Camila Motta Borgonove
Engenheira Agrônoma

**Caracterização dos mecanismos de direcionamento das FtsHs às membranas dos
tilacóides**

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

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

**Piracicaba
2008**

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

Borgonove, Camila Motta

Caracterização dos mecanismos de direcionamento das FtsHs às membranas dos tilacóides / Camila Motta Borgonove. -- Piracicaba, 2008.
97 p. : il.

Tese (Doutorado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Clonagem 2. Cloroplastos vegetais 3. Expressão gênica 4. Melhoramento genético vegetal 5. Membranas vegetais 6. Proteínas de plantas I. Título

CDD 581.19245
B734c

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

DEDICATÓRIA

*Dedico à memória do meu avô Dr. José Motta, minha fonte inspiradora e exemplo de vida.
Ao meu esposo Luiz pelo amor e companheirismo durante a realização do doutorado, e à nossa filha
Helena que está chegando, dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade e apoio acadêmico de excelência;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo–FAPESP, pelo suporte financeiro;

Ao professor Dr. Márcio de Castro Silva Filho, pela orientação, incentivo e disponibilização de excelente infra-estrutura para a pesquisa;

Ao professor Dr. Daniel Scherer de Moura pelas informações acrescentadas e pelos conhecimentos compartilhados;

Aos funcionários e alunos do Departamento de Genética, ESALQ-USP, em especial a Rafael Colombi, pela dedicação e auxílio prestado aos alunos do nosso laboratório;

Aos colegas, veteranos e novatos, do Laboratório de Biologia Molecular de plantas, ESALQ-USP, pela amizade, companheirismo e boa convivência. Um agradecimento especial para Joze Correa, Carolina Viana Morgante e Celso Espada Fiore;

Ao Dr. Reinaldo Montrazi Barata, por ceder parte do material utilizado neste trabalho;

Aos colegas do curso e amigos Marcelo Oliveira, Andréa, Matheus Figueiredo, Walter, Edgar, Marcos Barone, Sidney, Jair, José Manoel e Larissa pelos momentos de alegria e descontração;

À Marcela Emanuele Scarso, pelo apoio nos trabalhos de laboratório, sobretudo nos trabalhos de cultura de tecido;

Ao cientista molecular Luiz Ricardo Hanai, pelo auxílio nos trabalhos de bancada e discussões científicas;

Aos meus familiares, em especial aos meus pais Elenice e Hildebrando pelo incentivo e apoio emocional nos momentos difíceis.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 FtsH, uma metaloprotease pertencente à família AAA.....	15
2.2 A família das FtsHs em plantas.....	17
2.3 Funções das FtsHs em plantas.....	20
2.4 Importação de proteínas para os cloroplastos.....	23
2.4.1 Maquinaria de translocação TOC.....	26
2.4.2 Maquinaria de translocação TIC.....	27
2.5 Transporte de proteínas no interior dos cloroplastos.....	28
2.5.1 Sistema Sec.....	29
2.5.2 Sistema Tat.....	30
2.5.3 Mecanismo de inserção dependente de SRP.....	33
2.5.4 Inserção Espontânea.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 Busca por seqüências de proteínas homólogas à FtsH5 e FtsH2 em banco dados.....	37
3.1.1 Análise filogenética das seqüências obtidas.....	38
3.2 Clonagem do gene ftsh2.....	39
3.2.1 Extração de RNA.....	39
3.2.2 Eletroforese de RNA em gel desnaturante.....	39
3.2.3 Síntese de cDNA.....	40
3.2.4 Amplificação do gene ftsh2.....	41

3.2.5 Clonagem do gene <i>ftsh2</i> no vetor pCR®2.1.....	41
3.2.6 Preparo de Células Eletrocompetentes de <i>E. coli</i> (DH 5α) para transformação.....	42
3.2.7 Transformação de <i>E. coli</i> (DH5α).....	42
3.2.8 Extração de DNA plasmidial das colônias transformadas.....	43
3.2.9 Análise das colônias transformadas.....	44
3.2.10 Sequenciamento das colônias obtidas.....	45
3.3 Clonagem do gene <i>ftsh5</i>	44
3.3.1 Extração de DNA plasmidial dos clones.....	44
3.3.2 Sequenciamento dos clones.....	44
3.4 Construções gênicas envolvendo os genes <i>ftsh5</i> (tomate) e <i>ftsh2</i> (tabaco).....	45
3.5 Extração dos fragmentos amplificados de gel de agarose.....	49
3.6 Restrição das amostras e do vetor de expressão em plantas.....	50
3.7 Ligação dos fragmentos ao vetor binário pCAMBIA1302.....	50
3.8 Extração de DNA plasmidial das colônias transformadas.....	51
3.9 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> com as construções gênicas.....	51
3.10 Transformação de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i>	51
3.11 Regeneração das plantas transformadas.....	52
3.12 Construções envolvendo a região amino-terminal da proteína FtsH5.....	52
3.13 Extração de DNA das plantas transformadas.....	54
3.14 Análises das plantas transformadas.....	54
3.15 Análises da expressão do transgene.....	55
3.16 Extração de proteínas totais.....	56
3.17 Quantificação protéica.....	56
3.18 <i>Western Blot</i>	56
3.19 Localização subcelular.....	57

3.19.1 Isolamento de cloroplastos.....	57
3.19.2 <i>Western Blot</i>	58
3.20 Microscopia confocal.....	59
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1 Análises Filogenéticas e Aspectos Evolutivos do Direcionamento de Proteínas Intraorganelar.....	60
4.2 Localização subcelular: <i>Western blot</i>	69
4.3 Processamento das proteínas quiméricas.....	71
4.4 Localização subcelular: Microscopia confocal.....	75
4.5 Ausência de dados para a construção PT-CT(FtsH5)-GFP.....	79
5 CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS.....	81

RESUMO

Caracterização dos mecanismos de direcionamento das FtsHs às membranas dos tilacóides

O motivo de dupla arginina na região amino-terminal é uma característica das proteínas direcionadas pela via Tat. O direcionamento das proteases cloroplastidiais do tipo FtsH (cpFtsH) que contém motivo característico mostrou ser dependente de componentes da maquinaria de translocação Tat. Contudo, análises genômicas mostraram que as proteínas FtsHs de plantas e cianobactérias podem ser separadas em três clados distintos. O primeiro grupo contém o motivo RR na região N-terminal, próximo ao primeiro segmento transmembrana. Os outros dois grupos não apresentam um motivo de dupla arginina apesar de terem duas argininas consecutivas encontradas na região lumenal que liga os dois domínios transmembranas. A FtsH5, uma protease que pertence ao terceiro grupo e uma série de construções envolvendo deleções na região C-terminal deste gene foram fusionados à GFP e usadas para avaliar os determinantes estruturais responsáveis pelo direcionamento da proteína para os tilacóides. Nossos resultados mostram que a proteína FtsH5 completa fusionada à GFP é corretamente direcionada para a membrana dos tilacóides, porém a região N-terminal não é suficiente para transportar a proteína GFP corretamente. Estes resultados são contrastantes com os dados obtidos para a proteína FtsH2, que apresenta o motivo clássico de dupla arginina, no qual o direcionamento pode ser mediado apenas pela região N-terminal. Nossos dados indicam que os determinantes para o direcionamento das FtsHs variam nos diferentes grupos. O requerimento da região C-terminal para o direcionamento da FtsH5 sugere a existência de um mecanismo de transporte alternativo.

Palavras-chave: Proteínas FtsHs; Membrana dos tilacóides; Via Tat

ABSTRACT

Characterization of the mechanisms the targeting of FtsH to the thylakoids membrane

A twin-arginine-containing N-terminal sequence motif is characteristic for proteins that are targeted by the Tat-pathway. Targeting of a chloroplast FtsH protease (cp-FtsH) that contains such a motif has been shown to depend on components of the twin-arginine translocation (Tat)-pathway. However, phylogenetic and sequence comparison analyses showed that FtsH proteins of plants and cyanobacteria could be separated into three distinct clades. The first group contains a stroma-facing RR-motif near the N-terminus upstream of the first hydrophobic domain. The other two groups lack an obvious twin-arginine motif, albeit two consecutive arginines are found in a conserved luminal region that links the trans-membrane domains. FtsH5, a group 3-belonging protease, and a series of C-terminal deletions of FtsH5 were fused to GFP and used to reveal structural determinants for the targeting to thylakoids. Our results show that only the full-length fusion protein was correctly targeted to thylakoid membranes, whereas the N-terminal region was not sufficient to correctly deliver GFP to thylakoids. In contrast, for FtsH2, which carries the classical twin-arginine motif, we found that targeting can be mediated by the N-terminal region alone. Our data indicate that the targeting determinants for FtsH vary in the different classes. The requirement of the C-terminal domain for the targeting of FtsH5 suggests the existence of an unusual targeting pathway.

Key words: FtsH proteins; Thylakoid membrane; Tat system

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAA- ATPases associadas à diversas atividades celulares

AIA- ácido 3-indolacético

ATP- trifosfato de adenosina

BAP- benzilaminopurina

BLAST- *basic local alignment and search tool*

BSA- albumina de soro bovina

cDNA- DNA complementar

dNTP- deoxiribonucleotídeo trifosfato

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

EST- *expressed sequence tag*

FSII- fotossistema II

GFP- proteína verde fluorescente

GTP- trifosfato de guanosina

Hsp- proteína de choque térmico, chaperona

KDa- quilo Dalton

LHCP- proteína coletora de luz

LTD- domínio de direcionamento tilacoidal

ME- membrana externa

MI- membrana interna

MT- membrana do tilacóide

PAGE- eletroforese em gel de poliacrilamida

pb- pares de base

PCR- reação da polimerase em cadeia

rpm- rotação por minuto

RT-PCR- PCR após transcrição reversa

SDT- domínio de direcionamento estromal

SDS- dodecil sulfato de sódio

Sec- via de secreção

SPP- peptidase de processamento estromal

SRH- segunda região de homologia

SRP- partícula reconhecedora de sinal

TAT- via de translocação dependente de dupla arginina

T-DNA- DNA de transferência

TIC- translocase da membrana interna de cloroplastos

TOC- translocase da membrana externa de cloroplastos

TPP- peptidase de processamento tilacoidal

Tris- Tris(hidroximetil)aminometano

Tween- polioxietilenosorbitol

1 INTRODUÇÃO

Os cloroplastos são organelas complexas responsáveis pela conversão da energia luminosa em energia química presente em compostos de carbono. Para realizar esta e outras importantes funções, os cloroplastos são equipados com aproximadamente 3000 proteínas. De acordo com a Teoria Endossimbionte, os cloroplastos são derivados de um procarioto fotossintetizante, provavelmente uma cianobactéria. Embora os cloroplastos tenham mantido ao longo dos anos a sua função, o genoma desta organela foi profundamente reduzido. Aproximadamente 95% das 3000 proteínas presentes nos cloroplastos são codificadas no núcleo, traduzidas no citossol e posteriormente transportadas para a organela (LEISTER, 2003). Entretanto os cloroplastos são organelas complexas em termos de arquitetura, pois apresentam seis compartimentos diferentes: membrana interna, membrana externa, espaço intermembrana, estroma, membrana do tilacóide e lúmen (ROBINSON et al., 1998). Para efetuar o transporte das proteínas codificadas no núcleo para os diferentes compartimentos cloroplastidiais, tornou-se necessário o desenvolvimento de complexos mecanismos de transporte. As proteínas direcionadas às membranas externas e internas dos cloroplastos empregam variações dos mecanismos TOC (*Translocon at the Outer Envelope Membrane of Chloroplasts*) e TIC (*Translocon at the Inner Envelope Membrane of Chloroplasts*). No caso de proteínas endereçadas aos compartimentos internos, o transporte pode ser realizado por pelo menos quatro mecanismos diferentes: via de inserção espontânea; dependente de um gradiente de pH ou também chamado de sistema Tat (*Twin-Arginine Translocation system*); dependente da maquinaria Sec (*secretory pathway*) ou dependente de SRP (*Signal Recognition Particle*) (MORI; CLINE, 2001). O mecanismo mais bem caracterizado é a via Tat. Este intrigante sistema de transporte é capaz de direcionar proteínas montadas para a membrana dos tilacóides ou para o lúmen. Uma característica interessante é que os substratos transportados por esta via apresentam um clássico motivo de dupla arginina na região amino-terminal, presente dentro da região conservada RRXFLK (DALBEY; ROBINSON, 1999). Um típico substrato transportado por esta via é a proteína Pftf (*plastid fusion and/or translocation factor*) de pimentão. Esta proteína, localizada na membrana dos tilacóides, apresenta o clássico motivo em sua região amino-terminal e seu transporte

mostrou ser dependente de componentes da maquinaria Tat (SUMMER et al., 2000). Entretanto, segundo Summer et al. (2000), a Pftf pode ser transportada para a membrana mesmo quando a região amino-terminal, incluindo o motivo clássico, é removida. Em nosso laboratório, Barata (2003) mostrou que a região amino-terminal da proteína FtsH5 não foi suficiente para direcioná-la corretamente à membrana dos tilacóides. Interessantemente, a FtsH5 não apresenta o clássico motivo de dupla arginina que está presente em praticamente todos os substratos que seguem a via Tat, tanto em plantas como em bactérias. Este fato sugere que membros de uma mesma família podem usar sistemas de transporte distintos ou então uma variação da via Tat. Sendo assim, tornou-se interessante caracterizar o mecanismo de transporte adotado por membros da família das FtsHs cloroplastidiais. Esses dados serão importantes para um melhor entendimento dos processos de transporte de proteínas para as membranas, além de trazer questões relevantes sobre a filogenia das proteínas FtsHs em plantas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FtsH, uma metaloprotease pertencente à família AAA

As proteínas AAA (ATPases Associadas a Diversas Atividades Celulares) constituem uma família particular de proteínas capazes de converter energia em atividade biológica. Seus membros estão envolvidos em diversos processos celulares como o controle do ciclo celular, regulação da expressão gênica e biogênese de organelas. As proteínas AAA são divididas em várias subfamílias de acordo com sua similaridade e função (BEYER, 1997), dentre elas destacam-se as metaloproteases AAA. Seus membros apresentam uma ou duas cópias do módulo AAA que é um domínio ATPásico altamente conservado definido por uma sequência de 220-250 aminoácidos. O módulo AAA possui os motivos Walker A e B relacionados à ligação ao ATP, e o motivo SRH (*Second Region of the Homology*) envolvido na hidrólise do ATP (KARATA et al., 1999). O domínio proteolítico é encontrado na região carboxi-terminal e contém o sítio de ligação ao zinco (H-E-X-X-H) que é responsável pela atividade da protease e uma provável estrutura *coiled coil*. (TOMOYASU et al., 1993). Este motivo distingue as metaloproteases das demais proteínas AAA.

Um dos membros procarióticos desta família é representado pela metaloprotease FtsH. Esta protease foi isolada a partir da caracterização do mutante *ftsH* Y16 de *E.coli* (OGURA et al., 1991), que pertence ao grupo de mutantes denominado *fts*, *filamentation temperature sensitive*. Esses mutantes quando cultivados em altas temperaturas (42 °C), não são capazes de formar o septo que separa as células durante a divisão celular.

A FtsH em *E.coli* corresponde a uma proteína integral de membrana de aproximadamente 71 KDa e apresenta dois segmentos transmembrana em sua região amino-terminal seguido por um domínio citoplasmático carboxi-terminal contendo uma cópia do módulo AAA e um motivo de ligação ao zinco, responsável pela sua atividade proteolítica (Figura1) (TOMAYASU et al., 1993).

Várias funções foram descritas para a FtsH em *E. coli*. Por exemplo, a enzima é requerida para a degradação de algumas proteínas instáveis como a proteína regulatória σ 32 (fator de transcrição sigma *heat shock*) (TOMAYASU et al., 1995) e a

proteína CII do fago λ (ativador transcricional) (HERMAN et al., 1993). Estas foram as primeiras evidências experimentais da atividade proteolítica da FtsH.

Figura 1- Diagrama representativo da FtsH de *E. coli*. O módulo AAA engloba os motivos Walker A e Walker B e a SRH (segunda região de homologia). Adaptado de Marbach; Coelho e Silva-Filho (2001)

O genoma da cianobactéria *Synechocystis* codifica quatro genes homólogos a FtsH a saber: slr0228 (ftsh1), slr1390 (ftsh2), slr1463 (ftsh3), slr1604 (ftsh4) (MANN et al., 2000). Estudos com mutantes mostraram que dois deles - slr1390 e slr1604 - são genes essenciais para a sobrevivência do organismo, enquanto que o slr0228 está envolvido com o controle de qualidade do Fotossistema II, degradando a proteína D1, que está envolvida no transporte de elétrons e, portanto sofre constantes danos fotooxidativos (SILVA et al., 2003).

Em leveduras (*Sacharomyces cerevisiae*), foram identificadas três proteínas homólogas a FtsH: Yme1, Yta10, Yta12. Todas são encontradas na membrana interna da mitocôndria formando dois complexos protéicos distintos (m-AAA e i-AAA). O complexo m-AAA é constituído pelas subunidades Yta10 e Yta12 que estão presentes em quantidades equimolares. O sítio catalítico destas proteínas é encontrado na matriz mitocondrial. O complexo i-AAA é formado pela protease Yme1 e apresenta o sítio catalítico no espaço intermembrana (LEONARHARD, 1996). Esses complexos são responsáveis pela degradação de subunidades protéicas que não adquiriram a conformação correta (SUZUKI et al., 1997; apud YU; PARK; RODORMEL, 2004). Alguns autores sugerem que a FtsH é uma proteína muito versátil agindo também como chaperona em adição a sua atividade proteolítica (YU; PARK; RODORMEL, 2004).

A existência de uma protease homóloga a FtsH em plantas foi primeiramente demonstrada por Hugueney et al. (1995) quando estudava o desenvolvimento de

plastídios em pimentão. Em seus estudos, o autor isolou uma protease envolvida com fusão de vesículas e transporte de proteínas que foi inicialmente denominada de Pftf (*Plastid fusion and/or translocation factor*). Esta proteína apresentava alta similaridade com a FtsH bacteriana. Posteriormente, Lindahl et al. (1996) encontraram uma proteína similar nos cloroplastos de espinafre que apresentou reação com um anticorpo específico para a FtsH de *E. coli*. Subseqüentemente, proteases homólogas a FtsH foram encontradas em um grande número de espécies de plantas tais como: tabaco (SEO et al., 2000), tomate (BARATA, 2003), *Arabidopsis* (CHEN, M. et al, 2000), arroz (YU; PARK; RODERMEL, 2005), cana-de-açúcar (MARBACH; COELHO; SILVA-FILHO, 2001).

