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

Caracterização da interação entre FIP e FtsH5: mapeamento da região de interação e análise de expressão em condições de estresse

Wiliane Garcia da Silva Braga

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

Piracicaba
2013

Wiliane Garcia da Silva Braga
Bacharel em Bioquímica

Caracterização da interação entre FIP e FtsH5: mapeamento da região de interação e análise de expressão em condições de estresse

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

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

Piracicaba
2013

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

Braga, Wiliane Garcia da Silva
Caracterização da interação entre FIP e FtsH5: mapeamento da região de interação e análise de expressão em condições de estresse / Wiliane Garcia da Silva Braga.- - Piracicaba, 2013.
66 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. FtsH 2. Interação proteína-proteína 3. Expressão gênica I. Título

CDD 576.1192452
B813c

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

Dedico:

Aos meus pais, Iracema e Erlande,
pelo apoio constante.
E ao Estevão, pelo incentivo,
amor e paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, saúde e pela presença ao meu lado.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Marcio de Castro Silva Filho, por me conceder a oportunidade de trabalhar em sua equipe. Agradeço pelo seu entusiasmo, que tanto nos estimula, pelo apoio durante o trabalho e pela excelente estrutura disponibilizada.

Ao Prof. Dr. Daniel Scherer de Moura, por ter sido tão importante nessa etapa da minha formação. Professor, obrigada por manter aberta a porta da sua sala, e por estar sempre disposto a esclarecer minhas dúvidas e ajudar com os experimentos.

Agradeço à CAPES, pela bolsa de estudos concedida. Ao CNPq e à FAPESP, pelo apoio financeiro.

Um agradecimento especial ao Rafael Colombi, pela eficiência na organização do laboratório e por estar sempre pronto a nos ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular: Flávia, Wellington, Larissa, Poliene, Elaine, Lucas, Marcos, Fabiana, Thaís, Lígia, Marcelo, Horácio e Aline, pela convivência tão agradável e divertida, e pela troca de experiências.

À Poli, Elaine, Lucas e Lígia, pela amizade, pelo alto astral e pensamentos positivos quando os experimentos não iam tão bem. E também pela empolgação quando as coisas começavam a dar certo. Agradeço à Thaís, pelas várias conversas e pela ajuda indispensável nos experimentos de expressão.

Ao Marcos, por se mostrar disposto a ajudar assim que chegou. Obrigada por sua calma e paciência, e principalmente por sua amizade, que foi tão importante nos momentos finais.

Agradeço à Marcela Scarso, que teve toda paciência ao me ensinar a trabalhar com leveduras, dividindo seus conhecimentos comigo.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Bioquímica de Proteínas: Keine, Bianca, Tábata, Marina, Paulo, Andrés, Juan e Lucas, pelos ótimos momentos que passei com vocês no laboratório, as risadas e brincadeiras, principalmente. Ao Paulo e Keine, pela ajuda com a expressão heteróloga; à Bianca, ao Andrés e ao Juan, por me ajudarem com os mutantes. Foi muito bom conviver com vocês.

Agradeço aos meus amigos caratinguenses e viçosenses, que hoje estão espalhados pelo Brasil, mas ainda assim se fazem presentes. Agradeço especialmente à Nayra e à Fernanda, minhas queridas madrinhas, pelas conversas, visitas, viagens, e por todo incentivo que recebo de vocês.

Ás minhas amigas “piracicabanas”: Juliana, por compartilhar as dificuldades e alegrias do curso, compartilhar as noites de estudo e, claro, as guloseimas e almoços mineiros e baianos; e Isabela, pelas deliciosas conversas diárias e pela convivência incrível que tivemos. Aprendi muita coisa com vocês e sei que manteremos a amizade onde estivermos.

Agradeço à Dona Inês, que com seus 94 anos, por muitas vezes me acolheu como neta e ensinou que devemos manter sempre a alegria de viver.

Aos meus irmãos, Thalles e Erikson, à minha cunhada Claudiana, e aos meus cunhados irmãos do meu esposo, pelo incentivo. Agradeço a Alice, minha sobrinha linda, por renovar minhas forças a cada brincadeira; e à Sara, que mesmo longe tanto nos alegra.

Aos meus pais, Erlande e Iracema, pelo apoio constante, pelas inúmeras orações e pela dedicação aos filhos.

E finalmente, agradeço ao Estevão, pelo amor e companheirismo, por apoiar minhas decisões e tanto incentivar meu crescimento profissional.

SUMÁRIO

RESUMO 9
ABSTRACT 11
LISTA DE FIGURAS 13
LISTA DE TABELAS 15
1 INTRODUÇÃO 17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
2.1 Proteínas plastidiais 19
2.2 Proteínas pertencentes à família AAA 20
2.3 Proteases FtsH 21
2.4 Controle da atividade proteásica de FtsH 25
3 MATERIAL E MÉTODOS 29
3.1 Extração de RNA e síntese de cDNA 29
3.2 Preparo de Escherichia coli eletrocompetente 29
3.3 Amplificação das deleções de FIP 30
3.4 Clonagem nos vetores pGBKT7 e pGADT7 32
3.5 Purificação de DNA plasmidial 33
3.6 Ensaios de duplo híbrido de levedura 34
3.7 Análises da expressão gênica por PCR em tempo Real 35
3.7.1 Condições de crescimento e estresse 35
3.7.2 PCR em tempo real 36
4 RESULTADOS 39
4.1 Mapeamento da interação de FIP com FtsH5 39
4.2 Substituições de cisteína por alanina 42
4.3 Análise da expressão relativa de FIP e FtsH5 43
5 DISCUSSÃO 49
5.1 Mapeamento da região de interação de FIP com FtsH 49
5.2 Análise da expressão de FIP e FtsH5 sob condições de estresse 50
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 53
REFERÊNCIAS 55
ANEXOS 63

RESUMO

Caracterização da interação entre FIP e FtsH5: mapeamento da região de interação e análise de expressão em condições de estresse

Proteínas FtsH são metaloproteases pertencentes à família AAA (ATPases Associadas a Diversas Atividades Celulares), e estão presentes em todos os reinos dos seres vivos. Estas proteases utilizam a energia liberada da hidrólise do ATP para desempenhar suas diversas atividades celulares. Em *Escherichia coli*, as proteases FtsH se organizam em um homo-hexamero na membrana plasmática, sendo que este complexo atua na degradação de proteínas mal dobradas. Em *Arabidopsis*, o hetero-complexo FtsH localizado na membrana dos tilacóides é formados por isômeros do tipo A (FtsH1/FtsH5) e do tipo B (FtsH2/FtsH8). Sua atividade proteolítica está relacionada ao controle de qualidade organelar, degradando proteínas mal dobradas e de vida curta. O complexo está envolvido também na degradação da proteína D1 do PSII, danificada por danos foto-oxidativo. Embora as FtsH cloroplastidiais sejam bem caracterizadas em termos genéticos e moleculares, o mecanismo de regulação do complexo ainda não foi esclarecido, o que torna interessante a busca por fatores proteicos adicionais. Em investigações anteriores nosso grupo de pesquisa encontrou um candidato potencial, denominado FIP (*FtsH5 Interacting Protein*), que pode modular a atividade ATPásica e/ou proteásica do complexo. Fip está presente na membrana dos tilacóides e mostrou interação com FtsH5 *in vivo* e *in vitro*. Neste trabalho foram realizados ensaios de duplo híbrido de leveduras, utilizando deleções da proteína FIP, bem como substituições de resíduos de cisteína por alanina. Os resultados revelaram que a interação entre FIP e FtsH5 é mantida somente quando duas regiões ricas em cisteína estão presentes na sequência de FIP. Essa região compreende 46 aminoácidos, com 4 resíduos de cisteína conservados, e ensaios com 7 diferentes substituições desses resíduos por alanina não mostraram interação com FtsH5, o que corrobora a hipótese de que os resíduos de cisteína são necessários para a interação. Experimentos de análise de expressão utilizando PCR em tempo real, sob condições de estresse salino e estresse a frio, revelaram que os genes que codificam FIP e FtsH5 têm sua expressão regulada de modo antagônico, o que sugere que FIP possa atuar como modulador negativo da atividade proteásica do complexo FtsH.

