EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEASE FtsH-m1 EM *Nicotiana tabacum* L.

CAROLINA VIANNA MORGANTE

Bacharel em Ciências Biológicas

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

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Agronomia, Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Setembro – 2003

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Morgante, Carolina Vianna
Expressão heteróloga da protease FtsH-m1 em *Nicotiana tabacum* L. / Carolina Vianna Morgante. - - Piracicaba, 2003.
80 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.
Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar 2. Citogenética 3. DNA 4. Engenharia genética 5. Fumo
6. Melhoramento genético 7. Plantas transgênicas 8. Proteínas I. Título

CDD 633.71

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

OFEREÇO

Àqueles que têm a curiosidade como motivação para a busca de novos conhecimentos

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcio de Castro Silva-Filho pela orientação, atenção e incentivo na realização desse trabalho;

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro;

Aos professores, alunos e funcionários do Departamento de Genética, ESALQ-USP, em especial a Rafael Colombi, Léia de Oliveira e Maria da Glória Eloi da Silva, pelos intensos auxílios;

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, ESALQ-USP e a Ana Lúcia Bonna, pelas constantes ajudas, amizade e boa convivência;

Aos colegas Reinaldo M. Barata e Phellippe A. dos Santos Marbach, companheiros nos estudos sobre as FtsHs;

Às alunas de Iniciação Científica Ana Paula Rizzato e Mariana de Godoy, colaboradoras fundamentais nesse trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular de Plantas, ESALQ-USP, pelo gratificante convívio diário e à Prof^a. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira, por disponibilizar o uso de seu laboratório e substituir meu orientador nos momentos necessários;

Ao Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Peres, pelo incentivo e atenção ao meu trabalho;

Ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Aranha Camargo e a Daniela Truffi do Laboratório de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia, ESALQ-USP, pelas facilidades de seqüenciamento;

A Silvia Costa, do Laboratório de Citogenética Humana, IB-USP, pelo apoio na realização do *Southern Blot*;

A Karina Martins, Maria Rita de Cássia Campos e Sybelle Barreira pela eterna amizade e compreensão que me proporcionam muita felicidade;

De maneira muito especial, a João e Angela Morgante, principais incentivadores de minha vida científica, por quem tenho muita admiração e amor sem fim.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Proteases e a regulação celular em plantas.....	4
2.2 Proteínas AAA.....	6
2.3 A protease FtsH.....	7
2.4 Ortólogas da FtsH em eucariotos.....	10
2.4.1 Ortólogas da FtsH em leveduras.....	10
2.4.2 Ortólogas da FtsH em metazoários.....	13
2.4.3 Ortólogas da FtsH em plantas superiores.....	14
2.4.3.1 As isoformas plastidiais.....	16
2.4.3.2 As isoformas mitocondriais.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Análise assistida por computador da expressão das proteínas FTSHs de cana-de-açúcar.....	19
3.2 Comparação entre seqüências de aminoácidos da FtsH-m1 de plantas.....	20
3.3 Escolha do clone bacteriano no banco de dados do projeto SUCEST Cana-de-Açúcar.....	20
3.4 Confirmação do cDNA recebido.....	21
3.4.1 Isolamento do plasmídeo.....	21
3.4.2 Seqüenciamento do cDNA FtsH-m1.....	22
3.5 Construção gênica.....	24
3.5.1 Montagem da construção gênica.....	24
3.5.2 Transformação de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	26
3.5.3 Confirmação da transformação de <i>Escherichia coli</i>	28
3.5.4 Extração em média escala do plasmídeo pBIN2.35S.FtsHm1.E9.....	29
3.5.5 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29
3.5.6 Confirmação da transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
3.5.7 Sequenciamento da construção pBIN2.35S.FtsHm1.E9.....	30

3.6 Transformação de plantas.....	30
3.7 Verificação da presença de T-DNA nas plantas regeneradas (T0)	32
3.7.1 Extração de DNA pelo método CTAB.....	32
3.7.2 Análise por pela técnica de PCR.....	33
3.7.3 Análise por <i>Southern Blotting</i>	34
3.7.3.1 Digestão do DNA genômico.....	34
3.7.3.2 Separação do DNA genômico digerido por eletroforese em gel de agarose.....	34
3.7.3.3 Transferência e fixação do DNA à membrana.....	35
3.7.3.4 Marcação radioativa da sonda de DNA.....	35
3.7.3.5 Pré-hibridação e hibridação.....	36
3.7.3.6 Lavagem da membrana.....	36
3.8 Avaliação das plantas da geração T1.....	37
3.8.1 Avaliação <i>in vitro</i>	37
3.8.2 Avaliação das plantas T1 na casa de vegetação.....	38
3.8.3 Verificação da presença do T-DNA em plantas T1.....	39
3.9 Avaliação da expressão de FtsH-m1 nas plantas (T1) por experimentos de transcrição reversa (RT-PCR).....	40
3.9.1 Extração de RNA.....	40
3.9.2 Síntese de cDNA.....	40
3.9.3 Amplificação do cDNA alvo.....	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 Análise assistida por computador da expressão das proteínas FtsH em cana-de-açúcar.....	42
4.2 Comparação entre seqüências de aminoácidos da FtsH-m1 de plantas.....	43
4.3 Sequenciamento do cDNA da FtsH-m1.....	46
4.4 Obtenção da construção pBIN2.35S.FtsHm1.E9.....	46
4.5 Avaliação das colônias bacterianas quanto à presença do vetor pBIN2.35S.FtsHm1.E9.....	46
4.6 Obtenção de plantas transformadas geneticamente.....	48
4.7 Verificação da inserção do T-DNA no genoma de plantas T0.....	50
4.7.1 Verificação da presença do transgene por meio da técnica de PCR.....	51
4.7.2 Verificação da presença do transgene por <i>Southern Blotting</i> ...	53
4.8 Seleção de plantas T1 resistentes à canamicina.....	56
4.9 Verificação da inserção do T-DNA no genoma de plantas T1.....	59
4.10 Verificação da expressão do transgene em plantas da geração T1 via RT-PCR.....	60
5 CONCLUSÕES.....	64
ANEXO.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

AAA = ATPases associadas a diversas atividades celulares

AIA = ácido 3-indol-acético

ATP = trifosfato de adenosina

BAP = 6 - benzilaminopurina

cDNA = DNA complementar

CTAB = brometo de cetiltrimetilamônio

Da = Dalton

DMSO = dimetil sulfóxido

dNTP = desoxiribonucleotídeo trifosfato

EST = seqüências expressas (*expressed sequence tag*)

EDTA = ácido etileno diamono tetracético

FtsH = *filamentation temperature-sensitive*

GFP = proteína verde fluorescente

MOPS = ácido 3 (N-morfolino) etanossulfônico

pb = pares de bases

PCR = reação em cadeia da polimerase

(p/v) = peso/volume

RT-PCR = PCR após transcrição reversa

Rubisco = ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase

SDS = sódio dodecil

Sec = via de secreção

SSC = solução salina de citrato de sódio

SUCEST = Projeto Transcriptoma da cana-de-açúcar

T-DNA = DNA de transferência

TBE = tampão Tris borato

TE = tampão Tris EDTA

TMV = vírus do mosaico do tabaco

Tris = Tris(hidroximetil)aminometano

V = volt

EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEASE FtsH- m1 EM *Nicotiana tabacum* L.

Autora: CAROLINA VIANNA MORGANTE
Orientador: Prof. Dr. MARCIO DE CASTRO SILVA-FILHO

RESUMO

As proteases FtsHs, encontradas em eubactérias e eucariotos, pertencem à família das proteínas AAA (ATPases associadas a diferentes atividades celulares) e são classificadas no grupo das metaloproteases. A proteína FtsH foi primeiro identificada em *Escherichia coli* em mutantes *ftsH* (*filamentation temperature sensitive*) como uma protease que age facilitando a degradação de proteínas intermembrânicas e citosólicas. Ortólogas a FtsH já foram encontradas em leveduras, metazoários e plantas. Nestas últimas, a FtsH pode estar localizada nos plastídeos, como uma proteína integral da membrana dos tilacóides ou na membrana interna das mitocôndrias, como em leveduras. Estudos sobre as isoformas plastidiais são abundantes e indicam a participação dessas proteases na renovação da proteína D1, componente do fotossistema II, na resposta hipersensível e na biogênese das membranas do tilacóide. Os estudos sobre as isoformas mitocôndriais são escassos e resumem-se a informações sobre o direcionamento subcelular dessas proteases

e evidências de seu envolvimento no acúmulo da subunidade 9 da ATP-sintase na membrana interna. Com o objetivo de caracterizar a função da FtsH-m1 em plantas, foi realizada a transformação genética de *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens* contendo um plasmídeo em que o cDNA da FtsH-m1 de cana-de-açúcar encontra-se sob o controle de um promotor transcricional constitutivo. Esse plasmídeo apresenta o gene seletivo *nptII*, que confere resistência à canamicina. As plantas regeneradas *in vitro*, 17 no total, foram aclimatadas e transferidas para a casa de vegetação até a produção de sementes. As plantas regeneradas foram testadas quanto à presença do cDNA da FtsH-m1 de cana-de-açúcar por meio da técnica de PCR. A seleção de plantas da geração T1 que possuíam o transgene de interesse foi conduzida em ensaios *in vitro* e em casa de vegetação baseados na resistência dessas plantas à canamicina. A presença do transgene foi confirmada por meio da técnica de PCR. A análise da expressão heteróloga foi realizada via RT-PCR e revelou níveis elevados de RNA mensageiro nas plantas transformadas. Ao todo, foram obtidas dez plantas de fumo em que a presença do transgene de interesse foi confirmada. Não foram observadas alterações fenotípicas marcantes nas plantas das gerações T0 e T1 que pudessem ser relacionadas à expressão heteróloga da FtsH-m1 de cana-de-açúcar. Devem ser realizadas análises mais finas, que podem incluir ensaios para a investigação de possíveis alterações na função mitocondrial, no metabolismo respiratório ou na ultra-estrutura das mitocôndrias em plantas a partir da geração T2.

HETEROLOGOUS EXPRESSION OF FtsH- m1 PROTEASE IN *Nicotiana tabacum* L.

Author: CAROLINA VIANNA MORGANTE
Advisor: Prof. Dr. MARCIO DE CASTRO SILVA-FILHO

SUMMARY

FtsH proteases of eubacteria and eucaryotes belong to the AAA protein family (ATPases associated with different cellular activities) and are included among the metalloproteases. The FtsH protein was first described in *ftsh* (filamentation temperature sensitive) mutant of *Escherichia coli* as a protease involved in the degradation of transmembrane and cytosolic proteins. FtsH-orthologous proteins have been described in yeast, metazoa and plants. In the latter, FtsHs are localized to plastids, as an integral membrane protein of thylakoid or, as in yeast, to the inner mitochondrial membrane. The various studies on the plastid isoforms point to their involvement in the turnover of D1 protein, a member of the photosystem II, in hypersensitive response, and in thylakoid membrane biogenesis. On the other hand, data on the mitochondrial isoforms are scarce and restricted to their subcellular localization, and involvement in the accumulation of ATP-synthase subunit 9 in the inner membrane. With the aim of disclosing the function of FtsH-m1 in plants, *Nicotiana tabacum* plants were transformed by *Agrobacterium tumefaciens* carrying a designed plasmid containing the sugar-cane FtsH-m1 cDNA under the

control of a constitutive-transcription promoter. This plasmid also contained the selectable kanamycin-resistance gene *nptII*. The seventeen plants obtained *in vitro* were acclimatized and kept in a greenhouse until seeding. These plants were then tested by PCR for the presence of the sugar-cane FtsH-m1 cDNA. Selection of T1 plants for the presence of the transgene of interest was carried out both *in vitro* and in the greenhouse, based on kanamycin resistance. The transgene carrier status of the selected plants was confirmed by PCR. Higher levels of FtsH-m1 messenger RNA were detected by RT-PCR in transformed T1 plants. A total of ten tobacco plants carrying the sugar-cane FtsH-m1 cDNA were obtained. T0 and T1 plants did not show conspicuous phenotype alterations which could be related to the heterologous gene expression. Refined analyses are needed in plants from T2 generation on, including the evaluation of mitochondrial structural abnormalities and dysfunction, as well as respiratory alterations.

1 INTRODUÇÃO

A degradação de proteínas é um processo constante na célula e é crucial na remoção de proteínas danificadas, na reciclagem de aminoácidos e na regulação da atividade protéica pela eliminação de moléculas que não são mais necessárias (Estelle, 2001).

Dentre as proteases celulares, as proteínas AAA (ATPases associadas a diferentes atividades celulares) destacam-se pela diversidade de funções essenciais que desempenham as quais incluem a regulação da divisão e diferenciação celular, a degradação de proteínas, a biogênese de organelas, a formação do peroxissomo e o transporte de proteínas mediado por vesículas (Leonhard et al., 1996; Langer, 2000 e Lupas & Martin, 2002).

A protease FtsH, membro da família das proteínas AAA, foi primeiro identificada em *Escherichia coli* em mutantes *ftsH* (*filamentation temperature sensitive*). Trata-se de uma proteína integral da membrana com aproximadamente 71 kDa, sítio catalítico exposto ao citoplasma e atividade dependente de zinco.

Ortólogas a FtsH já foram documentadas em bactérias, leveduras, metazoários e plantas. Em leveduras existem três isoformas dessa proteína, todas localizadas na membrana interna das mitocôndrias onde estão envolvidas em processos respiratórios, na morte celular e na degradação de proteínas malformadas ou de subunidades protéicas não incorporadas.

Em plantas, a FtsH foi primeiro identificada e purificada em *Capsicum annuum* como uma proteína de aproximadamente 72 kDa. Diversas isoformas

da FtsH já foram identificadas em plantas e podem estar localizadas nos plastídeos, como uma proteína integral de membrana dos tilacóides com o sítio catalítico voltado ao estroma (Bailey et al., 2001), ou então na membrana interna de mitocôndrias, como em leveduras.

Marbach et al. (2001), utilizando informações geradas pelo projeto SUCEST- Cana de Açúcar, realizaram um estudo filogenético das proteases FtsH. Os autores identificaram cinco formas dessa proteína em plantas: três plastidiais e duas mitocondriais, sendo estas últimas até então desconhecidas. Os autores ainda sugeriram uma nova nomenclatura para essa subfamília protéica: FtsH-p1, FtsH-p2 e FtsH-p3, para as isoformas plastidiais e FtsH-m1 e FtsH-m2, para as mitocondriais.

Estudos sobre as isoformas plastidiais são abundantes e indicam o envolvimento dessas proteases na renovação da proteína D1, um componente do fotossistema II (Lindahl et al., 2000), na resposta hipersensível (Seo et al., 2000) e na biogênese das membranas do tilacóide (Chen et al., 2000).

Já os estudos sobre as isoformas mitocondriais são escassos. Há na literatura informações sobre o direcionamento subcelular dessas proteases (Marbach & Silva-Filho, 2002 e Morgante et al., 2003) e um outro trabalho em que Kolodziejczak et al. (2002) clonaram e sequenciaram o cDNA de uma FtsH-m2 e sugeriram sua participação no acúmulo da subunidade 9 da ATP-sintase na membrana mitocondrial.

Com o objetivo de caracterizar a função da FtsH-m1 em plantas, informação inédita na literatura, foram geradas plantas de *Nicotiana tabacum* expressando essa protease sob controle de um promotor transcricional forte. Espera-se que estudos morfológicos, anatômicos, fisiológicos e bioquímicos de plantas que apresentem a expressão heteróloga da protease contribuam para o esclarecimento do papel da FtsH-m1 nos processos em que está envolvida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As células eucariotas, constituintes de algas, fungos, protozoários, plantas e animais têm como característica a compartimentalização subcelular em estruturas envoltas por membranas que garantem a manutenção de condições interiores específicas, permitindo que cada subcompartimento desempenhe uma função particular no interior da célula.