Em plantas, genes homólogos a FtsH são encontrados nas membranas internas das mitocôndrias e na membrana dos tilacóides em cloroplastos (Figura 2). Geralmente, são codificados por genes nucleares e pós-traducionalmente importados para suas respectivas organelas por meio de seqüências de direcionamento específicas (CHEN, M. et al., 2000; HUGUENEY et al., 1995; LEONHARD et al., 1996).

Figura 2- Esquema mostrando a disposição da FtsH em plantas superiores. Em cloroplastos a FtsH está presente nas membranas dos tilacóides e em mitocôndria a FtsH é encontrada na membrana interna. ME:membrana externa; MI: membrana interna; MT: membrana do tilacóide

2.2 A Família das FtsHs em plantas

Segundo Marbach, Coelho e Silva-Filho (2001) o genoma da maioria dos procariotos (75%) contém apenas um único gene que codifica para a protease FtsH,

com exceção das cianobactérias, que apresentam quatro genes (MANN et al., 2000). Entretanto, no genoma de plantas superiores esses genes são encontrados em múltiplas cópias. O genoma nuclear de *Arabidopsis thaliana* contém doze genes (CHEN, K.; CHEN, X.; SCHNELL, 2000; LINDAHL et al., 1996; MARBACH; COELHO; SILVA-FILHO, 2001; SAKAMOTO et al., 2003; URANTOWKA et al., 2005; YU; PARK; RODERMEL, 2004) enquanto que para o genoma de arroz (*Oryza sativa*) já foram encontrados nove genes (YU; PARK; RODERMEL, 2005). Esta multiplicação de genes que codificam para proteases do tipo FtsH em plantas superiores ocorreu depois da divergência de seus progenitores procarióticos, por duplicação de diferentes genes de cianobactérias e parece estar relacionado com a evolução do aparato fotossintético (ADAM et al., 2005). De fato, os estudos mostram que todas as proteases FtsH encontradas nos organismos fotossintetizantes estão relacionadas com a proteção e reparo do fotossistema ao excesso de luz. Este pode ser um reflexo da necessidade da membrana dos tilacóides em reparar complexos protéicos que sofrem constantes danos fotooxidativos.

Os genomas de *arabidopsis* e arroz também apresentam genes semelhantes a genes encontrados em leveduras, sugerindo que estes derivaram de uma α -proteobactéria, que parecem ser ancestral das mitocôndrias atuais (SAKAMOTO et al., 2003).

Dos doze genes encontrados em *arabidopsis*, o produto de três deles (FtsH3, FtsH4 e FtsH10) é direcionado para mitocôndrias, oito são encontrados nos cloroplastos (FtsH1, FtsH2/VAR2, FtsH5/VAR1, FtsH6, FtsH7, FtsH8, FtsH9, FtsH12) (SAKAMOTO et al., 2003), e um (FtsH11) tem duplo direcionamento para mitocôndrias e cloroplastos (URANTOWKA et al., 2005).

Várias hipóteses tentam justificar a presença de múltiplas cópias de genes altamente relacionados. Uma possível explicação é que eles sejam expressos em diferentes órgãos ou em resposta a diferentes estímulos ambientais. Análise filogenética do genoma de *arabidopsis* mostrou que dos doze genes encontrados, oito deles podem ser agrupados em quatro pares, cujas seqüências são altamente conservadas. São eles: AtFtsH1 e AtFtsH5/VAR1, AtFtsH2/VAR2 e AtFtsH8, AtFtsH3 e AtFtsH10, AtFtsH7 e AtFtsH9. Esses pares de genes provavelmente surgiram de

eventos de duplicação que ocorreram durante a história evolucionária do genoma de *arabidopsis* (VISION; BROWN; TANKSLEY, 2000).

Análises estruturais das seqüências de proteínas mostraram que a região carboxi-terminal, encontrada após o módulo AAA apresenta um alto grau de similaridade dentro de cada par, entretanto diferem consideravelmente entre os pares. De fato, a região carboxi-terminal está relacionada com a especificidade ao substrato o que é importante na determinação da função de cada protease. Isto sugere que os membros desta família tenham diferentes atividades como demonstrado para homólogos em bactérias e leveduras (AKIYAMA; YOSHIHISA; ITO, 1995; ARLT et al., 1996).

Sakamoto et al. (2003) demonstraram que as FtsHs presentes nos cloroplastos estão agrupadas formando um complexo protéico na membrana dos tilacóides. Essas observações foram baseadas em experimentos de imunoprecipitação que revelaram uma associação entre as proteínas FtsH5/VAR1 e FtsH2/VAR2. Mais recentemente, análises de SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Eletrophoresis*) e experimentos de filtração de gel em *arabidopsis* mostraram que estes complexos eram formados por no mínimo quatro proteínas: FtsH1, FtsH5/VAR-1, FtsH2/VAR2 e FtsH8 (YU; PARK; RODERMEL, 2004). Estes experimentos também revelaram que estas proteínas estariam agrupadas formando dois tipos de subunidades: tipo A (FtsH1 e FtsH5/VAR-1) e tipo B (FtsH2/VAR2 e FtsH8) (Figura 3). Na ausência de qualquer um dos tipos (A e B) não é formado o complexo e as proteínas remanescentes são degradadas, entretanto dentro de cada tipo as subunidades são intercambiáveis.

Figura 3- Esquema mostrando a composição dos complexos proteicos formados por proteína FtsHs do tipo A (FtsH1 e FtsH5) e tipo B (FtsH2 e FtsH8). Fonte: Adan; Rudella e van Wijk (2006)

Estudos anteriores revelaram que as proteases da família AAA provavelmente formam estruturas hexaméricas (SOUZA et al., 2000; ZALTSMAN; FEDER; ADAM, 2005). Este processo de oligomerização parece crucial para atividade proteolítica, presumivelmente porque os resíduos de aminoácidos das subunidades vizinhas estariam envolvidos na ligação de moléculas de ATP aos módulos AAA (LANGER, 2000). Como a maioria das FtsHs de plantas apresenta dois domínios transmembrana em suas regiões amino-terminais, é provável que elas formem homo- e hetero-oligômeros dependendo de eventos fisiológicos e metabólicos.

2.3 Funções das FtsHs em plantas

Em plantas superiores tem sido observado que a FtsH está envolvida com várias atividades celulares. Ostersetzer e Adam (1997) mostraram que a FtsH é a responsável direta pela degradação de formas solúveis e associadas às membranas das proteínas Reiske Fe/S (subunidade do complexo citocromo *b₆f*) que não foram montadas em sua conformação correta.

Uma proteína chamada DS9, homóloga à FtsH2 de arábidaopsis foi encontrada em tabaco regulando a reação de hipersensibilidade (SEO et al., 2000). Neste trabalho, os autores encontraram que as células saudáveis apresentavam elevada concentração dessa protease enquanto que nas células infectadas pelo TMV (vírus do mosaico do

tabaco) a quantidade dela diminuía drasticamente antes do aparecimento das lesões. Esses resultados sugerem que a diminuição no nível da proteína FtsH em células infectadas pelo TMV, tem como resultado a perda de funcionamento dos cloroplastos e a aceleração da reação hipersensível.

Recentemente, Zelisko et al. (2006) demonstraram que a FtsH6 de *Arabidopsis thaliana* é responsável pela degradação das apoproteínas Lhcb1 e Lhcb3 durante a aclimação em condições de alta intensidade luminosa e durante a senescência. Estas duas proteínas - Lhcb1 e Lhcb3 - fazem parte do complexo LHCII (*light harvesting chlorophyll binding protein*) localizado na membrana dos tilacóides, sendo responsável por capturar a energia luminosa e transferi-la, na forma de energia de excitação, para o Fotossistema II (FSII). Este dado é interessante, pois anteriormente acreditava-se que a FtsH6 era um pseudogene já que a análise do proteoma de cloroplastos bem como os dados de seqüências expressas (EST) não detectavam a presença desta proteína. Atualmente, sabe-se que ela é expressa nos tilacóides em condições de senescência ou alta intensidade luminosa, embora os níveis tanto de mRNA como de proteína sejam bastante baixos. Segundo Sun et al. (2006) a protease FtsH6 de tomate, denominada LeftsH6, comporta-se como uma típica proteína de *heat-shock*, apresentando uma rápida resposta ao estresse por temperatura.

Recentemente, Chen et al. (2006) caracterizaram o gene que codifica para a AtFtsH11 e revelaram que esta proteína exerce um importante papel na resposta a termotolerância, uma função que até então só tinha sido reportada para os homólogos de bactéria e levedura (ADAM et al., 2005).

Uma importante função atribuída a FtsH é a degradação da proteína D1 (componente do Fotossistema II) que participa no processo de fotoinibição. A fotoinibição ocorre quando a planta é exposta a condições de alta luminosidade e espécies reativas de oxigênio que são rapidamente formadas, danificam a proteína D1. Como forma de reparar os danos causados pelo efeito das espécies reativas de oxigênio, um mecanismo de reparo da D1 ocorre no interior dos cloroplastos no sentido de restabelecer esta proteína (MELIS, 1999). Esse processo de reparo envolve dois passos (ANDERSON; ARO, 1997). Primeiramente, ocorre uma clivagem endoproteolítica no *loop* estromal que conecta as hélices D e E da proteína na

membrana. Esta primeira clivagem é realizada pela proteína DegP2 que é uma serino protease pertencente a família Deg-Htr (HAUBÜHL et al., 2001) e produz um fragmento amino-terminal de 23 KDa e um carboxi-terminal de 10 KDa. Estudos *in vitro* mostraram o envolvimento da FtsH1 na degradação do fragmento de 23 KDa. Para tanto, Lindahl et al. (2000), superexpressaram e purificaram a proteína FtsH1 de *arabidopsis* em *E.coli*. Assim, quando complexos do Fotossistema II desprovidos de FtsH foram isolados e iluminados, o fragmento de 23 KDa acumulou-se. Por outro lado, quando estes mesmos complexos foram colocados em contato com a FtsH1 recombinante na presença de ATP a degradação foi observada, comprovando o envolvimento da FtsH1 no processo degradativo.

A análise de diferentes mutantes de *arabidopsis* revelou que o nocaute do gene *ftsh2* resulta num fenótipo variegado denominado VAR2, no qual setores verdes contendo cloroplastos normais são encontrados adjacentes a setores brancos, onde os plastídios são vacuolados e não apresentam membrana dos tilacóides. Este fenótipo é mais pronunciado nos estágios juvenis de desenvolvimento foliar e não é observado nas folhas cotiledonares (CHEN, M. et al., 2000). Estudos mais aprofundados dos plastídios encontrados nos setores brancos mostraram que estes são formados por células vivas que possuem distintas estruturas plastidiais e não são consequência de morte celular ou mesmo senescência (KATO et al., 2007). O mesmo fenótipo embora menos acentuado foi encontrado para mutantes do gene *ftsh5* e são denominados VAR1 (SAKAMOTO et al., 2002). Como vimos anteriormente, o gene *ftsh2* está relacionado ao gene *ftsh8* (apresentam uma identidade de 90% em termos de sequência de aminoácidos), assim como o gene *ftsh5* está relacionado ao gene *ftsh1* (87% de identidade). É interessante comentar que a superexpressão do gene *ftsh8* em um mutante VAR2 (FtsH2) restaura o fenótipo selvagem e o mesmo acontece para superexpressão do gene *ftsh1* no mutante VAR1 (FtsH5). Entretanto, o nocaute dos genes *ftsh8* e *ftsh1* não acarreta em nenhuma alteração fenotípica. Isto sugere que os genes dentro de cada par tenham funções redundantes (YU; PARK; RODERMEL, 2005).

Interessantemente, o fenótipo variegado apresenta dois fenótipos dentro de uma mesma folha onde todas as células teriam o mesmo genótipo. Os setores verdes

representam o fenótipo selvagem e os setores brancos o fenótipo mutante. Este intrigante fenótipo foi estudado por Yu, Park e Rodermel (2004) que propuseram um modelo para explicar a variação foliar presente nos mutantes. Segundo este modelo, pequenas variações na expressão gênica em diferentes células empurrariam o nível das proteínas FtsHs remanescentes para cima ou para baixo do limiar necessário para o desenvolvimento normal dos cloroplastos. Estes dados mostram que a FtsH2 e FtsH5 estão relacionadas com a biogênese dos plastídios, já que os mutantes para estes genes apresentam anormalidades no desenvolvimento dos cloroplastos (CHEN, M. et al., 2000). Nesses mutantes também foi observado um aumento na sensibilidade a fotoinibição (BAILEY et al., 2002).

2.4 Importação de proteínas para os cloroplastos

Plastídios são uma heterogênea família de organelas encontradas em células de plantas e algas. Entre os membros desta família, estão os cloroplastos que são organelas fotossintetizantes responsáveis por captar a energia solar e convertê-la em energia química presente em compostos de carbono.

Como as mitocôndrias, os cloroplastos foram adquiridos por endossimbiose através do engolfamento de um procarioto fotossintetizante, provavelmente uma cianobactéria. Embora os cloroplastos tenham mantido ao longo dos anos a sua função, o genoma desta organela foi profundamente reduzido. Aproximadamente 95% das 3000 proteínas presentes nos cloroplastos são codificadas no núcleo, traduzidas no citossol e posteriormente transportadas para a organela (LEISTER, 2003).

Entretanto, os cloroplastos são organelas extremamente complexas formadas por seis compartimentos subcelulares sendo três distintos sistemas de membrana (membrana externa, membrana interna, membrana dos tilacóides) e três compartimentos aquosos (espaço intermembrana, estroma e lúmen). Sendo assim, as proteínas destinadas aos cloroplastos são sintetizadas sob a forma de grandes precursores e apresentam na extremidade amino-terminal uma sequência de direcionamento específica conhecida como peptídeo de trânsito que é clivada após a chegada da proteína na organela. Caso o destino da proteína seja a membrana dos

tilacóides ou o lúmen, a proteína precursora irá apresentar um peptídeo de trânsito bipartite, formado pelos domínios STD (*Stroma Targeting Domain*) e LTD (*Lumen Targeting Domain*) (Figura 4A). O primeiro domínio é responsável por direcionar a proteína até o estroma, sendo posteriormente clivado por uma protease estromal, a SPP (*Stromal Processing Peptidases*). Após a clivagem, a proteína expõe a segunda região do peptídeo de trânsito que direciona a proteína para membrana dos tilacóides onde ela é novamente processada por uma protease tilacoidal, a TPP (*Thylakoid Processing Peptidases*) (ROBINSON et al., 1998).

O domínio estromal dos precursores pode variar de 30 a 100 aminoácidos. Apesar de apresentarem pouca similaridade entre si, essas seqüências são caracterizadas pela presença dos aminoácidos serina e treonina e pela ausência de estrutura secundária (KEEGSTRA; CLINE, 1999). Já o domínio luminal do peptídeo de trânsito é formado por três motivos conservados que se assemelham aos encontrados nos peptídeos de trânsito bacterianos, incluindo uma região amino- terminal carregada positivamente, uma porção central hidrofóbica e uma região carboxi-terminal polar (Figura 4B) (MORI; CLINE, 2001) precedida pelo motivo A-X-A (onde X representa qualquer aminoácido) que representa o sítio de clivagem da protease tilacoidal TPP (KEEGSTRA; CLINE, 1999).

O peptídeo de trânsito é responsável por direcionar a proteína precursora até a membrana externa dos cloroplastos dando início ao processo de importação da proteína para o interior da organela (JARVIS; SOLL, 2002).

Figura 4- Importação de proteínas nos cloroplastos. (a) Esquema mostrando o processamento e a importação da proteína precursora para a membrana dos tilacóides. (b) Esquema representativo do peptídeo de trânsito

O transporte de proteínas através das membranas externas dos cloroplastos é mediado pelo domínio estromal do peptídeo de trânsito e ocorre em três estágios. Primeiramente os precursores se associam reversivelmente com proteínas presentes na membrana externa dos cloroplastos que constituem o complexo TOC. Essa associação provavelmente é realizada por interações proteína-proteína e estabilizadas por lipídios de membrana. Uma vez reconhecidas, as proteínas precursoras são profundamente inseridas nas membranas e entram em contato com o aparato TIC (KOURANOV; SCHNELL, 1997), presente na membrana interna dos cloroplastos. Este estágio requer baixas concentrações de ATP e GTP e é considerado irreversível

(OLSEN; KEEGSTRA, 1992; YOUNG; KEEGSTRA; FROEHLICH, 1999). No último estágio do processo de importação, a pre-proteína é completamente translocada para o estroma e o peptídeo de trânsito é clivado pela protease estromal SPP. Esta etapa exige altas concentrações de ATP. O ATP requerido para a completa translocação dos precursores é hidrolisado dentro da organela por chaperonas que puxam a pré-proteína para o interior do cloroplasto. Diferentemente do processo de importação em mitocôndria, a importação de proteínas para os cloroplastos não requer força próton-motriz (THEG et al. 1989).

Proteínas citossólicas também auxiliam no processo de translocação através das membranas dos cloroplastos. Elas se ligam as pré-proteínas que serão transportadas impedindo que estas se montem no citossol o que dificultaria a passagem pelo canal de translocação formado pelos complexos TOC-TIC. Além disso, os fatores citossólicos desempenham uma importante função no reconhecimento e na distinção do peptídeo de trânsito de outras seqüências de direcionamento similares, garantindo um correto tráfico de proteínas dentro das células (MAY; SOLL, 2000).

2.4.1 Maquinaria de translocação TOC

O reconhecimento específico dos precursores e seu transporte através da membrana externa dos cloroplastos ocorre por meio de um complexo molecular chamado TOC. Este complexo protéico foi primeiramente identificado em cloroplastos de ervilha (WARGEMANN; SOLL, 1991; PERRY; KEEGSTRA, 1994) sendo constituído por um complexo receptor formado por três subunidades que são nomeadas de acordo com o peso molecular: TOC159, TOC34 e TOC75 (SCHLEIFF et al., 2003). TOC159 é uma GTPase que se insere na membrana externa dos cloroplastos pelo seu domínio carboxi-terminal (CHEN K.; CHEN X.; SCHNELL, 2000). Tanto o domínio amino-terminal como o sítio de ligação ao GTP estão expostos no citossol. Recentemente, uma forma citossólica da TOC159 foi descrita sugerindo que esta proteína pode se mover da membrana para o citossol e vice-versa. (HILTBRUNNER et al., 2001; KESSLER; SCHNELL, 2004). A proteína TOC34 é muito semelhante à Toc159. Ela também é uma GTPase que se encontra inserida na membrana externa pelo domínio

carboxi-terminal, sendo que seu domínio citossólico apresenta alta homologia com o sítio de ligação ao GTP da proteína TOC159 (BOURNE; SANDERS; MCCORMICK, 1991). O terceiro componente do complexo receptor é representado pela TOC75. Esta proteína é profundamente inserida na membrana dos cloroplastos apresentando 16-18 regiões transmembranas que formam um poro aquoso por onde passam as pré-proteínas que estão sendo transportadas (HINNAH et al., 2002). Em adição, as proteínas TOC12 e TOC64 são encontradas associadas periféricamente ao complexo receptor (SOHRT; SOLL, 2000) (Figura 5).