Palavras-chave: FtsH; Interação proteína-proteína; Expressão gênica

ABSTRACT

Characterization of the interaction between FIP and FtsH5: Mapping the region of interaction and analysis of expression under stress conditions

Metalloprotease FtsH proteins are members of the AAA family (ATPases Associated with Diverse Cellular Activities), and are present in all kingdoms of living organisms. These proteases use energy of ATP hydrolysis to perform its various cellular activities. In *Escherichia coli*, FtsH proteases are organized in a homo-hexamer in the cytoplasmic membrane, and this complex acts in the degradation of misfolded proteins. In *Arabidopsis*, the FtsH hetero-complex located in the thylakoid membrane is formed by type A (FtsH1/FtsH5) and type B (FtsH2/FtsH8) isomers. Its proteolytic activity is involved in organellar quality control by degrading misfolded and short-lived proteins. The complex is also involved in the degradation of the D1 protein of PSII, damaged by photo-oxidative damage. Although the chloroplast FtsH are well characterized genetically and molecularly, the regulatory mechanism of the complex remains unclear, which makes it interesting to search for additional protein factors. In earlier studies our research group has found a potential candidate called FIP (FtsH5 Interacting Protein), which can modulate the ATPase and/or protease activity of the complex. FIP is present in the membrane of the thylakoids and showed interaction with FtsH5 *in vivo* and *in vitro*. In this study yeast two-hybrid assays were performed using FIP protein deletions, and substitutions of cysteine to alanine residues. The results showed that the interaction between FIP and FtsH5 is maintained only when two cysteine rich regions are present in the sequence of FIP. This region contains 46 amino acids with four conserved cysteine residues and 7 different assays with alanine replacements of these residues showed no interaction with FtsH5, which corroborates the hypothesis that the cysteine residues are required for the interaction. Expression experiments analysis using real-time PCR, under conditions of salt stress and cold stress, revealed that the genes encoding FtsH5 and FIP have its expression regulated in an antagonistic way, suggesting that FIP can act as a negative modulator of the activity FtsH protease of the complex.

Keywords: FtsH; Protein-protein interactions; Gene expression

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das formas ADP-FtsH (A) e *apo*-FtsH (B) de *T. marítima*. À esquerda: vista do anel AAA; à direita: anel proteásico. Adaptado de Bieniossek (2009).....23

Figura 2 - Modelo proposto por Kato e colaboradores para a degradação cooperativa da proteína D1. PSII fotodanificado migra para a região de grana, onde ocorre a dissociação do complexo. No sistema de reparo, a degradação de D1 é mediada principalmente pelo complexo FtsH. Mas em condições de fotoinibição, a clivagem endopeptídica de D1 mediada por Deg aumenta a taxa de degradação de D1 porque os fragmentos facilitam a clivagem de D1. Adaptado de Kato e colaboradores (2012).....25

Figura 3 - Representação esquemática das deleções feitas a partir da sequência codificadora de FIP e clonadas em vetores para duplo-híbrido em leveduras. CR1 e CR2: regiões ricas em cisteína1 e 2; DH: domínio hidrofóbico de ancoragem à membrana. A direita, está indicado o tamanho, em nucleotídeos, de cada deleção.....40

Figura 4 - Teste de crescimento de *Sacharomyces cerevisiae* AH109 transformada com diferentes construções descritas na figura. –L-W: meio deficiente em leucina e triptofano; -L-W-H e –L-W-A: meios seletivos para a interação, deficientes também em histidina e adenina, respectivamente. A interação entre FIP e FtSH5 é mantida somente quando as duas regiões ricas em Cys estão presentes.....41

Figura 5 - Resultado esquemático dos experimentos de interação em duplo híbrido de levedura. Houve crescimento em meio seletivo, portanto, interação, somente nas construções contendo ambas as regiões ricas em cisteína.....41

Figura 6 - Esquema das 7 substituições de Cys por Ala.....42

Figura 7 - Teste de crescimento de *Sacharomyces cerevisiae* MaV203 transformada com as substituições por Ala fusionadas ao domínio de ligação ao DNA, e FtsH5 fusionada ao domínio de ativação. –L-W: meio deficiente em leucina e triptofano, que seleciona células contendo ambos os plasmídeos; -L-W-His + 25mM 3AT: meio seletivo para interação, deficiente em leucina, triptofano e histidina, contendo 25mM de 3-Amino-1,2,4-triazole; -L-W-Ura: meio seletivo, deficiente em leucina, triptofano e uracila. 43

Figura 8- Expressão relativa dos genes que codificam FIP (A) e FtsH5 (B), sob condições de estresse a frio. RNA total foi extraído de plantas submetidas a 4^0C (tratado) e plantas mantidas a 22^0C (controle) nos intervalos de tempo descritos. 45

Figura 9- Expressão relativa dos genes que codificam FIP (A) e FtsH5 (B), sob condições de estresse salino. RNA total foi extraído de plantas mantidas em meio MS meia força (controle) e plantas transferidas para meio acrescido de 150 µM de cloreto de sódio. As coletas foram realizadas nos intervalos de tempo descritos.....47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos usados para amplificar as deleções de FIP. Os sítios de restrição estão sublinhados em cada sequência.....31

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados para as substituições de Cys por Ala.....32

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados nas análises de PCR em tempo real.....37

1 INTRODUÇÃO

As células eucarióticas apresentam um elaborado sistema de endomembranas, que compartimentaliza os processos celulares em ambientes específicos para cada conjunto de reações. Nesses compartimentos atuam diversos sistemas de controle de qualidade, que auxiliam na manutenção das condições organelares necessárias para o desempenho de suas funções. Nos cloroplastos de células vegetais estão presentes sistemas que eliminam proteínas mal dobradas ou danificadas por danos foto-oxidativos, e entender os mecanismos de controle desses sistemas aumenta o conhecimento sobre o funcionamento organelar.

As FtsH são metaloproteases pertencentes à família de proteínas AAA (ATPases Associadas à Diversas Atividades Celulares), que utilizam a energia proveniente da hidrólise do ATP para desempenhar suas atividades biológicas. As proteases AAA são amplamente encontradas nos diversos organismos e são caracterizadas por um domínio ATPásico conservado e um domínio relacionado à hidrolise do ATP. As FtsH foram primeiro descritas em *Escherichia coli* (OGURA et al., 1991) formando um complexo hexamérico na membrana plasmática e desempenham importante papel no controle de qualidade de proteínas intracelulares (ITO; AKIYAMA, 2005).

Em cloroplastos de plantas superiores as FtsH estão presentes como um complexo hetero-hexamérico ancorado na membrana dos tilacóides. Sua atividade proteásica está relacionada à degradação de proteínas danificadas por oxidação, principalmente no processo de reparo da proteína D1 do centro de reação do PSII (NIXON et al., 2010).

As FtsH cloroplastidiais são bem caracterizadas em termos genéticos e moleculares. No entanto, o mecanismo de regulação do complexo ainda não foi esclarecido e, nesse sentido, a busca por fatores protéicos adicionais se torna interessante. Em investigações anteriores, nosso grupo de pesquisa encontrou um candidato potencial, denominado FIP (*FtsH5 Interacting Protein*), que pode modular a atividade ATPásica e/ou proteásica do complexo. FIP é uma proteína plastidial, localizada na membrana dos tilacóides, e que mostrou interação com a proteína FtsH5 *in vivo* (duplo híbrido de levedura) e *in vitro* (*Pull-Down*). Além disso, experimentos de eletroforese em gel não desnaturante mostraram que FIP está associada a um complexo de aproximadamente 440 kDa, o tamanho esperado para o complexo FtsH. Esses resultados em conjunto sugerem que FIP pode atuar de algum modo no complexo (RODRIGUES, 2011). Sendo assim, se faz necessário estudar o real papel dessa nova proteína no complexo FtsH para começar a compreender os mecanismos de regulação do mesmo.

Este trabalho visou aumentar os conhecimentos sobre a proteína FIP, que ainda não possui função determinada. Especificamente, os objetivos do trabalho foram mapear o sítio de interação de FIP e FtsH5, utilizando a técnica de duplo-híbrido de leveduras; e estudar a expressão dos genes que codificam FIP e FtsH5 em condições de estresse abiótico. Para mapear o sítio de interação foram feitas deleções e substituições na sequência de FIP, e as construções testadas para interação. Para os experimentos de análise de expressão duas condições de estresse abiótico foram avaliadas: estresse a frio e estresse salino. Essas investigações contribuirão para melhor entender o funcionamento do complexo bem como para aumentar informações sobre essa nova proteína cloroplastidial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proteínas plastidiais

A compartimentalização da célula eucariótica, resultado da evolução de um complexo sistema de endomembranas, permitiu a separação de processos metabólicos em compartimentos celulares específicos. Esses compartimentos constituem verdadeiros microambientes celulares, com características próprias como composição proteica, iônica, valores específicos de pH e estado redox, que determinam as condições necessárias para as reações ocorridas naquele compartimento.