Dentre as organelas citoplasmáticas, as mitocôndrias e os plastídeos destacam-se por participarem do metabolismo energético celular e por possuírem seu próprio material genético. Isso implica em que essas organelas são capazes de sintetizar parte de suas proteínas, porém seu funcionamento esta sob controle nuclear.

A maioria das proteínas mitocondriais e plastidiais é codificada por genes nucleares, sintetizada nos ribossomos citosólicos e direcionada para as respectivas organelas. Para que esse direcionamento ocorra de forma efetiva e organizada, as proteínas possuem, em sua estrutura, seqüências específicas denominadas peptídeos de trânsito. Quando referidas aos cloroplastos, essas seqüências, contendo entre 20 a 120 resíduos, são denominadas peptídeo-sinal (Jarvis & Soll, 2002). Nas mitocôndrias, elas são denominadas pré-sequência e caracterizam-se pela formação de α -hélices anfifílicas (Stojanovski et al., 2003). Ambas estão presentes na porção N-terminal das proteínas, são hidrofílicas e ricas em resíduos de aminoácidos básicos hidroxilados. Apesar da maioria das proteínas mitocondriais e cloroplastidiais serem transportadas especificamente para cada organela, pesquisas demonstraram que uma mesma proteína pode

ser direcionada simultaneamente para mais de um compartimento subcelular num mecanismo que envolve a composição das seqüências de direcionamento e/ou controles transcricionais e traducionais (Chabregas et al., 2003 e Silva-Filho, 2003).

As proteínas sintetizadas no citosol são direcionadas às organelas na forma de precursores e adquirem sua conformação final somente no local em que são funcionais. Dessa forma, as organelas possuem, em sua membrana, um complexo sistema de controle de qualidade que facilita o dobramento de proteínas e garante a remoção de polipeptídeos malformados. Esse ponto é exemplificado pelas mitocôndrias, que possuem chaperonas e proteases em seus diversos subcompartimentos.

2.1 Proteases e a regulação celular em plantas

As proteases podem ser definidas como enzimas que hidrolisam ligações peptídicas num processo, na maioria das vezes, dependente de ATP. Essas enzimas podem ser classificadas em função da maneira em que clivam a cadeia polipeptídica. As endopeptidases, ou proteinases, reconhecem um sítio de clivagem na região interna da proteína, enquanto as exopeptidases iniciam o processo de degradação pelas extremidades protéicas, nas regiões N e/ou C terminais.

Uma outra classificação para as proteases baseia-se na natureza de seus sítio-ativos. Podem ser divididas em aspartato-proteases, cisteíno-proteases, metaloproteases, serino-proteases e treonino-proteases (Hooper, 2002).

O período de atividade da maioria das proteínas celulares é inferior ao tempo de vida dos organismos que as possuem. Aproximadamente metade das proteínas de uma planta é renovada a cada quatro a sete dias. Isso significa que a maioria das proteínas é degradada por proteases celulares.

A degradação de proteínas, um processo constante na célula, é crucial na remoção de proteínas danificadas, na reciclagem de aminoácidos e na regulação da atividade protéica pela eliminação de moléculas que não são mais necessárias. Estudos recentes revelaram a importância da atividade proteolítica em processos como a morte celular programada (Tian et al., 2000; Korthout et al., 2000), a fotomorfogênese (Kwok et al., 1999), o controle do ritmo circadiano (Xu et al., 2003; Kim et al., 2003), a via de transdução de sinais (Callis & Viestra, 2000) e a resposta de defesa em plantas (Liu et al., 2001; Pechan et al., 2002).

As proteases agem na regulação de diversos processos biológicos. São capazes de promover o acúmulo de subunidades de complexos protéicos oligoméricos em quantidades estequiométricas e manter a correta proporção de enzimas e seus cofatores. Além disso, são capazes de controlar vias metabólicas por meio da degradação de proteínas regulatórias ou de enzimas que catalizam passos iniciais de uma cascata metabólica (Buchanan et al., 2000).

Uma importante função desempenhada pelas proteases é a remoção de proteínas danificadas ou malformadas. Essas proteínas estão constantemente presentes na célula como resultado de mutações, doenças, estresses, danos oxidativos e erros na síntese ou no dobramento protéico. As células não suportam o acúmulo dessas proteínas que são removidas por processos altamente específicos e controlados. Existem mecanismos celulares precisos para a marcação e reconhecimento da proteína-alvo que permitem sua degradação específica no momento correto (Estelle, 2001).

Considerando-se o grande número de eventos celulares em que as proteases atuam, é natural concluir que existem diferentes vias para a degradação protéica. Na célula vegetal, por exemplo, cada compartimento celular, incluindo vacúolo, núcleo, plastídeos e mitocôndrias, possui sistemas distintos para a proteólise. Um mecanismo bastante estudado é o de degradação de proteínas citosólicas e nucleares pelo proteossomo, um

complexo protéico oligomérico com aproximadamente 1,5 MDa que compreende cerca de 5% do proteoma de *Arabidopsis thaliana*. As proteínas que seguem essa via de degradação são destinadas ao proteossomo após serem covalentemente modificadas pela ligação de ubiquitinas em suas estruturas (Viestra, 2003). Já os mecanismos da proteólise em cloroplastos e mitocôndrias são menos conhecidos, mas vêm sendo assunto de intensas investigações (Adam & Clarke, 2002).

2.2 Proteínas AAA

As enzimas que se ligam ao ATP e promovem sua hidrólise desempenham um importante papel na célula, uma vez que são capazes de transferir a energia química estocada às atividades biológicas.

Dentre as proteínas ATP-dependentes, as proteínas AAA (ATPases associadas a diferentes atividades celulares) formam uma classe de proteases que desempenham funções essenciais que incluem a regulação da divisão e diferenciação celular, a degradação de proteínas, a biogênese de organelas, a formação do peroxissomo e o transporte de proteínas mediado por vesículas (Leonhard et al., 1996; Langer, 2000 e Lupas & Martin, 2002).

A presença das proteínas AAA já foi descrita em Archea, Bacteria e Eukaria. Essas proteases podem ser encontradas em diversos locais das células: podem ser citosólicas ou estarem associadas a membranas. Além disso, são funcionais num estado monomérico ou em diferentes estados multiméricos (Langer et al., 2001) e possuem habilidade de formar anéis, geralmente hexâmeros (Lupas & Martin, 2002).

A estrutura atômica das proteínas AAA é bastante conservada e a interação entre as subunidades é o que garante a ação enzimática dessas proteínas que são capazes de utilizar a energia do ciclo ATPásico para dissociar interações estáveis entre proteínas (Vale, 2000).

Os membros da família AAA apresentam seqüências altamente conservadas ao longo da evolução e estão presentes nas mitocôndrias de todos os eucariotos, o que indica uma função celular importante (Arnold & Langer, 2002). Essas proteínas caracterizam-se por possuírem uma (tipo I) ou duas (tipo II) cópias do módulo AAA, um domínio ATPásico definido por uma seqüência conservada com 230 a 250 aminoácidos. Esse domínio inclui os motivos *Walker A* e *B*, relacionados com a ligação ao ATP, e a segunda região de homologia (SRH), motivo bastante conservado envolvido na hidrólise do ATP (Karata et al., 1999).

Segundo Patel & Latterich (1998), as proteínas AAA podem ser classificadas em quatro diferentes grupos: proteínas associadas com a biogênese de organelas; proteínas regulatórias do proteossomo; metaloproteases e; proteínas sem função conhecida.

2.3 A protease FtsH

As proteases FtsHs fazem parte da família das proteínas AAA e são classificadas no grupo das metaloproteases. Seus membros são encontrados em eubactérias e eucariotos e são caracterizados pela presença, em sua porção C-terminal, de um motivo conservado de ligação a um metal (HExxGH), uma região conservada localizada após o módulo AAA (Figura 1a).

Esse motivo foi identificado como sendo o centro proteolítico da proteína. Após essa região, encontra-se um motivo conservado (CC) cuja seqüência sugere a formação de uma estrutura do tipo *leucine zipper coiled coil* (Langer, 2000).

A FtsH é uma proteína integral de membrana cujo sítio catalítico está voltado para o citoplasma (Figura 1b). Em sua região N-terminal podem existir um ou dois domínios hidrofóbicos transmembrânicos que garantem a ancoragem da proteína em seu local de ação (Ogura & Wilkinson, 2001).

A FtsH foi primeiro identificada em *Escherichia coli* em mutantes *ftsH* (*filamentation temperature sensitive*). Esses mutantes não são capazes de formar o septo que separa as células ao término da divisão celular, quando cultivados em altas temperaturas (de Boer et al., 1990; Tomoyasu et al., 1993). Em *Escherichia coli*, essa protease tem aproximadamente 71 kDa, atividade proteolítica dependente de zinco e age facilitando a degradação de proteínas intermembrânicas e citosólicas, tais como proteínas malformadas e diferentes reguladores da expressão gênica (Gottesman, 1996).

Dentre os substratos da FtsH estão proteínas de membrana não complexadas, como o componente F_0 da ATP-sintase (Akiyama et al., 1996) e a translocase SecY (Kihara et al., 1995). Entre os substratos citoplasmáticos estão três proteínas regulatórias: LpxC, uma enzima envolvida no metabolismo de lipídeos (Ogura et al., 1999); o fator sigma 32, σ^{32} , que regula a taxa transcricional das proteínas *heat shock* (Herman et al., 1995; Tomoyasu et al., 1995) e; os ativadores transcricionais λ cII e λ cIII do fago lambda, que são essenciais no desencadeamento do ciclo lisogênico em células bacterianas infectadas (Shotland et al., 1997).

A degradação pela FtsH é eficiente apenas quando o substrato é uma proteína com baixa estabilidade termodinâmica. Como essa protease não apresenta capacidade de desdobrar proteínas, é o estado de dobramento das proteínas-alvo que determina a degradação (Herman et al., 2003). A FtsH degrada substratos da membrana plasmática nas duas direções, tanto de N a C como de C a N terminal. Essa foi a primeira evidência de que ATPases AAA são capazes de desdobrar e translocar os substratos a partir das duas extremidades (Chiba et al., 2002). Essa protease também pode agir como chaperona. Além de possuir atividade proteolítica, a FtsH é capaz de mediar inserções de proteínas em membranas e oligomerizar ou desmontar complexos protéicos (Suzuki et al., 1997).

Figura 1 - (a) Esquema dos domínios de uma protease AAA. SD, sinal de direcionamento; TM, segmento transmembrânico; WA, Walker A; WB, Walker B; SRH, segunda região de homologia; HExxGH, sítio de ligação a metal e; CC, *coiled coil*; (b) Disposição da protease na membrana plasmática (N, região amino-terminal; C, região carboxi-terminal)

Fonte: modificado de Langer (2000)

A FtsH é a única protease essencial em *Escherichia coli* além de ser a única protease ATP-dependente universalmente conservada em bactérias (Karzai et al., 2000).

2.4 Ortólogas da FtsH em eucariotos

Em eucariotos, diversas proteínas ortólogas da FtsH já foram identificadas e caracterizadas. Essas estão localizadas nas mitocôndrias ou plastídeos, sendo codificadas por genes nucleares e direcionados pós-traducionalmente para as respectivas organelas por meio de seqüência de direcionamento específica (Hugueney et al., 1995; Leonhard et al., 2000).

2.4.1 Ortólogas da FtsH em leveduras

Em leveduras, três proteínas do tipo FtsH foram identificadas, todas mitocondriais: YME1 (*Yeast mitochondrial escape*), YTA10 e; YTA12 (*Yeast tat-binding analogs*). A proteína YME1 forma um complexo oligomérico cujos sítios catalíticos estão expostos para o espaço intermembrânico (Langer, 2001) (Figura 2).

Figura 2 - Disposição dos ortólogos à FtsH na membrana interna de mitocôndrias de levedura. Essas proteases formam hexâmeros que podem ter sítios catalíticos voltados para o espaço intermembranar (*i*-AAA) ou para a matriz mitocondrial (*m*-AAA)

Fonte: modificado de Langer (2000)

Células de *Saccharomyces cerevisiae* mutantes para *yme-1* apresentam elevada taxa de escape de DNA mitocondrial para o núcleo, atividade respiratória deficiente quando submetidas a altas temperaturas, deficiência no crescimento quando cultivadas a baixas temperaturas em meio com glicose e crescimento debilitado quando o DNA mitocondrial é eliminado. Além disso, o acúmulo de mitocôndrias pontuadas está relacionado com a ausência da proteína YME1, o que revela sua participação na manutenção da morfologia dessas organelas (Thorsness et al., 1993; Thorsness & Fox, 1993; Campbell et al., 1994; Weber et al., 1996; Arnold & Langer, 2002 e Kominsky et al., 2002).

Pearce & Sherman (1995) evidenciaram a ação de YME1 em processos respiratórios na mitocôndria, uma vez que essa protease é capaz de degradar subunidades não incorporadas da citocromo-oxidase cuja montagem é dependente do citocromo c.

Manon et al. (2001) sugeriram a participação de YME1 na morte celular de *S. cerevisiae*. A expressão de Bax, uma proteína pro-apoptótica, induz a liberação do citocromo c que é acompanhada por um decréscimo na quantidade da citocromo-oxidase. Esse processo ocorre pela ativação de YME1 que tem como substrato a subunidade 2 (COX2) da citocromo c-oxidase.

YME1 também é capaz de reconhecer o estado de dobramento de domínios expostos de proteínas e degrada especificamente proteínas malformadas da membrana. O reconhecimento e a ligação ao substrato são mediados por uma região amino-terminal do domínio AAA, o que indica que essa região apresenta atividade de chaperona (Leonhard et al., 1999).

Já YTA10 e YTA12 formam heterodímeros com sítios catalíticos voltados para a matriz mitocondrial, *m*-AAA (Leonhard et al., 1996) (Figura 2) Essas proteases degradam cadeias polipeptídicas não incorporadas a complexos protéicos na matriz e participam da biogênese de complexos respiratórios da membrana interna de mitocôndrias. YTA10 e YTA12 controlam a expressão de subunidades da cadeia respiratória, como a subunidade 1 da citocromo-oxidase (COX1) e o citocromo b (COB), duas proteínas codificadas por genes mitocondriais que apresentam introns. Em mutantes para essas *m*-AAA proteases, o *splicing* dos genes *COX1* e *COB* é deficiente, porém a transcrição e a tradução ocorrem normalmente. Isso indica a ação específica dessas proteases no processamento do transcrito primário desses genes (Arlt et al., 1998).

Além disso, Paul & Tzagoloff (1995) demonstraram que mutações em YTA10 e YTA12 levam a deficiência respiratória causada pelo atraso na integração da citocromo-oxidase e da ubiquinol-citocromo c-redutase,

subunidades da F_0F_1 ATP-sintase, evidenciando o papel dessas proteases na montagem desse complexo.

Essas três proteases mitocondriais provavelmente têm atividades proteolíticas que se sobrepõem, mas a posição ocupada por essas proteínas na membrana interna da mitocôndria pode constituir o fator que determina o substrato que cada uma delas degrada (Arnold & Langer, 2002).

2.4.2 Ortólogas da FtsH em metazoários

A análise dos genomas completamente seqüenciados de *Caenorhabditis elegans* e de *Drosophila melanogaster* indicou a presença de três proteases mitocondriais homólogas à FtsH bacteriana (Juhola et al., 2000), porém não há estudos sobre mutantes para essas proteínas.

Em humanos, mutações em um gene ortólogo aos de FtsHs de levedura, cujo produto também destina-se à membrana interna de mitocôndrias, estão relacionadas com a paraplegia hereditária, uma doença neurodegenerativa com herança autossômica recessiva (Casari et al., 1998; Banfi et al., 1999; Coppola et al., 2000). Shah et al. (2000) demonstraram que leveduras mutantes para o gene *yme1* restabeleceram o fenótipo selvagem após transformação das células com o ortólogo humano. Essa complementação gênica indica que YME1 desempenha uma função filogeneticamente conservada no metabolismo de proteínas nas mitocôndrias.