Figura 5- Componentes da maquinaria TOC. Fonte: Adaptado de Schleiff et al (2003)

2.4.2 Maquinaria de translocação TIC

Várias proteínas têm sido identificadas como possíveis componentes da maquinaria TIC: TIC110, TIC62, TIC55, TIC40, TIC62, TIC22 e TIC20 (Figura 6) (KEEGSTRA; CLINE, 1999). A proteína TIC22, que reside no espaço intermembrana,

facilita a passagem das pré-proteínas do aparato TOC para o TIC, talvez em associação com a chaperona Hsp70 e com a TOC12. Um canal de translocação é formado pelas proteínas TIC110 e TIC20 (JARVIS; ROBINSON, 2004). A proteína TIC110 atua também em estágios mais tardios do processo de translocação recrutando chaperonas para o complexo TIC que auxiliam no transporte das pré-proteínas. Alguns autores sugerem que a TIC110 trabalhe em associação com a TIC40 (INABA et al., 2003). As proteínas TIC62 e TIC55 apresentam motivos estruturais relacionados a fatores redox, o que sugere que estas proteínas possam ter um importante papel na regulação de respostas endógenas ao status redox (JARVIS; SOLL, 2002).

Figura 6- Componentes da maquinaria TIC. EI- espaço intermembrana, MI- membrana interna. Fonte: Adaptado de Schleiff et al. (2003)

2.5 Transporte de proteínas no interior dos cloroplastos

Caso o destino da proteína seja as membranas dos tilacóides ou sua região luminal, após o processo de importação ter sido finalizado, deve-se dar início ao

processo de exportação para as membranas que pode ser realizado por quatro mecanismos diferentes (Figura 7): inserção espontânea, dependente de um gradiente de pH ou também chamado sistema Tat, dependente da maquinaria Sec, ou dependente de SRP (MORI; CLINE, 2001).

Figura 7 - Mecanismos de exportação de proteínas para a membrana dos tilacóides. Fonte. Wickner e Schekman (2005)

2.5.1 Sistema Sec

A via Sec em cloroplastos provavelmente está relacionada ao mecanismo Sec de exportação de proteínas para o espaço periplasmático em bactéria (ROBSON; COLLINSON, 2006). Em *E. coli* este sistema é formado pela SecA, uma proteína periférica responsável pela hidrólise de ATP, por um complexo hexamérico formado pelas proteínas SecY, SecE, SecG, SecD, SecF e YajC e pela chaperona SecB que se liga ao substrato impedindo a sua montagem no estroma. Acredita-se que as proteínas SecYEG formem um complexo trimérico que funcione como um canal de translocação por onde o substrato é conduzido. As proteínas SecDFYajC, constituem um segundo complexo que se associa ao canal de translocação (SecYEC) e auxilia na manutenção da força próton motor que se estabelece entre os dois lados da membrana sendo

responsável por estabilizar a SecA e promover a liberação das proteínas exportadas no espaço periplasmático (JARVIS; ROBINSON 2004, MANTING et al., 2000).

Em cloroplastos, este sistema parece operar com um número reduzido de componentes sendo encontrado homólogos apenas para as proteínas SecA (cpSecA), SecY(cpSecY) e SecE(cpSecE). É possível que em cloroplastos o sistema Sec utilize outros componentes que ainda não foram desvendados.

Como em bactérias, nos cloroplastos a via Sec transporta proteínas no estado não “montado”. (MARQUES et al., 2004). Entretanto, a chaperona SecB não foi identificada entre os componentes da via Sec em cloroplastos, o que sugere que algum fator estromal seja necessário para manter os substratos aptos para o transporte já que na ausência de estroma o transporte é altamente reduzido (JARVIS; ROBINSON 2004).

2.5.2 Sistema Tat

O sistema Tat é encontrado na membrana tilacoidal dos cloroplastos de plantas e algas e na membrana citoplasmática em bactérias e é constituído por três proteínas integrais: Tha4, Hcf106 e cpTatC em cloroplastos e seus ortólogos ThatA, TatB e TaC em bactérias. As proteínas Tha4 (TatA) e Hcf106 (TatB) apresentam um único segmento transmembrana enquanto que a cpTatC (TatC) contém seis domínios transmembrana (Figura 8). Nos cloroplastos estas três subunidades estão agrupadas formando dois subcomplexos. As subunidades Hcf106 e cpTatC formam o complexo receptor que se localiza na membrana tilacóide e apresenta um tamanho de aproximadamente 700 KDa. A proteína a ser transportada se liga a esse complexo estabelecendo um gradiente de prótons que promove a ligação da proteína Tha4 ativando o canal de translocação, que se dissocia após o término do transporte (MORI; CLINE 2002).

Figura 8 - Componentes do sistema de translocação Tat em cloroplastos.

Fonte: Schünemann (2007)

Um dos aspectos mais interessantes deste mecanismo é a capacidade de transportar proteínas “montadas” (MARQUES; DUDECK; KLÖSGEN, 2003). Em bactérias os substratos da via Tat incluem proteínas ligadas a cofatores, enzimas redox e fatores de virulência (BERKS; PALMER; SARGENT, 2005). Deste modo, o canal de translocação deve ter um diâmetro flexível possibilitando a passagem de proteínas de tamanho variado sem permitir a passagem de íons e outras pequenas moléculas (MORI; CLINE, 2001). Análises de microscopia eletrônica mostraram que a proteína TatA bacteriana forma uma estrutura em forma de anel de diâmetro variado (GÖHLKE et al., 2005). Posteriormente, Dabney-Smith et al. (2006) constataram que a oligomerização de Tha4 junto ao canal de translocação ativo resulta em um rearranjo conformacional da proteína Tha4 que permite a passagem do substrato.

Os substratos transportados pela via Tat em bactéria são caracterizados pela presença do motivo RRXFLK (onde X representa qualquer aminoácido), sendo que a

dupla RR é invariante e os demais aminoácidos são encontrados com uma frequência superior a 50% (BERKS, 1996). Já em plantas, o motivo é formado por RRX seguido por dois aminoácidos hidrofóbicos (PELTIER; 2002). Uma exceção é feita para a proteína Reiske Fe/S. Esta proteína é ancorada na membrana dos tilacóides por um único segmento transmembrana (KARNAUCHOV; HERRMANN; KLÖSGEN, 1997) encontrado na região amino terminal. Além de ancorar a proteína na membrana esta região serve como sinal de direcionamento no transporte até a membrana (MADUENO; BRADSHAW; GRAY, 1994). Segundo experimentos de importação realizados na presença de proteínas inibidoras e competidoras, a proteína Reiske é transportada pela via Tat (MOLIK et al., 2001). Entretanto, esta proteína não apresenta o clássico motivo de dupla arginina, sendo encontrada uma lisina-arginina antes do domínio hidrofóbico (KARNAUCHOV; HERRMANN; KLÖSGEN, 1997).

Tanto em bactérias como em plantas, a sequência consenso é localizada na junção entre a região amino-terminal e o núcleo hidrofóbico (DALBEY; ROBNSION, 1999). A importância do motivo RR tem sido constantemente analisada. Em bactérias, estudos de mutagênese sítio dirigida mostram que a substituição de qualquer uma das argininas por outro aminoácido reduz drasticamente a eficiência do transporte (KREUTZENBECK et al., 2007). Em plantas, a substituição da arginina por qualquer outro aminoácido, mesmo que seja do mesmo grupo funcional, bloqueia o transporte da proteína precursora (CHADDOCK et al., 1995; MORI; CLINE, 2002). Entretanto, Summer et al. (2000) mostraram que a deleção do peptídeo sinal, incluindo o motivo de dupla arginina, embora cause uma redução na eficiência, não impede o transporte da proteína. Segundo Gerard e Cline (2006), o motivo de dupla arginina é importante no reconhecimento do substrato pelo complexo receptor cpTatC-Hcf106. Uma forte interação é encontrada entre a subunidade cpTatC e resíduos adjacentes a dupla arginina presentes no peptídeo sinal. Os mesmos autores reportaram que no momento do transporte o peptídeo sinal é profundamente enterrado no sítio de ligação do complexo receptor (GERARD; CLINE, 2007). Entretanto, um modelo alternativo propõe que a translocação pode ser iniciada por uma inserção não assistida do substrato na membrana sendo que a interação com o canal de translocação ocorreria em estágios mais avançados do transporte. De acordo com este modelo, a proteína a ser

transportada forma uma estrutura temporária conhecida como *loop* no qual a região amino-terminal e carboxi-terminal se encontram expostas no estroma. Após a formação desta estrutura ocorre a interação do substrato com os componentes da via Tat e subseqüentemente a região carboxi-terminal da proteína precursora é transportada para o lúmen do tilacóide onde ela é processada pela protease TPP e a proteína madura é liberada (HOU; FRIELINGSDORF; KLÖSGEN, 2006).

Os requerimentos energéticos da via Tat foram inicialmente analisados por experimentos de importação *in vitro* usando cloroplastos ou tilacóides isolados. Esses estudos demonstram que o transporte requer a presença de um gradiente de prótons na membrana dos tilacóides (MOULD; ROBINSON, 1991). Entretanto, análises *in vivo* usando *Chlamydomonas reinhardtii* ou protoplastos de tabaco mostraram que o gradiente de prótons não é requerido no transporte dos substratos nestas condições (DI COLA; BAILEY; ROBINSON, 2005; FINAZZI et al., 2003). Segundo COLA; BAILEY e ROBINSON (2005) a presença de um potencial elétrico pode providenciar a força necessária para dirigir a translocação na ausência do gradiente de prótons. Porém, a dissipação tanto do gradiente de prótons como do potencial elétrico não inibem o transporte dos substratos pela via Tat em protoplastos. Perante estes dados, os autores concluem que os requerimentos energéticos podem diferir entre o sistema *in vitro* e *in vivo* e sugerem que estas diferenças podem ser resultantes de fatores desconhecidos que estão ausentes do sistema *in vitro*.

2.5.3 Mecanismo de inserção dependente de SRP

Em bactérias, muitas proteínas localizadas na membrana interna são direcionadas pela via SRP enquanto que em cloroplastos este mecanismo é responsável pelo transporte de proteínas do complexo LHCP (SCHÜNEMANN, 2004; LUIRINK et al., 2005). As proteínas LHCPs são sintetizadas no citossol com uma seqüência amino-terminal que especifica o direcionamento para o interior dos cloroplastos. No estroma, essa seqüência é clivada e as proteínas se ligam ao complexo SRP. Esse complexo é formado por duas subunidades: uma GTPases de 54 KDa (cpSRP54), encontrada também no complexo SRP citoplasmático e uma

subunidade única dos cloroplastos de 43 KDa (cpSRP43) (FRANKLIN; HOFFMAN, 1993). A proteína SRP43 atua no reconhecimento de uma sequência consenso presente nos substratos. Logo após o reconhecimento, a cpSRP54 se liga a regiões de alta hidrofobicidade das proteínas LHCPs formando o complexo de trânsito solúvel. Um segundo fator solúvel, a FtsY (outra GTPase), também está envolvido no mecanismo de inserção que é dependente da hidrólise de moléculas de GTP (TU; SCHUENEMANN; HOFFMAN, 1999). Esta proteína se liga ao complexo de trânsito e transfere a proteína alvo para maquinaria de translocação localizada na membrana dos tilacóides. Após alcançar a superfície da membrana, as proteínas LHCPs recrutam um terceiro componente, a Alb3 (uma proteína integral de membrana) que é responsável por sua inserção na membrana (MOORE et al., 2000) (Figura 9).

Assim como os demais mecanismos de translocação, o SRP foi herdado das cianobactérias, os prováveis ancestrais dos cloroplastos. Em bactérias, o SRP é responsável pelo transporte de um grande número de proteínas para a membrana plasmática. A proteína Alb3 é considerada homóloga à proteína YidC de *E. coli* que desempenha um papel fundamental na biogênese de membranas em bactérias (SAMUELSON et al., 2000). Entretanto, há diferenças entre este sistema de transporte em bactérias e cloroplastos. Em *E. coli*, o SRP compreende um único polipeptídeo de 48 KDa associado a uma molécula de RNA 4,5S enquanto que em cloroplastos, como descrito anteriormente, o complexo é formado por um dímero- cpSRP54/ cpSRP43- e não há componente de RNA. O processo de inserção das proteínas também opera diferentemente. Em bactérias, as proteínas de membrana são reconhecidas pela SRP assim que deixam os ribossomos. Posteriormente, interagem com elementos solúveis da via Sec e são direcionadas para o canal de translocação SecYEG onde ocorre a inserção na membrana plasmática (DALBEY; KUHN, 2000; GIER et al., 1997). A proteína YidC se associa ao canal de translocação SecYEG e auxilia no processo de inserção das proteínas. Em cloroplastos a via SRP pode funcionar tanto co-traducionalmente, transportando proteínas traduzidas nos cloroplastos (proteína D1), como pós-traducionalmente que é o caso das proteínas do complexo LHCPs (EICHACKER; HENRY, 2001). Duas populações da proteína SRP54 são encontradas, uma associada com ribossomos que participam do processo co-traducional e outra

associada à proteína SRP43. Este último apresenta importância preponderante no transporte das proteínas LHCP. Em ambos os processos, a eficiência do transporte reside na habilidade da partícula SRP54 em reconhecer e associar-se a região central hidrofóbica do peptídeo de trânsito que emergem dos ribossomos (EICHACKER; HENRY,2001)

Figura 9 - Esquema representativo da via de transporte dependente de SRP. Fonte: Adaptado de Schünemann (2007)

2.5.4 Inserção Espontânea

Nos últimos anos, vários trabalhos têm sugerido a existência de um mecanismo de inserção de proteínas na membrana dos tilacóides que não utiliza energia e não requer a presença de outras proteínas conhecido como inserção espontânea (COLA; BAILEY; ROBINSON, 2005; JARVIS; ROBINSON, 2004). Entre os substratos conhecidos desta via estão as proteínas CFoll, PsbX, PsbW, que são sintetizadas com um peptídeo de trânsito bipartite semelhante aqueles encontrados em proteínas que seguem a via Sec ou Tat. Experimentos *in vitro*, usando tilacóides isolados mostraram que estas proteínas não se associam a nenhum canal de translocação. Além disso, o processo de inserção não requer a presença de extrato estromal e nucleotídeos

trifosfato (ROBINSON, et al., 1996). A análise dos substratos transportados pela via de inserção espontânea mostrou que eles apresentam um domínio hidrofóbico localizado próximo a região amino-terminal da proteína madura. Este domínio, juntamente com o domínio hidrofóbico presente nos peptídeos de trânsito destas proteínas é responsável pela formação de uma estrutura intermediária em forma de *loop*, que é estabilizada por interações hidrofóbicas (THOMPSON; KIM; ROBINSON, 1998). O transporte destas proteínas ocorre primeiramente pela inserção da região hidrofílica no lúmen. Posteriormente, o peptídeo de trânsito é clivado pela TPP gerando a proteína madura que permanece ancorada na membrana dos tilacóides pelo domínio hidrofóbico localizado na região amino-terminal da proteína. Recentemente, foram identificados novos substratos que seguem a via de inserção espontânea. Entre eles estão as proteínas PsaK e PsaG que representam subunidades do Fotossistema I. Essas proteínas são formadas por dois domínios transmembrana conectados por um *loop* estromal carregado positivamente. Interessantemente, análises bioquímicas mostraram que a carga positiva na região do *loop* apresenta um importante papel na inserção das proteínas. Entretanto, estudos anteriores envolvendo as proteínas CF_oII, PsbX, PsbW, atribuíam ao domínio transmembrana um importante papel no mecanismo de inserção dos substratos (ZYGADLO et al., 2006). Estes dados sugerem que os fatores que governam o mecanismo de inserção espontânea podem variar entre as proteínas que seguem esta via.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Busca por seqüências de proteínas homólogas à FtsH5 e FtsH2 em banco dados

Foi realizada uma busca nos bancos de dados: GenBank, TAIR (*The Arabidopsis Information Resource database*), TIGR (*The Institute for Genomic Research*) por seqüências homologas à FtsH5 e FtsH2 em plantas superiores e cianobactérias (Tabelas 1 e 2). Posteriormente, para as seqüências de aminoácidos de plantas foram determinados as regiões correspondentes ao peptídeo de trânsito e os motivos hidrofóbicos presentes na região amino-terminal com auxílio dos programas *SignalP* (BENDTSEN et al., 2004) e *TMHMM* (NIELSEN; KROGH, 1998). As proteínas foram analisadas quanto à presença ou ausência do motivo de dupla arginina. Para as FtsHs de cianobactérias foi usado o programa *SignalP* para determinar a seqüência de direcionamento. Posteriormente, foi feita uma busca por motivos de dupla arginina localizados após a seqüência de direcionamento.

Tabela 1 - Proteases FtsHs em diferentes espécies de cianobactérias

Organismo	Nº de acesso	Presença do motivo Tat
<i>Synechocystis sp (SyFtsH1)</i>	NP442160	Não
<i>Synechocystis sp (SyFtsH2)</i>	NP440525	Sim
<i>Synechocystis sp (SyFtsH3)</i>	NP440797	Não
<i>Synechocystis sp (SyFtsH4)</i>	NP440330	Não
<i>Thermosynechococcus elongatus (TeFtsH1)</i>	NP681523	Não
<i>T. elongatus (TeFtsH2)</i>	NP6812622	Não
<i>T. elongatus (TeFtsH3)</i>	NP681318	Não
<i>T.elongatus (TeFtsH4)</i>	NP680922	Não
<i>Prochlorococcus marinus (PmFtsH1)</i>	NP894509	Não
<i>P. marinus (PmFtsH2)</i>	NP895625	Não
<i>P. marinus (PmFtsH3)</i>	NP894211	Não
<i>P. marinus (PmFtsH4)</i>	NP894588	Sim
<i>Synechococcus sp (ScFtsH1)</i>	NP897393	Não
<i>Synechococcus sp (ScFtsH2)</i>	NP896400	Não
<i>Synechococcus sp (ScFtsH3)</i>	NP897680	Sim
<i>Synechococcus sp (ScFtsH4)</i>	NP897304	Não
<i>Nostoc sp (NoFtsH1)</i>	NP487682	Não
<i>Nostoc sp (NoFtsH2)</i>	NP488816	Sim
<i>Nostoc sp (NoFtsH3)</i>	NP488976	Não
<i>Nostoc sp (NoFtsH4)</i>	NP485304	Não

Tabela 2 - Proteases FtsH em cinco espécies de plantas superiores

Organismo	N° de acesso	Presença do motivo <i>Tat</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i> (AtFtsH1)	At1g50250	Não
<i>A. thaliana</i> (AtFtsH2)	At2g30950	Sim
<i>A. thaliana</i> (AtFtsH5)	At5g42270	Não
<i>A. thaliana</i> (AtFtsH6)	At5g15250	Sim
<i>A. thaliana</i> (AtFtsH7)	At3g47060	Não
<i>A. thaliana</i> (AtFtsH8)	At1g06430	Sim
<i>A. thaliana</i> (AtFtsH9)	At5g58870	Não
<i>A. thaliana</i> (AtFtsH11)	At5g53170	Não
<i>A. thaliana</i> (AtFtsH12)	At5g79560	Não
<i>Capsium annuum</i> (CaFtsH5)	CAA62084	Não
<i>C. annuum</i> (CaFtsH2)	CAA09935	Sim
<i>Solanum Lycopersicum</i> (SlFtsH5)	AAQ93011	Não
<i>S. Lycopersicum</i> (SlFtsH6)	BAD99306	Sim
<i>Nicotiana tabacum</i> (NtFtsH5)	BAA33755	Não
<i>N. tabacum</i> (NtFtsH2)	AAD17230	Sim
<i>Oriza sativa</i> (OsFtsH2)	Os06g45820	Sim
<i>O. sativa</i> (OsFtsH1)	Os06g12370	Não
<i>O. sativa</i> (OsFtsH6)	Os02g43350	Sim
<i>O. sativa</i> (OsFtsH7)	Os05g38400	Não

3.1.1 Análise filogenética das seqüências obtidas

As análises filogenéticas das seqüências de proteínas obtidas anteriormente foram realizadas utilizando o pacote computacional MEGA 4 (TAMUR; DUDLEY; KUMAR, 2007). As distâncias evolutivas foram calculadas a partir do método baseado na matriz JTT (JONES; TAYLOR; THORNTON, 1992). O agrupamento foi feito pelo método Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987). A confiabilidade dos nós foi verificada através de *bootstraps*.