Acredita-se que mitocôndrias e cloroplastos tenham suas origens em eventos endossimbióticos ocorridos a cerca de 1,5 bilhão de anos (MARGULIS, 1970). Segundo essa teoria, mitocôndrias originaram-se pela associação entre uma célula hospedeira e um ancestral de α-protobactéria. Os cloroplastos originaram-se da aquisição de um segundo endossimbionte ancestral de cianobactérias. Diversas evidências sustentam a teoria endossimbiótica, como presença nessas organelas de genoma próprio, maquinaria de síntese proteica, e o fato de possuírem um sistema de dupla membrana.

Ao longo do processo evolutivo ocorreu a transferência de genes endossimbiontes para o genoma nuclear, com a maciça redução do conteúdo genético e perda de autonomia desses organismos. Atualmente o genoma de cloroplastos possui de 50-150 genes que codificam proteínas das maquinarias de transcrição e tradução, bem como para subunidades de complexos do aparato fotossintético (LYSKA; MEIERHOFF; WESTHOFF, 2013). No entanto, o proteoma estimado dessa organela é de 2700 proteínas, o que evidencia a presença de um importante sistema de importação de proteínas.

Os plastídeos atuais são organelas bastante complexas que apresentam seis diferentes compartimentos: membrana externa, membrana interna, espaço intra-membranas, estroma, membrana do tilacóide e lúmen. Cada um desses espaços apresenta um conjunto próprio de proteínas que permitiu a especialização da organela nas reações fotossintéticas e outros processos essenciais, como metabolismo de lipídeos e biossíntese de aminoácidos. Assim como nas demais organelas celulares, um sistema de controle de qualidade rigoroso é indispensável para manutenção das funções organelares. Nos tilacóides encontram-se complexos proteásicos que atuam nesse controle, sendo que um deles, o complexo FtsH

inserido na membrana dos tilacoides, desempenha importante papel na eliminação de proteínas mal dobradas e/ou afetadas por danos foto-oxidativos.

2.2 Proteínas pertencentes à família AAA

As proteínas AAA (ATPases Associadas à Diversas Atividades Celulares) formam uma vasta e diversa família de proteínas encontradas em todos os organismos. As proteínas AAA estão envolvidas em uma ampla variedade de processos celulares, como controle do ciclo celular, transporte de proteínas e degradação de proteínas em bactérias e organelas de origem endossimbiótica (LEONHARD et al., 1996; OGURA; WILKINSON, 2001). Apesar da variedade de processos, a energia proveniente da hidrólise do ATP é utilizada em todas essas atividades biológicas (SNIDER; THIBAULT; HOURY, 2008). O módulo AAA, comum a todos os membros da família, constitui de um domínio ATPásico conservado, compreendido por uma sequência de 200-250 aminoácidos. Este domínio é caracterizado pelos motivos Walker A e Walker B, relacionados à ligação ao ATP, e o motivo SRH (*Second Region of the Homology*), relacionado à hidrólise do ATP (HANSON; WHITEHEART, 2005; ITO; AKIYAMA, 2005; KARATA et al., 1999; OGURA; WILKINSON, 2001).

A família AAA é dividida em várias subfamílias de acordo com suas características estruturais e funcionais. ClpAP, ClpXP, HslVU, Lon e FtsH são subfamílias presentes em *Escherichia coli*, sendo que cloroplastos e mitocôndrias possuem proteínas homólogas a essas (OGURA; WILKINSON, 2001) (AMMELBURG; FRICKEY; LUPAS, 2006). Nas famílias Lon e FtsH, seis subunidades idênticas, cada uma contendo o domínio AAA e o domínio proteásico, formam hexâmeros. Nas famílias ClpAP, ClpXP, HslVU os domínios AAA e proteásico não estão no mesmo polipeptídeo: ClpX, ClpA, e HslU formam homo-hexâmeros de domínios AAA, enquanto que os compartimentos proteásicos ClpP e HslV são formados por múltiplas cópias desses polipeptídeos, formando uma estrutura de dois anéis com 14 e 12 subunidades, respectivamente (SAUER; BAKER, 2011).

2.3 Proteases FtsH

Proteases FtsH (*Filamentous temperature sensitive*) são metaloproteases membros da superfamília AAA, encontradas desde eubactérias a organelas de origem bacteriana, isto é, cloroplastos e mitocôndrias (JANSKA; KWASNIAK; SZCZEPANOWSKA, 2013). Foram primeiramente descritas em *Escherichia coli* por Oruga e colaboradores (1991) através da caracterização do mutante ftsH Y16. O nome FtsH resulta da incapacidade destes mutantes de formar o septo que separa as células durante a divisão celular quando mantidos em altas temperaturas (OGURA et al., 1991). O termo FtsH tem sido mais usado para referenciar proteases bacterianas e cloroplastidiais, enquanto o termo proteases AAA é preferencialmente usado para proteínas mitocondriais (JANSKA; KWASNIAK; SZCZEPANOWSKA, 2013).

As proteases FtsH são altamente conservadas, com cerca de 40% de identidade entre proteínas de *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens* e *Arabidopsis thaliana*. Seus membros possuem três domínios em um único polipeptídeo: na região N-terminal está o domínio hidrofóbico, que ancora a proteína na membrana; este é seguido pelo domínio ATPásico característico da família AAA; e na porção C-terminal localiza-se o domínio proteásico, cujo centro catalítico é formado por um motivo conservado de ligação a zinco, característico das metaloproteases (His-Glu-X-X-His, sendo X qualquer aminoácido) (JANSKA; KWASNIAK; SZCZEPANOWSKA, 2013; SAKAMOTO, 2006).

Posteriormente à descrição em *E. coli*, foram identificadas proteínas homólogas às FtsH bacterianas em *Sacharomyces cerevisiae* e em cloroplastos isolados. Em leveduras, estas proteases estão localizadas na membrana interna de mitocôndrias e fazem parte de dois complexos com atividade proteásica (m-AAA e i-AAA), que possuem atividade de chaperona e atuam na degradação de proteínas da membrana (LEONHARD et al., 1996). A primeira FtsH cloroplastidial foi identificada através de ensaios imunológicos com frações celulares enriquecidas de tilacóides de espinafre (LINDAHL et al., 1996). Posteriormente, proteases homólogas foram encontradas em diversas outras espécies de plantas, como tabaco (SEO et al., 2000) e Arabidopsis (CHEN et al., 2000).

O genoma de *E. coli* contém uma cópia gênica para FtsH, em cianobactéria *Synechocystis* sp. encontram-se quatro genes e o genoma nuclear de *Arabidopsis thaliana* contém 12 genes que codificam FtsHs. Essa multiplicação dos genes para FtsH parece estar relacionada com a evolução do aparato fotossintético (ADAM et al., 2005). Em *A. thaliana***,** além dos 12 genes que codificam isoformas ativas, 5 codificam isoformas que perderam o

motivo de ligação a zinco, o que possivelmente as tornam inativas para atividade proteolítica (SOKOLENKO et al., 2002). Através de ensaios de expressão transiente com proteínas fusionadas a GFP (SAKAMOTO et al., 2003) demonstrou que 9 das 12 isoformas são direcionadas a cloroplastos (FtsH 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 11 e 12) e 3 são direcionadas a mitocôndrias (FtsH3, 4 e 10). Posteriormente, utilizando métodos imunológicos foi demonstrado que FtsH11 apresenta duplo direcionamento (URANTOWKA et al., 2005). Todas as isoformas inativas são direcionadas a cloroplastos (revisado por Adam, Rudella, e van Wijk (2006) e Wagner, Aigner e Funk (2012)).