2.4.3 Ortólogas da FtsH em plantas superiores

Em plantas, a FtsH foi primeiro identificada e purificada em *Capsicum annuum* como uma proteína de aproximadamente 72 kDa envolvida na fusão de vesículas ou na translocação de proteínas da membrana (Hugueney, et al., 1995).

Diversas isoformas da FtsH em plantas já foram identificadas e podem estar localizadas nos plastídeos, como uma proteína integral de membrana dos tilacóides (Figura 3) com o sítio catalítico voltado ao estroma (Bailey et al., 2001) ou então na membrana interna de mitocôndrias com o sítio catalítico voltado para o espaço intermembranas ou para a matriz mitocondrial, como em leveduras (Figura 2).

Figura 3 - Esquema mostrando a localização e a disposição da protease FtsH na membrana do tilacóide de plastídeos

Fonte: modificado de Langer (2000)

Analisando as informações geradas pelo projeto de sequenciamento do genoma de *Arabidopsis thaliana*, Adam et al. (2001) e Adam & Clarke (2002) identificaram nove isômeros da protease FtsH, os quais nomearam FtsH1 a FtsH9.

Marbach et al. (2001) também sugeriram uma nomenclatura para os ortólogos da FtsH em plantas superiores. Em estudos de reconstrução filogenética das proteínas FtsHs de cana-de-açúcar, utilizando os dados gerados pelo Projeto Sucest Cana-de-Açúcar, os autores identificaram cinco grupos filogeneticamente relacionados de proteínas do tipo FtsH, sendo dois deles localizados nas mitocôndrias (FtsH-m1 e FtsH-m2) e os outros três localizados nos plastídeos (FtsH-p1, FtsH-p2 e FtsH-p3). Essa última nomenclatura engloba uma maior quantidade de isoformas da FtsH e será adotada neste trabalho.

Marbach & Silva-Filho (2002) e Morgante et al. (2003) ainda conduziram estudos sobre a localização subcelular de certas proteínas FtsH de cana-de-açúcar e *Arabidopsis thaliana*, respectivamente. Nesses estudos, a região 5' do cDNA das FtsHs, contendo a seqüência de direcionamento e os segmentos transmembrânicos, foram fusionadas ao gene que codifica a proteína verde fluorescente (GFP) sob controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor. Células de epiderme de cebola foram transformadas e a expressão transiente da GFP foi visualizada em microscópio de fluorescência. Os resultados confirmaram *in vivo* a predição da localização subcelular dessas proteínas que fora realizada *in silico* com auxílio do programa *Target P* (Emanuelsson et al., 2000).

2.4.3.1 As isoformas plastidiais

A identificação e a caracterização de uma ortóloga da FtsH em plantas (FtsH-p2) por Hugueney et al. (1995) permitiu o desenvolvimento de diversas pesquisas no assunto, a grande maioria envolvendo as isoformas plastidiais.

Lindahl et al. (1996) identificaram uma outra isoforma plastidial (FtsH-p1) por meio de imunoenaios utilizando o extrato protéico de folhas de espinafre e um anticorpo específico para o reconhecimento da FtsH bacteriana. A proteína foi caracterizada como sendo integral da membrana do tilacóide com expressão dependente de luz e participa da degradação de proteínas solúveis do estroma e da membrana do tilacóide.

Ostersetzer & Adam (1997) evidenciaram o papel dessa mesma FtsH na degradação de formas não incorporadas da proteína Rieske FeS (RISP), uma subunidade do complexo citocromo *b₆f*. Os autores ainda demonstraram que essa degradação é estimulada pelo metal zinco e totalmente dependente de ATP.

Essa mesma ortóloga plastidial (FtsH-p1), localizada na membrana do tilacóide, tem função relacionada com a renovação da proteína D1, um componente do fotossistema II que sofre freqüentes danos foto-oxidativos irreversíveis. A protease FtsH-p1 participa da degradação da proteína danificada, garantindo sua substituição por uma nova proteína funcional (Spetea et al., 1999; Lindahl et al., 2000).

Seo et al. (2000) ainda demonstraram a participação da FtsH-p1 na resposta hipersensível. Plantas infectadas pelo vírus do mosaico do fumo (TMV) apresentam, após a infecção, morte das células infectadas seguida de lesões necróticas foliares, num processo acompanhado pela redução nos níveis da proteína FtsH. Foi observado que, após a infecção, plantas transgênicas super-expressando essa proteína apresentam lesões necróticas mais acentuadas, quando comparadas a plantas com expressão diminuída em relação à planta selvagem. Os autores concluíram que a diminuição dos níveis

de expressão da FtsH-p1 em plantas infectadas pelo TMV resulta na perda de funções dos cloroplastos (a proteína D1 não é renovada) e acelera a resposta hipersensível.

A análise da expressão da FtsH-p1 sob diferentes condições ambientais foi realizada por Ivashuta et al. (2002) em alfafa, *Medicago sativa*. Plantas cultivadas em alta luminosidade ou a 2° C apresentaram níveis elevados do RNA mensageiro e da proteína FtsH-p1, o que indica uma regulação positiva nessas condições.

Em estudos sobre o direcionamento da FtsH-p1 de tomate, Barata (2003) concluiu que a proteína é exportada aos tilacóides por um mecanismo incomum que difere dos processos conhecidos de direcionamento de proteínas às membranas. O clássico motivo RRXFLK, que caracteriza o direcionamento aos tilacóides, não foi encontrado nessas proteínas. Além disso, o autor complementou suas análises, demonstrando que a região promotora da FtsH-p1 de tomate responde diferencialmente a estímulos como luz e hormônios vegetais.

Takechi et al. (2000) e Chen et al. (2000) demonstraram que mutações no gene *var2* de *Arabidopsis thaliana*, causam um fenótipo variegado nas folhas em consequência da perda de uma proteína presente na membrana do tilacóide, identificada como pertencente à família das FtsHs, mais especificamente uma FtsH-p2.

Chen et al. (2000) revelaram que VAR2 está envolvida no desenvolvimento dos cloroplastos, mais especificamente na biogênese das membranas do tilacóide. Takechi et al. (2000) observaram que nas regiões amarelas das folhas mutantes, há acúmulo de proteínas fotossintéticas danificadas. Os autores propõem a participação dessa proteína na diferenciação de plastídeos por evitar a foto-oxidação parcial dos cloroplastos em desenvolvimento. Bailey et al. (2002), em estudos com *Arabidopsis thaliana*, concluíram que a FtsH-p2 também é necessária à degradação da proteína D1 *in vivo*.

2.4.3.2 As isoformas mitocondriais

Estudos abrangendo as isoformas mitocondriais de plantas são escassos. Na literatura há apenas um trabalho mostrando a clonagem e o sequenciamento de um cDNA de uma FtsH-m2 de ervilha que apresenta similaridade significativa com as proteases m-AAA de leveduras (Kolodziejczak et al., 2002). Os autores demonstraram que a proteína é importada e processada corretamente em mitocôndrias isoladas e que expõe seu domínio chaperona à matriz mitocondrial. Além disso, foi demonstrado que a protease de ervilha é capaz de complementar leveduras mutantes para *yta10* ou *yta12*. Baseando-se em ensaios bioquímicos, os autores ainda sugeriram a participação dessa protease, FtsH-m2, no acúmulo da subunidade 9 da ATP-sintase na membrana mitocondrial.

Considerando que há em plantas um grupo de proteases mitocondriais, FtsH-m1, ainda não explorado nas pesquisas, estudos sobre essas proteases são bastante promissores, visto que a função de suas ortólogas desempenham funções essenciais em leveduras.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise assistida por computador da expressão das proteínas FtsHs de cana-de-açúcar

O projeto SUCEST Cana-de-Açúcar (<http://sucest.lad.ic.unicamp.br/en/>) teve como objetivo o seqüenciamento em larga escala de seqüências expressas (EST) de cana-de-açúcar. Ao final, foram identificados cerca de 40.000 agrupamentos de seqüência expressas provenientes de 27 bibliotecas de cDNA preparadas de diversos tecidos da planta (Vettore et al., 2001).

A partir das informações geradas por esse projeto, Marbach et al. (2001) identificaram os agrupamentos ("clusters") referentes às diversas isoformas da FtsH de plantas. Esses dados foram utilizados numa análise assistida por computador da expressão das proteínas FtsHs de cana-de-açúcar.

Considerando-se que as etapas para a construção de uma biblioteca de cDNA ocorrem ao acaso, pode-se assumir que a quantidade de uma determinada EST em uma biblioteca específica é proporcional ao nível de expressão dos mRNAs da mesma seqüência. Sendo assim, foi feita uma correlação entre o número de ESTs das diferentes isoformas da FtsH e o número total de ESTs em cada uma das bibliotecas de cDNA do projeto.

3.2 Comparação entre seqüências de aminoácidos da FtsH-m1 de plantas

Com o objetivo de se investigar o grau de conservação da protease FtsH-m1 em plantas, as seqüências de aminoácidos da FtsH-m1 de cana-de açúcar (SCAGRT2039E08.g), *Arabidopsis thaliana* (AAC31223), arroz (BAB91903.1) e tomate (TC118132 e TC118133) foram alinhadas e comparadas pelo programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Pelo fato de não haver no banco de dados uma seqüência completa do cDNA da FtsH-m1 de tomate, as duas seqüências indicadas foram fusionadas para a obtenção de uma completa.

3.3 Escolha do clone bacteriano no banco de dados do projeto SUCEST Cana-de-Açúcar

Um clone contendo a seqüência completa do cDNA correspondente à proteína FtsH-m1 SCAGRT2039E08.g foi obtido junto ao banco do projeto. Esse material foi recebido pelo laboratório na forma de clone bacteriano com a seqüência de interesse (Figura 4).

Figura 4 - Mapa de restrição simplificado do plasmídeo enviado pelo Projeto SUCEST-Cana de Açúcar. O fragmento de cDNA (em vermelho) foi inserido no plasmídeo pSPORT (em azul) com a extremidade 5' voltada para o sítio da enzima *Sal*I e a 3' voltada para o da *Not*I

3.4 Confirmação do cDNA recebido

3.4.1 Isolamento do plasmídeo

O plasmídeo pSPORT contendo o cDNA FtsH-m1 foi isolado por meio de uma minipreparação pelo método de lise alcalina, modificado de Sambrook & Russel (2001): uma colônia bacteriana foi crescida em 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina 100 mg/L por 14 horas, a 37° C. A cultura bacteriana foi

transferida para um tubo de 1,7 mL e centrifugada por 5 minutos a 5000 g. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi ressuspendido em 150 μ L da solução I gelada (50 mM glicose, 25mM Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM EDTA). Em seguida, foram adicionados 150 μ L da solução II (0,2M NaOH e 1% SDS) e a amostra foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Completado esse período, foram adicionados 150 μ L da solução III (3M KOAc pH5,5) e o conteúdo do tubo foi misturado por inversão e incubado em gelo por 10 minutos. A amostra foi centrifugada por 15 minutos, 20.000 g, a 4° C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,7 mL. O volume de 400 μ L de clorofórmio saturado foi adicionado e misturado por inversão. A amostra foi centrifugada por 5 minutos, 20.000 g, à temperatura ambiente e, em seguida, a fase aquosa, a superior, foi transferida para um novo tubo. À essa fase, adicionaram-se 400 μ L de fenol. A amostra foi misturada por inversão e centrifugada por 5 minutos, 20.000 g, à temperatura ambiente. Novamente a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o DNA foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto. A amostra foi incubada por 15 minutos no gelo e centrifugada por 10 minutos, 20.000 g, a 4° C. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com etanol 70%. A amostra foi centrifugada por 5 minutos, 20.000 g, a 4° C, o sobrenadante foi removido e o DNA foi ressuspendido em 50 μ L de água deionizada estéril. O DNA extraído foi avaliado e quantificado após eletroforese (5V/cm por 30 minutos) em gel de agarose 0,8% com tampão TBE 0,5X (45mM Tris-HCl e 1mM EDTA) e coloração com brometo de etídeo.

3.4.2 Seqüenciamento do cDNA FtsH-m1

O cDNA em questão, com aproximadamente 2,8 kpb, foi seqüenciado totalmente por meio da técnica *primer walking*. Para tanto, foram utilizados seis iniciadores, dois deles complementares a seqüências do vetor e os outros quatro com seqüências complementares ao próprio cDNA FtsH-m1 (Tabela 1).

Tabela 1. Iniciadores utilizados na técnica de *primer walking*

Iniciador	Seqüência de nucleotídeos (5'- 3')	Complementaridade
UP (F)	GTAAAACGACGGCCAGT	Vetor
RP (R)	AACAGCTATGACCATG	Vetor
m1- 291 (F)	GACCAACAAAAGCAATC	cDNA FtsH-m1
m1- 841 (F)	CGAGGATAGAGGAATCA	cDNA FtsH-m1
m1- 1630 (R)	GCTCACTACCCATCATG	cDNA FtsH-m1
m1- 2217 (R)	CTCCTGTTGGTGTGTTTGT	cDNA FtsH-m1

Para a reação de seqüenciamento, foi utilizado o *kit DYEnamic ET Terminator Sequencing* (Amersham Biosciences). Neste procedimento, 2 µL de *mix* (contendo dNTP, terminadores ddNTPs associados a substâncias fluorescentes e DNA polimerase) foram adicionados a 3,2 pM do iniciador de interesse e 200 a 500 ng de DNA. O volume da reação foi completado para 10 µL com água deionizada estéril. A reação foi levada a um termociclador PTC-100, MJ - Research), seguindo o ciclo 95° C por 20 segundos, 50° C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, que foi repetido por 30 vezes.

Após essa etapa, o DNA amplificado foi purificado e precipitado. Para tanto, 1 µL do tampão acetato de sódio/EDTA (fornecido no *kit*) e 40 µL de etanol 95% foram adicionados à reação. A amostra foi incubada por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente e centrifugada por 15 minutos, 20.000 g. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70%. A amostra foi centrifugada por 5 minutos, 20.000 g, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o precipitado secado a 65° C. O material foi seqüenciado automaticamente no equipamento ABI PRISM 377 (Applied Biosystems), no laboratório de Entomologia e Zoologia Agrícola, sob coordenação do prof. Dr. Luiz Eduardo Aranha Camargo.

As seqüências geradas foram alinhadas pelo programa Phred-Phrap (<http://www.phrap.org>) para a obtenção de uma seqüência consenso.

3.5 Construção gênica

Para a super-expressão da FtsH-m1, foi feita uma construção em que o respectivo cDNA encontra-se sob o controle do promotor constitutivo forte 35S do vírus do mosaico da couve-flor. Nessa construção, foi utilizado o plasmídeo binário Bin2.35S.cat.E9' (Chaumont et al., 1994) (Figura 5).

3.5.1 Montagem da construção gênica

O plasmídeo Bin2.35S.cat.E9' foi isolado em uma preparação à média escala, utilizando-se o *kit* Qiagen midi-prep, seguindo o protocolo para extração de cosmídio, recomendado pelo fabricante. O plasmídeo extraído foi digerido com a enzima de restrição *Hind* III (Invitrogen) e tratado com a enzima *Large fragment of DNA Polimerase I / Klenow Fragment* (Invitrogen), que também tem atividade no sentido 3'-5'. Essa enzima pode ser utilizada no preenchimento das extremidades coesivas geradas pela digestão do DNA com enzimas de restrição a fim de se obterem extremidades lisas. Em seguida, o plasmídeo foi digerido com *Bam*H I (Invitrogen) para a liberação do gene *cat*. Todos os procedimentos seguiram as orientações do fornecedor das enzimas. O plasmídeo linearizado sem o gene *cat* foi purificado em gel de agarose com o auxílio do *kit Qiaex II Gel Extraction* (Qiagen). Paralelamente, o plasmídeo pSPORT1-m1 foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*H I e *Sma* I (Invitrogen) para liberação do cDNA-m1. Este foi purificado em gel de agarose, também com o auxílio do *kit Qiaex II Gel Extraction* (Qiagen), conforme recomendações do fabricante. O fragmento de cDNA isolado e o vetor linearizado foram quantificados após eletroforese (5V/cm por 30 minutos) em

gel de agarose 0,8% com tampão TBE 0,5X e coloração com brometo de etídeo.