Para o alinhamento das seqüências foi utilizado o *CLUSTALW* (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994).

3.2 Clonagem do gene *ftsh2*

O gene *ftsh2* foi obtido a partir da extração de RNA total de plantas de *Nicotiana tabacum* (var. SR1).

3.2.1 Extração de RNA

Primeiramente foram coletadas duas amostras de folhas de tabaco (100 mg cada) que foram maceradas em cadinho com nitrogênio líquido. Antes de descongelar foi adicionado a cada um dos macerados 1 mL de Trizol[®], e os extratos resultantes transferidos para tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL. Os homogeneizados foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente, e posteriormente centrifugados à 12.000 g (microcentrífuga) por 10 minutos, à 4°C. Os sobrenadantes foram coletados em novos tubos onde foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio e agitados vigorosamente por 15 segundos. Após este procedimento os tubos foram incubados por 3 minutos, à temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugados à 12.000 g (microcentrífuga) por 15 minutos, à 4°C. Transferiu-se a fase aquosa de cada amostra para novos tubos Eppendorf e precipitou-se o RNA adicionando-se 0,5 mL de isopropanol para 1 mL de Trizol utilizado no início. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas, posteriormente, a 12.000 g por 10 minutos, à 4°C e o sobrenadante de cada tubo foi removido. O RNA precipitado formou um *pellet* gelatinoso no fundo do tubo. Os *pellets* foram lavados uma vez com 1 mL de etanol 75% e as amostras resultantes misturadas no vortex e centrifugadas à 7.500 g por 5 minutos, à 4°C. Descartou-se novamente o sobrenadante. Os *pellets* foram secos ao ar por 5-10 minutos e posteriormente ressuspensos em 20-80 µL de água livre de RNase. As amostras foram incubadas por 10 minutos, a 55-60°C. Para verificar a presença de RNA, leituras espectrofotométricas das soluções obtidas foram tomadas a 260-280 nm. Amostras de RNA parcialmente dissolvidas têm uma razão $A_{260}/A_{280} < 1,6$.

3.2.2 Eletroforese de RNA em gel desnaturante

As amostras de RNA total foram separadas em gel de agarose em condições desnaturantes e específicas para RNA seguindo o protocolo descrito por Sambrook e

Russel (2001) com algumas modificações. 0,43 g de agarose foram dissolvidas em 27 mL de água destilada à 70 °C. Em seguida foi adicionado 3 mL de tampão MOPS 10X concentrado (200 mM de ácido 3-[N-morpholino]propanesulfonic (MOPS), 50 mM de acetato de sódio e 10 mM de EDTA), 1,62 mL de formaldeído 37% (12,3 M) e 1 µL de brometo de etídeo (10 mg/mL). Esta solução foi vertida em um suporte sólido e após sua polimerização, foi adicionado tampão MOPS 1X. Quatro volumes de cada amostra de RNA foi misturada com um volume de uma solução estoque de RNA *loading buffer* 5X concentrado, composta de 16 µL de solução de azul de bromofenol saturada, 80 µL de EDTA 500 mM pH 8,0; 720 µL de formaldeído 37% (12,3 M), 2 mL de glicerol 100%, 3084 µL de formamida, 4 mL de tampão MOPS (10X) e água livre de RNase até um volume final de 10 mL. Antes de carregar o gel, as amostras de RNA junto com o *loading buffer* foram aquecidos por 5 minutos à 65 °C.

3.2.3 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado o Kit SuperScript II RT (Invitrogen). Seguindo as recomendações do fabricante, em um tubo Eppendorff estéril (0,5 mL), foi adicionado 1 µL de oligo(dT), 2 µL (5 µg) de RNA de tabaco. A mistura foi aquecida à 65 °C por 5 minutos e colocada no gelo por 1 minuto. Adicionou-se 4 µL de tampão First Strand (5X), 2 µL de DTT (0,1 M) e 1 µL de mix dNTP (10 mM). Os componentes foram misturados e incubados à 42 °C por 2 minutos após os quais foi adicionado 1 µL (200 unidades) de SuperScript II (Transcriptase Reversa). O tubo foi incubado à 42 °C por 50 minutos e a reação inativada por aquecimento à 70 °C por 15 minutos. Ao tubo foi adicionado 1 µL (2 unidades) de RNase H de *E. coli* e o mesmo incubado à 37 °C por 20 minutos.

3.2.4 Amplificação do gene *ftsh2*

A amplificação do gene de interesse foi realizada com *primers* específicos que se anelam nas extremidades da sequência de nucleotídeos do gene *ftsh2*. Esses *primers* foram engenheirados de modo a conter sítios de restrição nas extremidades para facilitar posteriormente a inserção do gene de interesse no vetor binário que será usado na transformação de plantas de tabaco.

3.2.6 Preparo de Células Eletrocompetentes de *E. coli* (DH 5 α) para transformação

A bactéria *E. coli* (DH5 α), estocada à -80 °C, foi inoculada em 2 mL de meio 2XYT (0.5% NaCl, 1.0% extrato de levedura, 1.6% triptona pH: 7,5) e incubada por 15 horas à 37 °C. Após este período, 500 μ L dessa suspensão foram colocados em 500 mL de meio 2XYT estéril e mantidos sob agitação (180 rpm) à 37 °C por aproximadamente 1 hora onde a absorbância (A_{600}) não deve ultrapassar os valores 0,6-0,9. Nesse ponto, a cultura foi transferida para tubos SS-34 e centrifugada à 4000 rpm (rotor SLT 50 da Sorvall) por 20 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 40 mL de água deionizada autoclavada gelada. Uma centrifugação de 20 minutos foi feita e o *pellet* ressuspensionado em 20 mL de água deionizada gelada. As células passaram por mais uma etapa de centrifugação (4000 rpm por 20 minutos à 4 °C) e o *pellet* foi colocado no gelo onde foi gentilmente ressuspensionado em 15 mL de solução de glicerol 10% gelada. O conteúdo dos tubos foi misturado de modo a obter 30 mL de solução em cada frasco. A solução foi novamente centrifugada à 4.000 rpm por 10 minutos à 4 °C. Os tubos foram colocados no gelo onde o sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspensionado em 1 mL de solução de glicerol 10% e posteriormente usadas nos procedimentos de transformação.

3.2.7 Transformação de *E. coli* (DH5 α)

Para a transformação, em um tubo Eppendorf adicionou-se 1 μ L de DNA plasmidial (provenientes da reação descrita acima) e 200 μ L de células eletrocompetentes. A mistura foi incubada no gelo por 30 minutos sendo posteriormente transferidas para cuvetas de 0,1 cm estéreis e previamente resfriadas. A amostra foi eletroporada no eletroporador Gene Pulser II System (BIORAD) seguindo as recomendações do fabricante. Imediatamente após o choque adicionou-se 1 mL de meio Luria-Bertani- LB [1% (p/v) de bacto-triptona, 0,5% (p/v) de extrato de levedo, 1% (p/v) de NaCl, pH 7,5] e as células foram mantidas sob forte agitação (180 rpm) por 1 hora a 37 °C. Centrifugou-se a 13000 rpm (microcentrífuga) por 1 minuto e descartou-se 900 μ L do sobrenadante. Após a ressuspensão das células, inoculou-se 100 μ L da amostra em placa de Petri contendo meio de cultura LB sólido (mesma composição do

meio LB acrescido de 0,8% de bacto-agar) contendo antibiótico ampicilina (200 mg/L) e X-gal (1 mg/placa) e a placa foi incubada à 37 °C, por 20 horas.

3.2.8 Extração de DNA plasmidial das colônias transformadas

Foram escolhidas seis colônias dentre as que cresceram sob meio de cultura sólido contendo antibiótico para serem analisadas quando a presença do gene de interesse. Essas colônias foram inoculadas individualmente em 3 mL de meio LB líquido contendo antibiótico ampicilina (200 mg/L) por 12 horas, a 37°C sob agitação. Após este período, as suspensões bacterianas foram transferidas para tubos Eppendorfs de 1,5 mL e centrifugadas em microcentrífuga por 1 minuto 12.000 rpm. Os *pellets* foram ressuspendidos em 200 µL da solução I (50 mM glicose, 25 mM Tris-HCl pH8,0; 10 mM Na₂EDTA) e mantidos por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 200 µL da solução II (0,2 M NaOH, 1.0% SDS) e os tubos foram incubados no gelo por 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se 150 µL da solução III (3 M KOAc pH 5,5) e as amostras foram rapidamente colocados no gelo por 5 minutos e depois centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, os sobrenadantes contendo o DNA plasmidial foram transferidos para novos tubos onde foram adicionados 500 µL de fenol e 500 µL de clorofórmio para a eliminação de compostos orgânicos. As amostras foram centrifugadas 12.000 rpm por 5 minutos. Para cada tubo, foi recolhida a fase superior aquosa, obtida após a centrifugação e transferidas para novos tubos onde adicionou-se 500 µL de clorofórmio sendo novamente submetidas a centrifugação por 12.000 rpm por um minuto. Após a centrifugação a fase aquosa superior de cada amostra foi novamente transferida para novos tubos onde foi adicionado 1 mL de etanol absoluto e os tubos foram deixados por 20 minutos a -20°C para a precipitação do DNA. Decorrido este tempo, as amostras de DNA plasmidial foram centrifugadas 12.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação pode ser visualizado *pellets* no fundo dos tubos. Os *pellets* foram lavados com etanol 70% e deixados secar ao ar por 15 minutos, sendo posteriormente ressuspendidos em 30 µL de água destilada.

3.2.9 Análise das colônias transformadas

Após a extração, os plasmídeos foram analisados para verificar a presença do gene de interesse. Para tanto, foram utilizadas enzimas de restrição que cortam o DNA em sítios específicos, possibilitando a identificação dos plasmídeos transformados.

3.2.10 Seqüenciamento das colônias obtidas

O seqüenciamento das colônias foi feito no Centro de Estudos do Genoma Humano, localizado, no Instituto de Biociências da USP, que oferece serviços de seqüenciamento de DNA plasmidial utilizando o MegaBACE 1000. As reações de seqüenciamento são realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase).

As seqüências resultantes foram comparadas com a seqüência de nucleotídeos do gene *ftsh2* (acesso: AF117339) para verificar se o gene clonado correspondia ao gene de interesse.

3.3 Clonagem do gene *ftsh5*

Devido às dificuldades surgidas na amplificação do gene *ftsh5* a partir do RNA de tomate, optamos por solicitar clones do gene de interesse. A escolha dos clones foi feita por meio de Blast em banco de *ESTs* usando a seqüência do gene *ftsh5*. Escolhemos três *ESTs* que faziam parte de uma biblioteca genômica de tecido floral de *Solanum lycopersicum* (var. *cerasiforme*) e apresentavam uma identidade de 99% em termos de seqüência de nucleotídeos com o nosso gene alvo. Deste modo, os clones: *clet20g6*, *ctod19e5* e *cley12l11*, que correspondentes as *ESTs* selecionadas, foram solicitados ao Clemson University Genomics Institute.

3.3.1 Extração de DNA plasmidial dos clones

A metodologia de extração de DNA plasmidial foi descrita no item 3.2.8.

3.3.2 Seqüenciamento dos clones

Os clones foram seqüenciados no Centro de Estudos do Genoma Humano, e seguiram a mesma metodologia descrita no item 3.2.10.

3.4 Construções gênicas envolvendo os genes *ftsh5* (tomate) e *ftsh2* (tabaco)

Os genes clonados e seqüenciados - *ftsh2* e *ftsh5* - foram utilizados como molde na obtenção de quatro construções gênicas que serão detalhadas abaixo. Todas as construções foram inseridas no vetor binário pCAMBIA 1302 sob controle do promotor 35S e em fase de leitura com a proteína repórter GFP presente no vetor.

A primeira construção (FtsH5-GFP) é formada pela seqüência completa do gene que codifica a proteína FtsH5 de tomate. A amplificação deste gene gera produto de 2.400 pb. Os *primers* utilizados para a obtenção da seqüência correspondente ao gene da FtsH5 estão representados abaixo:

Primer FtsH5-atg: 5'-CCCAGATCTCCAATGGCCAATGCT-3'

Bal

Primer FtsH5-stop: 5'-GGGACTAGTAGAAATGTATAGCTC-3'

Spe I

A reação de PCR usada foi a mesma descrita no item 3.2.4, sendo alterado apenas os *primers* e o DNA molde.

A segunda construção (PT-CT(FtsH5)-GFP) é formada pela seqüência do gene da *ftsh5* sem a região hidrofóbica. A amplificação deste fragmento gera um produto de 1.600 pb.

A deleção na seqüência do gene *ftsh5* envolvendo os domínios hidrofóbicos foi realizada através de PCR para o qual foi necessário o uso de quatro *primers*. Os *primers* que se anelam nas extremidades da seqüência são os mesmos usados na primeira construção que compreende o gene completo da *ftsh5*, sendo assim, apenas dois novos *primers* foram desenhados. Estes iniciadores se anelam nas extremidades da região a ser removida e são complementares um ao outro.

Primer A:

5'-ATTTCAAGAATGTTCCATCTAGGCGGTCTCAGGGCGGCCCAGGT-3'

Primer B:

5'-ACCTGGGCGGCCCTGAGACCGCCTAGATGGAACATTCTTGAAAT-3'

Os procedimentos para a amplificação desta construção foram realizados três etapas.

1ª etapa: Amplificação do peptídeo de trânsito:

Primeiramente foi feita uma reação de PCR com os *primers* FtsH5-atg e *primerB*, que amplifica o peptídeo de trânsito. Entretanto o *primerB* possui uma extensão de 20 nucleotídeos complementar a região localizada logo após o segundo segmento transmembrana. Esta região não irá se anelar na seqüência e funcionará simultaneamente como *primer* e como molde na terceira etapa, pois como veremos a seguir, esta região tem complementaridade com o produto amplificado na segunda reação de PCR. O esquema abaixo ilustra o processo:

Os seguintes componentes foram utilizados na reação de amplificação: 5 µL de tampão (10X) para PCR (200 mM de TrisHCl pH 8,4; 500 mM KCl), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL de dNTP mix (10 mM), 1 µL de *primer* específico FtsH-atg (10 µM), 1 µL de

primer específico *primerB* (10 μ M), 0,4 μ L de *Platinum Taq DNA polimerase* (5 unidades/ μ L), 0,5 μ L de DNA plasmidial (clone cley12111), 40,6 μ L de água estéril.

Programa de PCR:

- 94 °C por 3 minutos
- 30 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 58 °C por 50 segundos e 72 °C por 40 minutos
- 72 °C por 3 minutos

2ª etapa: Amplificação da região carboxi-terminal:

Na segunda etapa foi feita outra reação de PCR usando os *primers* FtsH5-stop e *primerA*. Esta reação amplifica a região carboxi-terminal que vai do final do segundo *span* até o *codon stop*. O *primerA* é complementar ao *primerB*, portanto também possui uma extensão de 20 nucleotídeos que não se anelam na seqüência, pois tem complementariedade com a região localizada imediatamente antes do primeiro *span*.

A reação de PCR foi realizada da mesma maneira que a reação acima substituindo apenas os *primers* FtsH5-atg e *primerB* por FtsH5-stop e *primerA*. O programa de PCR usado também foi o mesmo.

3ª etapa: Fusão da região do peptídeo de trânsito com a região carboxi-terminal:

Na terceira e última etapa, os dois produtos de PCR foram colocados em uma mesma reação e utilizados simultaneamente como molde e *primers* na obtenção da sequência desejada. O esquema abaixo representa o processo:

A reação de PCR foi realizada da seguinte maneira: 5 μ L de tampão (10X) para PCR (200 mM de TrisHCl pH 8,4; 500 mM KCl), 1,5 μ L de $MgCl_2$ (50 mM), 1 μ L de dNTP mix (10 mM), 1 μ L do produto obtido na reação 1, 1 μ L do produto obtido na reação 2, 0,4 μ L de *Platinum Taq DNA polimerase* (5 unidades/ μ L), 40,6 μ L de água estéril.

Programa de PCR:

- 94 °C por 3 minutos
- 30 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 58 °C por 50 segundos e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos
- 72 °C por 3 minutos

Após o sétimo ciclo foi colocado 1 μ L do *primer* FtsH-atg e 1 μ L do *primer* FtsH-stop e a reação procedeu até o trigésimo ciclo.

A terceira construção (PT-H1-Loop-H2(FtsH2)-GFP) é formada pelo peptídeo de trânsito mais os dois domínios hidrofóbicos do gene *ftsH2*, incluindo o motivo conservado de dupla arginina. A região a ser amplificada apresenta um tamanho de 610 pb. Os seguintes *primers* foram usados na amplificação:

Primer FtsH2-atg: 5'-GGGCCATGGCTCCTTCATCAGTATGC-3'

Primer FtsH2-span2: 5'-GGGGAGATCTGCCCCACCAGGACCTCCCAT-3'
BqI II

Os *primers* acima foram utilizados para amplificar o fragmento desejado usando como molde, o vetor pCR®2.1-TOPO FtsH2 amplificado anteriormente, sendo que a reação de amplificação e o programa utilizado foram o mesmo descrito anteriormente.

