of phytosulfokine, a sulfated peptide growth factor found in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, p. 13560 – 13565, 1999.

YANG, T.; POOVAIAH, B.W. Calcium/calmodulin mediated signal network in plants. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 8, p. 505-512, 2003.

YANG, Z. Signaling tip growth in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, Maryland, v. 1, p. 525-539, 1998.

APÊNDICE

A conserved dibasic site is essential for correct processing of the peptide hormone AtRALF1 in *Arabidopsis thaliana*

Juliana L. Matos^a, Celso S. Fiori^a, Marcio C. Silva-Filho^a, Daniel S. Moura^{a,b,*}

^a Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, C.P. 83, 13400-970 Piracicaba, SP, Brazil

^b Departamento de Ciências Biológicas, Escola Paulista de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema, 09972-270 Diadema, SP, Brazil

Received 19 July 2008; revised 2 August 2008; accepted 21 August 2008

Available online 5 September 2008

Edited by Michael R. Sussman

Abstract Prohormone proteins in animals and yeast are typically processed at dibasic sites by convertases. Propeptide hormones are also found in plants but little is known about processing. We show for the first time that a dibasic site upstream of a plant peptide hormone, AtRALF1, is essential for processing. Overexpression of preproAtRALF1 causes semi-dwarfism whereas overexpression of preproAtRALF1(R69A), the propeptide with a mutation in the dibasic site, shows a normal phenotype. RALF1(R69A) plants accumulate only the mutated proprotein and not the processed peptide. In vitro processing using microsomal fractions suggests that processing is carried out by a kexin-like convertase.

© 2008 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Convertase; Protein processing; Prohormone

1. Introduction

Rapid alkalization factor (RALF) is a 5 kDa ubiquitous plant peptide hormone first isolated from tobacco leaves that induces a rapid and strong alkalinating activity in cell suspension cultures and activates a mitogen-activated protein kinase (MAP-kinase) [1]. When the active peptide was applied exogenously to *Arabidopsis* seedlings it inhibited root growth and development [1]. Gene expression profiles of two RALF peptides isolated from hybrid poplar leaves and five isoforms isolated from fertilized ovule and ovary cDNA libraries of *Solanum chacoense* also suggest a developmental role [2,3]. RALF peptide regulates the extracellular pH at the root hair tip during root hair development and also mobilizes extracellular and intracellular Ca^{+2} [4,5]. The peptides are synthesized as preproteins and when tobacco preproRALF was fused to GFP it was visualized in the ER and, later on, in the apoplast [6]. In tomato cell suspension cultures, two membrane proteins

of 25 and 125 kDa are cross-linked to RALF peptide and may be part of a membrane receptor [7].

The primary structure of RALF precursors contains a conserved dibasic site upstream of the active peptide suggesting that they undergo protein processing similar to prohormones of animals and yeast [1,8]. In animals and yeast, proteases such as kexin, furin and convertases PC2, PC1/PC3, PC4, PACE4, PCS6 and PC7, all of them members of the subtilisin family of serine proteases, are responsible for the recognition and processing of preprohormones at dibasic sites [9,10]. In plants, subtilisin-like proteinases have been isolated and characterized from several species. *Arabidopsis* exhibit 56 annotated subtilases [11], and two of them exhibit high similarity to the mammalian kexin proteases. Subtilisin-like activity similar to prohormone convertases has also been observed in leaves and plant microsomes [12–14].

To date, no evidence has been presented that dibasic sites are essential for in vivo processing of plant peptide hormone precursors. Here we report that *Arabidopsis* plants overexpressing AtRALF1 gene (35S:AtRALF1) show a semi-dwarf phenotype, and accumulate the processed peptide. On the other hand, plants overexpressing the mutated AtRALF1 precursor with an Arg to Ala substitution at the conserved dibasic site [35S:AtRALF1(R69A)] fail to exhibit the semi-dwarf phenotype. The 35S:AtRALF1(R69A) plants show normal root and leaf growth with accumulation of the mutated proprotein and nearly undetectable levels of the processed peptide. In addition, protein extracts from the microsomal fractions were able to cleave the preproAtRALF1, but not the mutated precursor preproAtRALF1(R69A). Our results demonstrate that an intact dibasic site upstream of the active peptide hormone RALF is essential for proper processing and suggest that, like in animals and yeast, this processing in plants is likely done by a kexin-like convertase.