Figura 5 - Mapa de restrição simplificado do plasmídeo pBIN2.35S.cat.E9'. Este plasmídeo contém: o gene *nptII* que codifica a neomicina fosfotransferase e confere resistência à canamicina em plantas, em preto; as extremidades do T-DNA (DNA de transferência), em azul claro; o promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico do fumo, em vermelho; o gene cloranfenicol acetiltransferase (*cat*), em verde, e; a sequência 3' não traduzida da Rubisco, contendo o sítio de poliadenilação (E9'), em magenta

O fragmento de cDNA-m1 foi inserido no plasmídeo binário em uma reação de ligação em que foi utilizada a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen). As quantidades utilizadas de fragmento e vetor obedeceram a proporção de 3:1, respectivamente. Os volumes de enzima e tampão foram estabelecidos conforme especificações do fabricante. A reação de ligação foi incubada por 16

horas, a 16° C. Na Figura 6 estão esquematizados os procedimentos seguidos na obtenção da construção.

3.5.2 Transformação de células competentes de *Escherichia coli*

Obtiveram-se células competentes de *Escherichia coli* JM109, obedecendo o protocolo modificado de Smbrook & Russel (2001) descrito a seguir: uma colônia de bactéria foi cultivada em 5 mL meio Luria-Bertani líquido, LB (1% (p/v) de bactotripton, 0,5% (p/v) de extrato de levedura, 1% de NaCl, pH 7,5) sob agitação (180 rpm), a 37° C, por 12 horas. Após esse período, 1 mL da cultura bacteriana foi adicionado a 50 mL de meio LB líquido, mantido a 37° C, sob agitação até a cultura atingir uma densidade óptica, medida em um espectrofotômetro, de 0,5 a 0,6, num comprimento de onda de 600 nm. Nesse ponto, 500 µL de MgCl₂ 1M estéril foram adicionados à cultura que permaneceu incubada em gelo por 15 minutos. O material foi distribuído em tubos do tipo SS-34 e centrifugado a 1200 g, a 4° C, por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 15 mL da solução RFI gelada (30 mM KOAc, 50 mM MnCl₂, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂ e 15% de glicerol). A solução foi incubada em gelo por 10 minutos e centrifugada a 1200 g, 4° C, por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi ressuscitado em 2 mL da solução RFII gelada (10 mM Na-MOPS pH7,0, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl e 15% de glicerol). O material foi aliquotado em tubos contendo 150 µL cada um e armazenado a - 80° C por até seis meses.

Figura 6 - Etapas seguidas para a obtenção da construção pBIN2.35S.FtsHm1.E9. *nptII*, gene que codifica a neomicina- fosfotransferase, em preto; BD e BE bordas direita e esquerda, respectivamente, do DNA de transferência, em azul claro; promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico do fumo, em amarelo; gene cloranfenicol-acetiltransferase (*cat*), em magenta e; a seqüência 3' não traduzida da Rubisco, contendo o sítio de poliadenilação (E9'), em verde

Para a transformação bacteriana, 5 μL da reação de ligação foram adicionados a 150 μL de células competentes. A mistura foi incubada por 30 minutos no gelo e, em seguida, as células foram submetidas a um choque térmico de 42° C, por 2 minutos, e novamente incubadas em gelo. Adicionou-se 1 mL de meio LB líquido e a suspensão celular foi mantida por uma hora, a 37° C, sob agitação. Após esse período, centrifugou-se o material por 5 minutos a 5000 g e cerca de 900 μL do sobrenadante foram removidos. As células foram ressuspendidas no meio restante e 30 μL dessa suspensão foram distribuídos em placas de Petri com meio LB sólido contendo canamicina 100 mg/L. As placas foram incubadas a 37° C, por 20 horas.

3.5.3 Confirmação da transformação de *Escherichia coli*

As colônias de bactéria que cresceram em meio seletivo foram transferidas para uma outra placa de Petri contendo LB e canamicina 100 mg/L e utilizadas diretamente numa reação de PCR. Cada colônia bacteriana foi ressuspendida em 17,8 μL de água deionizada estéril. A essa suspensão foram adicionados 1,25 μL de DMSO, 2,5 μL de tampão de PCR 10X, 0,75 μL de MgCl_2 50 mM, 0,5 μL de dNTP 10 mM, 1 μL dos iniciadores m1- 291 e m1-1630 (Tabela 1) a 5 mM e 0,2 μL de Taq DNA Polimerase Recombinante 5 U/ μL (Invitrogen). A reação foi levada a um termociclador (PTC - 100, MJ - Research) e o ciclo a seguir foi repetido por 30 vezes: 94° C, 1 minuto; 50° C, 45 segundos e; 72° C, 2 minutos.

O produto da amplificação foi analisado após eletroforese (5V/cm por 30 minutos) em gel de agarose 0,8% com tampão TBE 0,5X³ e coloração com brometo de etídeo. As colônias que continham o fragmento do cDNA FtsH-m1 clonado no vetor binário foram cultivadas em meio LB líquido com canamicina 100 mg/L. 500 μL da cultura de bactéria foram adicionados a 500 μL de glicerol 50% e esse material foi armazenado a - 80° C. Obteve-se, dessa forma, a construção pBin2.35S.FtsHm1.E9.

3.5.4 Extração em média escala do plasmídeo pBin2.35S.FtsHm1.E9

A extração em média escala do plasmídeo em questão foi conduzida com o auxílio do *Plasmid Midi Kit* (Qiagen), seguindo o protocolo, fornecido pelo fabricante, para extração de cosmídeos.

3.5.5 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 foi realizada da seguinte forma: a bactéria foi cultivada por 14 horas a 28° C sob agitação (180 rpm) em 5mL meio LB líquido contendo rifampicina 10 mg/mL. Cerca de 2 mL dessa cultura foram diluídos em 50 mL de LB, contendo o antibiótico na mesma concentração inicial, e mantidos sob agitação a 28° C. Ao atingir a densidade óptica de 0,5 a 600 nm, a cultura bacteriana foi centrifugada a 3.400 g, por 5 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de CaCl₂ 20 mM e mantidas em gelo. Cerca de 1 µg do plasmídeo pBin2.35S.FtsHm1.E9 foi adicionado a 100 µL das células e a suspensão foi incubada por 30 minutos em gelo. Após esse período, a mistura foi congelada em nitrogênio líquido e, em seguida, descongelada a 37° C por 5 minutos. Foi adicionado 1 mL de meio LB líquido à mistura que permaneceu incubada por 2 horas, a 28° C sob agitação. As células foram centrifugadas por 30 segundos a 20.000 g e o sobrenadante foi removido. O precipitado foi ressuspensado em 100 µL de meio LB líquido e metade desse volume foi distribuído em placas de Petri com LB sólido, contendo rifampicina 50 µg/mL e canamicina 100 µg/mL, que foram incubadas a 28° C, por 48 horas. Esse procedimento também foi realizado com o plasmídeo pBIN2.35S.cat.E9.

3.5.6 Confirmação da transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

A verificação da transformação de *Agrobacterium tumefaciens* foi realizada pela técnica de PCR seguindo protocolo similar ao descrito anteriormente, no item 3.5.3. Foram utilizados os iniciadores m1-291 e m1-1630 (Tabela 1) com as bactérias contendo os plasmídeos pBIN2.35S.FtsHm1.E9 e pBIN2.35S.cat.E9.

3.5.7 Seqüenciamento da construção pBIN2.35S.FtsHm1.E9

O seqüenciamento da construção em questão foi realizado conforme descrito anteriormente no item 3.4.2. Foram utilizados os iniciadores complementares ao cDNA FtsH-m1 listados na Tabela 1 e os iniciadores:

- m1-promotor (5'AGAGAAGTTTCACTTGGT3');
- m1A1-3' (5' GCACTTCTTGAGCATGA 3') e;
- m1A2-3' (GCAGCAATAGAACATACTGA).

3.6 Transformação de plantas

Pelo fato de o protocolo de transformação e regeneração de fumo já estar bem estabelecido e padronizado, plantas de *Nicotiana tabacum* cv SRI foram utilizadas na transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*.

Explantes foliares , com cerca de 1cm², de fumo cultivado *in vitro* foram transferidos para uma placa de Petri contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962). Esses discos foram perfurados com uma agulha de seringa estéril com a finalidade de estimular a infecção pela bactéria. Nessa etapa, quatro tratamentos diferentes foram realizados:

- 1) Os discos foliares foram perfurados com uma agulha de seringa limpa, sem bactéria. Esse é um controle da regeneração dos brotos a partir do disco foliar perfurado;
- 2) Os discos foliares foram perfurados com uma agulha previamente imersa em uma cultura fresca de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, que não apresenta qualquer plasmídeo binário. Esse é um controle da regeneração dos brotos na presença da bactéria;
- 3) Os discos foliares foram perfurados com uma agulha previamente imersa em uma cultura fresca de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 transformada com o plasmídeo pBin2.35S.cat.E9. Trata-se de um controle para investigar se a transformação genética mediada por esse plasmídeo causa alterações fenotípicas nas plantas regeneradas e;
- 4) Os discos foliares foram perfurados com uma agulha previamente imersa em uma cultura fresca de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 transformada com o plasmídeo pBin2.35S.FtsHm1.E9, a construção de interesse.

Após três dias, os discos foliares foram transferidos para um meio de cultura contendo os seguintes componentes:

- Fitorreguladores de crescimento: 6-benzilaminopurina (BAP) 2,2 mg/mL e ácido 3-indol-acético (AIA) 0,2mg/mL;
- Cefotaxima 500 mg/L e carbenicilina 400 mg/L, que inibem o crescimento da agrobactéria e;
- Opcionalmente canamicina 100 mg/L, antibiótico utilizado como agente seletivo das plantas transformadas. Essa concentração foi estabelecida após a montagem de um experimento de curva de morte.

Aproximadamente 30 dias depois, surgiram os primeiros brotos por organogênese direta. Esses foram transferidos para um novo meio com a mesma composição do usado anteriormente, porém em um recipiente maior do

tipo “Magenta”. A eficiência de transformação foi calculada numa correlação entre o número de explantes utilizados e a quantidade de brotos regenerados em canamicina. Uma vez enraizadas, as plantas foram transferidas para um vaso com substrato orgânico, areia e vermiculita (2:2:1) e envoltas por um saco plástico para evitar a perda d'água. Após o processo de aclimação, que durou uma semana, o material vegetal foi transferido para a casa de vegetação.

3.7 Verificação da presença do T-DNA nas plantas regeneradas (T0)

A presença do T-DNA nas plantas regeneradas após o processo de transformação genética foi investigada por meio da técnica de PCR. Adicionalmente, a técnica de *Southern Blotting* foi empregada com a finalidade de se avaliar o número de cópias do transgene inserido em cada evento de transformação.

Para essas análises, o DNA de plantas T0 foi extraído pelo método CTAB, conforme descrito a seguir.

3.7.1 Extração de DNA pelo método CTAB

O DNA das plantas analisadas foi extraído pelo método CTAB, conforme descrito por Brasileiro & Carneiro (1998), com modificações. Três gramas de folha fresca foram macerados em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, que foi transferido para um tubo contendo 15 mL de tampão CTAB (CTAB 2%, NaCl 1,4M, Tris-HCl, pH 8,0 100mM, EDTA 20mM, β -mercaptoetanol 0,2%). O material foi mantido a 65°C por 30 minutos sob agitação a cada 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 15 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e o tubo foi agitado manualmente por 10 minutos. O material foi centrifugado por 10 minutos a 5000 g e a fase aquosa, a superior, foi transferida para um novo tubo. O tratamento com clorofórmio:álcool isoamílico foi repetido mais uma vez. Adicionou-se, à fase aquosa coletada, RNase A (Sigma) a uma

concentração final de 100 µg/mL e a amostra foi incubada a 37°C, por 30 minutos. Foram adicionados 9 mL de isopropanol à temperatura ambiente e a amostra foi misturada por inversão suave do tubo. Após centrifugação por 20 minutos, a 10.000 g, o sobrenadante foi descartado, o precipitado lavado com 5 mL de etanol 70% e submetido a centrifugação por cinco minutos, a 10.000 g. Quando totalmente seco, o precipitado foi ressuspensionado em 500 µL de água deionizada estéril e transferido para um tubo de 2 mL. Para a obtenção de DNA com melhor pureza, 1 mL da solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionado ao ressuspensionado. A amostra foi misturada por inversão e centrifugada por cinco minutos, a 20.000 g. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo ao qual foram adicionados 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Novamente a amostra foi centrifugada por cinco minutos, a 20.000 g e a fase aquosa transferida para um novo tubo. Para a precipitação do DNA, foram adicionados 50 µL de acetato de sódio 3M, pH 5,2 e 1,5 mL de etanol absoluto e a amostra foi mantida a -20°C durante 14 horas. Após esse período procedeu-se a centrifugação por 30 minutos, a 20.000 g, a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado, após secagem, foi ressuspensionado em 500 µL de água deionizada estéril. A qualidade e a quantidade de DNA foram avaliadas após eletroforese (3V/cm por uma hora) em gel de agarose 0,8% com tampão TBE 0,5X e coloração com brometo de etídeo.

3.7.2 Análise pela técnica de PCR

O DNA extraído foi utilizado na PCR para a amplificação de parte do transgene, utilizando-se iniciadores específicos para a amplificação do cDNA FtsH-m1 (Tabela 1) e os iniciadores can1 (5' GCTTGGGTGGAGAGGCTATT 3') e can2 (5' ATACTTTCTCGGCAGGAGCA 3'), os quais amplificam uma região de aproximadamente 300pb do gene *nptII*, que confere resistência à canamicina.

3.7.3 Análise por *Southern Blotting*

3.7.3.1 Digestão do DNA genômico

As enzimas escolhidas para a digestão do DNA genômico extraído das plantas foram *BamH* I e *EcoR* I. Essas enzimas não apresentam sítios de clivagem no cDNA FtsH-m1, de acordo com o mapa de restrição construído utilizando-se ferramentas do site www.arabidopsis.org e o programa GeneRunner (<http://www.generunner.com>). Cada reação de digestão continha os seguintes reagentes nas concentrações a seguir: 10 µg de DNA genômico, 2 mM de espermidina, 1X tampão da enzima de restrição e 80 U da enzima de restrição. O material foi incubado por 16 horas, a 37° C. Para cada amostra de DNA genômico, foram realizadas três reações com *BamH* I, com *EcoR* I e; a dupla digestão com as enzimas *BamH* I e *EcoR* I.

Para controle do *Southern Blotting*, as mesmas reações de digestão foram feitas com o DNA genômico de uma planta selvagem.

O DNA digerido foi precipitado com 20 µL de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 500 µL de etanol absoluto. As amostras foram mantidas a - 20° C por 14 horas e centrifugadas por 30 minutos, 20.000 g, a 4° C. O sobrenadante foi removido e o precipitado ressuspensionado em 40 µL de água deionizada estéril.

3.7.3.2 Separação do DNA genômico digerido por eletroforese em gel de agarose

O DNA genômico digerido foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8% com tampão TBE 0,5X e corado com brometo de etídeo. Para cada amostra de DNA, foram aplicados no gel uma alíquota do DNA genômico não digerido, como controle da qualidade do DNA, e o volume total das três

reações de digestão realizadas. A migração do DNA no gel de agarose foi conduzida a 2 V/cm, por aproximadamente 14 horas.