A quarta construção (PT(FtsH2)-H1-Loop-H2(FtsH5)-GFP) é uma quimera formada pelo peptídeo de transito da FtsH2 fusionado aos dois domínios hidrofóbico da FtsH5. A amplificação desta região gera um produto de 720 pb. Os iniciadores utilizados foram:

Primer FtsH2-atg: 5' GGGCCATGGCTCCTTCATCAGTATGC-3'
Nco I

Primer FtsH2-PT: 5'-GATGGAACATTCTTGAAATTGAGAAAACCTCTTCTTCCTT-3'

Primer FtsH5-H1:5'-AAGGAAGAAGAGGTTTTCTCAATTTCAAGAATGTTCCATC-3'

Primer FtsH5-H2: 5'-CCCACTAGTTCCAGGCCACCTGGCGG-3'
SpeI

Os procedimentos usados para realizar esta construção foram os mesmos descritos para a terceira construção.

3.5 Extração dos fragmentos amplificados de gel de agarose

As amostras obtidas nas reações de PCR descritas acima foram aplicadas em gel de agarose 1% para posterior excisão das bandas correspondentes aos fragmentos desejados. Foi utilizado o Kit Qiaex II® da Qiagen para purificação das amostras.

3.6 Restrição das amostras e do vetor de expressão em plantas

As amostras descritas anteriormente e o vetor binário pCAMBIA1302 (disponível em nosso laboratório, Figura10) foram digeridas com as respectivas enzimas de restrição (cerca de 5 unidades por micrograma de DNA). Nas construções 1 e 2 foi usado um vetor pCAMBIA1302 modificado que apresenta uma mutação no sítio de restrição *Nco* I de modo a eliminar o ATG presente neste sítio. Após as etapas de digestão, as amostras foram purificadas novamente para eliminar a presença de sais.

Figura 10 - Vetor binário pCAMBIA1302 utilizado nos procedimentos de transformação de plantas

3.7 Ligação dos fragmentos ao vetor binário pCAMBIA1302

A ligação das amostras digeridas ao vetor pCAMBIA1302 também digerido foi realizada utilizando-se uma proporção de 1 vetor: 3 insertos. Deste modo, o DNA plasmidial juntamente com os insertos foram colocados em tubos do tipo Eppendorf, onde foram adicionados a enzima *T*₄ DNA ligase e seu respectivo tampão. As reações foram incubadas por 2 horas à 16°C.

Os produtos da ligação foram introduzidos em *E. coli* DH5α. As células eletrocompetentes foram preparadas conforme procedimento descrito anteriormente e a transformação foi realizada por eletroporação.

3.8 Extração de DNA plasmidial das colônias transformadas

Foram selecionadas seis colônias de cada construção e estas foram usadas para extração do DNA plasmidial conforme metodologia descrita anteriormente.

3.9 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com as construções gênicas

A transformação de *A. tumefaciens* (GV3101) com as construções 1,2,3, 4 e com vetor pCAMBIA1302 fechado foi feita por eletroporação segundo o protocolo descrito no item 3.2.7. As células foram plaqueadas em meio LB sólido + kanamicina (100 µg/mL) + rifampicina (50 µg/mL) + gentamicina (50 µg/mL) e incubadas à 28° C por 2 dias.

3.10 Transformação de plantas de *Nicotiana tabacum*

A transformação de tabaco (*Nicotiana tabacum*) foi feita em três etapas:

1ª etapa: Preparo do inóculo:

Primeiramente foi preparado o inóculo que será usado na infecção dos discos foliares de tabaco. Para isso, cerca de 100 µL de cada linhagem de *Agrobacterium* (GV3101) contendo o vetor binário pCAMBIA1302 com os respectivos insertos foi inoculada em 5 mL de meio LB (contendo os antibióticos: kanamicina (100 µg/mL), rifampicina (50 µg/mL) e gentamicina (50 µg/mL) e incubadas à 28° C até atingirem a fase exponencial de crescimento ($A_{600} = 0,6$). Ao final desta etapa, obtivemos cinco inóculos diferentes sendo que cada um representava uma determinada construção.

2ª etapa: Preparação dos explantes de fumo:

Folhas jovens de tabaco *in vitro* foram cortadas em pedaços pequenos de aproximadamente 1 cm², incluindo nervuras foliares, com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, sobre uma placa de Petri umedecida com água deionizada e estéril para manter os explantes hidratados.

3ª etapa: Co-cultura dos explantes com o inóculo:

Em placas de Petri, foram adicionados 1 mL do inóculo preparado anteriormente, sendo que cada placa recebeu uma única linhagem de *Agrobacterium* com uma determinada construção. Em seguida, foram adicionados cerca de 10 explantes foliares

em cada placa e estes foram mantidos no meio líquido por 15 minutos à temperatura ambiente sob leve agitação. Após este período, os explantes foram transferidos para outra placa de Petri forrada com papel de filtro estéril para retirar o excesso de bactérias. Seguidamente, os explantes foram colocados em placas contendo meio MS sólido (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 6- BAP (1 mg/L) permanecendo no escuro por 48 horas à 28 °C.

3.11 Regeneração das plantas transformadas

Após 3 dias, os pedaços de folhas foram transferidos para meio de cultura MS + higromicina (25 µg/mL) + cefotaxime (500 µg/mL) + 6-BAP (2,2 µg/mL), que permite a regeneração das plantas transformadas, resistentes a higromicina. Os explantes foram transferidos a cada duas semanas para novas placas com meio de cultura fresco. Os brotos regenerados com aproximadamente 2 cm foram colocados em frascos com meio de enraizamento (meio MS suplementado com 0,1 mg/L de AIA e agentes seletivos). As plantas enraizadas foram levadas para casa de vegetação e transferidas para vasos.

3.12 Construções envolvendo a região amino-terminal da proteína FtsH5

Recentemente, em nosso laboratório foi desenvolvido um projeto de pesquisa que tinha como objetivo estudar as propriedades iniciais do direcionamento da proteína FtsH5 para os cloroplastos. Para realização deste projeto foram obtidas cinco construções gênicas envolvendo a região amino-terminal da proteína FtsH5, todas inseridas no vetor pCAMBIA1302 e fusionadas a proteína repórter GFP. As propriedades iniciais do direcionamento destas quimeras foram analisadas, porém os resultados não foram conclusivos. Portanto, plantas transformadas com estas construções foram cedidas pelo pesquisador responsável, Dr. Reinaldo Montrazi Barata, para serem novamente analisadas como parte do presente projeto.

A primeira construção TP(FtsH5)-GFP compreende a região que vai da primeira metionina até o provável sítio de clivagem do peptídeo de trânsito. A segunda construção TP-H1(FtsH5)-GFP corresponde ao peptídeo de trânsito seguido pelo

primeiro domínio hidrofóbico da proteína. A terceira construção PT-H1-Loop(FtsH5)-GFP é formada pelo peptídeo de trânsito, o primeiro domínio hidrofóbico e a região hidrofílica compreendida entre os dois domínios transmembrana. Finalmente, o quarto gene quimérico TP-H1-Loop-H2(FtsH5)-GFP compreende a região que vai do peptídeo de trânsito até a segunda região hidrofóbica seguida de 11 aminoácidos da proteína madura.

Segue abaixo um esquema de todas as construções usadas no projeto:

Construções FtsH5:

Construção FtsH2:

Construção FtsH5-FtsH2:

3.13 Extração de DNA das plantas transformadas

A extração de DNA foi efetuada com o reagente Plant DNAzol da Invitrogen. Primeiramente, foi coletado aproximadamente 0,1 g de tecido foliar que foi macerado na presença de nitrogênio líquido, até obtenção de um pó fino e homogêneo. O material ainda congelado foi transferido para tubos do tipo Eppendorf contendo previamente 0,3 mL de Plant DNAzol. As amostras foram misturadas gentilmente por inversão dos tubos e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Após este tempo, foi adicionado nas amostras 0,3 mL de clorofórmio e uma nova incubação foi feita (5 minutos, temperatura ambiente). Posteriormente os extratos foram centrifugados à 12.000 g por 10 minutos e o sobrenadante resultante foi transferido para novos tubos. Para precipitar o DNA das amostras, foi feita uma centrifugação do sobrenadante na presença de 0,225 mL de etanol 100% (5.000 g, 4 minutos). Após a centrifugação o *pellet* podia ser visualizado e o sobrenadante foi descartado. Seguiram-se vários passos de lavagem do DNA para total limpeza das amostras. Na primeira etapa de lavagem, foi usado 0,3 mL de uma solução contendo Plant DNAzol e etanol 100% na proporção de 1(DNAzol):0,75 (Etanol 100%). As amostras foram mantidas por 5 minutos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas. (5.000 g, 4 minutos). Os *pellets* foram novamente lavados com 0,3 mL de uma solução de etanol 75% para completa remoção do reagente e centrifugados à 5000 g por 5 minutos. Os precipitados, após a secagem, foram dissolvidos em 70 µL de H₂O Milli-Q e quantificados em gel de agarose 1%.

3.14 Análises das plantas transformadas

As plantas transformadas foram analisadas por PCR para verificar a presença do T-DNA na plantas obtidas. Após a extração do DNA genômico foram feitas reações de PCR com *primers* que se anelam no início da seqüência de nucleotídeos de cada construção e na proteína repórter GFP, presente no vetor. Os *primers* utilizados para cada construção estão dispostos na Tabela 3.

As plantas que apresentaram o fragmento de tamanho desejado foram mantidas na casa de vegetação e submetidas a análise de expressão gênica.

Tabela 3 - Seqüência dos *primers* utilizados para verificação da inserção do T-DNA nas plantas que cresceram em meio seletivo

Construção	Iniciadores	Seqüência dos iniciadores
FtsH5-GFP	FtsH5-atg	5'CCCAGATCTCCAATGGCCAATGCT3'
	GFP REV	5'GGGTAAGTTTTCCGTATGT3'
PT(FtsH5)-GFP	FtsH5-atg	5'CCCAGATCTCCAATGGCCAATGCT3'
	GFP REV	5'GGGTAAGTTTTCCGTATGT3'
PT-H1(FtsH5)-GFP	FtsH5-atg	5'CCCAGATCTCCAATGGCCAATGCT3'
	GFP REV	5'GGGTAAGTTTTCCGTATGT3'
PT-H1-Loop(FtsH5)-GFP	FtsH5-atg	5'CCCAGATCTCCAATGGCCAATGCT3'
	GFP REV	5'GGGTAAGTTTTCCGTATGT3'
PT-H1-Loop-H2(FtsH5)-GFP	FtsH5-atg	5'CCCAGATCTCCAATGGCCAATGCT3'
	GFP REV	5'GGGTAAGTTTTCCGTATGT3'
PT-CT(FtsH5)-GFP	GFP FWD	5'CCCAGATCTCCAATGGCCAATGCT3'
	GFP REV	5'GGGTAAGTTTTCCGTATGT3'
PT-H1-Loop-H2(FtsH2)-GFP	FtsH2-atg	5'GGGCCATGGCTCCTTCATCAGTATGC3'
	GFP REV	5'GGGTAAGTTTTCCGTATGT3'
PT(FtsH2)-H1-Loop-H2(FtsH5)-GFP	FtsH2-atg	5'GGGCCATGGCTCCTTCATCAGTATGC3'
	GFP REV	5'GGGTAAGTTTTCCGTATGT3'
Vetor vazio	GFP FWD	5'CATGGTAGATCTGACTAGT3'
	GFP REV	5'GGGTAAGTTTTCCGTATGT3'

3.15 Análises da expressão do transgene

A confirmação da transgenia pela análise do fragmento de DNA correspondente às construções gênicas não assegura que o gene esteja sendo transcrito, uma vez que o T-DNA pode inserir-se em regiões de heterocromatina.

A confirmação da transcrição dos genes quiméricos nas plantas transgênicas foi realizada por RT-PCR. Para estas análises foi necessária a extração de RNA das plantas e síntese de cDNA que foram feitos conforme a metodologia descrita anteriormente. Após a obtenção do cDNA foram feitas reações de PCR com *primers* específicos descritos na Tabela 3.

3.16 Extração de proteínas totais

Para a extração de proteínas totais, 200 mg de folhas de tabaco foram coletadas e trituradas em um cadinho na presença de nitrogênio líquido. O pó obtido foi transferido para um tubo Eppendorff onde foi adicionado 0,5 mL de tampão de extração (Tris-HCL pH7,5; 50 mM; NaCl 30 mM; β -mercaptoetanol 1%; Triton X-100 0,1%). A mistura foi incubada por 1 hora, sob forte agitação, a 4 °C. Em seguida o extrato protéico foi centrifugado em microcentrífuga por 30 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novo tubo sendo armazenado a -20 °C.

3.17 Quantificação protéica

O teor de proteína no extrato foi determinado com base no método descrito por Bradford (1976), onde 10 μ L de extrato das amostras foram adicionados a 250 μ L do reagente de Bradford e deixados à temperatura ambiente por 15 minutos. Após a reação, determinou-se a concentração protéica das amostras via espectrofotômetro com base na densidade ótica a 595 nm tomando-se como base uma curva padrão construída com BSA (albumina de soro bovina) em concentrações variando de 0,0 a 10,0 μ g de proteínas.

3.18 Western Blot

As proteínas (~10 μ g) foram solubilizadas em 80 mM de Tris-Cl, 2% (p/v) de SDS, 10% (p/v) de glicerol, 0,005% (p/v) de azul de bromofenol e 1% (p/v) de dithiothreitol, pH 6,8 (HCl) por 15 minutos à 60 °C, e então separadas eletroforeticamente por SDS em gel de poliacrilamida 12% (LAEMMLI, 1970), a voltagem constante de 120 V/gel.

As amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose 0,45 μ m da BioRad por 1 hora e 30 minutos utilizando uma voltagem de 100 V/gel. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi incubada por 30 minutos com 20 mL de tampão salino TTBS [20 mM de Tris, 500 μ M de NaCl, 0,05% (v/v) de Tween 20] com 5% de leite em pó desnatado. Posteriormente, a membrana foi incubada por 4 horas,

sob leve agitação, com 10 mL de tampão TTBS acrescido de 2% de leite em pó desnatado juntamente com o anticorpo primário, anti-GFP na diluição de 1:5.000. Após este período a membrana foi incubada por mais 4 horas com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG conjugado com a fosfatase alcalina (SIGMA) na diluição de 1:10.000 sendo então lavada com tampão TBS (20 mM de Tris, 500 μ M de NaCl). A revelação foi realizada por quimioluminescência. Para tanto foi usado o substrato Lumi-Phos WB (Pierce) e os procedimentos foram realizados seguindo as recomendações do fabricante

3.19 Localização subcelular

Após a seleção das plantas que expressavam as proteínas de interesse foi feita análise da localização subcelular das mesmas. A estratégia utilizada consistiu em isolar cloroplastos e suas membranas tilacóides e verificar, com anticorpos específicos (anti-GFP, anti-Hsp70 - controle estromal, anti-LHCP - controle tilacoidal) a localização da GFP.

3.19.1 Isolamento de cloroplastos

Para o isolamento de cloroplastos, cerca de 10 g de folhas foram lavadas com uma solução aquosa de 0,1% de Tween 20. Todos os passos subsequentes foram realizados à 4°C. As folhas foram colocadas em um liquidificador contendo 100 mL de tampão de homogenização (0,35 M de sorbitol, 50 mM de HEPES-KOH pH7,5; 2 mM de EDTA, 1 mM de $MgCl_2$, 1 mM de $MnCl_2$ e 1 g de ascorbato de sódio) e 3 a 5 pulsos foram efetuados para o completo rompimento celular. O homogenizado foi filtrado utilizando-se 2 camadas de papel Miracloth e duas frações de 50 mL de cada amostra foram recolhidas em tubos de polipropileno que foram centrifugados por 5 minutos à 2500 g em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi eliminado e os dois precipitados ressuspensos em um total de 3 mL de tampão de homogenização. Essa amostra foi adicionada sobre um gradiente de Percoll contínuo (50% de Percoll, 0,35 mM de sorbitol, 50 mM de HEPES-KOH, 1 mM de $MgCl_2$, 1 mM de $MnCl_2$, 2 mM de EDTA, 4,2 g de Polietileno Glicol 8000, 0,14 g de BSA, 1,4 g de Ficoll) em tubo falco de 15 mL. O

tubo foi centrifugado por 10 minutos, 10.000 rpm, rotor HI 50T Sorvall. Após a centrifugação, a fração enriquecida com cloroplastos intactos (banda inferior do gradiente) foi coletada e diluída em tampão de homogenização. Os cloroplastos foram coletados por centrifugação à 2.500 g por 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 5 mL de tampão de homogenização. Uma pequena alíquota foi retirada e diluída em solução de acetona 80% para a determinação do teor de clorofila via espectofotometro, nos comprimentos de onda 663 e 645 nm. A form. (1) foi usada para estimar a concentração de clorofila nas amostras.

$$Chl(\mu\text{g/ml}) = [20,2(A_{645}) + 8,02(A_{663})] \times \text{fator de diluição} \left(\frac{1000}{100} \right) \quad (1)$$

Após estimar a concentração de clorofila, as amostras foram precipitadas por centrifugação e os *pellets* ressuspendidos em tampão de lise (62,5 mM de Tris –HCl pH7,5; 2 mM de MgCl₂) gelado em uma concentração de 250 µg/mL de clorofila. As amostras foram deixadas no gelo por 15 minutos para melhor rompimento dos cloroplastos. Posteriormente, os cloroplastos lisados foram divididos em alíquotas de 200 µL em Eppendorfs de 1,5 mL. Uma das alíquotas foi centrifugada à 20.000 g por 5 minutos à 4 °C para precipitação das membranas dos tilacóides. O sobrenadante, que representa a fração estromal, foi transferido para outro Eppendorf e armazenado à -80 °C juntamente com a fração representativa dos tilacóides e as demais alíquotas com cloroplastos lisados.

3.19.2 Western Blot

As amostras obtidas após o fracionamento dos cloroplastos: membrana dos tilacóides (fração insolúvel) e estroma (fração solúvel), bem como uma alíquota dos cloroplastos totais, foram analisados por Western Blot (metodologia descrita no item 3.18), para a determinarmos a localização do gene repórter GFP fusionado as proteínas de interesse. Para cada fração do cloroplasto, foram usados 2 µg de clorofila, sendo que as amostras foram diluídas em tampão de solubilização descrito anteriormente. Os géis foram feitos em triplicatas sendo utilizados os seguintes anticorpos: anti-GFP-

detecção do transgene, anti-Hsp70 - controle estromal e anti-LHCP - controle tilacoidal para certificarmos de que as frações não estavam contaminadas.