Os primeiros estudos a respeito da estrutura tridimensional do complexo foram feitos a partir de análises cristalográficas e estudos de modelagem de domínios AAA de FtsH de *E. coli* (KRZYWDA et al., 2002) e *Thermus thermophilus* (NIWA et al., 2002). Mesmo se tratando de dados referentes a estruturas monoméricas, esses trabalhos já inferiram a organização de um complexo homo-hexamérico, de modo semelhante a outros membros da família. Em 2009, Bieniossek e colaboradores compararam duas estruturas cristalográficas do complexo FtsH de *Thermotoga maritima*: o complexo ligado a ADP (BIENIOSSEK et al., 2006) e o complexo na forma *apo-state*. A comparação entre as estruturas mostra os movimentos que ocorrem entre os estados ligado e não ligado ao nucleotídeo (Figura 1). O anel proteásico é uma "região estacionária" e os movimentos dos domínios AAA realizam o desdobramento do substrato e a translocação de sua cadeia peptídica para o poro central. A hipótese corrente mais aceita é a de que a energia proveniente da hidrólise do ATP é convertida em força mecânica pelas mudanças conformacionais envolvendo os resíduos do poro (BIENIOSSEK; NIEDERHAUSER; BAUMANN, 2009).

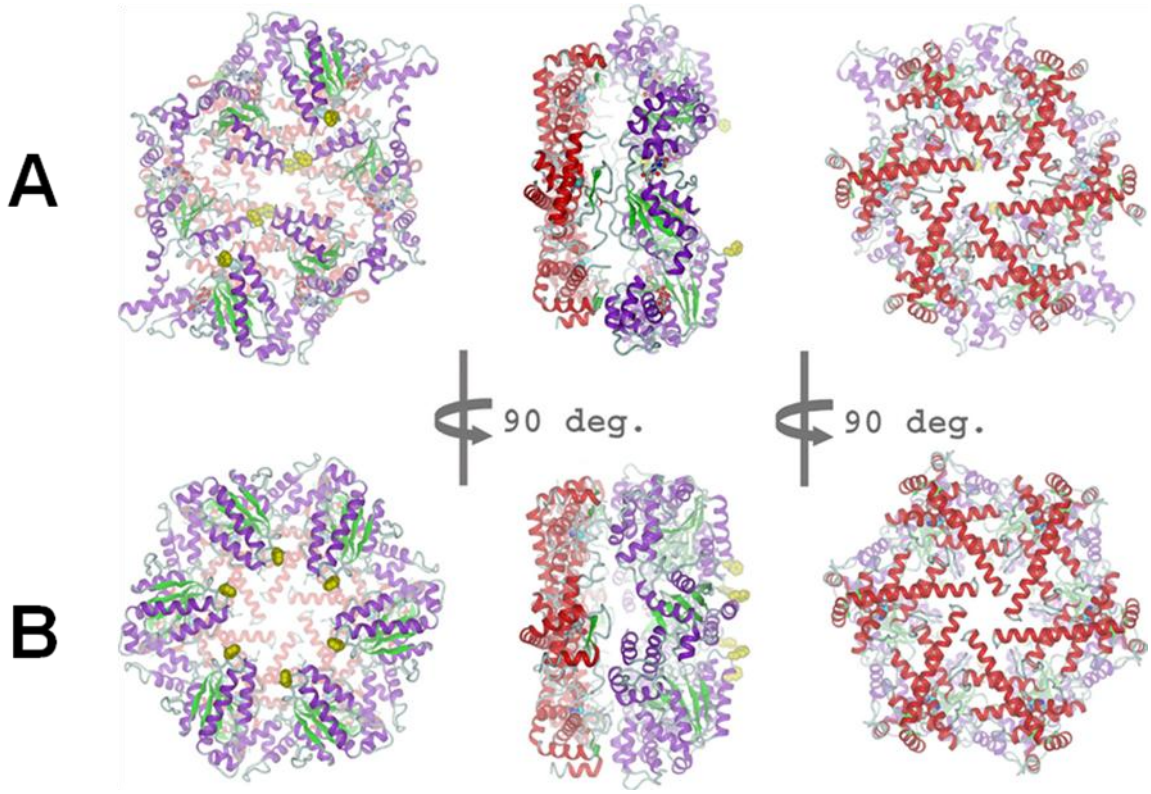


Figura 1 - Representação das formas ADP-FtsH (A) e *apo*-FtsH (B) de *T. marítima*. À esquerda: vista do anel AAA; à direita: anel proteásico. Adaptado de Bieniossek (2009)

Diferentemente do homo-hexâmero formado em organismos eucariotos, em cloroplastos de *A. thaliana* observa-se a presença de hetero-hexâmeros, formados por isômeros dos tipos A (FtsH1/FtsH5) e do tipo B (FtsH2/FtsH8) (YU; PARK; RODERMEL, 2004). Mutações nos genes que codificam dois desses isômeros, FtsH2 (mutante var2) e FtsH5 (mutante var1) apresentam fenótipos de variegação foliar em *A. thaliana* (SAKAMOTO et al., 2003). Essas são as duas principais isoformas do complexo, visto que os mutantes para outras FtsHs plastidiais não resultam em fenótipos visíveis (SAKAMOTO, 2003; ZALTSMAN; FEDER; ADAM, 2005). Além das análises de mutantes, dados de expressão também revelam a importância dessas duas isoformas, mostrando que FtsH2 é a mais abundante, seguida pela FtsH5 (SINVANY-VILLALOBO et al., 2004).

A respeito da topologia das proteases na membrana, FtsH de *E. coli* possui dois domínios ancorados na membrana plasmática, situados na porção N-terminal, e o domínio proteásico C-terminal exposto ao citoplasma (TOMOYASU et al., 1993) revisado por Ito e Akiyama (2005) e Langklotz, Baumann, e Narberhaus (2012). Os hexâmeros FtsH estão associados a outras proteínas de membrana, como HflKC (KIHARA; AKIYAMA; ITO, 1996) e formam um grande complexo proteico, com massa molecular de aproximadamente

1000 kDa (SAIKAWA; AKIYAMA; ITO, 2004). Já em cloroplastos, as proteases FtsH2 e FtsH5 formam um heterocomplexo com massa entre 400 a 450 kDa (SAKAMOTO et al., 2003). Além disso, estudos recentes mostram que, em cloroplastos, há somente uma região transmembrana que ancora cada protease na membrana dos tilacóides, sendo que o domínio catalítico está exposto ao estroma (RODRIGUES; SILVA-FILHO; CLINE, 2011).

Um importante papel desempenhado pelo complexo FtsH nos tilacóides é o controle de qualidade desse compartimento organelar, atuando na degradação de proteínas mal dobradas ou danificadas por oxidação. Tem sido demonstrado o envolvimento dessas proteases no processo de degradação da proteína D1 do centro de reação do PSII. Utilizando tilacóides isolados, (LINDAHL et al., 2000) mostraram que o fragmento de D1 com 23 kDa (primeiro produto de clivagem, induzido pela luz), é degradado em um processo dependente de ATP e íons bivalentes, sugerindo a participação de FtsHs. Posteriormente, estudos com mutantes para FtsH2 mostraram que, em condições de alta intensidade luminosa, a proteína D1 danificada é acumulada, enquanto em plantas selvagens isso não ocorria (BAILEY et al., 2002) (revisado por Sakamoto (2006), Chi, Sun e Zhang (2012) e Nixon e colaboradores (2010). Esses resultados corroboram a importância do complexo FtsH no mecanismo de reparo do PSII danificado por fotoxidação. Kato e Sakamoto (2009), sugeriram um modelo para degradação da proteína D1 envolvendo a participação das proteases FtsH e Deg (família de endoproteases do tipo serina-proteases, associadas perifericamente à membranas de cloroplastos em *A. thaliana* (KATO; SAKAMOTO, 2009)). Recentemente, o mesmo grupo mostrou que fragmentos de D1 gerados por Deg podem ser substratos do complexo FtsH (Figura 2). Esses novos resultados suportam o papel cooperativo de proteases cloroplastidiais nos processos de degradação da proteína D1 danificada (KATO et al., 2012).