3.7.3.3 Transferência e fixação do DNA à membrana

Após a eletroforese, a imagem do gel foi documentada e o gel foi lavado em água destilada e transferido para um recipiente plástico onde foi incubado com HCl 0,2M, sob agitação, por 10 minutos. Após esse período, o HCl foi removido, o gel foi lavado rapidamente com água destilada e incubado com a solução de desnaturação (NaOH 0,5M, NaCl 1,5M), por 30 minutos, sob agitação suave. Em seguida, o gel foi lavado novamente com água destilada e incubado na solução de neutralização (Tris-HCl 1M, pH 7,2, NaCl 1,5M) por 30 minutos, sob agitação. Após essa etapa, foi montada a transferência do DNA para a membrana de nylon Hybond-N⁺ (Amersham Biosciences). Um recipiente de vidro "Pyrex" foi preenchido com SSC 20X (NaCl 3M, citrato de sódio 0,3M, pH 7,0) e uma plataforma foi montada com uma placa de vidro. Cobrindo a plataforma de vidro estava uma tira de papel de filtro em contato com a solução. Sobre a plataforma foram empilhados, na seguinte ordem: o gel de agarose; a membrana; três folhas de papel de filtro; uma camada de aproximadamente 10 cm de papel-toalha; uma placa de vidro e; um peso com cerca de 1 kg. Essa montagem foi mantida por 16 horas.

Após a transferência, a membrana foi lavada rapidamente em água destilada, envolvida em papel de filtro e mantida por 2 horas, a 80° C, para a fixação do DNA.

3.7.3.4 Marcação radioativa da sonda de DNA

O preparo da sonda para hibridação foi realizado por 2 horas, à temperatura ambiente, com o *kit* de marcação *Random Primer DNA Labeling System* (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. A reação foi feita com o oligonucleotídeo adenina marcado radioativamente com fósforo 32, [α -³²P]-

dATP (Amersham Biosciences). Três sondas complementares a diferentes regiões do cDNA FtsH-m1 e com tamanhos variáveis foram testadas (Anexo). Os iniciadores utilizados para obtenção das sondas estão indicados abaixo na orientação 5'-3':

Sonda 1: iniciadores m1-841 e m1-1630 (Tabela 1)

Sonda 2: CATGGATGGTGC e AGATCCCATTCC

Sonda 3: TATCGAAGCACCCACAGAAGA e CGATGTGGGTACAAAACCTGA

Após a marcação, as sondas foram purificadas em uma coluna contendo a resina "Sephadex" G-50 (Amersham Biosciences) diluídas em 0,5% SDS em TE (tampão Tris-EDTA) e equilibradas com 0,5% SDS em TE. Em seguida, as sondas foram desnaturadas por 5 minutos a 100° C e imediatamente transferidas para o gelo, onde foram mantidas até o momento da hibridação.

3.7.3.5 Pré-hibridação e hibridação

Após a fixação do DNA, a membrana foi transferida para garrafas de hibridação, incubada com 5 mL da solução *Rapid-hyb buffer* (Amersham Biosciences) durante 15 minutos a 65° C, sob agitação, de acordo com as instruções do fabricante. Para a hibridação, a sonda marcada e desnaturada foi adicionada à solução que permaneceu incubada a 65° C por 2 horas, sob agitação.

3.7.3.6 Lavagem da membrana

A primeira lavagem foi feita com uma solução de 2x SSC e 0,1% SDS durante 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram feitas outras lavagens, com 0,1-1x SSC e 0,1% SDS a 65° C, durante 15 minutos. A radioatividade foi monitorada com contador do tipo Geiger, repetindo-se as lavagens até que a radioatividade permanecesse ligeiramente acima da

radiação ambiente. Após a secagem ao ar sobre papel filtro, a membrana foi envolta em filme PVC e exposta à auto-radiografia, utilizando-se filme de raio-X Kodak X-OMAT.

3.8 Avaliação das plantas da geração T1

As plantas regeneradas após o processo de transformação genética, T0, foram autofecundadas e mantidas na casa de vegetação até que produzissem sementes. Essas foram recolhidas e armazenadas a 4° C. As sementes T1 obtidas foram semeadas em experimentos *in vitro* e na casa de vegetação.

3.8.1 Avaliação *in vitro*

As sementes T1 foram transferidas para um tubo de 1,7 mL e esterelizadas. Nesse processo, as sementes foram tratadas com 1 mL de etanol 70% que foi removido para o acréscimo de uma solução de hipoclorito de sódio 2% em que as sementes ficaram incubadas por 20 minutos, sob agitação. Em seguida, três lavagens com água deionizada estéril foram feitas com a finalidade de eliminar qualquer resíduo do hipoclorito de sódio. As sementes foram semeadas em placas de Petri com meio MS contendo ou não o antibiótico canamicina 100 mg/mL. Em cada placa foram mantidas 100 sementes. Como controle, sementes de uma planta selvagem receberam o mesmo tratamento. As placas foram mantidas a 25° C com uma variação de 2°C, num fotoperíodo de 16 horas.

As plantas T1 que cresceram em meio contendo canamicina foram transferidas para um vaso e levadas à casa de vegetação.

3.8.2 Avaliação das plantas T1 na casa de vegetação

Esse ensaio , modificado de Weide et al. (1989), foi realizado com a finalidade de selecionar rapidamente plantas resistentes à canamicina.

Sementes T1 foram semeadas em vasos com 5,5 cm de diâmetro contendo substrato orgânico, areia e vermiculita (2:2:1). Após o aparecimento da primeira folha, o que levou aproximadamente 30 dias, foi aplicada às plantas uma solução de canamicina 300 mg/L, por três dias consecutivos. Para cada 20 plantas, foram borrifados 100 mL da solução do antibiótico. Como controle, plantas selvagens foram submetidas ao mesmo tratamento e plantas T1 e selvagens foram borrifadas com a mesma quantidade de água (Figura 7). As plantas T1 resistentes à canamicina estão sendo mantidas na casa de vegetação até que produzam sementes. O mesmo procedimento de seleção com o antibiótico será empregado nas plantas T2, até a obtenção de plantas homozigotas para o transgene.

Figura 7 - Esquema do experimento realizado na casa de vegetação com a finalidade de se selecionar as plantas resistentes à canamicina. O retângulo simboliza as bandejas e os círculos, as plantas

3.8.3 Verificação da presença do T-DNA em plantas T1

A presença do T-DNA em plantas da geração T1 foi confirmada por PCR. O DNA de plantas resistentes e susceptíveis, detectadas nos experimentos com canamicina, foi extraído com o reagente DNAzol (Invitrogen). Nesse procedimento, seguiu-se o protocolo sugerido pelo fabricante com 0,1 g de folha macerada em nitrogênio líquido. Após a extração, o DNA foi purificado com fenol-clorofórmio. Cerca de 1 mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionado às amostras que foram centrifugadas por 5 minutos, a 12.000 g. Em seguida, a fase superior foi transferida para um tubo contendo 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 12.000 g e a fase superior foi novamente transferida para um novo tubo. O DNA foi precipitado com 50 µL de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 1,5 mL de etanol 100%. As amostras foram mantidas por 16 horas a - 20° C e depois centrifugadas por 30 minutos, a 4°C, 12.000 g. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 70 µL de água deionizada estéril.

Como controle, o DNA de plantas selvagens tratadas com o antibiótico e com água bem como o de plantas T1 tratadas com água foi extraído. O DNA obtido foi analisado e quantificado após eletroforese (5V/cm, por 30 minutos) em gel de agarose 0,8% com tampão TBE 0,5X e coloração com brometo de etídeo.

Esse material foi utilizado numa reação de PCR com a finalidade de se detectar a presença do gene *nptII*, que confere resistência à canamicina, e a presença do cDNA FtsH-m1. Nessas reações foram utilizados os iniciadores can1 e can2 (item 3.7.2) e os iniciadores listados na Tabela 1. O seguinte ciclo de tempo e temperatura foi repetido por 24 vezes: 94° C, 45 segundos; 50° C, 50 segundos e; 72° C, 2 minutos.

O resultado da PCR foi avaliado após eletroforese (5V/cm, por 30 minutos) em gel de agarose 0,8% com tampão TBE 0,5X e coloração com brometo de etídeo.

3.9 Avaliação da expressão de FtsH-m1 nas plantas (T1) por experimentos de transcrição reversa (RT-PCR)

As análises descritas a seguir foram conduzidas com plantas em que a presença do T-DNA foi confirmada por PCR (item 3.8.3).

3.9.1 Extração de RNA

O RNA das plantas selecionadas foi extraído com o auxílio do reagente TRIzol (Invitrogen) a partir de 0,1 g de folha macerada em nitrogênio líquido, seguindo protocolo fornecido pelo fabricante. A qualidade e a quantidade do RNA extraído foram avaliadas após eletroforese (3V/cm) por 40 minutos em gel de agarose 0,8% com o tampão FA (20 mM MOPS, 5 mM acetato de sódio, 1 mM EDTA, 12 M formamida, pH 7,0) e coloração com brometo de etídeo.

3.9.2 Síntese de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi conduzida com o auxílio do *kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen). O RNA extraído foi utilizado numa reação contendo a enzima *SuperScript II RT*, uma transcriptase reversa seguindo o protocolo utilizando oligo dT, de acordo com as recomendações do fabricante.

3.9.3 Amplificação do cDNA alvo

A amplificação do cDNA alvo, no caso o da FtsH-m1, foi realizada diretamente por PCR. O volume de 1 µL da reação descrita anteriormente foi utilizado em uma PCR com os iniciadores m1- 841 e m1- 1630 (Tabela 1), que amplificam uma região de aproximadamente 810 pb do cDNA FtsH-m1. O seguinte ciclo de tempo e temperatura foi repetido por 29 vezes num termociclador PTC-100 (MJ - Research): 94° C, 45 segundos; 50° C, 50 segundos e; 72°C, 1 minuto.

O produto da PCR foi analisado após eletroforese, 5V/cm, em gel de agarose 0,8% com tampão TBE 0,5X e coloração com brometo de etídeo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise assistida por computador da expressão das proteínas FtsH em cana-de-açúcar

A partir de uma análise filogenética com seqüências das FtsHs presentes em bancos de dados de seqüências, foi demonstrado que essa classe de metaloproteases pode ser classificada em cinco grupos, sendo três plastidiais (p1, p2 e p3) e dois mitocondriais (m1 e m2) (Marbach et al., 2001). Além disso, a sub-classe m1 pode ser dividida em m1A e m1B.

Diante da existência de cinco grupos de FtsHs filogeneticamente relacionados, foi realizada a análise assistida por computador da expressão dessas proteases a partir de informações geradas pelo projeto SUCEST Cana-de-Açúcar. Esse tipo de análise fornece informação preliminar sobre a expressão das isoformas da FtsH em diferentes tecidos da planta. Os resultados obtidos encontram-se esquematizados na Figura 8.

As isoformas m1A e p2 destacam-se por serem as mais expressas. Além disso, a presença dos transcritos foi detectada em todos os tecidos testados, exceto em raízes de plântulas infectadas por *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, em que nenhum gene de FtsH mitocondrial estava expresso.

Uma constatação importante é que as isoformas mitocondriais são muito pouco estudadas em plantas, contrariamente ao que acontece com leveduras onde seu papel essencial já foi documentado (Langer, 2000). Baseado no fato de que a isoforma m1A apresenta um significativo nível de expressão em cana-de-açúcar, o que pode ser uma indicação de sua importância funcional, aliado

ao fato de ser pouco conhecida em plantas, sua caracterização funcional é plenamente justificada.

4.2 Comparação entre seqüências de aminoácidos da FtsH-m1 de plantas

Com a finalidade de investigar o grau de conservação da protease FtsH-m1 em plantas, as seqüências de aminoácidos da FtsH-m1 de cana-de açúcar, *Arabidopsis thaliana*, arroz e tomate foram alinhadas e comparadas (Figura 9).

Os resultados indicam que os domínios funcionais da protease localizados no módulo AAA (Walker A, Walker B e SRH) e a região de ligação a zinco são conservados entre as plantas, até mesmo entre monocotiledôneas e dicotiledôneas. Não foi possível obter nos bancos de dados uma seqüência de aminoácidos da protease FtsH-m1 de fumo, porém a inclusão de uma seqüência de tomate, também da família Solanaceae, sugere que resultados similares seriam obtidos com a seqüência de fumo.

Pode-se considerar que as proteases ortólogas a YME1 de leveduras desempenham função filogeneticamente conservada no metabolismo de proteínas nas mitocôndrias uma vez que Shah et al. (2000) demonstraram que leveduras mutantes para o gene *yme1* restabeleceram o fenótipo selvagem após transformação das células com o ortólogo humano.

Figura 8 - Análise assistida por computador da expressão das isoformas da FtsH de cana-de açúcar a partir de bibliotecas de cDNA de diferentes tecidos. Abreviaturas das bibliotecas: AD, plântulas *in vitro* sem folhas e raízes desenvolvidas infectadas com *Acetobacter diazotrophicans*; AM, meristema apical; CL, calos submetidos a estresse de luz e temperatura (4° C e 37° C); FL, flores; HR, plântulas *in vitro* sem folhas e com raízes desenvolvidas infectadas por *Herbaspirillum rubrisubalbicans*; LB, gema lateral; LR, palmito; LV, folhas; RT, raiz; RZ, zona de transição folha/raiz; SB, bainha; SD, sementes; ST, colmo. Na ordenada, o número de "reads" recuperados x 10⁴

Figura 9 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da FtsH-m1 de cana-de-açúcar, arroz, *Arabidopsis thaliana* e tomate. Os retângulos indicam os domínios funcionais da proteína: domínios Walker A e B, SRH (segunda região de homologia) e motivo Zn⁺, sítio de ligação ao zinco. A barra preta indica a localização do segmento transmembrânico

4.3 Seqüenciamento do cDNA da FtsH-m1

O cDNA da FtsH-m1 foi seqüenciado totalmente por meio da técnica *primer walking*. Nessa metodologia foram utilizados seis iniciadores, listados na Tabela 1, e cada reação de seqüenciamento foi repetida uma vez. As seqüências geradas foram alinhadas para a obtenção de uma seqüência consenso que foi comparada à sequência do banco de dados do projeto SUCEST - Cana-de-Açúcar. O resultado desse alinhamento revelou que a seqüência gerada por *primer walking* apresenta 99% de identidade com a do banco de dados, o que indica que o material seqüenciado corresponde ao cDNA de interesse e que não existem diferenças significativas entre essas seqüências que possam comprometer o uso do cDNA enviado ao laboratório para a montagem da construção.

4.4 Obtenção da construção pBIN2.35S.FtsHm1.E9

A montagem da construção pBIN2.35S.FtsHm1.E9 está esquematizada na Figura 6. Após a obtenção do plasmídeo pBIN2.35S.FtsHm1.E9, a região que inclui o início do promotor, o cDNA completo e o início do terminador foi seqüenciada e não apresentou variações significativas quando comparada à seqüência do cDNA FtsH-m1 gerada anteriormente.

4.5 Avaliação das colônias bacterianas quanto à presença do vetor pBIN2.35S.FtsHm1.E9

Células competentes de *Escherichia coli* JM109 foram transformadas com o plasmídeo pBIN2.35S.FtsHm1.E9 e diversas colônias bacterianas foram obtidas em meio seletivo. Escolheram-se aleatoriamente sete colônias para serem testadas, por meio da técnica de PCR, quanto à presença do plasmídeo

de interesse. Para tanto, foram utilizados os iniciadores m1-291 e m1-2217 (Tabela 1) que amplificam um região de aproximadamente 1,9 kpb do cDNA FtsH-m1. Como controle positivo foi utilizado o plasmídeo pSPORT FtsH.m1, enviado ao laboratório, que contém apenas o cDNA em questão. Das sete colônias testadas, três mostraram-se positivas quanto à presença do T-DNA (2, 3 e 5), Figura 10.