3.20 Microscopia confocal

Para as análises de microscopia confocal foram utilizadas plantas jovens cultivadas em casa de vegetação. Pequenos segmentos de folhas foram coletados, embebidos em água e analisados imediatamente em microscópio confocal (Carl Zeiss-Instituto Butantan-SP). A autofluorescência dos tecidos de plantas foi induzida com laser He/Ne no comprimento de onda 663 nm enquanto para a fluorescência da GFP foi usado laser argon no comprimento de onda 488 nm. As imagens foram coletadas com filtros vermelho e verde respectivamente. O *software* Zeiss LSM Image Browser foi usado para processar as imagens.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises Filogenéticas e Aspectos Evolutivos do Direcionamento de Proteínas Intraorganelar

Usualmente, os genomas dos organismos procariotos apresentam um gene que codifica para a protease FtsH, com exceção das cianobactérias que contém quatro genes (MANN et al., 2000). Em plantas superiores, as FtsHs são membros de famílias multigênicas, sendo que *Arabidopsis thaliana* possui doze genes que codificam oito proteínas cloroplastidiais, três proteínas mitocondriais e uma com duplo direcionamento para mitocôndrias e cloroplastos (CHEN et al., 2000; LINDAL et al., 1996; MARBACH; COELHO; SILVA-FILHO, 2001; SAKAMOTO et al., 2003; URANTOWKA et al., 2005; YU; PARK; RODERMEL, 2004). A duplicação dos genes que codificam estas proteases em cloroplastos ocorreu após a divergência desta organela de seu ancestral procarioto, as cianobactérias, e parece estar relacionada com a evolução do aparato fotossintético (ADAM et al., 2005). A presença de três proteases FtsHs em mitocôndrias, que apresentam alta similaridade com FtsHs de leveduras, sugere que a duplicação destes genes foi um evento específico que ocorreu durante a evolução das células de plantas. O direcionamento destes produtos gênicos para as mitocôndrias e cloroplastos pode ser explicado em razão de sua origem filogenética, sendo que alguns deles foram redirecionados. Este é o caso da proteína FtsH11, o único membro da família com duplo direcionamento que demonstra maior similaridade com seus homólogos mitocondriais do que cloroplastidiais (CHEN et al., 2006).

Com o objetivo de estudar os aspectos evolutivos do direcionamento de proteínas intraorganelar, foi efetuada uma busca por seqüências homólogas as FtsHs em cianobactérias e plantas superiores. Ao todo, foram analisadas cinco espécies de cianobactérias e cinco espécies de plantas, entre elas *Arabidopsis thaliana* e *Oriza sativa* cujos genomas já foram completamente seqüenciados. Com isso, foi possível obter dados precisos quando ao número de isoformas presentes (Tabelas 1 e 2). A análise filogenética representada pela Figura 11A mostrou que as FtsHs cloroplastidiais podem ser divididas em três clados distintos, cujas seqüências apresentam uma alta identidade entre si. No primeiro grupo estão os genes *ftsh2*, *ftsh6* e *ftsh8*, no segundo

grupo são encontrados os genes *ftsh7* e *ftsh9* e o terceiro grupo é constituído pelos genes *ftsh1* e *ftsh5*. Em *arabidopsis* essas seqüências constituem pares de genes altamente relacionados, cujos produtos gênicos apresentam funções redundantes (SAKAMOTO et al., 2003). Interessantemente, como podemos observar na Figura 11B, as FtsHs presentes no genomas de cianobactérias também podem ser organizadas em três grupos. Este dado sugere que a divisão das FtsHs em clados distintos já estava presente nas cianobactérias, o provável ancestral dos cloroplastos. Análises de dados genômicos mostram que entre as várias espécies de cianobactérias conhecidas, a *Nostoc* é a espécie mais relacionada aos cloroplastos atuais (DEUSCH et al., 2008; MARTIN et al., 2002). Com o objetivo de facilitar a visualização dos dados, construiu-se uma árvore filogenética constituída pelas seqüências protéicas de FtsHs de *Arabidopsis thaliana* e *Nostoc*. A análise da Figura 11C mostra que para cada par de genes encontrado em *arabidopsis* existe um ortólogo em *Nostoc*. Este dado, juntamente com as demais análises sugere que as FtsHs cloroplastidiais evoluíram de diferentes genes de cianobactéria.

Figura 11 - (a) Análise Filogenética das proteínas FtsHs cloroplastidiais. As distâncias evolutivas foram computadas usando o método baseada na matriz JTT e estão em unidade de número de aminoácidos por sítio de substituição. O comprimento dos braços está na mesma unidade das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. O valor de *bootstrap* utilizado foi de 500 repetições.

Figura 11 – (b) Análise Filogenética das proteínas FtsHs de cianobactérias. As distâncias evolutivas foram computadas usando o método baseada na matriz JTT e estão em unidade de número de aminoácidos por sítio de substituição. O comprimento dos braços está na mesma unidade das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. O valor de *bootstrap* utilizado foi de 100 repetições.

Figura 11 - (c) Análise Filogenética das proteínas FtsHs cloroplastidiais de *Arabidopsis thaliana* e *Nostoc*. As distâncias evolutivas foram computadas usando o método baseada na matriz JTT e estão em unidade de número de aminoácidos por sítio de substituição. O comprimento dos braços está na mesma unidade das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. O valor de *bootstrap* utilizado foi de 500 repetições.

O alinhamento das seqüências das FtsHs cloroplastidiais dentro de cada grupo, mostrou que estas podem ser organizadas de acordo com a presença ou ausência do motivo de dupla arginina. Como mostrado na Figura 12A, as seqüências pertencentes ao grupo um, apresentam um clássico motivo de dupla arginina, representado pela seqüência consenso RRXFLK, precedendo a primeira região hidrofóbica. A localização

dos domínios hidrofóbicos é conservada entre todos os membros do grupo, bem como o posicionamento do motivo de dupla arginina. Uma exceção é feita para a FtsH6 de *Arabidopsis thaliana* que tem uma arginina substituída por uma lisina. Interessantemente, esta variação também é observada na proteína Reiske, uma subunidade do complexo citocromo *b₆f*. Diferentemente dos demais membros deste grupo, a AtFtsH6 apresenta uma baixa hidrofobicidade na região que precede o motivo KR. Como pode ser observado na Figura 12A, as proteínas apresentam o sítio de clivagem da peptidase TPP, representado pela sequência AXA, localizado logo após o primeiro domínio hidrofóbico.

Nas Figuras 12B e C estão alinhados as seqüências das proteínas FtsHs do segundo e terceiro grupo que não apresentam nenhum motivo Tat. As proteínas do grupo dois, diferentemente das demais proteínas não apresentam o sítio de processamento da peptidase TPP. Interessantemente, as proteínas do grupo três (Figura 12C) apresentam uma dupla arginina localizada entre as duas regiões hidrofóbicas. Entretanto, essas seqüências não estão dentro de um contexto apropriado, ou seja, precedendo o primeiro domínio transmembrana e seguidas por aminoácidos hidrofóbicos, portanto, não foram consideradas como possíveis determinantes da via Tat. As seqüências das proteínas AtFtsH11 e AtFtsH12 não foram incluídas nos alinhamentos por apresentarem baixa identidade com as demais seqüências utilizadas nas análises.

(a)

	Motivo Tat	Região Hidrofóbica
AtFtsH2 (At2g30950)	QEGRRDFLKILLG-NAGVGLVASGK ANA --DEQG---VSSSRMSYSR	
AtFtsH8 (At1g06430)	HEGRRGFFKLLLGNAAGVGLLASGN ANA -DEQGQG-VSSSRMSYSR	
CaFtsH2 (CAA09935)	DEGRRGFLKLLLGNVGLGAPALLGNGK AYADE QG---VSNSRMSYSI	
NtFtsH2 (AAD17230)	DEGRRGFLKLLLGNVGLGVPALLGDGK AYADE QG---VSNSRMSYSR	
OsFtsH2 (Os06g45820)	NDARRKFLKLALGNLGVGLPTLLGAKR ALAE EQG---VSSSRMSYSR	
AtFtsH6 (At5g15250)	KFTKRNLSSLTTALGFTSALGTVLAH PAKAE PEAPIEATSNRMSYSR	
SlFtsH6 (BAD99306)	RINRRKLLSTSGLSLVAGTLSK PARA EETAPVEVTS----SRMSYSR	
OsFtsH6 (Os02g43350)	GLSRRRLQLSAGLGLGLGLTAAR PARA EATAPEEVT---SNRMSYSR	
AtFtsH2 (At2g30950)	FLEYLDKDRVNKVDLYENG TIA IVEAVSP ELGN RVERVRVQLPGLSQ	
AtFtsH8 (At1g06430)	FLEYLDKGRVEKVDLYENG TIA IVEAVSP ELGN RIRQVRVRVQLPGLSQ	
CaFtsH2 (CAA09935)	FSEYLDKDRVQKVDFENG TIA IVEAVSP ELGN RVRVRVQLPGLSQ	
NtFtsH2 (AAD17230)	FLEYLDKDRVQKVDFENG TIA IVEAISP ELGN RVRVRVQLPGLSQ	
OsFtsH2 (Os06g45820)	FLEYLDKDRVKKVDFENG TIA IVEAISP ELGN RVRVRVQLPGLSQ	
AtFtsH6 (At5g15250)	FLQHLKENEVKKVDLIENG TVA IVEISN-PVVGKIQRVRVNLPLPGLPV	
SlFtsH6 (BAD99306)	FLDYLNQGA VKKV DFE NSA VAEILIN--PALNKVQRVKIQPLPGLPP	
OsFtsH6 (Os02g43350)	FLEYLDAGAVKKVDFENG TV AVAEVDDAAALSRVHRVKVQLPGLPA	
		Região Hidrofóbica
AtFtsH2 (At2g30950)	ELLQKLRAKNIDFAAHNAQEDQGSVLFNLIGNLAF PALLIGGLFLLS	
AtFtsH8 (At1g06430)	ELLQKLRAKNIDFAAHNAQEDQGSPI LN LIGNLAF PVILIGGLFLLS	
CaFtsH2 (CAA09935)	ELLQKFREKNIDFAAHNAQEDSGSLIFNLIGNLAF PLILIGGLFLLS	
NtFtsH2 (AAD17230)	ELLQKLREKNIDFAAHNAQEDSGSFLFNLIGNLAF PLILIGGLFLLS	
OsFtsH2 (Os06g45820)	ELLQKLREKNIDFAAH SNQ EDSGSLLFNLIGNLAF PLILIGGLFLLS	
AtFtsH6 (At5g15250)	DLVREMKEKNVDFAAH PMNV NWGAFLLN FLGN LGFPLILLV SLL LTS	
SlFtsH6 (BAD99306)	ELVRKLKDKNVDFAAHL PEKN VIGPLLDLLGNLAF PLILLGYLL LRS	
OsFtsH6 (Os02g43350)	ELVRKL RD KGVDFAAHP VEPS AGVM LLD LLVN FG FPL LF VAS LL WRS	

Figura 12 - (a) Alinhamento da região N-terminal das seqüências de aminoácidos de proteases FtsHs que apresentam o clássico motivo de dupla arginina (RRXFLK). As seqüências foram alinhadas usando o programa ClustalW (THOMPSON ; HIGGINS; GIBSON, 1994). Traços dentro das seqüências indicam *gaps* inseridos para otimizar o alinhamento. Aminoácidos em negrito representam o sítio de processamento da peptidase TPP

(b)

	Região Hidrofóbica
AtFtsH7 (At3g47060)	-----MTTTFEFLQPRIHGFIATCCSSNSLLYSKASRFFNDRRCRVYRQNP
AtFtsH9 (At5g58870)	----MTSIELLSPLIHDKFRFSTCCSTSSLLYLHASSFFRDRSFGFRQNP
OsFtsH7 (Os02g43350)	MASASAAETLAAASLPVASPSRSLRLPLRRASAGGGCSASVRISAVPP
AtFtsH7 (At3g47060)	NRFVNSNITLPLQKKQVTVLRNHERFNLWDGFSRKK---SRLVVNCQED
AtFtsH9 (At5g58870)	NRFVNSSSIQLPQS--VPGSINQERFNLWQGFSRKKSTSSSRTIVNCQEG
OsFtsH7 (Os02g43350)	RGLGFAVVQRRVLRPPAARANVEREGDGAESGPGEASSSSSGDGRDG
AtFtsH7 (At3g47060)	DQNESSSEEEESSQSTPAKSERKREKKEDKVWWSKGK-----KWQ
AtFtsH9 (At5g58870)	DQKASSSEGEKTN-----KDKGRKQGKNELWWSKGK-----KWQ
OsFtsH7 (Os02g43350)	AAAAAEAGGDGASTSTTSAAATPPQPPSSKRGENKWRRLIKGGGVGRWL
	Região Hidrofóbica
AtFtsH7 (At3g47060)	WQPIIQAQGIGVLLLQLSVVMFVMRLLRPGIPLPGSEPRIQTTFVSVYPYS
AtFtsH9 (At5g58870)	WKPIIQAQEIGVMLLQLGIVMFVVRLLRPGIPLPGSEPRTQTTFMSVPYS
OsFtsH7 (Os02g43350)	WEPIVQGREMGFLLLQLGFAIFALRMLRPEIALPGSEPRPQTTYVSVYPYS

Figura 12 - (b) Alinhamento da região N-terminal das seqüências de aminoácidos de proteases FtsHs que não apresentam o motivo Tat. As seqüências foram alinhadas usando o programa ClustalW (THOMPSON ; HIGGINS; GIBSON, 1994). Traços dentro das seqüências indicam *gaps* inseridos para otimizar o alinhamento

(c)

	Região Hidrofóbica
CaFtsH5 (CAA62084)	STLNKKPNSDNFKNAQSKAALAALLFSSITPH AI ALDDAAPIASPPQVME
SlFtsH5 (AAQ93011)	SILSKKNSDNFKNVPSKAAIAALLFSSITPQ AF ALDNTTPAAPP-QVIE
NtFtsH5 (BAA33755)	SILNKKPNSDN SKNIPSKAALAALLFSSITPH AY ALDNTTPTVPTPRVIQ
AtFtsH5 (Atg42270)	KRYQISQSEKLMKSLPSQAALAALLFSSSSPQ AL AVNEPVQPAPTITAE
AtFtsH1 (Atlg50250)	SQDENSPNGKPNSPFSSQVALAAILLSSISSSP IAL AVVDEPASPSVVIE
OsFtsH1 (Os06g51029)	LPKPSLRPPRLPHPKPLPAALLALAAAAPTLP AL ADV PAPPSPSTQDVQV
CaFtsH5 (CAA62084)	VEAPNPNTSNPL----PFSQNLVLNAPKTQASPVSDLPESTQWRYSEFLN
SlFtsH5 (AAQ93011)	AEAPKPSASNSL----PFAQNIILNAPKTQAQPASDLPEGTQWRYSEFLN
NtFtsH5 (BAA33755)	AEAANPTTSN-----PFSQNIILNAPKPQAQTNPELPEVSQWRYSEFLN
AtFtsH5 (Atg42270)	AQSP-----NLS----TFGQNVLMTAPNPQAQ-SSDLPGDTQWRYSEFLN
AtFtsH1 (Atlg50250)	SQAVKPSTPSPLFIQN-----EILKAPSPKSSDLPEGSQWRYSEFLN
OsFtsH1 (Os06g51029)	LEAPSPAANPFS-----NALLTAPKPTSSAAADLPEGAQWRYSEFLS
CaFtsH5 (CAA62084)	AVKKGKVERVRFSKDGSA LQLTAVDGRRANVIVPNDPDLIDILAMNGVDI
SlFtsH5 (AAQ93011)	AVKKGKVERVRFSKDGSTLQLTAVDGRRANVIVPNDPDLIDILAMNGVDI
NtFtsH5 (BAA33755)	AVKKGKVERVRFSKDGSA LQLTAVDGRRATVTVPNDPDLIDILAMNGVDI
AtFtsH5 (Atg42270)	AVKKGKVERVKFSKDGSVLQLTAVDNRRATVIVPNDPDLIDILAMNGVDI
AtFtsH1 (Atlg5025)	AVKKGKVERVRFSKDGSVVQLTAVDNRRASVIVPNDPDLIDILAMNGVDI
OsFtsH1 (Os06g51029)	AVKKGKVERVRFSKDGGLLQLT AIDGRRATVVVPNDPDLIDILATNGVDI
	↑
	Região Hidrofóbica
CaFtsH5 (CAA62084)	SVSEGE--GNGLFSVIGNLLFPPIAFAGLFLLFRRSQGGPGG-PGGLGG
SlFtsH5 (AAQ93011)	SVSEGE--GNGLFSVIGNLLFPPIAFAGLFLLFRRSQGGPGG-PGGLGG
NtFtsH5 (BAA33755)	SVSEGDS--AGNGLFN LIGNLFPPIAFAGLFYLFQRSQGGPGG-PGGLGG
AtFtsH5 (Atg42270)	SVSEGE--GNGLFDFIGNLLFPLLAFGGFLFYLFRRGQGGAGG-PGGLGG
AtFtsH1 (Atlg5025)	SVSEGE--GNDLFTVIGNLI FPLLAFGGFLFLFRRSQGGPGGGPGGLGG
OsFtsH1 (Os06g51029)	SVAEGDAAGPGGFLAFVGNLLFPFLAFAGLFLLFRRSQGGPGAGPGGLGG

Figura 12 - (c) Alinhamento da região N-terminal das seqüências de aminoácidos de proteases FtsHs que não apresentam o motivo Tat. As seqüências foram alinhadas usando o programa ClustalW (THOMPSON ; HIGGINS; GIBSON, 1994). Traços dentro das seqüências indicam *gaps* inseridos para otimizar o alinhamento. Aminoácidos em negrito representam o sítio de processamento da peptidase TPP. A seta indica a presença de dupla arginina na seqüência de proteína

Estes dados parecem relevantes já que até o momento, com exceção da proteína do Reiske, todos os substratos descritos para a via Tat apresentam o motivo de dupla arginina precedendo a primeira região hidrofóbica (DALBEY; ROBNSION, 1999). A importância deste motivo foi demonstrada experimentalmente em plantas e bactérias onde a substituição do RR por outros aminoácidos levou a uma drástica

diminuição no transporte dos precursores (CHADDOCK et al., 1995, KREUTZENBECK et al., 2007; MORI; CLINE, 2002). Além disto, Hou; Frielingsdorf e Klösger (2006) mostraram que o posicionamento da dupla arginina antes da região hidrofóbica é crucial pois facilita o seu reconhecimento pelos componentes da maquinaria Tat, sendo que o distanciamento desta região reduz significativamente o transporte da proteína. Este fato explica a conservação no posicionamento destes motivos em todos os substratos da via Tat. Entretanto, os dados apresentados neste trabalho apontam para a existência de membros da família das FtsHs que não apresentam o clássico motivo de dupla arginina. Essas observações sugerem que as proteínas FtsHs podem ser transportadas para a membrana dos tilacóides por diferentes mecanismos ou empregam variações da via Tat.