2. Materials and methods

2.1. Plant transformation and root and leaf measurements

Arabidopsis plants (Columbia ecotype) were grown in environmental chambers at 16 h light, 22 °C and 8 h dark, 18 °C. For AtRALF1 gene overexpression, the intronless AtRALF1 gene was obtained from genomic DNA of *Arabidopsis* using PCR. The mutation of AtRALF1 to generate AtRALF1(R69A) was also performed by PCR. The primers used for cloning are available in Supplementary Table S1. For cloning strategy, details of AtRALF1 gene mutation and plant transformation see Supplementary methods. Root and leaf measurements were obtained as described [15].

*Corresponding author. Address: Departamento de Ciências Biológicas, Escola Paulista de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema, 09972-270 Diadema, SP, Brazil. Fax: +55 11 40436428.

E-mail address: daniel_moura54@hotmail.com (D.S. Moura).

Abbreviations: RALF, rapid alkalization factor; MAP-kinase, mitogen-activated protein kinase; 35S, cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter

2.2. Purification of AtRALF1(R69A) proprotein, digestion, N-terminal sequencing and isolation of active peptide

Crude protein extracts were prepared and purified with preparative slab gels as described [16] (Supplementary methods). Purified AtRALF1(R69A) protein was digested over-night at room temperature using Endoproteinase Glu-C (Boehringer Mannheim) according to manufacturer's instructions. Digested products were separated using a reversed phase C18 HPLC column (218TP54, 5- μ m 4.6 $\times$ 250 mm column, Vydac) and fractions containing RALF peptides were detected using ELISA. N-terminal sequence of the peptides was obtained using Edman chemistry on an Applied Biosystems (Foster City, CA) Procise Model 492 protein sequencer.

AtRALF1 and AtRALF1(R69A) active peptides were purified from leaves of *Arabidopsis* plants as described [1] (Supplementary methods).

2.3. In vitro synthesis of labeled peptide and Arabidopsis microsomal fraction

The wild-type AtRALF1 gene and its mutated form AtRALF1(R69A) were amplified by PCR and cloned into the pGBKT7 vector (Clontech). For primer sequences see Supplementary Table S2. Precursors were produced using the TNT[®] coupled wheat germ extract system (Promega) according to manufacturer's instructions. The translation reaction was made in the presence of Redivue [35S] methionine (GE Healthcare Bio-sciences).

Crude microsomal membrane extracts were obtained as previously described [17] with some modifications. Cells from a 7-day-old *Arabidopsis* cell suspension culture [18] were collected by a brief spin and then pulverized in a mortar in the presence of liquid N₂. The lysate was homogenized in ice-cold buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 5 mM EDTA) and filtered through two layers of miracloth (Clontech). The homogenate was centrifuged at 12000 $\times$ g for 15 min at 4 °C and the supernatant was collected and then centrifuged at 100000 $\times$ g for 1 h at 4 °C. The resulting microsomal pellet was resuspended in 100 μ l of 1% Triton X-100 ice-cold solution to a final protein concentration of 1.25 μ g/ μ l. The resulting protein concentration was measured with Bradford reagent (Sigma) and visualized by SDS-PAGE.

The proprotein processing assay was carried out in a 200 μ l final volume reaction by mixing 5 μ l of labeled peptides with 10 μ g of total microsomal protein extract in Kex2p reaction buffer [19]. The mix was incubated for 1 h at 30 °C followed by TCA precipitation. The pellet was washed with 200 μ l of cold acetone and resuspended in Laemmli sample buffer. Samples were separated in polyacrylamide gels (SDS-PAGE) that were later dried and exposed to X-ray film.

3. Results

3.1. AtRALF1 mutation and plant transformation

In order to evaluate the significance of the conserved dibasic site in the maturation of preproRALF, a mutation that replaced the second Arg for an Ala (Arg69 in AtRALF1, locus At1g02900) was introduced into the *Arabidopsis* AtRALF1 gene. Transgenic plants carrying the AtRALF1 gene or the mutated AtRALF1 transgene [AtRALF1(R69A)] under the control of the constitutive CaMV 35S promoter were obtained and overexpressors were identified based on kanamycin resistance and RNA blots. Over thirty plants of 35S:AtRALF1 and 35S:AtRALF1(R69A) independent transgenic lines were produced and they all showed a high level of expression of the transgenes. An RNA gel blot of nine selected transgenic lines is shown to illustrate the level of transcript accumulation for both 35S:AtRALF1 and 35S:AtRALF1(R69A) plants (Supplementary Fig. S1).