Figura 10 - Verificação da transformação bacteriana pelo plasmídeo pBIN2.35S.FtsH-m1.E9. Gel de agarose com o DNA amplificado na reação de PCR a partir de colônias bacterianas. 1-7, colônias bacterianas testadas; C(+), controle positivo; C(-), controle negativo da PCR com todos os reagentes utilizados, exceto DNA

Selecionou-se uma dessas colônias para a extração do DNA plasmidial em média escala. O material obtido foi utilizado na transformação de *Agrobacterium tumefaciens* e diversas colônias foram obtidas em meio com o agente seletivo canamicina. A presença do plasmídeo nas bactérias foi confirmada por meio da PCR, utilizando-se os iniciadores m1-291 e m1-1630 (Tabela 1) que amplificam uma região de aproximadamente 1,4 kpb do cDNA FtsH-m1. Como controle, a PCR também foi feita com uma colônia bacteriana pBIN2.35S.cat.E9, que não contém o cDNA FtsH-m1, e com o plasmídeo pBIN2.35S.FtsHm1.E9, proveniente da extração a média escala. O resultado das reações segue o esperado: não houve amplificação de DNA na PCR

realizada com a colônia pBIN2.35S.cat.E9 enquanto que nas outras duas reações foi amplificado um fragmento de DNA com aproximadamente 1,4 kpb (Figura 11).

Figura 11 - Verificação da transformação bacteriana. Gel de agarose com o resultado da PCR com as colônias de *Agrobacterium tumefaciens*. 35S.cat, com a colônia pBIN2.35S.cat.E9; 35S.m1, com a colônia pBin2.35S.FtsHm1.E9; C(+), controle positivo com o plasmídeo pBin2.35S.FtsHm1.E9; C(-), controle negativo da PCR com todos os reagentes utilizados, exceto DNA

4.6 Obtenção de plantas transformadas geneticamente

Explantos foliares de *Nicotiana tabacum* foram transformados via *Agrobacterium tumefaciens* contendo o plasmídeo pBIN2.35S.FtsHm1.E9, além dos controles mencionados anteriormente no item 3.3. Plântulas foram regeneradas em meio MS seletivo contendo canamicina (Figura 12), o que sugere a presença do T-DNA nas mesmas.

Figura 12 - Etapas da transformação e regeneração de plantas de fumo com o plasmídeo pBIN2.35S.FtsHm1.E9 (a) explante foliar com brotos regenerando em meio com canamicina; (b) planta regenerada *in vitro* em meio MS com canamicina; (c) planta regenerada na casa de vegetação

As plântulas obtidas foram mantidas *in vitro* em meio MS até enraizarem. Em seguida, esse material T0 foi aclimatado e transferido para a casa de vegetação.

No total, foram obtidas 17 plantas transformadas resistentes à canamicina, o que indicou uma eficiência de transformação de 21,2%. Essas plantas foram nomeadas de m1.1 a m1.17.

4.7 Verificação da inserção do T-DNA no genoma de plantas T0

Utilizaram-se as técnicas de PCR e de *Southern Blotting* para a verificação da inserção do T-DNA no genoma de plantas T0.

Primeiramente o DNA das plantas da geração T0 foi extraído pelo método CTAB e quantificado após eletroforese em gel de agarose. O resultado deste procedimento está documentado na Figura 13. A planta 4 não foi incluída nessas análises, pois no momento em que o DNA das plantas foi extraído, não se dispunha de material vegetal suficiente.

Figura 13 - DNA genômico das plantas T0, após eletroforese em gel de agarose. WT, DNA de uma planta selvagem; 1-17, DNA das 17 plantas regeneradas *in vitro* após a transformação com o plasmídeo pBIN2.35S.FtsHm1.E9

4.7.1 Verificação da presença do transgene por meio da técnica de PCR

Cerca de 5 ng do DNA extraído foram utilizados nas reações de PCR para verificação da presença do T-DNA. Essas reações foram realizadas com conjuntos diferentes de iniciadores com homologia ao T-DNA. Os iniciadores m1-841 e m1-1630 (Tabela 1) amplificam um fragmento de aproximadamente 800 pb enquanto os iniciadores m1-291 e m1-1630 amplificam um fragmento com cerca de 1,4 kpb. Para detectar a presença do gene de resistência à canamicina, foram utilizados os iniciadores can1 e can2, que amplificam um fragmento de 300 pb. Os resultados obtidos estão demonstrados nas Figuras 14 e 15.

Figura 14 - Verificação da presença do T-DNA. Gel de agarose com o resultado da PCR com os iniciadores m1-841 e m1-1630. WT, planta selvagem; 1-17, plantas regeneradas *in vitro* após transformação com o plasmídeo pBIN2.35S.FtsHm1.E9; C(+), PCR realizada com o plasmídeo pBIN2.35S.FtsHm1.E9 e; C(-), controle negativo da PCR com todos os reagentes utilizados, exceto DNA

Figura 15 - Verificação da presença do T-DNA Gel de agarose com o resultado da PCR com os iniciadores m1-291 e m1-1630. WT, planta selvagem; 1-17, plantas regeneradas *in vitro* após transformação com o plasmídeo pBIN2.35S.FtsHm1.E9; C(+), PCR realizada com o plasmídeo pBIN2.35S.FtsHm1.E9 e; C(-), controle negativo da PCR com todos os reagentes utilizados, exceto DNA

As reações de PCR realizadas com os iniciadores homólogos a regiões do cDNA FtsH-m1 foram eficientes e informativas, uma vez que os resultados obtidos permitiram identificar a presença ou ausência de um fragmento amplificado com tamanho esperado no gel de agarose, sendo possível discriminar as plantas T0 transgênicas. Com relação aos controles, os resultados estão de acordo com o esperado: houve amplificação de um fragmento no controle positivo e não houve amplificação de DNA das plantas selvagens e no controle negativo.

Já os resultados obtidos nas reações realizadas com os iniciadores can1 e can2 não foram informativos. Além de haver amplificação inespecífica, o fragmento de 300 pb, resultado da amplificação de parte do gene *nptII*, apareceu no gel de agarose sem definição, o que poderia levar a erros de interpretação. Desta forma, os dados obtidos nas reações com esses iniciadores não foram considerados na verificação da presença do T-DNA nas plantas transformadas.

Os resultados das reações com iniciadores homólogos ao cDNA FtsH-m1 sugerem que as plantas 1, 2, 3, 6, 7, 8, 13, 14, 15 e 16, que tiveram seus DNAs amplificados quando os dois conjuntos de iniciadores foram testados, são transgênicas. Não houve amplificação do DNA das plantas 5, 10 e 17, o que indica que essas plantas não foram transformadas com o cDNA FtsHm1.E9. Dessa forma, essas três plantas foram descartadas, não sendo consideradas nas análises posteriores.

O DNA das plantas 9, 11 e 12 foi amplificado apenas nas reações em que os iniciadores m1-841 e m1-1630 foram utilizados. Considerando que a ausência da amplificação com os iniciadores m1-291 e m1-1630 pode ser devido a problemas técnicos, essas plantas não foram descartadas, porém as dez plantas em que a presença do cDNA FtsH-m1 foi confirmada pelos dois conjuntos de iniciadores foram priorizadas nas análises seguintes.

4.7.2 Verificação da presença do transgene por *Southern Blotting*

Essa análise foi realizada com o DNA das plantas transformadas 1, 3, 8 e de uma planta selvagem como controle. Além da confirmação da presença do T-DNA do genoma das plantas transformadas, essa técnica permite estimar o número de cópias do transgene que foram inseridas no genoma das plantas.

O resultado da digestão do DNA genômico das plantas testadas é mostrado na Figura 16. Para a certificação dos resultados, foram utilizadas duas enzimas de restrição, *Bam*H I e *Eco*R I, que não clivam internamente o cDNA da FtsH-m1, em reações de restrição independentes e duplas. Como controle positivo foi utilizado o plasmídeo pBIN2.35S.FtsHm1.E9 linearizado pela enzima *Eco*R I.

Figura 16 - Resultado da digestão do DNA genômico da planta T0 m1.1. Resultados similares foram obtidos na digestão do DNA das plantas m1.1-3 e m1.1-8. (1) marcador de peso molecular lambda *Hind* III; DNA de uma planta selvagem (2) não digerido; (3) digerido com *Bam*H I; (4) digerido com *Eco*R I; (5) digerido com *Bam*H I e *Eco*R I. DNA da planta m1.1 (6) não digerido; (7) digerido com *Bam*H I; (8) digerido com *Eco*R I; (9) digerido com *Bam*H I e *Eco*R I

Três sondas posicionadas em diferentes regiões do cDNA FtsH-m1 foram testadas. Duas dessas sondas estão localizadas na região 3' do cDNA FtsH-m1, uma região mais variável. A finalidade de se utilizar sondas em regiões mais variáveis é evitar a hibridação da sonda com o gene FtsH-m1 endógeno de fumo ou então a hibridação com os genes de outras FtsHs, uma vez que existem regiões muito conservadas entre essas seqüências.

A técnica de *Southern Blotting*, no entanto, não foi eficiente na detecção da presença do T-DNA nas plantas transformadas e, assim, a estimativa do número de cópias do transgene inseridas no genoma das plantas não foi possível. Não houve hibridação das três sondas testadas com o DNA genômico das plantas utilizadas nos ensaios, porém houve hibridação das três sondas com o controle positivo, o plasmídeo pBIN2.35S.FtsHm1.E9 linearizado, o que significaria que essas plantas não foram transformadas geneticamente. No entanto, esses resultados são contrários aos obtidos por meio da técnica de PCR em que as plantas 1, 3 e 8 mostraram-se positivas quanto à inserção do T-DNA no genoma. Os resultados obtidos com o *Southern Blotting* também não concordam com obtidos na análise das plantas T1, em que plantas resistentes e susceptíveis à canamicina foram observadas, como discutido no item 4.8.

A falta de detecção da presença do gene que codifica a FtsH-m1A de cana-de-açúcar em plantas de fumo deve provavelmente ter resultado de problemas com a metodologia *per se*. Novos experimentos com variações no procedimento são necessários, permitindo não só a verificação dos resultados da PCR, como a quantificação das cópias inseridas no genoma.

4.8 Seleção de plantas T1 resistentes à canamicina

Para a seleção de plantas T1 contendo o T-DNA, ensaios de resistência à canamicina foram realizados por duas metodologias: *in vitro* e em casa de vegetação.

Nos ensaios *in vitro*, as sementes T1 foram semeadas em placas com meio MS contendo ou não canamicina. Este experimento foi realizado com sementes da planta m1.1 e os resultados após 45 dias do plaqueamento das sementes são mostrados na Figura 17.

Figura 17 - Seleção de plantas T1 resistentes à canamicina. Resultado do experimento *in vitro* realizado com sementes T1 da planta m1.1. (A) sementes de uma planta selvagem germinadas em meio MS; (B) sementes de uma planta selvagem germinada em meio MS com canamicina; (C) sementes T1 da planta m1.1 germinadas em meio MS com canamicina

Apenas 72 das 170 (42,3%) sementes m1.1 plaqueadas germinaram em meio com canamicina. Dentre as sementes que germinaram, nove apresentaram-se susceptíveis à canamicina e 63 resistentes, uma segregação de 7:1. Essa segregação da 3:1 esperada para a inserção de uma cópia do

transgene. Os valores obtidos para a segregação podem ter sido influenciado por problemas encontrados na germinação das sementes.

Os ensaios em casa de vegetação foram realizados com a descendência das plantas 1, 3 e 6. Weide et al. (1989) observaram que plantas de tomate susceptíveis à canamicina, quando tratadas por três dias consecutivos com uma solução do antibiótico numa concentração de 100 mg/L, apresentaram manchas cloróticas em suas folhas. Resultados similares foram obtidos com fumo, porém houve a necessidade de se aumentar a concentração do antibiótico para 300 mg/L. A Figura 18 mostra os resultados obtidos com a descendência, geração T1, da planta m1.6. As manchas cloróticas podem ser observadas em plantas selvagens e m1.6 susceptíveis à canamicina quando tratadas com o antibiótico. Plantas selvagens e m1.6 tratadas com água e plantas m1.6 resistentes à canamicina não apresentaram variação na coloração das folhas. Resultados similares foram obtidos com a descendência das plantas m1.1 e m1.3.

A segregação de plantas resistentes e susceptíveis novamente não obedeceu a segregação de 3:1 esperada com a inserção de uma cópia do transgene. Na descendência da planta m1.1, em que pôde ser estimada essa segregação pelo número abundante de descendentes na geração T1, foram obtidas 53 plantas resistentes à canamicina e 34 plantas susceptíveis, valores que não justificam a inserção de mais de uma cópia do transgene no genoma.

Os valores obtidos podem ser decorrentes de um número amostral insuficiente ou por problemas metodológicos. Entre as plantas susceptíveis estão plantas que apresentaram manchas cloróticas em suas folhas e plantas que não resistiram à aplicação do antibiótico. A morte dessas plantas pode ter sido causada pela quantidade de antibiótico aplicado ou por alguma disfunção fisiológica.

Figura 18 - Seleção de plantas T1 resistentes à canamicina. Resultados de experimento realizado em casa de vegetação. WT+água, planta selvagem tratada com água; WT+can, planta selvagem tratada com canamicina; m1.6 + água, planta T1 tratada com água; m1.6+can susceptível, planta T1 tratada com canamicina e susceptível ao antibiótico e; m1.6 + can resistente, planta T1 tratada com canamicina e resistente ao antibiótico

A seleção de plantas T1 resistentes à canamicina em casa de vegetação destacou-se por ser eficiente em plantas de fumo e envolver uma metodologia simples em que os resultados podem ser obtidos rapidamente, em cerca de 30 dias. As sementes semeadas na casa de vegetação não apresentaram problemas na germinação e as plantas geradas, por dispensarem a etapa de aclimação, mostraram-se mais vigorosas em relação àquelas obtidas a partir de sementes germinadas *in vitro*. Além disso, a metodologia utilizada na seleção em casa de vegetação não é destrutiva o que permite o uso de plantas susceptíveis ao antibiótico em análises seguintes.

4.9 Verificação da inserção do T-DNA no genoma de plantas T1

A presença do T-DNA no genoma de plantas T1 foi confirmada pela técnica de PCR utilizando-se os iniciadores m1-291 e m1-1630, que amplificam um fragmento de aproximadamente 1,4 kpb do cDNA FtsH-m1. Novamente os resultados obtidos com a amplificação com os iniciadores can1 can2 foram desconsiderados pela falta de nitidez dos resultados obtidos após eletroforese em gel de agarose. A reação de PCR foi realizada com o DNA de plantas selvagens, plantas resistentes e plantas susceptíveis ao antibiótico detectadas em experimentos descritos no item 4.6. O resultado está mostrado na Figura 19.

Figura 19 - Verificação da inserção do T-DNA no genoma de plantas T1. Gel de agarose mostrando os produtos da amplificação de DNA de plantas T1 com os iniciadores m1-291 e m1-1630. WT1, planta selvagem tratada com canamicina; WT2, planta selvagem tratada com água; 1-1 e 1-2, plantas T1 descendentes de m1.1 obtidas em casa de vegetação; 1-3 e 1-4, plantas T1 descendentes de m1.1 obtidas *in vitro*; 3-1 a 3-5, plantas T1 descendentes de m1.3 obtidas em casa de vegetação; 6-1 a 6-4, plantas T1 descendentes de m1.6 obtidas em casa de vegetação

Os resultados obtidos nas reações de PCR concordam com aqueles obtidos com a seleção de plantas resistentes à canamicina (item 4.8), o que corrobora a eficiência da técnica de seleção. Conforme o esperado, não houve amplificação do cDNA FtsH-m1 nas reações realizadas com o DNA de plantas selvagens e de plantas T1 susceptíveis ao antibiótico. Nas reações realizadas com o DNA de plantas resistentes, houve amplificação de um fragmento do cDNA FtsH-m1 do tamanho esperado, com exceção da reação realizada com o DNA da planta m1.1-4, que foi obtida *in vitro*.

Os resultados indicam que a seleção de plantas resistentes à canamicina e a posterior confirmação da inserção do T-DNA no genoma por meio da PCR são técnicas simples e reproduzíveis. Além disso, o uso dessas técnicas permite a obtenção, com agilidade e exatidão, de plantas T2 homozigotas para o transgene, a geração em que as análises fenotípicas, bioquímicas e fisiológicas são geralmente realizadas.