4.2 Localização subcelular: *Western blot*

A localização subcelular da FtsH5 foi determinada por experimentos de fracionamento celular onde obtivemos amostras representativas das frações estromais e tilacoidais. Essas amostras foram analisadas por *Western blot* com anticorpos para a proteína repórter GFP. Anticorpos específicos para proteínas do estroma (Hsp70) e da membrana dos tilacóides (LHCP) também foram usados, para verificar se estas frações estavam íntegras e não apresentavam contaminações (Figura 13G e 13H). Como pode ser observado na Figura 13A, a construção correspondente a proteína FtsH5 completa fusionada a GFP foi encontrada na membrana dos tilacóides. Este dado era esperado já que análises prévias sugerem que as proteínas do tipo FtsH representam proteínas integrais de membrana tanto em bactérias com em plantas (TOMAYASU et al., 1993; HUGUENEY et al., 1995). Entretanto, as construções envolvendo a região amino-terminal da FtsH5 (figura 13B, 13C, 13D, 13E) não foram direcionadas para as membranas, sendo que a GFP foi encontrada na fração estromal, confirmando os resultados de análises prévias realizadas em nosso laboratório pelo Dr. Reinaldo Barata (2003). O mesmo resultado é observado para a construção formada pelo peptídeo de trânsito da FtsH2 seguido pelos domínios hidrofóbicos e o *loop* da FtsH5 (figura 13F).

Figura 13 - *Western blot* de plantas transgênicas de tabaco expressando proteínas quiméricas **C**= fração enriquecida de cloroplasto; **E**= fração solúvel do cloroplasto (estroma); **T**= fração enriquecida de membranas dos tilacóides. Para a análise das proteínas quiméricas (FtsH5+GFP, PT(FtsH5)+GFP, PT+H1(FtsH5)+GFP, PT+H1+loop(FtsH5)+GFP; PT+H1+loop+H2(FtsH5)+GFP; PT(FtsH2)+H1+Loop+H2(FtsH5) foi usado o anticorpo anti-GFP e para controle das frações estromal e tilacoidal foram usados os anticorpos Hsp70 e LHCP respectivamente

De fato, estudos prévios mostraram que a proteína Pftf, uma homóloga da FtsH2, pode ser inserida na membrana dos tilacóides sem a região amino-terminal sugerindo que os determinantes responsáveis pelo direcionamento estão presentes na proteína madura (SUMMER et al., 2000).

Curiosamente, nossas análises envolvendo a região amino-terminal da FtsH2 de tabaco, incluindo os dois segmentos transmembrana, mostraram que a GFP foi encontrada na membrana dos tilacóides, como pode ser observado na Figura 14.

Figura 14 - *Western blot* de plantas de tabaco transformadas com a região amino-terminal da FtsH2 fusionada a GFP. C= fração enriquecida de cloroplasto; E= fração solúvel do cloroplasto (estroma); T= fração enriquecida de membranas dos tilacóides. Para análise da construção PT+H1+Loop+H2(FtsH2)+GFP foi usado o anticorpo anti-GFP e para controle das frações estromal e tilacoidal foram usados os anticorpos Hsp70 e LHCP respectivamente

Esses dados, juntamente com os resultados mostrados na Figura 13 sugerem que elementos distintos estão envolvidos na translocação das proteínas FtsH2 e FtsH5 para a membrana dos tilacóides. Ao contrário do que ocorre com a FtsH2, a região amino-terminal da FtsH5 fusionada a GFP não foi capaz de transportá-la corretamente ao seu destino final. É importante destacar que estas proteína apresentam uma importante diferença no peptídeo de transito, referente a presença do clássico motivo RR que só é encontrado na FtsH2. Com base nestes resultados, pode-se concluir que aminoácidos específicos localizados no peptídeo de trânsito e motivos presentes na proteína madura devam interagir com os componentes da maquinaria de transporte adotado pelas proteínas garantindo seu correto direcionamento.

4.3 Processamento das proteínas quiméricas

Segundo os dados de literatura, as proteínas localizadas na membrana dos tilacóides ou no lúmen são sintetizadas sob a forma de precursores contendo um peptídeo de trânsito bipartite. A primeira região do peptídeo é responsável pelo direcionamento da proteína até o estroma onde ela é processada por uma protease estromal. Após este processamento, a proteína precursora, expõe a segunda região do

peptídeo que endereça a proteína para membrana dos tilacóides onde ela sofre uma segunda clivagem realizada por uma protease tilacoidal (Robinson et al., 1998). Em um interessante trabalho, Cola; Bailey e Robinson (2005) analisaram o transporte de uma proteína quimérica formada pelo peptídeo de trânsito de um substrato da via Tat fusionado a GFP em protoplastos de tabaco. A proteína deveria ser encontrada na membrana dos tilacóides, entretanto foi localizada no estroma apresentando o tamanho correspondente a proteína madura, sugerindo que ela havia passado pelas duas etapas do processamento. Porém, a segunda clivagem da proteína precursora só é possível após a sua inserção na membrana, onde ela se torna acessível às proteases tilacoidais. Estes dados revelam a ocorrência de um mecanismo de translocação reversa, ou seja, a proteína precursora é corretamente direcionada para as membranas onde é processada pela protease tilacoidal, porém, ela retorna ao estroma. Este fato também foi observado em experimentos utilizando autênticos substratos da via Tat, o que sugere que a translocação bilateral não é restrita a proteínas heterólogas (BRÜSER, 2007; COLA; ROBINSON, 2005).

Portanto, tendo em vista a possível ocorrência de translocação reversa no interior dos cloroplastos, tornou-se relevante analisar o processamento das proteínas quiméricas utilizadas em nossas análises, já que as construções envolvendo a região amino-terminal da FtsH5 fusionada a GFP foram encontradas no estroma e não na membrana como era esperado. Abaixo é mostrado um esquema com as construções utilizadas e os pesos moleculares esperados após a remoção da primeira e segunda região do peptídeo de trânsito.

FtsH5: **FtsH2:**

Peso molecular aproximado das construções após o primeiro processamento:

PT (FtsH5)-GFP = 28,0 KDa

PT-H1(FtsH5)-GFP = 31,0 KDa

PT-H1-Loop(FtsH5)-GFP = 43,0 KDa

PT-H1-Loop-H2(FtsH5)-GFP = 46,0 KDa

PT(FtsH2)-H1-Loop-H2(FtsH5)-GFP = 46,0 KDa

PT-H1-Loop-H2(FtsH2)-GFP = 42,52 KDa

PT-H1-Loop-H2-Cterminal(FtsH5)-GFP = 98,0 KDa

Peso molecular aproximado das construções após o segundo processamento:

PT (FtsH5)-GFP = 28,0 KDa

PT-H1(FtsH5)-GFP = 28,0 KDa

PT-H1-Loop(FtsH5)-GFP = 40,0 KDa

PT-H1-Loop-H2(FtsH5)-GFP = 43,0 KDa

PT(FtsH2)-H1-Loop-H2(FtsH5)-GFP = 43,0 KDa

PT-H1-Loop-H2(FtsH2)-GFP = 40,68 KDa

PT-H1-Loop-H2-Cterminal(FtsH5)-GFP = 95,0 KDa

Analisando os dados obtidos para as construções envolvendo a região amino-terminal da FtsH5 (Figura 15), verifica-se que estas apresentam um peso molecular compatível com a ocorrência de um único processamento que é efetuado pela protease SPP.

Figura 15 - Proteínas totais de plantas de tabaco transgênicas transformadas com as construções envolvendo a região amino-terminal da FtsH5, submetidas à análise de *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-GFP. 1. Marcador BenchMark Pre-Stained Protein Ladder, 2. PT(FtsH5)-GFP; 3. PT-H1(FtsH5)-GFP; 4. PT-H1-Loop(FtsH5)-GFP; 5. PT-H1-Loop-H2(FtsH5)-GFP; 6. PT(FtsH2)-H1-Loop-H2(FtsH5)-GFP

No caso das construções FtsH5-GFP e PT-H1-Loop-H2(FtsH2)-GFP, nota-se a ocorrência de dois processamentos (Figura 16 e 17). Neste caso, as proteínas são inseridas nas membranas dos tilacóides e, portanto são acessíveis as proteases TPP.

Figura 16 - Proteínas totais de plantas de tabaco transgênicas transformadas com a construção FtsH5-GFP, submetidas à análise de *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-GFP. 1. Marcador BenchMark Pre-Stained Protein Ladder; 2. FtsH5-GFP

Figura 17 - Proteínas totais de plantas de tabaco transgênicas transformadas com a construção correspondente à região amino-terminal da FtsH2, submetidas à análise de *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-GFP. 1. Marcador BenchMark Pre-Stained Protein Ladder; 2. PT-H1-Loop-H2(FtsH2)-GFP

Com base nos resultados mostrados acima pode-se concluir que não ocorre translocação reversa, já que as proteínas encontradas no estroma não foram processadas pela protease TPP.

Este dado reforça a idéia de que as proteínas FtsH2 e FtsH5 possuem determinantes distintos que governam seu direcionamento o que nos leva a sugerir que estas proteínas empregam diferentes mecanismos de transporte ou variações na via Tat.

4.4 Localização subcelular: Microscopia confocal

Os resultados obtidos até o momento com as análises de *Western blots* indicam que a proteína GFP pôde ser transportada à membrana dos tilacóides quando fusionada a seqüência completa da FtsH5 e a região amino-terminal da FtsH2. A presença de um motivo de dupla arginina na região amino-terminal da proteína FtsH2 juntamente com dados de literatura que mostram que o transporte da proteína Pftf (uma proteína homóloga a FtsH2) é dependente de componentes da via Tat, sugere que estas proteínas são direcionadas às membranas pela via de translocação dependente de dupla arginina. Uma importante característica deste mecanismo de direcionamento é a capacidade de transportar proteínas montadas para as membranas ou lúmen dos

tilacóides (MARQUES; DUDECK; KLÖSGEN, 2003). Portanto, uma forte evidência de que estas proteínas utilizam a via Tat é a presença de fluorescência da GFP nas construções analisadas. Isto porque, a GFP só é capaz de emitir fluorescência quando está no estado montado. Para isto, plantas transgênicas transformadas com as construções envolvendo as proteínas FtsH5 e FtsH2 fusionadas a GFP foram analisadas por microscopia confocal, o que permite observar a fluorescência da GFP caso ela esteja no seu estado correto. O padrão de fluorescência observada depende da localização da proteína de fusão. Se a GFP é encontrada no estroma, observa-se uma distribuição homogênea da fluorescência, com áreas não fluorescentes que correspondem aos grânulos de amido presentes nas membranas dos tilacóides. No caso da proteína quimérica estar nas membranas, a fluorescência é restrita a áreas definidas cuja forma e distribuições são características dos grânulos de amido presentes nestas membranas. Os resultados mostrados na Figura 18 ilustram esta diferença:

Figura 18 - Microscopia confocal de células da epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* expressando GFP em diferentes compartimentos subcelulares. (a) FtsH5-GFP; (b) PT-H1-Loop-H2(FtsH5)-GFP

Dois aspectos importantes podem ser observados nesta figura. O primeiro deles é a presença de fluorescência nas duas construções analisadas evidenciando a montagem da GFP nos cloroplastos. O segundo ponto diz respeito a localização da GFP. Conforme descrito acima, a Figura 18A mostra um padrão de expressão típico de proteínas localizadas nas membranas dos tilacóides enquanto a Figura 18B aparece como uma proteína estromal. Estes dados corroboram aqueles obtidos nas análises de

imunolocalização e reforçam a necessidade da sequência completa da proteína no direcionamento da FtsH5.

Estas análises foram feitas também para outras proteínas quiméricas, incluindo um controle negativo, mostrado na Figura 19. Esses dados mostram que todas as proteínas quiméricas foram direcionadas para diferentes compartimentos dos cloroplastos e são capazes de emitir fluorescência, indicando que em todos os casos a GFP foi transportada na sua forma ativa. Estes dados excluem a possibilidade de que as proteínas FtsH sejam transportadas pela via Sec pois segundo Marques et al. (2004), a GFP não pode ser eficientemente transportada por esta via. Sendo assim, podemos sugerir que as proteínas FtsHs são transportadas para a membrana dos tilacóides pela via Tat ou empregam variações deste mecanismo já que até o momento o sistema Tat é o único capaz de transportar proteínas montadas (MARQUES et al., 2004).

Figura 19 - Imagens obtidas por microscopia confocal de células da epiderme foliar de plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* expressando GFP fusionada a diferentes construções envolvendo o peptídeo de transito das proteínas FtsH5 e FtsH2. (a) FtsH5+GFP, (b) PT+H1+Loop+H2(FtsH2)+GFP (c) PT(FtsH5)+GFP (d) PT+H1+Loop+H2(FtsH5)+GFP (e) planta selvagem

4.5 Ausência de dados para a construção PT-CT(FtsH5)-GFP.

Após as etapas de transformação de explantes de tabaco com a construção PT-CT(FtsH5)-GFP foram obtidas seis plantas que cresceram em meio seletivo. Estas plantas foram analisadas por RT-PCR para verificar a expressão da proteína quimérica desejada. O resultado é mostrado na Figura 20 e como se pode observar três delas apresentaram o fragmento de tamanho desejado.

Figura 20 - Análise de plantas de tabaco transformadas com a construção PT-CT(FtsH5)-GFP. 1. marcador de peso molecular, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 amostras de cDNA das plantas transformadas após reação de PCR com primers específicos

Como pode ser observado nas amostras 2, 3 e 5 há uma banda de aproximadamente 1.600 pb que corresponde ao tamanho esperado para a construção PT-CT(FtsH5)-GFP. Este dado indica que estas plantas estão expressando a proteína quimérica. Entretanto, nas análises de *Western blot*, não foi possível observar a presença do transgene. Talvez a proteína seja expressa em um nível muito baixo e não foi detectado pelo anticorpo anti-GFP ou então a proteína está sendo degradada logo após a tradução, portanto é possível encontrar o RNA mensageiro, mas não é detectada a proteína.

5 CONCLUSÕES

- As proteínas FtsHs cloroplastidiais se agrupam em três clados distintos nas análises filogenéticas. Esta distribuição parece estar relacionada com a presença ou ausência do motivo de dupla arginina.
- A proteína FtsH2 representa um clássico substrato da via Tat, apresentando um motivo de dupla arginina precedendo o primeiro domínio hidrofóbico, enquanto que a FtsH5, embora pertença a mesma família não apresenta o motivo Tat.
- A região amino-terminal da proteína FtsH2 é suficiente para direcioná-la até as membranas dos tilacóides. Entretanto, o correto direcionamento da proteína FtsH5 só é observado quando é utilizada a seqüência completa da proteína. Esta observação sugere que fatores determinantes para o direcionamento da FtsH5 estejam presentes na proteína madura.
- As proteínas FtsH2 e FtsH5 são capazes de transportar a GFP para a membrana dos tilacóides no estado montado, o que é evidenciado pela presença de fluorescência nas plantas transformadas.
- Análises de dados de literatura juntamente com os dados apresentados neste trabalho sugerem que a proteína FtsH5 utiliza um mecanismo alternativo de transporte para a membrana dos tilacóides, provavelmente um variante da via Tat.

REFERÊNCIAS

- ADAM, Z.; RUDELLA, A.; WIJK, K.J. van. Recent advances in the study of Clp, FtsH and other proteases located in chloroplasts. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, p. 234-240, 2006.
- ADAM, Z.; ZALTSMAN, A.; SINVANY-VILLALOBO, G.; SAKAMOTO, W. FtsH protease in chloroplasts and cyanobacteria. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, p. 338-390, 2005.
- AKIYAMA, Y.; YOSHIHISA, T.; ITO, K. FtsH, a membrane-bound ATPase forms a complex in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, p. 23485-23490, 1995.
- ANDERSSON, B.; ARO, E.M. FtsH, a membrane bound ATPase forms a complex in the cytoplasmic membrane of the *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, p. 23485-23490, 1997.
- ARLT, H.; TAUER, R.; FELDMANN, H.; NEUPERT, W.; LANGER, T. The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperon-like activity in the inner membrane of mitochondria. **Cell**, Massachusetts, v. 85, p. 875-885, 1996.
- 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**, Baltimore, v. 277, p. 2006-2011, 2002.
- BARATA, R.M. **Clonagem, caracterização da expressão gênica e do transporte intra-organelar da protease FtsH-p1 de tomate (*Lycopersicon esculento* Mill. cv. MicroTom)**. 2003. 122 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)– Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

- BENDTSEN, J. D.; NIELSEN, H.; HEIJNE, G. VON; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **Journal Molecular Biology**, London, v. 340, p. 783-795, 2004.
- BERKS, B.C. A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 22, p. 393-404, 1996.
- BERKS, B.C.; PALMER, T.; SARGENT, F. Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 8, p. 174:181, 2005.
- BEYER, A. Sequence analysis of the AAA protein family. **Protein Science**, Woodbury, v. 6, p. 2043-2058, 1997.
- BOURNE, H.R.; SANDERS, D.A.; MCCORMICK, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. **Nature**, New York, v. 349, p. 117–127, 1991.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRÜSER, T. The twin-arginine translocation system and its capability for protein secretion in biotechnological protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 76, p. 35-45, 2007.
- BRÜSER, T.; SANDER, C. An alternative model of the twin arginine translocation system. **Microbiological Research**, Jena, v. 10, p. 7-17, 2003.

- CHADDOCK, A.M.; MANT, A.; KARNAUCHOV, I.; BRINK, S.; HERRMANN, R.G.; KLÖSGEN, R.B.; ROBINSON, C. A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the Delta pH-dependent thylakoidal protein translocase. **EMBO Journal**, New York, v. 14, p. 2715–2722, 1995.
- CHEN, J.; BURKE, J.J.; VELTEN, J.; XIN, Z. FtsH11 protease plays a critical role in Arabidopsis thermotolerance. **Plant Journal**, Oxford, v. 48, p. 73-84, 2006.
- CHEN, K.; CHEN, X.; SCHNELL, D.J. Initial binding of preproteins involving the Toc 159 receptor can be bypassed during protein import into chloroplasts. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, p. 813-822, 2000.
- 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. **Plant Journal**, Oxford, v. 22, p. 303-313, 2000.
- COLA, A. di; BAILEY, S.; ROBINSON, C. The thylakoid $\Delta pH/\Delta \varphi$ are not required for the initial stages of Tat-dependent protein transport in tobacco protoplasts. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280, p. 41165-41170, 2005.
- DABNEY-SMITH, C.; MORI, H.; CLINE, K. Oligomers of Tha4 organize at the thylakoid Tat translocase during protein transport. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 281, p. 5476-5483, 2006.
- DALBEY, R.E.; KUHN, A. Evolutionarily related insertion pathways of bacterial, mitochondrial, and thylakoid membrane proteins. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 16, p. 51-87, 2000.
- DALBEY, R.E.; ROBINSON, C. Protein translocation into and across bacterial plasma membrane and thylakoid membrane. **Trends in Biochemical Sciences**, London, v. 24, p. 17-22, 1999.