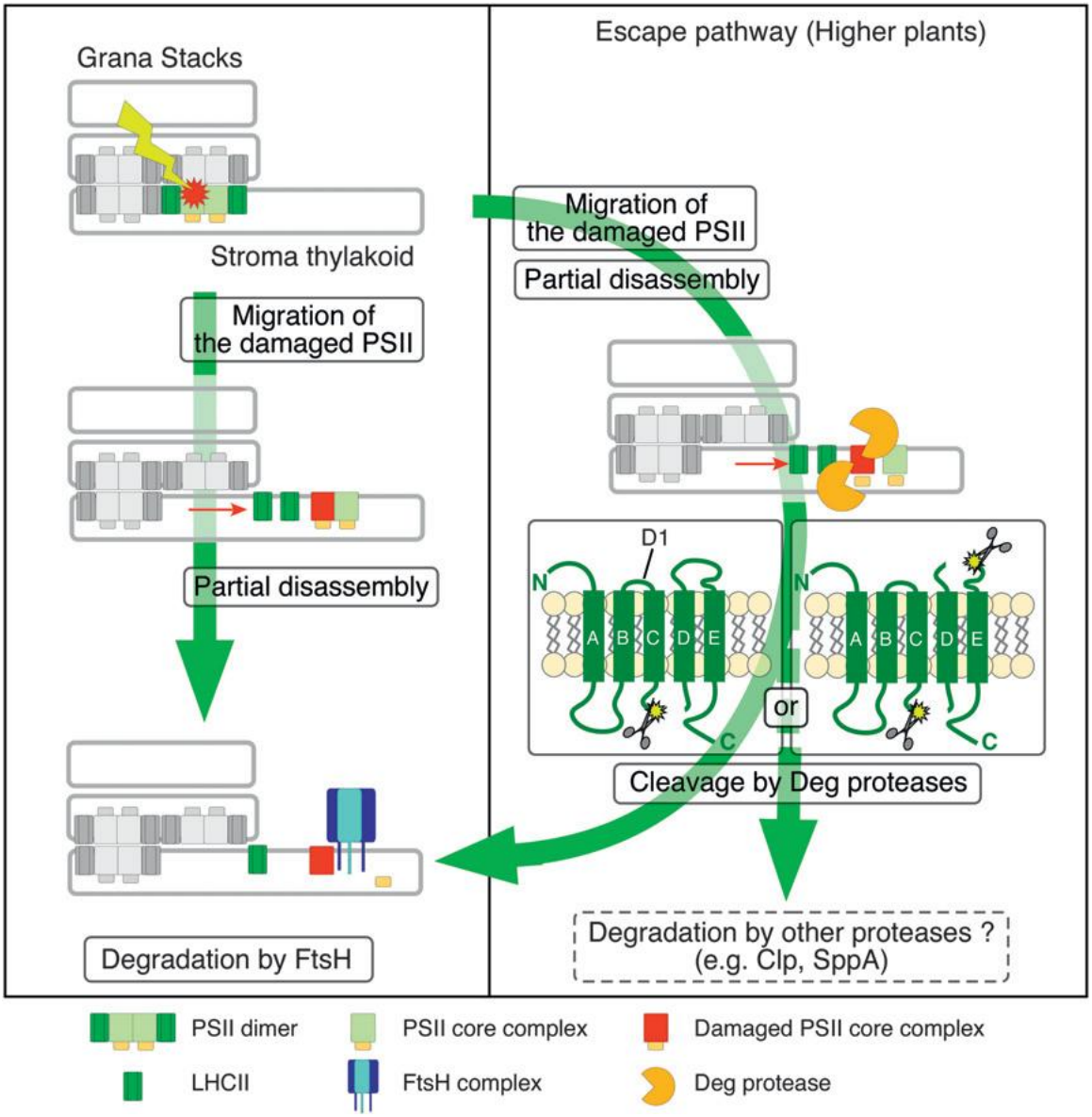


Figura 2 – Modelo proposto por Kato e colaboradores para a degradação cooperativa da proteína D1. PSII fotodanificado migra para a região de grana, onde ocorre a dissociação do complexo. No sistema de reparo, a degradação de D1 é mediada principalmente pelo complexo FtsH. Mas em condições de fotoinibição, a clivagem endopeptídica de D1 mediada por Deg aumenta a taxa de degradação de D1 porque os fragmentos facilitam a clivagem de D1. Adaptado de (KATO et al., 2012)

2.4 Controle da atividade proteásica de FtsH

Um sistema de controle de qualidade organelar como o complexo FtsH, que atua na degradação de proteínas danificadas, deve estar sob um rigoroso mecanismo de controle. Caso contrário, a degradação de proteínas normais teria igual probabilidade de ocorrer, o que não seria energeticamente interessante. Para evitar essa degradação inespecífica, espera-se que a

atividade proteolítica seja suprimida quando não for necessária, ou então seja passível de um mecanismo regulatório envolvendo a participação de outras proteínas.

Em *E. coli*, o complexo hexamérico FtsH está associado a outro complexo proteico, chamado HflKC. Diversos estudos *in vitro* mostram que FtsH isolado apresenta atividade, o que indica que HflKC não é necessário para a atividade proteásica. Na verdade, em mutantes hflK ou hflC ocorre um aumento da atividade proteásica de FtsH sobre o substrato SecY (AKIYAMA et al., 1996), e a proteína *cII* do bacteriófago λ (KIHARA; AKIYAMA; ITO, 1997). Adicionalmente, o complexo purificado inibe a degradação de SecY por FtsH *in vitro*. Juntos, esses resultados indicam que a atividade proteolítica de FtsH é modulada negativamente pela associação com HflKC em *E. coli* (AKIYAMA, 2009; ITO; AKIYAMA, 2005).

Já em cloroplastos, embora a estrutura do complexo seja bem conhecida, o seu mecanismo de regulação ainda não foi elucidado. Recentemente, Yoshioka e Yamamoto (2011) propuseram mecanismos possíveis de ativação do complexo, que podem ocorrer em condições de estresse luminoso. Um dos mecanismos possíveis de ativação reversível seria a oligomerização das subunidades FtsH para formar o hexâmero ativo (e sua desorganização para inativá-lo). Essa hipótese surgiu do fato de que diferentes oligômeros, desde dímeros a hexâmeros, estão presentes em tilacóides de espinafre, mas que a região de grana é enriquecida de hexâmeros (YOSHIOKA et al., 2010). Essa é a fração onde o complexo do PSII é mais abundante.

Outra hipótese levantada é a sensibilidade da cauda luminal ao pH do tilacóide. Foi mostrado em *E. coli* que a região periplasmática de FtsH, equivalente a região exposta ao lúmen em tilacóides, apresenta um papel crucial na interação entre os monômeros e na modulação da atividade de proteólise (AKIYAMA et al., 1998). A acidificação do lúmen dos tilacóides em condições de iluminação deve protonar alguns resíduos da calda luminal, promovendo mudanças conformacionais que favorecem a formação do complexo (YOSHIOKA; YAMAMOTO, 2011).

Também é possível que espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidas em condições de alta intensidade luminosa, atuem na oligomerização do complexo. Além de causar danos oxidativos em diversas moléculas, sabe-se que os ROS atuam como sinais que ativam resposta ao estresse. É possível que a síntese das FtsH seja ativada pela presença de ROS, ou mesmo que essas moléculas promovam modificações na estrutura das proteases, induzindo sua oligomerização (YOSHIOKA; YAMAMOTO, 2011).

Outra hipótese que deve ser considerada é a presença de fatores protéicos adicionais, que associados ao complexo, atuam modulando a sua atividade. Foi encontrado, por nosso grupo de pesquisa, através de experimentos de duplo-híbrido de leveduras utilizando a protease FtsH5 como isca, uma proteína hipotética, de localização cloroplastidial e função ainda não determinada, que se mostrou um candidato em potencial para associação ao complexo FtsH. Essa proteína, denominada pelo grupo de FIP (*FtsH5 Interacting Protein*), é direcionada aos cloroplastos e está inserida na membrana dos tilacóides. Além disso, experimentos de eletroforese em gel não desnaturante mostraram que FIP está associada a um complexo de aproximadamente 440 kDa, o tamanho esperado para o complexo FtsH. Esses resultados em conjunto sugerem que FIP pode regular a atividade ATPásica e/ou proteásica do complexo de maneira ainda não conhecida (RODRIGUES, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

Aproximadamente 100 mg de tecido foliar foi macerado em nitrogênio líquido e misturado a 1mL de Trizol (Invitrogen), com agitação em vórtex por 1 minuto. Então, foi adicionado 200 µL de clorofórmio e o tubo foi incubado a temperatura ambiente por 5 minutos, seguido por centrifugação a 13.000 g por 15 minutos a 4^0C. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um tubo novo, no qual foi adicionado 500 µL de isopropanol e incubou-se a temperatura ambiente por 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 13.000 g por 10 minutos a 4^0C, o sobrenadante removido e o *pellet* lavado com 1mL de etanol 75%. Após nova centrifugação a 5.400 g por 5 minutos a 4^0C, o etanol foi removido e o *pellet* secado a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, o RNA foi ressuspendido em água ultrapura e tratado com DNase (Fermentas) por 1h a 37^0C, para eliminar contaminação por DNA genômico. Após o tratamento as amostras foram submetidas a uma segunda extração, utilizando metade dos volumes descritos, para remoção da DNase adicionada. A quantificação do RNA bem como a avaliação da sua qualidade foi feita pela leitura da absorbância nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. As amostras foram consideradas adequadas quando a razão A_{260}/A_{280} estava entre 1,85 e 2.