3.2. Phenotype of transgenic plants and quantitative analyses

All 35S:AtRALF1 plants overexpressing AtRALF1 gene showed a semi-dwarf phenotype (Fig. 1A and Supplementary Fig. S2) as opposed to the normal phenotype showed by all

Fig. 1. Third-generation transgenic plants with high level of expression of AtRALF1 and the mutated AtRALF1(R69A). (A) Three plants overexpressing AtRALF1 (lines 35S:AtRALF1-I, II and III). (B) Two plants overexpressing AtRALF1(R69A) (lines 35S:AtRALF1(R69A)-I and II) and a control plant transformed with empty vector. (C) Phenotype comparison among control, 35S:AtRALF1 and 35S:AtRALF1(R69A) plants in advanced stage of maturation. Control and 35S:AtRALF1(R69A) plants show normal phenotypes while 35S:AtRALF1 plants show semi-dwarf phenotype.

AtRALF1(R69A) plants (Fig. 1B). AtRALF1(R69A) overexpressors were undistinguishable from wild-type or plants transformed with an empty vector (Fig. 1B). We are now using the third generation of the transgenic plants and they all show stability of both semi-dwarf and normal phenotypes. Fig. 1C shows mature control plants, 35S:AtRALF1 and 35S:AtRALF1(R69A) plants. Mature plants overexpressing AtRALF1(R69A) gene could not be set apart from control plants and could be easily separated from plants overexpressing AtRALF1. No differences in flowering time were observed in transgenic plants (data not shown).

Quantitative analyses were obtained for leaf length and width and for root growth (Supplementary Figs. S3 and S4). Evaluation of leaf growth revealed reduced leaf dimensions for 35S:AtRALF1 plants, but similar leaf sizes for both 35S:AtRALF1(R69A) and control plants (Fig. 2A). Roots of 12 days old seedlings of 35S:AtRALF1 plants are much smaller than roots of 35S:AtRALF1(R69A) plants (Fig. 2B).

Fig. 2. Leaf and root growth of *Arabidopsis* transgenic plants. (A) Leaves from 1 to 6 of adult plants were digitalized for dimensional comparison. Plants overexpressing the AtRALF1(R69A) show normal growth when compared to reduced growth of plants overexpressing the AtRALF1 precursor. Plants carrying an empty vector and wild-type plants were used as controls. (B) Seedlings growing in plates for root measurements. Seedlings overexpressing the 35S:AtRALF1 transgene show reduced root growth when compared to seedlings overexpressing the 35S:AtRALF1(R69A) transgene.

3.3. Identification of unprocessed and processed precursors

Crude protein extracts from 35S:AtRALF1(R69A) plants separated in SDS/PAGE gels showed a strong band about twice the size of RALF peptide in a protein blot (Fig. 3A). This band has a molecular weight (M_r) of approximately 10 kDa and it is in accordance with the expected molecular weight for AtRALF1 precursor lacking the signal peptide. A weak band of the same size could also be detected in crude protein extracts from plants overexpressing AtRALF1 transgene. Neither wild-type plants nor plants transformed with an empty vector showed bands in crude protein extracts. Same amounts of protein were loaded in the gel (Fig. 3B).

We also isolated the active processed RALF peptides from leaves of *Arabidopsis* plants. Crude protein extracts from plants overexpressing the AtRALF1 and AtRALF1(R69A) transgenes were obtained and loaded in a C-18 flash column chromatography. After freeze-drying, the 60% methanol fraction yielded 67 and 66 mg of protein for AtRALF1 and AtRALF1(R69A) extracts, respectively. The materials were resuspended in appropriate buffer and loaded into a RESOURCE-3 ml HPLC reversed phase column. Fractions were tested in the alkalization assay and RALF peptide activity was detected only in fractions 26–29 of the AtRALF1 purified extract. Fractions from 22 to 33 of AtRALF1 extract and correspondent fractions of AtRALF1(R69A) extract were combined every three fractions, lyophilized and loaded in an SDS-PAGE gel. Western blot analyses with anti-RALF