- DEUSCH, O.; LANDAN, G.; ROETTGER, M.; GRUENHEIT, N.; KOWALLIK, K.V.; ALLEN, J.F.; MARTIN, W.; DAGAN, T. Genes of cyanobacterial origin in plant nuclear genomes point to a heterocyst-forming plastid ancestor. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 25, p. 748-761, 2008.
- EICHACKER, L.A.; HENRY, R. Function of a chloroplast SRP in thylakoid protein export. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1541, p. 120-134, 2001.
- FINAZZI, G.; CHASEN, C.; WOLLMAN, F.A.; VITRY, C. de. Thylakoid targeting ofTat passenger proteins shows no delta pH dependence *in vivo*. **EMBO Journal**, New York, v. 22, p. 807-815, 2003.
- FRANKLIN, A.E.; HOFFMAN, N.E. Characterization of a chloroplast homologue of the 54-kDa subunit of the signal recognition particle. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, p. 22175-22180, 1993.
- GERARD, F.; CLINE, K. Efficient twin-arginine translocation (Tat) pathway transport of a precursor protein covalently anchored to its initial cpTatC binding site. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 281, p. 6130-6135, 2006.
- GERARD, F.; CLINE, K. The thylakoid proton gradient promotes an advanced stage of signal peptide binding deep within the Tat pathway receptor complex. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, p. 5263-5272, 2007.
- GIER, J.W. de; VALENT, Q.A.; HEIJNE, G. Von; LUIRINK, J. The E. coli SRP: preferences of a targeting factor. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Amsterdam, v. 408, p. 1-4, 1997.

- GOHLKE, U.; PULLAN, L.; McDEVITT, C.A.; PORCELLI, I.; LEEUW, E. de; PALMER, T.; SAIBIL, H.R.; BERKS, B.C. The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, p. 0482-10486, 2005.
- HAUSSÜHL, K.; ANDERSSON, B.; ADAMSKA, I. A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. **EMBO Journal**, New York, v. 20, p. 713-722, 2001.
- HERMAN, C.; OGURA, T.; TOMOYASU, T.; HIRAGA, S.; AKIYAMA, Y.; ITO, K.; THOMAS, R.; D'ARI, R.; BOULOC, P. Cell growth and lambda phage development controlled by the same essential Escherichia coli gene, ftsH/hflB. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 10861-10865, 1993.
- HILTBRUNNER, A.; BAUER, J.; VIDI, P.A.; INFANGER, S.; WEIBEL, P.; HOHWY, M. Targeting of an abundant cytosolic form of the protein import receptor atToc159 to the outer chloroplast membrane. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 154, p. 309-316, 2001.
- HINNAH, S.C.; WAGNER, R.; SVESHNIKOVA, N.; HARRER, R.; SOLL, J. The chloroplast protein import channel Toc75: pore properties and interaction with transit peptides. **Biophysical Journal**, Bethesda, v. 83, p. 899-911, 2002.
- HOU, B.; FRIELINGS DORF, S.; KLÖSGEN, R.B. Unassisted membrane insertion as the initial step in Δ pH-Tat dependent protein transport. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 355, p. 957-967, 2006.

- 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 United States of America**, Washington, v. 92, p. 5630-5634, 1995.
- INABA, T.; LI, M.; ALVAREZ-HUERTA, M.; KESSLER, F.; SCHNELL, D.J. atTic110 functions as a scaffold for coordinating the stromal events of protein import into chloroplasts. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, p. 38617-38627, 2003.
- JARVIS, P.; ROBINSON, C. Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 14, p. 1064-1077, 2004.
- JARVIS, P.; SOLL J. TOC, TIC, and chloroplast protein import. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1590, p. 177-189, 2002.
- JONES, D.T.; TAYLOR, W.R.; THORNTON, J.M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Computer Applications in the Biosciences**, Oxford, v. 8, p. 275-282, 1992.
- KARATA, K.; INAGGAWA, T.; WILKISSON, A.J.; TATSUTA, T.; OGURA, T. Dissenting the role of a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, p. 26225-2632, 1999.
- KARNAUCHOV, I.; HERRMANN, R.G.; KLÖSGEN, R.B. Transmembrane topology of the Rieske Fe/S protein of the cytochrome b6/f complex from spinach chloroplasts. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Amsterdam, v. 408, p. 206-210, 1997.

- KATO, Y.; MIURA, E.; MATSUSHIMA, R.; SAKAMOTO, W. White leaf sectors in yellow variegated² are formed by viable cells with undifferentiated plastids. **Plant Physiology**, Rockville, v. 144, p. 952-960, 2007.
- KEEGSTRA, K.; CLINE, K. Protein import and routing systems of chloroplasts. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 11, p. 557-570, 1999.
- KESSLER, F.; SCHNELL, D.J. Chloroplast protein import: solve the GTPase riddle for entry. **Trends in Cell Biology**, London, v. 14, p. 334-338, 2004
- KESSLER, F.; BLOBEL, G.; PATEL, H.A.; SCHNELL, D.J. Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery. **Science**, Washington, v. 266, p. 1035-1039, 1994.
- KOURANOV, A.; SCHNELL, D. J. Analysis of the interactions of the preproteins with the import machinery over the course of protein import into chloroplasts. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 139, p. 1677-1685, 1997.
- KREUTZENBECK, P.; KRÖGER, C.; LAUSBERG, F.; BLAUDECK, N.; SPRENGER, G.A.; FREUDL, R. *Escherichia coli* twin arginine (Tat) mutant translocases possessing relaxed signal peptide recognition specificities. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, p. 7903-7911, 2007.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, New York, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LANGER, T. AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, London, v. 25, p. 247-251, 2000.
- LEISTER, D. Chloroplast research in the genomic age. **Trends in Genetics**, London, v. 19, p. 47-56, 2003.

- LEONHARD, K.; HERRMANN, J.M.; STUART, R.A.; MANNHAUPT, G.; NEUPERT, W.; LANGER, T. AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria. **EMBO. Journal**, New York, v. 15, p. 4218-4229, 1996.
- LI, X.; HENRY, R.; YUAN, J.; CLINE, K.; HOFFMAN, N.E. A chloroplast homologue of the signal recognition particle subunit SRP54 is involved in the posttranslational integration of a protein into thylakoid membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, p. 3789-3793, 1995.
- LINDAHL, J.M.; SPETEA, C.; HUNDAL, T.; OPPENHEIM, A.B.; 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**, Baltimore, v. 12, p. 419-431, 2000.
- LINDAHL, J.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**, Baltimore, v. 271, p. 29329-29334, 1996.
- LUIRINK, J.; HEIJNE, G. Von; HOUBEN, E.; GIER de, J.W. Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 59, p. 329-355, 2005.
- MADUENO, F.; BRADSHAW, S. A.; GRAY, J. The thylakoid-targeting domain of the chloroplast Rieske iron-sulfur protein is located in the N-terminal hydrophobic region of the mature protein. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, p.17458–17463, 1994.

- MANN, N.H.; NOVAC, N.; MULLINEAUX, C.W.; NEWMAN, J.; BAILEY, S.; ROBINSON, C. Involvement of an FtsH homologue in the assembly of functional photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC6803. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Amsterdam, v. 479, p. 72-77, 2000.
- MANTING, E.H.; DOES, C. van der; REMIGY, H.; ENGEL, A; DRIESSEN, A.J. SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. **EMBO Journal**, New York, v. 19, p. 852-861, 2000.
- MARBACH, P.A.S.; COELHO, A.S.G.; SILVA-FILHO, M.C. Mitochondrial and chloroplasts localization of FtsH-like protein sugarcane based on their phylogenetic profile. **Genetics and Molecular Biology**, Alto da Boa Vista, v. 24, p. 183-190, 2001.
- MARQUES, J.P.; DUDECK, I.; KLÖSGEN, R.B. Targeting of EGFP chimeras within chloroplasts. **Molecular Genetics and Genomics**, New York, v. 269, p. 381-387, 2003.
- MARQUES, J.P; SCHATTAT, M.H; HAUSE, G.; DUDECK, I.; KLOSGEN, R.B. *In vivo* transport of folded EGFP by the Δ pH/Tat-dependent pathway in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 1697-1706, 2004.
- MARTIN, W.; RUJAN, T.; RICHLY, E.; HANSEN, A.; CORNELSEN, S.; LINS, T.; LEISTER, D.; STOEBE, B.; HASEGAWA, M.; PENNY, D Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, p. 12246-12251, 2002.

- MAY, T.; SOLL, J. 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 12, p. 53-64, 2000.
- MELIS, A. Photosystem II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates that the rate of photodamage in vivo ? **Trends in Plant Science**, London, v. 4, p.130-134, 1999.
- MOLIK, S.; KARNAUCHOV, I.; WEIDLICH, C.; HERRMANN, R.G.; KLÖSGEN, R.B. The Rieske Fe/S protein of the cytochrome b6/fcomplex: missing link in the evolution of protein transport pathways in chloroplasts? **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, p. 42761–42766, 2001.
- MOORE, M.; HARRISON, M.S.; PETERSON, E.C.; HENRY, R. Chloroplast Oxa1p homolog albino3 is required for post-translational integration of the light harvesting chlorophyll-binding protein into thylakoid membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, p. 1529-1532, 2000.
- MORI, H.; CLINE, K. Post-translational protein translocation into thylakoids by the Sec and Δ pH-dependent pathways. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1541, p. 80-90, 2001.
- MORI, H.; CLINE, K. A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid Δ pH/Tat translocase. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 157, p. 205-210, 2002.
- MOULD, R.M.; ROBINSON, C. A proton gradient is required for the transport of two luminal oxygen-envolving proteins across the thylakoid membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, p. 12189-12193, 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, Rockville, v. 15, p. 473-497, 1962.

- NAKAI, M.; GOTO, A.; NOHARA, T.; SUGITA, D.; ENDO, T. Identification of the SecA protein homolog in pea chloroplasts and its possible involvement in thylakoidal protein transport. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, p. 31338-31341, 1994.
- NIELSEN, H.; KROGH, A. Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. In: PROCEEDINGS OF THE SIXTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON INTELLIGENT SYSTEMS FOR MOLECULAR BIOLOGY, 1998, California. Anais... California: AAAI Press, 1998. 8 p.
- OGURA, T.; TOMOYASU, T.; YUKI, T.; MORIMURA, S.; BEGG, K.J.; DONACHIE W.D.; MORI, H.; NIKI, H.; HIRAGA, S. Structure and function of the *ftsH* gene in *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v.142, p. 279-282, 1991.
- OLSEN, L.J.; KEEGSTRA, K. The binding of precursor proteins to chloroplasts requires nucleoside triphosphates in the intermembrane space. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, p. 433-439, 1992.
- 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**, Baltimore, v. 9, p. 957-965, 1997.
- PERRY, S.E.; KEEGSTRA, K. Envelope membrane proteins that interact with chloroplastic precursor proteins. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 6, p. 93-105, 1994.
- ROBINSON, C.; HYND, P.J.; ROBINSON, D.; MANT, A. Multiple pathways for the targeting of thylakoid proteins in chloroplast. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 38, p. 209-221, 1998.

- ROBINSON, D.; KARNAUCHOV, I.; HERRMANN, R.G.; KLÖSGEN, R.B.; ROBINSON, C. Protease-sensitive thylakoidal import machinery for the Sec-, Δ pH- and signal recognition particle-dependent protein targeting pathways, but not for CFolI integration. **Plant Journal**, Oxford, v. 10, p. 149-155, 1996.
- ROBSON, A.; COLLINSON, I. The structure of the Sec complex and the problem of protein translocation. **EMBO Reports**, London, v. 7, p. 1099-1103, 2006.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, p. 406-425, 1987.
- SAKAMOTO, W.; ZALTSMAN, A.; ADAM, Z.; TAKAHASHI, Y. Coordinated regulation and complex formation of *yellow variegated 1* and *yellow variegated 2*, chloroplastic FtsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in Arabidopsis thylakoid membranes. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 2843-2855, 2003.
- SAKAMOTO, W.; TAKAYUKI, T.; HANBA-TOMITA, Y.; MURATA, M.; SODMERGEN. The VAR1 locus of Arabidopsis encodes a chloroplastic FtsH and is responsible for leaf variegation in the mutant alleles. **Genes to Cells**, Oxford, v. 7, p. 769-780, 2002.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001, 3v.
- SAMUELSON, J.C.; CHEN, M.; JIANG, F.; MÖLLER, I.; WIEDMANN, M.; KUHN, A.; PHILLIPS, G.J.; DALBEY, R.E. YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. **Nature**, New York, v. 406, p. 637-641, 2000.

- SCHLEIFF, E.; SOLL, J.; KUCHLER, M.; KUHLBRANDT, W.; HARRER, R. Characterization of the translocon of the outer envelope of chloroplasts. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 160, p. 541-551, 2003.
- SCHÜNEMANN, D. Structure and function of the chloroplast signal recognition particle. **Current Genetics**, Berlin, v. 44, p. 295-304, 2004.
- SCHÜNEMANN, D. Mechanisms of protein import into thylakoids of chloroplasts. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 388, p. 907-915, 2007.
- 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**, Baltimore, v. 12, p. 917-932, 2000.
- SILVA, P.; THOMPSON, E.; BAILEY, S.; KRUSE, O.; MULLINEAUX, C.W.; ROBINSON, C.; MANN, N.H.; NIXON, P.J. FtsH is involved in the early stages of repair of photosystem II in *Synechocystis* sp PCC 6803. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 2152-2164, 2003.
- SOHRT, K.; SOLL, J. Toc64, a new component of the protein translocon of chloroplasts. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 148, p.1213–1221, 2000.
- SOUZA, M.C.; TRAME, C.B.; TSURUTA, H.; WILBANKS, S.M.; RESSY, V.S.; MACKAY, D.B. Crystal and solution structures of na HslUV protease-chaperone complex. **Cell**, Massachusetts, v. 103, p. 633-643, 2000.
- SUMMER, E.J.; MORI, H.; DETTLES, A.M.; CLINE, K. The thylakoid Δ ph-dependent pathway machinery facilitates RR-independent N-tail protein integration. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, p. 23483-23483, 2000.

- SUN, A.Q.; YANG, J.Y.; YI, S.Y.; ZHAO, C.M.; LIU, J. Cloning and molecular characteristic of the metalloprotease gene LeftsH6 from tomato. **Plant Science**, Amsterdam, v. 170, p. 551–562, 2006.
- SUZUKI, C.K.; REP, M.; DIJL, J.M. van; SUDA, K., GRIVELL, L.A.; SCHATZ, G. ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. **Trends in Biochemical Sciences**, London, v. 22, p. 118-123, 1997.
- TAIR-THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE DATABASE. Disponível em: <<http://www.arabidopsis.org>>. Acesso em: 2 jan. 2006.
- TAMUR, K.; DUDLEY, J.; NE, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p.1596-1599, 2007.
- THEG, S.M.; BAUERLE, C.; OLSEN, L.J.; SELMAN, B.R.; KEEGSTRA, K. Internal ATP is the only energy requirement for the translocation of precursor proteins across chloroplastic membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 264, p. 6730-6736, 1989.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. ClustalW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- THOMPSON, S.J.; KIM, S.J.; ROBINSON, C. Sec-independent insertion of thylakoid membrane proteins. Analysis of insertion forces and identification of a loop intermediate involving the signal peptide. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, p. 18979-18983, 1998.

TIGR-THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH. Disponível em:

< <http://tigrblast.tigr.org> >. Acesso em: 2 jan. 2006

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**, Washington, v. 75, p.1352-1357, 1993.

TOMOYASU, T.; GAMER, J.; BUKAU, B.; KANEMORI, M.; MORI, H.; RUTMAN, A.J.; OPPENHEIN, A.B.; YURA, T.; YAMANAKA, K.; NIKI, H.; HIRAGA, S.; OGURA, T. *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor σ_{32} . **EMBO Journal**, New York, v. 14, p. 2251-2260, 1995.

TU, C.J.; SCHUENEMANN, D.; HOFFMAN, N.E. Chloroplast FtsY, chloroplast signal recognition particle, and GTP are required to reconstitute the soluble phase of high-harvesting chlorophyll protein transport into thylakoid membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, p. 4059-4066, 1999.

TULLMAN-ERCEK, D.; DELISA, M.P.; KAWARASAKI, Y.; IRANPOUR, P.; RIBNICKY, B.; PALMER, T.; GEOGIU, G. Export Pathway Selectivity of *Escherichia coli* Twin Arginine Translocation Signal Peptides. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, p. 8309-8316, 2007.

URANTOWKA, A.; KNORPP, C.; OLCZAK, T.; KOLODZIEJCZAK, M.; JANSKA, H. Plant mitochondria contain at least two i-AAA like complexes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 59, p. 239-252, 2005.

VISION, T.J.; BROWN, D.G.; TANKSLEY, S.D. The origins of genomic duplications in Arabidopsis. **Science**, Washington, v. 290, p. 2114-2117, 2000.

- WAEAGEMANN, K.; SOLL, J. Characterization of the protein import apparatus in isolated outer envelopes of chloroplasts. **Plant Journal**, Oxford, v.1, p.149–158, 1991.
- WICKNER, W.; SCHEKMAN, R. Protein Translocation Across Biological Membranes. **Science**, Washington, v. 310, p.1452-1456, 2005.
- ZALTSMAN, A.; FEDER, A.; ADAM, Z. Developmental and light effects on the accumulation of FtsH protease in Arabidopsis chloroplasts- implications for thylakoid formation and photosystem II maintenance. **Plant Journal**, Oxford, v. 42, p. 609-617, 2005.
- ZELISKO, A.; GARCIA LOURENZO, M.; JACKOWSKI, G.; JANSSEN, S.; FUNK, C. AtFtsH6 is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during high-light acclimation and senescence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, p.13699-13704, 2006.
- ZYGADLO, A.; ROBINSON, C.; SCHELLER, H.V.; MANT, A.; JENSEN, P.E. The properties of the positively charged loop region in PSI-G are essential for its "spontaneous" insertion into thylakoids and rapid assembly into the photosystem I complex. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 281, p. 10548-10554, 2006.
- YOUNG, M.E.; KEEGSTRA, K.; FROEHLICH, J.E. GTP promotes the formation of early-import intermediates but is not required during the translocation step of protein import into chloroplasts. **Plant Physiology**, Rockville, v. 121, p. 237-244, 1999.
- YU, F.; PARK, S.; RODERMEL, S.R. The Arabidopsis FtsH metalloprotease gene family: interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes. **Plant Journal**, Oxford, v. 37, p.864-876, 2004.

YU, F.; PARK, S.; RODERMEL, S.R. Functional Redundancy of AtFtsH Metalloproteases in Thylakoid Membrane Complexes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 138, p. 1957-1966, 2005.