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit *ImProm-II Reverse Transcriptase* (Promega): 1µg de RNA total foi misturado a 1µL de oligodT 50 µM e foi incubado a 70^0C por 5 minutos. Os tubos foram colocados no gelo por mais 5 minutos e então foi adicionado o mix de reação contendo 4 µL do tampão Impro 5X, 4,8 µL de $MgCl_2$ 25 mM, 1 µL de dNTPmix (concentração final de 0,5 mM de cada dNTP) e 1U de Improm-II Reverse. Os tubos foram incubados por 5 minutos a 25^0C, 60 minutos a 42^0C e 15 minutos a 70^0C.

3.2 Preparo de Escherichia coli eletrocompetente

Células *E. coli* (cepa DH5α) foram estriadas em placa contendo meio Luria-Bertani (LB) sólido (1% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 1% NaCl e 2% de ágar bacteriológico pH7,0) e crescidas por 18 horas a 37 ^{0}C. Então, uma colônia isolada foi transferida para 10 mL de meio LB líquido, o qual foi incubado por 16 horas a 37^0C, sob

agitação de 200 rpm. Após, adicionou-se 5 mL do pré-inóculo a 500 mL de meio líquído, e este foi mantido sob as condições anteriores até a absorbância no comprimento de onda 600 nm atingir entre 0,6 e 0,8 (densidade ótica, DO_{600}). As células foram centrifugadas por 15 minutos a 6000 g, a 4^0C. O sobrenadante foi removido e as células ressuspendidas em 250 mL de água estéril, a 4^0C. O procedimento da centrifugação foi repetido três vezes, e após a quarta repetição as células foram ressuspendidas em glicerol 10% gelado. Centrifugou-se novamente, as células foram ressuspendidas em 2 mL de glicerol 10%, foram feitas alíquotas de 70 µL e estas foram armazenadas a -80 ^{0}C.

3.3 Amplificação das deleções de FIP

A sequência codificadora para a proteína FIP (AT5G02160), obtida a partir do banco de dados TAIR (*The Arabidopsis Information Resource* _ www.arabidopsis.org) foi utilizada para o desenho dos iniciadores específicos. Nas extremidades 5' de cada iniciador foram adicionados sítios para enzimas de restrição *Eco*RI e *Bam*HI (Tabela 1). Cada reação de PCR foi composta por tampão 1X, 2 mM de $MgSO_4$, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada iniciador, 1µL de cDNA e 1U da enzima *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen). As reações foram conduzidas em termociclador, programado da seguinte maneira: 94^0C por 2 minutos, 30 ciclos de 94^0C por 30 segundos, 58^0C por 30 segundos e 68^0C por 45 segundos, uma extensão final a 68^0C por 5 minutos e 4^0C.

Foram amplificadas seis deleções da sequência codificadora da proteína, sendo quatro a partir da extremidade carboxiterminal e duas a partir da extremidade aminoterminal da proteína completa. Os produtos da amplificação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para verificação do tamanho de cada fragmento. Os fragmentos foram então recortados do gel e purificados com o *QIAEX II Gel Extraction kit* (QIAGEN), de acordo com as recomendações do fabricante.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos usados para amplificar as deleções de FIP. Os sítios de restrição estão sublinhados em cada sequência

Oligonucleotídeos	**Sequência 5'→3'**	**Construção**
FIP del F Eco RI	ATGAATTCATGACGATCGCACCGGCATTGC	Del 1 a 4
FIP del 1 R Bam HI	ATGGATCCCTATCCGAGTCCATTGCAGTTAGCAC	Del 1
FIP del 2 R Bam HI	ATGGATCCCTAAACGATCTGAGGAAGATCCTTCC	Del 2
FIP del 3 R Bam HI	ATGGATCCCTATCCTGCTCCGTCACATTCCGGAC	Del 3
FIP del 4 R Bam HI	ATGGATCCCTACGTGTCTTTGCGTTTGAAGAGG	Del 4
FIP del 5 Eco RI F	ATGAATTCTGTCCGGAATGTGACGGA	Del 5
FIP del 6 Eco RI F	ACGAATTCTTTGTGAGGAAAGGAGGAGTG	Del 6
FIP BamHI Rev	CGGGATCCTTATGATTTATCAATCTGGTTAAGCTT	Del 5 e 6

Para as construções contendo substituições de resíduos de cisteína por alanina foi utilizada a técnica de PCR, com oligonucleotídeos iniciadores contendo a troca do códon TGT (Cys) para o códon GCT ou GCA (Ala). A Tabela 2 lista os iniciadores usados em cada substituição. A estratégia de clonagem para essas substituições baseou-se na clonagem dos fragmentos amplificados no vetor de entrada DTOPO e posterior recombinação nos vetores de expressão em levedura pDEST 22 e pDEST 32, contidos no *Kit ProQuest™ Two-Hybrid System* (Invitrogen).

Tabela 2 - Oligonicleotídeos utilizados para as substituições de Cys por Ala

Oligonucleotídeos	**Sequência 5'→3'**	**Construção**
Fip ENTRDTOPO C84A/C87A F	CACCGCACCTGAAGCAGAC	Subst1; Subst2
Fip ENTRDTOPO C114A/C117A R	TCCGAGTCCATTAGCGTTAGCAGCAA	Subst1; Subst3
FIP ENTRDTOPO C114_C117 R	TCCGAGTCCATTACAGTTAG	Subst2; Subst4; Subst5
Fip ENTRDTOPO C84_C87 F	CACCTGTCCTGAATGTGAC	Subst3; Subst6; Subst7
Fip ENTRDTOPO C84A F	CACCGCTCCTGAATGTGACG	Subst4
Fip ENTRDTOPO C87A F	CACCTGTCCTGAAGCTGACG	Subst5
Fip ENTRDTOPO C114A R	TCCGAGTCCATTGCAGTTAGCACCAA	Subst6
Fip ENTRDTOPO C117A R	TCCGAGTCCATTGCAGTTAGC	Subst7

Nota: Os códons alterados e as extremidades para clonagem no vetor de entrada estão sublinhados.

3.4 Clonagem nos vetores pGBKT7 e pGADT7

Os fragmentos purificados e os vetores pGBKT7 e pGADT7 foram clivados com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Bam*HI por 2h a 37^0C para aquisição de extremidades coesivas. As reações de ligação foram realizadas com o *Rapid DNA Ligation Kit* (Fermentas), com a seguinte modificação: os tubos foram incubados a 22^0C por 2h.

A partir das reações de ligação, 2 µL foram utilizados para eletroporar 70 µL de células *E. coli* eletrocompententes, cepa DH5α, preparadas como descrito no item 3.2. As células somadas a reação de ligação foram delicadamente colocadas em uma cubeta de eletroporação de 0,2cm de espessura, previamente resfriada, e então, submeteu-se o conjunto a um pulso elétrico de 1,8kV/25µF (eletroporador Gene Pulse, BioRad). Imediatamente após a eletroporação, adicionou-se 600 µL de meio SOC (em 100 mL: 2g de triptona; 0,5g de extrato de levedura; 0,05g de NaCl; 1mL de KCl 250mM; 180µL de $MgCl_2$ 1M; 180µL de glicose 20% filtroestéril; pH 7,0) e as células foram incubadas por 1 hora a 37 ^{0}C, sob agitação de 180 rpm. Após esse período as células foram plaqueadas em meio LB sólido, (contendo 50 µg/mL de canamicina para clonagens no vetor pGBKT7 e 100 µg/mL de ampicilina para clonagens no vetor pGADT7) e incubadas a 37 ^{0}C por 16 -18 horas.