4.10 Verificação da expressão do transgene em plantas da geração T1 via RT-PCR

O RNA de plantas T1, testadas previamente para a verificação do T-DNA pela técnica de PCR, foi extraído (Figura 20) e utilizado na produção de cDNA. Esse material foi utilizado numa PCR com iniciadores m1-841 e m1-1630 (Tabela 1) que amplificam um fragmento de aproximadamente 800 pb do cDNA FtsH-m1. Essa análise foi realizada com as plantas WT1, m1.1-1, m1.3-2, m1.3-4, m1.6-2 e m1.6-4. Os resultados estão mostrados na Figura 21.

Como a técnica de RT-PCR permite apenas uma análise qualitativa, não é possível estimar-se os níveis de expressão aumentada do gene de interesse nas plantas transformadas. Outras técnicas, como *Northern Blotting*, por exemplo, devem ser utilizadas para uma análise quantitativa e mais precisa.

Não foram observadas alterações morfológicas marcantes nas plantas das gerações T0 e T1 que pudessem ser relacionadas à expressão heteróloga da FtsH-m1 de cana-de-açúcar em fumo. São necessárias, entretanto, análises mais finas, incluindo a avaliação de alterações mitocondriais estruturais e funcionais e do metabolismo respiratório. Essas análises devem ser realizadas em plantas a partir da geração T2, quando plantas homozigotas para o transgene podem ser obtidas e qualquer alteração morfológica devida à variação somaclonal pode ser descartada.

Ainda foram realizadas análises da expressão da FtsH-m1 em plantas transformadas da geração T1 por *Western Blotting* utilizando-se um anticorpo policlonal específico para a protease em questão que foi desenvolvido no laboratório. Os ensaios foram realizados com o extrato foliar e com mitocôndrias isoladas de folhas, porém os resultados obtidos são preliminares e não conclusivos. Ajustes na metodologia deverão ser realizados com a finalidade de se otimizar a extração de proteínas e a especificidade do anticorpo à proteína FtsH-m1.

Figura 20 - RNA obtido de plantas T1 em gel de agarose. O mesmo volume de amostra foi aplicado em cada canaleta, o que indica que a quantidade de RNA é, no geral, semelhante em todas as amostras. (1) WT1; (2) m1.1-1; (3) m1.3-2; (4) m1.3-4; (5) m1.6-2; (6) m1.6-4

Figura 21 - Expressão do transgene em plantas T1. Gel de agarose com os resultados da PCR realizada com o cDNA sintetizado a partir do RNA de plantas T1. (1) WT1; (2) m1.1-1; (3) m1.3-2; (4) m1.3-4; (5) m1.6-2; (6) m1.6-4, C(+), controle positivo realizado com o plasmídeo pBIN2.35S.FtsHm1.E9; C(-), controle negativo da reação de PCR realizado com todos os reagentes, exceto DNA

Observou-se a amplificação de um fragmento de aproximadamente 800 pb em todas as amostras, incluindo a planta selvagem e as plantas susceptíveis. A amplificação do cDNA das plantas resistentes à canamicina em que a presença do T-DNA foi confirmada pela técnica de PCR foi mais acentuada (amostras m1.1-1, m1.3-4 e m1.6-2).

Assim, a expressão do gene da FtsH-m1 endógeno do tabaco foi detectada pela técnica utilizada, havendo, entretanto, uma expressão significativamente aumentada do gene nas plantas transformadas resistentes à canamicina. O fato do gene endógeno do tabaco ter sido detectado nos experimentos de RT-PCR e não ter sido amplificado nas reações de PCR realizadas a partir do DNA genômico pode ser explicado pelos iniciadores utilizados nessas reações. Esses iniciadores foram desenhados a partir da sequência do cDNA da FtsH-m1 que não inclui introns.

Como a técnica de RT-PCR permite apenas uma análise qualitativa, não é possível estimar-se os níveis de expressão aumentada do gene de interesse nas plantas transformadas. Outras técnicas, como *Northern Blotting*, por exemplo, devem ser utilizadas para uma análise quantitativa e mais precisa.

Não foram observadas alterações morfológicas marcantes nas plantas das gerações T0 e T1 que pudessem ser relacionadas à expressão heteróloga da FtsH-m1 de cana-de-açúcar em fumo. São necessárias, entretanto, análises mais finas, incluindo a avaliação de alterações mitocondriais estruturais e funcionais e do metabolismo respiratório. Essas análises devem ser realizadas em plantas a partir da geração T2, quando plantas homozigotas para o transgene podem ser obtidas e qualquer alteração morfológica devida à variação somaclonal pode ser descartada.

Ainda foram realizadas análises da expressão da FtsH-m1 em plantas transformadas da geração T1 por *Western Blotting* utilizando-se um anticorpo policlonal específico para a protease em questão que foi desenvolvido no laboratório. Os ensaios foram realizados com o extrato foliar e com mitocôndrias isoladas de folhas, porém os resultados obtidos são preliminares e não conclusivos. Ajustes na metodologia deverão ser realizados com a finalidade de se otimizar a extração de proteínas e a especificidade do anticorpo à proteína FtsH-m1.

5 CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados apresentados, pode-se concluir que:

- Plantas transgênicas de tabaco expressando a FtsH-m1 de cana-de-açúcar não apresentaram alterações fenotípicas marcantes nas gerações T0 e T1;
- A técnica de PCR foi eficaz na verificação da presença do transgene em plantas regeneradas T0 e em plantas da geração T1, enquanto que a técnica de *Southern Blotting* não foi eficiente na detecção da presença do transgene nas plantas transformadas;
- A metodologia de seleção de plantas T1 de tabaco resistentes à canamicina em casa de vegetação mostrou-se eficiente, simples e rápida em comparação com a seleção *in vitro*;

ANEXO

AAGCTGGTACGCCTGCAGGTACCGGTCCGGAATT**CCCGGG**TCGACCCACGCGTCCGGCCCCCGCCGCTAC
 ATCCGCTCATCCCCGCGCCCGCTCAACCGCGCCGCCACCGACCACCTCTAATCCGGCCTCCCCCGCCGCG
 CGGTTCCGAGGCTCGTTTCCGTTGGGATCGTCCGTCCGCCCCGACCGCGTGGGCGCTTCTTCTTCGGGATC
 TCGCTGGGCCGAGCGGCGCAGGGCTAGGGATTCCGGGCCC**ATG**GCGTGGCGGCGCGTCCCTACCCAGATTGC
 TAGGCATCGACCAACAAAAGCAATCTATAATGAACTAGTTGCTTCCCTCCCCTTTGGGCGCTCTTCGAAGTG
 ACATCACTGCAGGTGCCAGAATTAGAAATTTACAAGAGAGGAACCAAGTCAAGTTACATTGGTAGCCTTGCA
 CGCCGGGTGCGAGACCTAGAATCACCAAGTGAACTTCTCTGCTTAAAGAGATCTACAGAAGTGACCCAGA
 GCGTGTCATACAAATATTTGAAAGCCAACCTTCGTTACATTCTAATCCTGCAGCACCTTCAGAGTATGTAA
 AAGCTCTTGTAAGGGTTGATAGGCTGGACGAGAGTGCCTTGCTTAAACACTGCAGAGAGGTGTTGCTTCC
 TCGACAAGGGGGGAAGAAAGCTTTAGTAGCATTCCAGCATTAATTGGTGCTGGTCAAGTGACAAAAGATGG
 AGCTCTTGCGACTGCAAAATGCACCTATTACATGGTACAGCAGAAACAGGTCAATTTAAGGATCAGCTTT
 GCGGTACCTTCCGAAGCATTGCACTAACTTTCTTCTTATTTTCGGGCATCGGTGCTCTCAT**CGAGGATAGA**
GGAATCAGCAAAGGCCTTGGTCTGAATGAAGAGGTTCAACCAAGCATGGAGTCTAGTACAAAATTCAGTGA
TGTAAAGGGTGTGATGAAGCAAAATCTGAACCTGAAGAAATAGTTCATTATCTTCGAGATCCCAAGCGCT
TTACACGTCTTGGTGGAAAAGCTTCCGAAAGGTGTCTTGCTTGTGGCCCTCCTGGCACCGGGAAAACCATG
CTAGCTAGGGCTATTGCTGGTGAAGCTGGTGTTCCTTTCTTCTTGCAGTGGAAGCGAGTTTGAGGAGAT
GTTTGTGGGAGTTGGAGCTCGGAGAGTGCAGACCTTTTTGCTGCAGCAAAAAAGCGATCTCCTTGCATAA
TATTTATTGATGAAATAGATGCAATTGGTGGGAGCCGGAATCCTAAAGATCAACAGTATATGAAGATGACC
TTGAACCAGCTGCTTGTGAGTTGGATGGCTTTAAGCAGAACGAGGGGATAATTGTCAATTGCTGCAACTAA
CTTTCCTGAGTCACTAGATAAAGCCCTAGTCAGACCTGGGCGTTTTGACCGTCATATTGTTGTTCCCAACC
CAGATGTTGAAGTGCAGCTCAAATTCCTAGAATCCCATATGTCAAAGATCTTGAAAAGTGATGATGTGGAC
TTAATGATCATTGCTAGAGGAACACCAGGATTCTCTGGTGCAGACCTTGCTAACTTGGTAAATGTTGCTGC
TCTTAAGGCTGCCATGGATGGTGC**CAAAAGCTGT**CACAATGAATGATCTTGAGTATG**CAAAAGGACCGAATCA**
TGATGGGTAGTGAGCGGAAGTCGGCAGTTATCTCTGACGAATGCAGGAAGTTGACAGCATACCATGAGGGA
GGGCATGCCCTTGTGCTATCCACACAGAAGGAGCTCACCTGTCCACAAGGCTACCATTGTACCCAGGGG
GATGGCTCTAGGAATGGTGGCCCCAACTCCCTGACAAAGACCAGACTAGTGTGTCAAGGAAACAGATGCTAG
CAAAATTGGATGTCTGCATGGGAGGCCGTGTGGCAGAAGAGCTTATATTTGGGGATACTGAGGTGACATCC
GGTGCCTCCTCAGACTTCCAGCAAGCAACTGCAATGGCAAGAGCAATGGTTACTAAATATGGCATGAGCAA
GAGGTCGGCCTTGTCTTTATAATTATGAGGACGATGGAAAGAGCCTGAGCTCAGAACTAGACTTGTGA
TTGAGCAGGAGGTGAAGAAATTTCTTAGAGAATGCATATAATAATGCGAAGACCATTCTTACAAAACACAAT
AAAGAGCTACATGCTCTAGCCAAACGCACCTTCTTGAGCATGAGACTCTCACAGGAGCCAGATAACGAACAT
ATTGGCCAGGTACATAACAAACAGCAACAGGAGCGTACTATCGAATC**ACCACAGAAGACTT**CAGTTCAC****
CAGCTTCCCCCGCATCACAGCTGCATCAGCTGCTGCAGCAGCAGCTGCAGCCCGCTGGGACACACAGCAG
ACGGCAGCTCAAAAGCTAAGGGGTTGCTGGAATGGGATCTTAGCACATGGACCACCCACCAGATTGCATTG
TGTATATTTACCCAAACAAGCAAAGCTGTTCCAGCAATTGACAGTTGACGAGGGTCATCGGTAGTATGCTA
AACTGCTGCAGCAATAGAACATACTGATCGCATGGAAGTTACTGTTGATGTGCCTGCAGTGCAAAAGCAGAA
ACAAAAACTTTACGCATTGTAG**TGGGCACATTTAGCTGGTGTGAATCAGTTTTGTACCCACATCG**AAAA
 CAATTTCTGTTGTTTACACCCCAAAAATTGTTAGATTTTGATCTGCCTGCCTTCTGTACCCTAACAGAGCA
 TAAATTGTATCACATTCTGAATAAGATGCCGTGTGTGCTTGAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAGGGCGCCGCTCTAGAG**GGATCC**AAGCTTACGTACGCGTGCATGCGACGTCATAGCTCTTCTAT
 AGTGTACCTAAATTCATTCC

Sequência de nucleotídeos do cDNA da FtsH-m1 com a indicação das sondas utilizadas na técnica de *Southern Blotting*. Sítios de clivagem das enzimas *Sma* I e *Bam*H I, respectivamente, em azul; códon de início e parada da transcrição, respectivamente, em vermelho; região amplificada na obtenção da sonda 1 (806 pb), em amarelo; da sonda 2 (808 pb), em magenta e; da sonda 3 (383 pb), em verde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, Z.; ADAMSKA, I.; NAKABAYASHI, K.; OSTERSETZER, O.;
HAUSSUHL, K.; MANUELL, A.; ZHENG, B.; VALLON, O.; RODERMEL,
S.R.; SHINOZAKI, K.; CLARKE, A.K. Chloroplast and mitochondrial
proteases in Arabidopsis. A proposed nomenclature. **Plant Physiology**,
v.125, n.4, p.1912-1918, 2001.

ADAM Z.; CLARKE, A.K. Cutting edge of chloroplast proteolysis. **Trends in
Plant Science**, v. 7, n.10, p. 451-456, 2002.

AKIYAMA, Y.; KIHARA, A.; ITO, K. Subunit of proton ATPase F₀ sector is a
substrate of the FtsH protease in *Escherichia coli*. **Federation of
European Biochemical Societies Letters**, v.399, n.1-2, p.26-28, 1996.

ARLT, H.; STEGLICH, G.; PERRYMAN, R.; GUIARD, B.; NEUPERT, W.;
LANGER, T. The formation of respiratory chain complexes in
mitochondria is under the proteolytic control of the m-AAA protease.
EMBO Journal, v.17, n.16, p.4837-4847, 1998.

ARNOLD, I.; LANGER, T. Membrane protein degradation by AAA proteases
in mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1592, n.1, p.89-96,
2002.

- BAILEY, S.; SILVA, P.; NIXON, P.J.; MULLINEAUX, C.; ROBINSON, C.; MANN, N. Auxiliary functions in photosynthesis: the role of the FtsH protease. **Biochemical Society Transactions**, v.29, n.4, p.455-459, 2001.
- BAILEY, S.; THOMPSON, E.; NIXON, P.J.; HORTON, P.; MULLINEAUX, C.W.; ROBINSON, C.; MANN, N.H. A critical role for the Var2 FtsH homologue of *Arabidopsis thaliana* in the photosystem II repair cycle *in vivo*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.3, p.2006-2011, 2002.
- BANFI, S.; BASSI, M.T.; ANDOLFI, G.; MARCHITIELLO, A.; ZANOTTA, S.; BALLABIO, A.; CASARI, G.; FRANCO, B. Identification and characterization of AFG3L2, a novel paraplegin-related gene. **Genomics**, v.59, n.1, p.51-58, 1999.
- BARATA, R.M. Clonagem, caracterização da expressão gênica e do transporte intra-organelar da protease FtsH-p1 de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. MicroTom). Piracicaba, 2003. 123p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C (Ed.). **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília: SPI/Embrapa, Cenargem, 1998. 309p.
- BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1366p.