Fig. 3. Detection of AtRALF propeptides and AtRALF active peptides in leaf protein extracts. (A) Western blot analysis of crude protein extracts from plants overexpressing the 35S:AtRALF1 and 35S:AtRALF1(R69A) transgenes. Levels of endogenous AtRALF (in control and wild-type plants) are too low to be detected. (B) A Coomassie Brilliant Blue stained replicate gel is shown as a protein loading control. R69A propeptide and rapid alkalization factor (RALF) peptide are positive controls. (C) Western blot analysis of AtRALF peptides purified from leaf protein extracts by reversed phase chromatography. Active fractions in the alkalization assay of the AtRALF1 extract and correspondent fractions of AtRALF1(R69A) extract are numbered from I to IV. Arrows indicate bands identified using an antibody raised against RALF peptide. Standard protein bands are shown on the right.

antibody revealed the presence of a band in lane I (fractions 22–24), II (fractions 25–27) and III (fractions 28–30) of the AtRALF1 protein extract (Fig. 3C). A hardly noticeable band can be seen in lane II (fractions 25–27) of the AtRALF1(R69A) extract (Fig. 3C).

3.4. Mutated unprocessed precursor

Preparative slab gels were used to isolate and confirm the identity of the mutated unprocessed propeptide showed in Fig. 4A. The purified putative precursor was digested with Endo-Glu-C and ELISA was used to identify the digested fragments. AtRALF1 deduced prepropeptide has six Endo-Glu-C cleavage sites and also a predicted signal peptidase cleavage site between amino acids Ala26 and Gly27 (Fig. 4A). Enzyme immunoassay (ELISA) performed in HPLC fractions of the Endo-Glu-C digested and undigested putative AtRALF1(R69A) precursor detected two peaks in the digested sample that were absent in the undigested precursor (Fig. 4B). The first peak contained a peptide resulted from Endo-Glu-C cleavage at the amino acid position Glu65. The second peak

Fig. 4. Identification of the amino acid substitution (R69A) in the precursor preproAtRALF1(R69A) extracted from *Arabidopsis* leaves. (A) Primary structure of the preproAtRALF1 protein. The arrow shows the cleavage site for the enzyme Signal peptidase and the asterisks indicate possible targets of Endo-Glu-C. The substitution of the amino acid alanine at position 69 in the preproAtRALF1 is indicated by a star. Sequenced peptides are double-underlined and cysteine residues are underlined. (B) ELISA results of chromatographic fractions of preproAtRALF1(R69A) prior to digestion (empty circles) and after digestion with the enzyme Endo-Glu-C (black-filled circles). Sequenced peptides are shown above their respective peaks.

contained two peptides. One is identical to the first peak, and the second is the N-terminal sequence of the unprocessed pro-peptide. The two sequences eluted together generating two N-terminal sequences in a single eluting peak. The first eluting peak had a retention time on HPLC similar to RALF peptide standard (data not shown) and the N-terminal sequence obtained covered the Arg69 to Ala69 amino acid substitution (star in Fig. 4A).

3.5. In vitro cleavage of preproAtRALF1 by *Arabidopsis* microsomal fraction

Radiolabeled wild-type preproAtRALF1 and mutated preproAtRALF1(R69A) were produced by in vitro transcription and translation and then incubated with protein extracts from microsomal fractions of *Arabidopsis* cell suspension cultures. The results in Fig. 5 show that only the preproAtRALF1 was processed when incubated with the microsomal protein extract. The mutated preproAtRALF1(R69A) remained intact. The observed mass based on relative gel mobility of the band matched the expected mass of the labeled N-terminal part of the processed peptide plus the amino acids of the pGBKT7 vector, approx. 8874 Da. Both radiolabeled peptides were fully digested when incubated with trypsin.

4. Discussion

RALF peptides are located in the C-terminal region of preproteins that share a conserved dibasic site upstream of the active peptides [1–3,20]. Dibasic residues are also conserved in the Phytosulfokine and Clavata families of peptide hormones

Fig. 5. In vitro digestion assay of native and mutated AtRALF precursors by microsomal extract from *Arabidopsis*. Radiolabeled [35S] methionine preproAtRALF1 and preproAtRALF1(R69A) were incubated into kex2p reaction buffer with (+) or without (–) microsomal protein extract. A prior digestion of precursors with trypsin was carried out as a control. Molecular weight standards are represented on the right.