3.5 Purificação de DNA plasmidial

Colônias isoladas obtidas da transformação foram inoculadas em 5 mL de meio LB líquido, contendo o antibiótico adequado, e mantidas sob agitação de 180 rpm por 16h a 37^{0}C para extração do DNA plasmidial, de acordo com os procedimentos descritos por Sambrook e Russel (2001). Brevemente: as células foram coletadas por centrifugação a 12.000g por 1 minuto e ressuspendidas em 300 µL de solução I (50 mM de glicose; 25 mM de Tris-HCl; 10 mM de EDTA; pH 8,0) sob agitação intensa. Foram adicionados 300 µL da solução II (0,2 N de NaOH; 1% de SDS), a mistura foi agitada por inversão e mantida a temperatura ambiente por não mais que 5 minutos. Então, 300 µL de solução III (100 ml: 60 mL de acetato de potássio 5 M; 11,5 mL de ácido acético glacial, 28,5 mL de água) foram adicionados, homogeneizados por inversão e os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e a este foi adicionado 2 volumes de etanol, e os tubos incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 10 minutos, e o excesso de sal do DNA precipitado foi removido pela lavagem com 500 µL de etanol 70%, seguido de nova centrifugação.

Os pellets foram secos a temperatura ambiente e ressuspensos em 50 µL de água ultrapura autoclavada. Sua qualidade foi avaliada em eletroforese em gel de agarose e a concentração determinada em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

Para verificar as clonagens, os plasmídeos extraídos foram submetidos a digestão com enzimas de restrição e reações de PCR utilizando iniciadores complementares à sequência do vetor e do inserto. Após a confirmação dos tamanhos dos fragmentos amplificados e digeridos, os plasmídeos foram sequenciados para confirmar cada construção.

3.6 Ensaios de duplo híbrido de levedura

Para os experimentos de duplo híbrido com as construções das deleções da FIP utilizou-se o protocolo proposto por Gietz e Woods (2002). Células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem AH109 (MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4 gal80 LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ) estocadas a -80 ^{0}C em meio YPDA (1% de extrato de levedura; 2% de peptona; 2%glicose; 0,008% de hemissulfato de adenina) e glicerol, foram plaqueadas em meio YPDA sólido e incubadas por 24-36 horas a 30 ^{0}C. Uma colônia foi inoculada em 5mL de meio YPDA líquido e crescido por 16 horas sob agitação a 30 ^{0}C. Alíquotas de 1 mL da cultura foram centrifugadas por 30 segundos a 5000 rpm e o sobrenadante descartado. Para remover completamente o meio de cultura, as células foram ressuspendidas em água estéril, e novamente centrifugadas por 30 segundos a 5000 rpm. Após remover o sobrenadante foi adicionado ao pellet, na ordem descrita: 240 µL de polietileno glicol MW 3350 (50%), 36 µL de acetato de lítio 1M, 50 µL ss-DNA de esperma de salmão 2mg/mL (Sigma), 1µg do plasmídeo contendo a isca de interesse, 1µg do plasmídeo contendo a presa de interesse e água estéril completando o volume para 360 µL. A mistura de transformação e as células foram homogeneizadas em vórtex e submetidas a choque térmico a 42 ^{0}C por 30 min. Centrifugou-se novamente, ressuspendeu-se as células em 600 µL de água estéril e estas foram plaqueadas em meio SC -trp -leu (SC não contendo triptofano e leucina; base de nitrogênio 0,66%, glicose 2%, mistura de aminoácidos 0,083%, ágar bacteriológico 1,6, pH5,6), e incubadas a 30 ^{0}C por 2 a 4 dias.

A seleção de clones positivos foi feita repicando as colônias obtidas em meio SC -trp -leu -his e SC -trp -leu –ade e incubadas a 30^{0}C por 48 horas. Foram considerados clones positivos aqueles capazes de crescer em ambas as placas. Como controle positivo foi utilizada a interação da proteína FIP completa clonada no vetor pGBKT7 e FtsH5 clonada no vetor pGADT7, e como controle negativo foram feitas transformações com o vetor pGADT7 vazio e cada uma das deleções clonadas ao vetor pGBKT7, bem como com os dois vetores vazios.

Para os experimentos com as substituições de Cys por Ala foi utilizado o ProQuest™ Two-Hybrid System (Invitrogen), que provê células de levedura da linhagem MaV203 (MATα, *leu*2-3,112, *trp*1-901, *his*3Δ200, *ade*2-101, *gal*4Δ, *gal*80Δ, *SPAL*10*::URA*3, *GAL*1::*lac*Z, *HIS*3UAS GAL1*::HIS*3*@LYS*2, *can*1R, *cyh*2R). Células competentes da levedura foram cotransformadas com as construções isca e presa a serem testadas pelo método de acetato de lítio/polietilenoglicol, como descrito no manual do Kit.

A fim de verificar a interação entre as proteínas quiméricas, os duplos transformantes obtidos em meio SC-L-W foram plaqueados em meio seletivo deficiente também em histidina (SD, *Synthetic Dropout*, -Leu, -Trp, -His) e incubados a 28ºC por 4dias. Os transformantes obtidos foram repicados em meio deficiente dos mesmos aminoácidos, mas suplementado com 25 mM de 3AT (3-Amino-1,2,4-triazole; Sigma) e meio CS -Leu, -Trp, -His –Ura. Como controles positivos e negativos da interação, foram utilizados os plasmídeos fornecidos pelo kit.

3.7 Análises da expressão gênica por PCR em tempo Real

3.7.1 Condições de crescimento e estresse

Para as análises de expressão gênica, sementes de *A. thaliana* (Col-0) foram esterilizadas com solução 50% de hipoclorito de sódio, seguido por quatro lavagens com água ultrapura autoclavada, e distribuídas em placa de Petri contendo MS meia força (Murashige & Stkoong 1962, acrescido de 6 g/L de fitagel). Estas foram colocadas a 4^0C por 48h para a quebra da dormência. Após esse período, as placas foram transferidas para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h de luz (200 µmol/m^2s) e 8 h de escuro a 22^0C (± 2) até o 14º dia. Então, foram feitos dois experimentos:

<u>*Estresse a frio*</u>: duas horas após o início do fotoperíodo, plantas em placa foram transferidas da sala de crescimento para BOD a 4^0C (± 2). Nos intervalos de tempo 0h, 1h, 4h, 8h e 12h, foram feitas as coletas da parte vegetativa, removendo as raízes com o auxilio de bisturi. Em cada coleta, 10 plantas foram divididas em 2 tubos de 1,5 mL, consistindo duas repetições para cada tempo. Os tubos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido para posterior extração do RNA e síntese de cDNA. Como controle desse experimento, placas foram transferidas para BOD a 22^0C e as coletas foram feitas nos mesmos intervalos de tempo do tratamento.

Estresse salino: duas horas após o início do fotoperíodo, as plantas foram delicadamente removidas do meio e transferidas para água destilada por aproximadamente 1 minuto. As plantas foram então colocadas em placa contendo MS meia força acrescido de 150 mM de NaCl. As coletas foram realizadas nos mesmos intervalos de tempo descritos acima e procedendo-se da mesma maneira. Como controle, plantas foram transferidas para placa contendo somente meio MS e as coletas foram realizadas nos mesmos intervalos de tempo.

3.7.2 PCR em tempo real

O PCR quantitativo foi executado com a máquina *StepOneTM Real time PCR systems* (Applied Biosystems). Cada reação de PCR conteve 12,5 µL de SYBR Green/ROX (Fermentas), 0,3 µL de cada um dos iniciadores (Tabela 3) (10 µM), 4 µL de cDNA diluído e água mili-Q para completar o volume para 25 µL. As reações foram conduzidas nas seguintes condições: 2 minutos a 50ºC, 95ºC por 10 minutos, 35 ciclos de 95ºC por 15 segundos e 61ºC por 30 segundos. Ao término dos ciclos, foram determinadas as curvas de dissociação de cada produto amplificado: 95ºC por 15 segundos, 62ºC por 1 minuto, + 1ºC, 95ºC por 15 segundos.

As reações foram feitas em triplicatas e no controle negativo foi adicionado água ultrapura estéril e não o molde de cDNA. Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e proteína fosfatase 2A (PP2A) foram usados como genes de referência (Tabela 3). Para a obtenção dos valores de eficiência de amplificação os dados foram analisados com o auxílio do programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003) e as expressões relativas foram determinadas com o auxílio do programa REST (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLE, 2002). Por esta ferramenta foi feito teste estatístico t, com 2000 randomizações.