- CALLIS, J.; VIERSTRA, R.D. Protein degradation in signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, n.5, p.381-386, 2000.
- CAMPBELL, C.L.; TANAKA, N.; WHITE, K.H.; THORSNESS, P.E. Mitochondrial morphological and functional defects in yeast caused by yme1 are suppressed by mutation of a 26S protease subunit homologue. **Molecular and Cellular Biology**, v.5, n.8, p.899-905, 1994.
- CASARI, G.; DE FUSCO, M.; CIARMATORI, S.; ZEVIANI, M.; MORA, M.; FERNANDEZ, P.; DE MICHELE, G.; FILLA, A.; COCOZZA, S.; MARCONI, R.; DUERR, A.; FONTAINE, B.; BALLABIO, A. Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. **The Cell**, v.93, n.6, p.973-983, 1998.
- CHABREGAS, S.M.; LUCHE, D.D.; VAN SLUYS, M-A.; MENCK, C.F.M.; SILVA-FILHO, M.C. Differential usage of two in-frame translational start codons regulates subcellular localization of *Arabidopsis thaliana* THI1. **Journal of Cell Science**, v.116, n.2, p.285-291, 2003.
- CHAUMONT, F.; SILVA-FILHO, M.C.; THOMAS, D.; LETERME, S.; BOUTRY, M. Truncated presequences of mitochondrial F1-ATPase β -subunit from *Nicotiana plumbaginifolia* transport CAT and GUS proteins into mitochondria of transgenic tobacco. **Plant Molecular Biology**, v.24, n.4, p. 631-641, 1994.
- CHEN, M.; CHOI, Y.; VOYTAS, D.F.; RODERMEL, S. Mutations in the *Arabidopsis* VAR2 locus cause leaf variegation due to the loss of a chloroplast FtsH protease. **The Plant Journal**, v.22, n.4, p.303-313, 2000.

- CHIBA, S.; AKIYAMA, Y.; ITO, K. Membrane protein degradation by FtsH can be initiated from either end. **The Journal of Bacteriology**, v.184, n.17, p.4775-4782, 2002.
- COPPOLA, M.; PIZZIGONI, A.; BANFI, S.; BASSI, M.T.; CASARI, G.; INCERTI, B. Identification and characterization of YME1L1, a novel paraplegin-related gene. **Genomics**, v.66, n.1, p.48-54, 2000.
- DE BOER, P.A.J.; COOK, W.R.; ROTHFIELD, L.I. Bacterial cell division. **Annual Review of Genetics**, v.24, p.249-274, 1990.
- EMANUELSSON, O.; NIELSEN, H.; BRUNAK, S.; HEIJNE, G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **Journal of Molecular Biology**, v.300, n.4, p.1005-1016, 2000.
- ESTELLE, M. Proteases and cellular regulation in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, n.3, p.254-260, 2001.
- GOTTESMAN, S. Proteases and their targets in *Escherichia coli*. **Annual Review of Genetics**, v.30, p.465-506, 1996.
- HERMAN, C.; THEVENET, D.; D'ARI, R.; BOULOC, P. Degradation of sigma 32, the heat shock regulator in *Escherichia coli*, is governed by HflB. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 92, n.8, p.3516-3520, 1995.

- HERMAN, C.; PRAKASH, S.; LU, C.Z.; MATOUSCHEK, A.; GROSS, C.A. Lack of a robust unfoldase activity confers a unique level of substrate specificity to the universal AAA protease FtsH. **Molecular Cell**, v.11, n.3, p.659-669, 2003.
- HOOPER, N.M. Proteases: a primer. **Essays in Biochemistry**, v.38, p.1-8, 2002.
- HUGUENEY, P.; BOUVIER, F.; BADILLO, A.; D'HARLINGUE, A.; KUNTZ, M.; CAMARA, B. Identification of a plastid protein involved in vesicle fusion and/or membrane protein translocation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.92, n.12, p.5630-5634, 1995.
- IVASHUTA, S.; IMAI, R.; UCHIYAMA, K.; GAU, M.; SHIMAMOTO, Y. Changes in chloroplast FtsH-like gene during cold acclimation in alfafa (*Medicago sativa*). **The Journal of Plant Physiology**, v.159, n.1, p.85-90, 2002.
- JARVIS, P.; SOLL, J. Toc, tic, and chloroplast protein import. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1590, n.1-3, p.177-189, 2002.
- JUHOLA, M.K.; SHAH, Z.H.; GRIVELL, L.A.; JACOBS, H.T. The mitochondrial inner membrane AAA metalloprotease family in metazoans. **Federation of European Biochemical Society Letters**, v.481, n.2, p.91-95, 2000.

KARATA, K.; INAGAWA, T.; WILKINSON, A.J.; TATSUTA, T.; OGURA T.
Dissecting the role of a conserved motif (the second region of homology)
in the AAA family of ATPases. **The Journal of Biological Chemistry**,
v.274, n.37, p.26225-26232, 1999.

KARSAI, A.W.; ROCHE, E.D.; SAUER, R.T. The SsrA-SmpB system for
protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. **Nature
Structural Biology**, v.7, n.6, p.449-455, 2000.

KIHARA, A.; AKIYAMA, Y.; ITO, K. FtsH is required for proteolytic
elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein
translocase subunit. **Proceedings of the National Academy of
Sciences of USA**, v.92, n.10, p.4532-4536, 1995.

KIM, W.Y.; GENG, R.; SOMERS, D.E. Circadian phase-specific degradation
of the F-box protein ZTL is mediated by the proteasome. **Proceedings of
the National Academy of Sciences of USA**, v.100, n.8, p.4933-4938,
2003.

KOŁODZIEJCZAK, M.; KOLACZKOWSKA, A.; SZCZESNY, B.;
URANTOWKA, A.; KNORPP, C.; KIELECZAWA, J.; JANSKA, H. A
higher plant mitochondrial homologue of the yeast m-AAA protease. **The
Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.46, p.43792-43798, 2002.

KOMINSKY, D.J.; BROWNSON, M.P.; UPDIKE, D.L.; THORSNESS, P.E.
Genetic and biochemical basis for viability of yeast lacking mitochondrial
genomes. **Genetics**, v.162, n.4, p.1595-1604, 2002.

- KORTHOUT, H.A.; BERECKI, G.; BRUIN, W.; VAN DUIJN, B.; WANG, M.
The presence and subcellular localization of caspase 3-like proteinases in plant cells. **Federation of European Biochemical Society Letters**, v.475, n.2, p.139-144, 2000.
- KWOK, S.F.; STAUB, J.M.; DENG, X.W. Characterization of two subunits of Arabidopsis 19S proteasome regulatory complex and its possible interaction with the COP9 complex. **Journal of Molecular Biology**, v.285, n.1, p.85-95, 1999.
- LANGER, T. AAA proteases: cellular machines for degrading membrane protein. **Trends in Biochemical Science**, v.25, n.16, p.247-251, 2000.
- LANGER, T.; KLANNER, C.; LEONHARD, K. AAA proteases of mitochondria: quality control of membrane proteins and regulatory functions during mitochondrial biogenesis. **Biochemical Society Transactions**, v.29, n.4, p.431-436, 2001.
- LEONHARD, K.; HERRMANN, M.; STUART, R.A.; MANNHAUPT, G.; NEUPERT, W.; LANGER, T. AAA proteases with catalytic sites on opposing membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria. **The Embo Journal**, v.15, n.16, p.4218-4229, 1996.
- LEONHARD, K.; STIEGLER, A.; NEUPERT, W.; LANGER T. Chaperone-like activity of the AAA domain of the yeast Yme1 AAA protease. **Nature**, v.398, n. 6725, p.348-351, 1999.

- LEONHARD, K.; GUIARD, B.; PELLECCIA, G.; TZAGOLOFF, A.; NEUPERT, W.; LANGER, T. Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria: extraction of substrates from either membrane surface. **Molecular Cell**, v.5, n.4, p.629-638, 2000.
- LINDAHL, M.; TABAK, S.; CSEKE, L.; PICHERSKY, E.; ANDERSSON, B.; ADAM, Z. Identification, characterization, and molecular cloning of a homologue of the bacterial FtsH protease in chloroplasts of higher plants. **The Journal of Biological Chemistry**, v.271, n.46, p.29329-29334, 1996.
- LINDAHL, M.; SPETEA, C.; HUNDAL, T.; OPPENHEIM, A.O.; ADAM, Z.; ANDERSSON, B. The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. **The Plant Cell**, v.12, n.3, p.419-431, 2000.
- LIU, Y.; DAMMANN, C.; BHATTACHARYYA, M.K. The matrix metalloproteinase gene GmMMP2 is activated in response to pathogenic infections in soybean. **Plant Physiology**, v.127, n.4, p.1788-1797, 2001.
- LUPAS, N.A.; MARTIN, J. AAA proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, v.12, n.6, p.746-753, 2002.
- MANON, S.; PRIAULT, M.; CAMOUGRAND, N. Mitochondrial AAA-type protease Yme1p is involved in Bax effects on cytochrome c oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.289, n.5, p.1314-1319, 2001.
- MARBACH, P.A.S.; COELHO, A.S.G.; SILVA-FILHO, M.C. Mitochondrial and chloroplast localization on FtsH-like proteins in sugarcane based on their phylogenetic profile. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, n.1-4, p.183-190, 2001.

- MARBACH, P.A.S. & SILVA-FILHO, M.C. Phylogenetic profile as a powerful tool on subcellular localization of plant FtsH-like proteins. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 48., Águas de Lindóia, 2002. **Resumos**. Ribeirão Preto: S B G, 2002. p.466.
- MORGANTE, C.V.; MARBACH, P.A.S.; BARATA, R.M.; SILVA-FILHO, M.C. Subcellular localization of *Arabidopsis thaliana* FtsH-like proteins predicted by phylogenetic profile is confirmed *in vivo*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 32., Caxambu, 2003. **Programação e Resumos**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2003. p.55.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, v.15, n.2, p.473-497, 1962.
- OGURA, T.; INOUE, K.; TATSUTA, T.; SUZAKI, T.; KARATA, K.; YOUNG, K.; SU, L.H.; FIERKE, C.A.; JACKMAN, J.E.; RAETZ, C.R.; COLEMAN, J.; TOMOYASU, T.; MATSUZAWA, H. Balanced biosynthesis of major membrane components through regulated degradation of the committed enzyme of lipid A biosynthesis by the AAA protease FtsH (HflB) in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v.31, n.3, p.833-844, 1999.
- OGURA, T.; WILKINSON, A.J. AAA+ superfamily ATPases: common structure-diverse function. **Genes to Cells**, v.6, n.7, p.575-597, 2001.

- OSTERSETZER, O.; ADAM, Z. Light-stimulated degradation of an unassembled Rieske FeS protein by a thylakoid-bound protease: the possible role of the FtsH protease. **The Plant Cell**, v.9, n.6, p.957-965, 1997.
- PATEL, S.; LATTERICH, M. The AAA team: related ATPases with diverse functions. **Trends in Cell Biology**, v.8, n.2, p.65-71, 1998.
- PAUL, M.F.; TZAGOLOFF, A. Mutations in RCA1 and AFG3 inhibit F1-ATPases assembly in *Saccharomyces cerevisiae*., **Federation of European Biochemical Society Letters**, v.373, n.1, p.66-70, 1995.
- PEARCE, D.A.; SHERMAN, F. Degradation of Cytochrome Oxidase Subunits in Mutants of Yeast Lacking Cytochrome c and Suppression of the Degradation by Mutation of *yme1*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.36, p.20879-20882, 1995.
- PECHAN, T.; COHEN, A.; WILLIAMS, W.P.; LUTHE, D.S. Insect feeding mobilizes a unique plant defense protease that disrupts the peritrophic matrix of caterpillars. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.99, n.20, p.13319-13323, 2002.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 3v.
- SEO, S.; OKAMOTO, M.; IWAI, T.; IWANO, M.; FUKUI, K.; ISOGAI, A.; NAKAJIMA, N.; OHASHI, Y. Reduced levels of chloroplast FtsH protein in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves accelerate the hypersensitive reaction. **The Plant Cell**, v.12, n.6, p.917-932, 2000.

- SHAH, Z.H.; HAKKAART, G.A.; ARKU, B.; DE JONG, L.; VAN DER SPEK, H.; GRIVE, L.A.; JACOBS, H.T. The human homologue of the yeast mitochondrial AAA metalloprotease Yme1p complements a yeast yme1 disruptant, **Federation of European Biochemical Society Letters**, v.478, n.3, p.267-270, 2000.
- SHOTLAND, Y.; KOBAYASHI, S.; TEFF, D.; MANSUR, N.; OREN, D.A.; TATEMATSU, K.; TOMOYASU, T.; KESSEL, M.; BUKAU, B.; OGURA, T. Proteolysis of the phage lambda CII regulatory protein by FtsH (HflB) of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v.24, n.6, p.1303-1310, 1997.
- SILVA-FILHO, M.C.; One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, n.6, 2003. /No prelo/
- SPETEA, C.; HUNDAL, T.; LOHMANN, F.; ANDERSSON, B. GTP Bound to chloroplast thylakoid membranes is required for light-induced, multienzyme degradation of the photosystem II D1 protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.96, n.11, p.6547-6552, 1999.
- STOJANOVSKI, D.; JOHNSTON, A.J.; STREIMANN, I.; HOOGENRAAD, N.J.; RYAN, M.T. Import of nuclear-encoded proteins into mitochondria. **Experimental Physiology**, v.88, n.1, p.57-64, 2003.
- SUZUKI, C.K.; REP, M.; VAN DIJL, J.M.; SUDA, K.; GRIVELL, L.A.; SCHATZ, G. ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. **Trends in Biochemical Sciences**, v.22, n.4, p.118-123, 1997.

- TAKECHI, K.; SODMERGEN; MURATA, M.; MOTOYOSHI, F.; SAKAMOTO, W. The *YELLOW VARIEGATED* (*VAR2*) locus encodes a homologue of FtsH, an ATP-dependent protease in *Arabidopsis*. **Plant Cell Physiology**, v.41, n.12, p.1334-1346, 2000.
- THORSNESS, P.E.; WHITE, K.H.; FOX, T.D. Inactivation of *YME1*, a member of the *ftsH-SEC18-PAS1-CDC48* family of putative ATPase-encoding genes, causes increased escape of DNA from mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v.13, n.9, p.5418-5426, 1993.
- THORSNESS, P.E.; FOX, T.D. Nuclear mutations in *Saccharomyces cerevisiae* that affect the escape of DNA from mitochondria to the nucleus. **Genetics**, v.134, n.1, p.21-28, 1993.
- TIAN, R.; ZHANG, G.Y.; YAN, C.H.; DAI, Y.R. Involvement of poly (ADP-ribose) polymerase and activation of caspase-3-like protease in heat shock-induced apoptosis in tobacco suspension cells. **Federation of European Biochemical Society Letters**, v.474, n.1, p.11-15, 2000.
- TOMOYASU, T.; YAMANAKA, K.; SUZAKI, T.; BOULOC, P.; KATO, A.; NIKI, H.; HIRAGA, S.; OGURA, T. Topology and subcellular localization of FtsH protein in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.5, p.1352-1357, 1993.

TOMOYASU, T.; GAMER, J.; BUKAU, B.; KANEMORI, M.; MORI, H.; RUTMAN, A.J.; OPPENHEIM, A.B.; YURA, T.; YAMANAKA, K.; NIKI, H. *Escherichia coli* FtsH is a membrane –bound , ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor sigma 32. **The EMBO Journal**, v.14, n.11, p.2551-2560, 1995.

VALE, R.D. AAA proteins: Lords of the ring. **The Journal of Cell Biology**, v.150, n.1, p.f13-f19, 2000.

VETTORE, A.L.; DA SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, n.1-4, p.1-7, 2001.

VIESTRA, R.D. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. **Trends in Plant Science**, v.8, n.3, p.135-142, 2003.

WEBER, E.R.; HANEKAMP, T.; THORSNESS, P.E. Biochemical and functional analysis of the YME1 gene product, an ATP and zinc-dependent mitochondrial protease from *S. cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, v.7, n.2, p.307-317, 1996.

WEIDE, R.; KOORNNEEF, M.; ZABEL, P. A Simple, nondestructive spraying assay for the detection of an active kanamycin resistance gene in transgenic tomato plants. **Theoretical and Applied Genetics**, v.78, n.2, p.169-172, 1989.

XU, Z.F.; CHYE, M.L.; LI, H.Y.; XU, F.X., YAO, K.M. G-box binding coincides with increased *Solanum melongena* cysteine proteinase expression in senescent fruits and circadian-regulated leaves. **Plant Molecular Biology**, v.51, n.1, p.9-19, 2003.