[8,21–23]. Such evidences suggest that, like in animals and yeast, a dibasic site for processing may be essential for the maturation of plant prohormones.

We generated a mutation in the second Arg of the At1-gRALF1 precursor coded by the gene At1g02900, and our results confirm that a dibasic site is essential for proper maturation and release of RALF active peptides in *Arabidopsis*. Lack of processing activity due to a single change in the dibasic site has been shown using chimeric reporter proteins in tobacco cell suspension culture [13].

Transgenic plants overexpressing the AtRALF1 gene show a semi-dwarf phenotype while plants mutated at Arg69 do not (Fig. 1). The lack of typical phenotype in 35S:AtRALF1(R69A) plants was revealed in detail by quantitative analyses of root and leaf growth (Fig. 2). It must be noted that the shortening of aerial parts of 35S:AtRALF1 plants is somehow unexpected since AtRALF1 isoform is expressed solely in roots. Possibly, ectopic overexpression of AtRALF1 is interfering in the normal perception of other (leaf) RALF isoform peptides.

The absence of the semi-dwarf phenotype in 35S:AtRALF1(R69A) plants indicates that no active AtRALF1 peptide was being produced or released from mutated precursor in the aerial parts of these plants, and protein analyses of transgenic plants confirm such hypotheses. Crude protein extracts from 35S:AtRALF1(R69A) plants revealed an accumulation of mutated precursor, but nearly undetectable levels of active peptides (Fig. 3). The presence of a signal of low intensity is probably due to endogenous conserved and ubiquitously expressed RALF isoforms [8,20].

Interesting to note that even with high levels of transgene expression, no processed AtRALF1 peptide was detected in protein extracts of 35S:AtRALF1 plants. We were able to detect the active peptide when crude extracts were enriched with semi-purification of RALF peptides (Fig. 3C). This suggests a fast turnover of the active AtRALF1 peptide as a way to control its activity.

In animals and yeast, the group of kexin-like serine proteases is a branch of the subtilisin family that recognizes a more specific site generally composed by RR or KR [24]. In plants, a kexin-like activity has been demonstrated to play a role in protein processing [12,13]. To start elucidating the nature of the

processing enzyme of RALF peptides, we extracted proteins from microsomal fractions (RER and Golgi complex) of *Arabidopsis* cell suspension cultures and conducted experiments in conditions proper to kex2p-like enzymes. Radiolabeled preproRALF1 was processed to liberate a peptide with a molecular weight equivalent to RALF active peptide, while radiolabeled preproAtRALF1(R69A) showed no alteration (Fig. 5). This result demonstrates that the processing enzyme may be a convertase or kex2p-like subtilisin, similar to processing enzymes of animals and yeast prohormones.

Our results set the beginning of a search for the processing enzymes of propeptide hormones in plants. There is a large number of RALF and RALF-like peptides in *Arabidopsis* and it would be interesting to investigate how plants dealt with specific processing considering that only two convertase-like enzymes have been identified in the *Arabidopsis* genome [11].

Acknowledgments: In memoriam of Dr. Clarence A. Ryan (Washington State University, Pullman, WA) for his generous support that enabled part of this research to be conducted in his laboratory. We are very thankful to Gregory Pearce (Washington State University, Pullman, WA) for helpful discussions on peptide purification. This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP Project 02/08661-1. J.L.M. was supported by an undergraduate fellowship from FAPESP. C.S.F. was supported by a graduate fellowship from FAPESP. M.C.S.F. is a research fellow of CNPq. D.S.M. is recipient of a Young Researcher Grant from FAPESP.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.febslet.2008.08.025.

References

- [1] Pearce, G., Moura, D.S., Stratmann, J. and Ryan, C.A. (2001) RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98, 12843–12847.
- [2] Haruta, M. and Constabel, C.P. (2003) Rapid alkalization factors in poplar cell cultures. Peptide isolation, cDNA cloning, and differential expression in leaves and methyl jasmonate-treated cells. *Plant Physiol.* 131, 814–823.
- [3] Germain, H., Chevalier, T., Caron, S. and Matton, D.P. (2005) Characterization of five RALF-like genes from *Solanum chacoense* provides support for a developmental role in plants. *Planta* 220, 447–454.
- [4] Wu, J.S., Kurten, E.L., Monshausen, G., Hummel, G.M., Gilroy, S. and Baldwin, I.T. (2007) NaRALF, a peptide signal essential for the regulation of root hair tip apoplastic pH in *Nicotiana attenuata*, is required for root hair development and plant growth in native soils. *Plant J.* 52, 877–890.
- [5] Haruta, M., Monshausen, G., Gilroy, S. and Sussman, M.R. (2008) A cytoplasmic Ca^{2+} functional assay for identifying and purifying endogenous cell signaling peptides in *Arabidopsis* seedlings: identification of AtRALF1 peptide. *Biochemistry* 47, 6311–6321.
- [6] Escobar, N.M., Haupt, S., Thow, G., Boevink, P., Chapman, S. and Oparka, K. (2003) High-throughput viral expression of cDNA–green fluorescent protein fusions reveals novel subcellular addresses and identifies unique proteins that interact with plasmodesmata. *Plant Cell* 15, 1507–1523.
- [7] Scheer, J.M., Pearce, G. and Ryan, C.A. (2005) LeRALF, a plant peptide that regulates root growth and development, specifically binds to 25 and 120 kDa cell surface membrane proteins of *Lycopersicon peruvianum*. *Planta* 221, 667–674.
- [8] Ryan, C.A., Pearce, G., Scheer, J.M. and Moura, D.S. (2002) Polypeptide hormones. *Plant Cell* 14, S251–S264.
- [9] Rockwell, N.C., Krysan, D.J., Komiyama, T. and Fuller, R.S. (2002) Precursor processing by Kex2/furin proteases. *Chem. Rev.* 102, 4525–4548.
- [10] Seidah, N.G. and Chretien, M. (1999) Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.* 848, A14–A15.
- [11] Rautengarten, C., Steinhäuser, D., Bussis, D., Stintzi, A., Schaller, A., Kopka, J. and Altmann, T. (2005) Inferring hypotheses on functional relationships of genes: analysis of the *Arabidopsis thaliana* subtilase gene family. *Plos Comput. Biol.* 1, 297–312.
- [12] Kinal, H., Park, C.M., Berry, J.O., Koltin, Y. and Bruenn, J.A. (1995) Processing and secretion of a virally encoded antifungal toxin in transgenic tobacco plants – evidence for a Kex2p pathway in plants. *Plant Cell* 7, 677–688.
- [13] Jiang, L.W. and Rogers, J.C. (1999) Functional analysis of a Golgi-localized Kex2p-like protease in tobacco suspension culture cells. *Plant J.* 18, 23–32.
- [14] Popovic, T., Puizdar, V. and Brzin, J. (2002) A novel subtilase from common bean leaves. *FEBS Lett.* 530, 163–168.
- [15] Weigel, D. and Glazebrook, J. (2002) *Arabidopsis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [16] Scheer, J.M. and Ryan, C.A. (2001) A method for the quantitative recovery of proteins from polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 298, 130–132.
- [17] Benghezal, M., Wasteneys, G.O. and Jones, D.A. (2000) The C-terminal dilysine motif confers endoplasmic reticulum localization to type I membrane proteins in plants. *Plant Cell* 12, 1179–1201.
- [18] Menges, M. and Murray, J.A.H. (2002) Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant J.* 30, 203–212.
- [19] Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R. and Thorner, J. (1984) Isolation of the putative structural gene for the lysine–arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro- α -factor. *Cell* 37, 1075–1089.
- [20] Olsen, A.N., Mundy, J. and Skriver, K. (2002) Peptomics, identification of novel cationic *Arabidopsis* peptides with conserved sequence motifs. *In Silico Biol.* 2, 441–451.
- [21] Yang, H.P., Matsubayashi, Y., Nakamura, K. and Sakagami, Y. (2001) Diversity of *Arabidopsis* genes encoding precursors for phytosulfokine, a peptide growth factor. *Plant Physiol.* 127, 842–851.
- [22] Matsubayashi, Y. and Sakagami, Y. (2006) Peptide hormones in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 57, 649–674.
- [23] Ni, J. and Clark, S.E. (2006) Evidence for functional conservation, sufficiency, and proteolytic processing of the CLAVATA3 CLE domain. *Plant Physiol.* 140, 726–733.
- [24] Antão, C.M. and Malcata, F.X. (2005) Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiol. Biochem.* 43, 637–650.