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados nas análises de PCR em tempo real

Gene	**Oligonucleotídeos**	**Sequência 5'→3'**
FIP (AT5G02160)	RT FIP F	CATTCCCGATCCTCTTCAAA
	RT FIP R	CGAGTCCATTGCAGTTAGCA
FtsH5 (AT5G42270)	RT FtsH5 F	GTGGATAGGCCTGATGTAGC
	RT FtsH5 R	TCTCCTCGCAACTTTTTCGT
GAPDH (AT1G13440)	GAPDH F	TTGGTGACAACAGGTCAAGCA
	GAPDH R	AAACTTGTCGCTCAATGCAATC
PP2A (AT1G13320)	PP2A F	TAACGTGGCCAAAATGATGC
	PP2A R	GTTCTCCACAACCGCTTGGT

4 RESULTADOS

4.1 Mapeamento da interação de FIP com FtsH5

Com o objetivo de encontrar novos fatores proteicos associados ao complexo proteolítico FtsH, Rodrigues (2011) lançou mão do sistema de duplo híbrido de leveduras tendo a protease FtsH5 como isca. Nessa varredura foi encontrada uma proteína hipotética, denominada FIP (*FtsH5 Interacting Protein)*, localizada na membrana dos tilacóides, associada a um complexo de tamanho esperado para o complexo FtsH e que mostrou interação *in vitro* com FtsH5. Análises *in silico* mostraram que a região C-terminal da proteína contém um domínio rico em cisteína, composto por duas repetições da sequência CXXCXGXG, onde X é qualquer aminoácido (RODRIGUES, 2011).

Para melhor compreender o possível papel de FIP no complexo FtsH, foram feitos ensaios de duplo híbrido para mapear a região de interação entre FIP e FtsH5. Foram feitas deleções a partir da sequência codificadora de FIP e estas clonadas em vetores de duplo híbrido. A partir da extremidade C-terminal, foram feitas quatro construções: **Del 1**, contendo 363 nt, excluindo 9 aminoácidos da porção C-terminal; **Del 2**, com 339 nt, excluindo também a região rica em cisteína 2; **Del 3**, com 273 nt, excluindo 22 aminoácidos a mais que a Del 2; e **Del 4**, com 249 nt, excluindo ambas as regiões ricas em cisteína. A partir da extremidade N-terminal foram feitas mais duas deleções: **Del 5**, com 138 nt, contendo as duas regiões ricas em cisteína; e **Del 6**, com 114 nt, apresentando somente a 2ª região rica em cisteína. A Figura 3 mostra, de forma esquemática, as construções para mapeamento da interação.

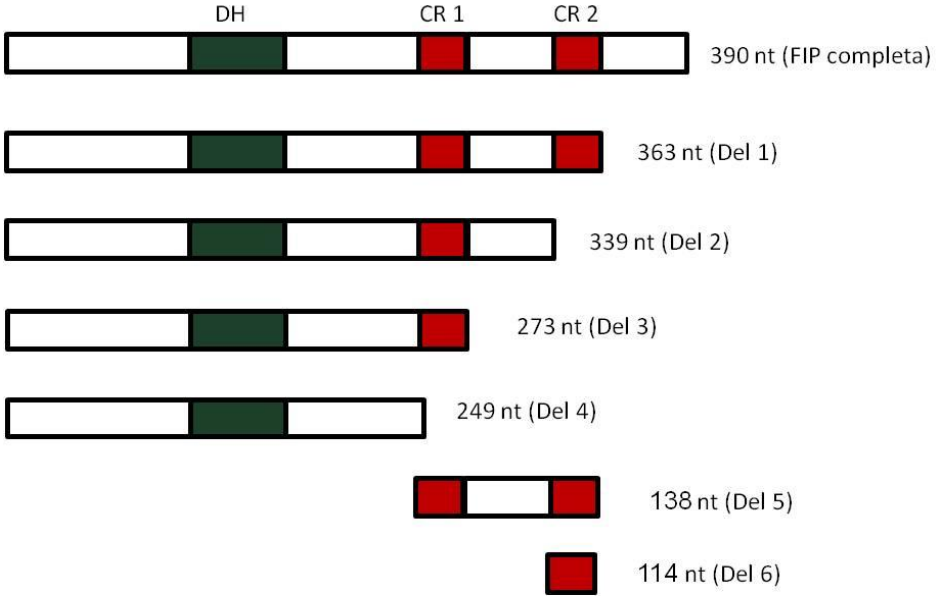


Figura 3 - Representação esquemática das deleções feitas a partir da sequência codificadora de FIP e clonadas em vetores para duplo-híbrido em leveduras. CR1 e CR2: regiões ricas em cisteína1 e 2; DH: domínio hidrofóbico de ancoragem à membrana. À direita, está indicado o tamanho, em nucleotídeos, de cada deleção

As deleções de FIP foram amplificadas com os iniciadores listados na Tabela 1 e fusionadas ao domínio de ligação de GAL4 (vetor de expressão pGBKT7). A sequência de FtsH5 foi fusionada ao domínio de ativação (vetor pGADT7). Os ensaios de duplo híbrido revelaram que as células de levedura foram capazes de crescer em meio seletivo somente quando as construções Del1 e Del 5 foram cotransformadas com FtsH5 (Figura 4). Essas construções são as únicas contendo ambas as regiões ricas em cisteína, mostrando a importância desse domínio para a ocorrência da interação. Para cada deleção testada foi feito um controle negativo que consistiu da transformação com a deleção em questão fusionada ao vetor pGBKT7 e do vetor pGADT7 vazio, além de ambos os vetores vazios. A ausência de crescimento desses controles mostrou que nenhuma das construções isoladas ativou a expressão dos genes repórteres. A Figura 5 apresenta, de maneira esquemática, o resultado das deleções.

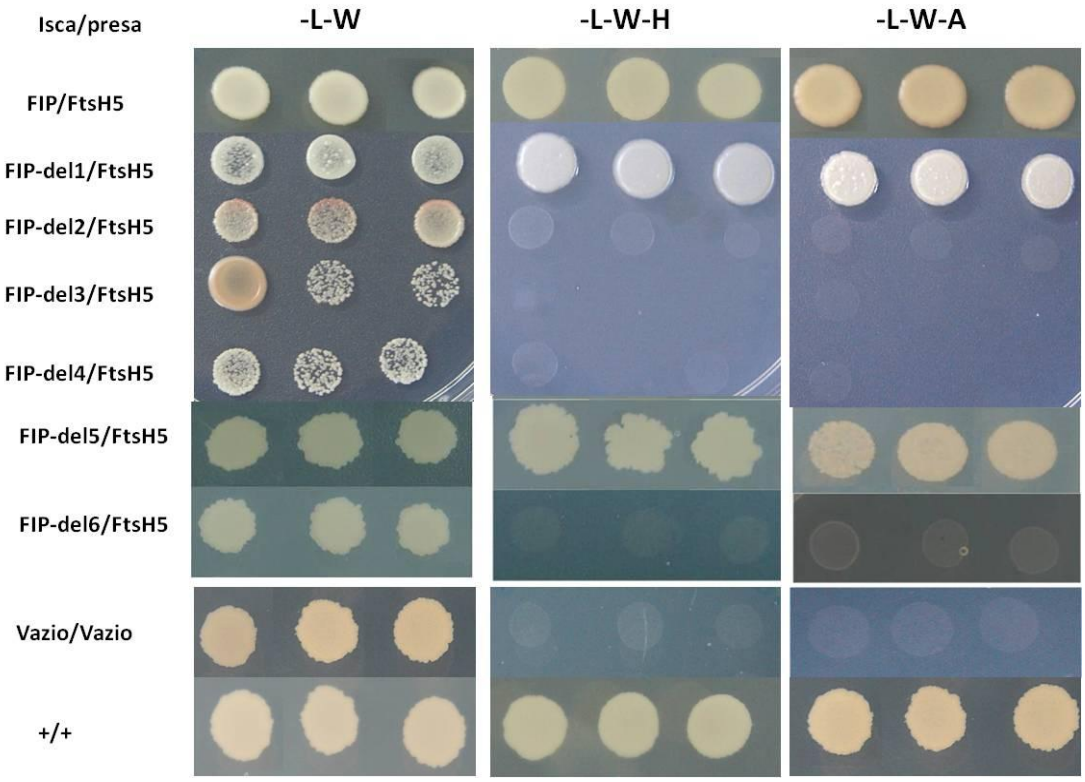


Figura 4 - Teste de crescimento de *Sacharomyces cerevisiae* AH109 transformada com diferentes construções descritas na figura. –L-W: meio deficiente em leucina e triptofano; -L-W-H e –L-W-A: meios seletivos para a interação, deficientes também em histidina e adenina, respectivamente. **A interação entre FIP e FtSH5 é mantida somente quando as duas regiões ricas em Cys estão presentes**

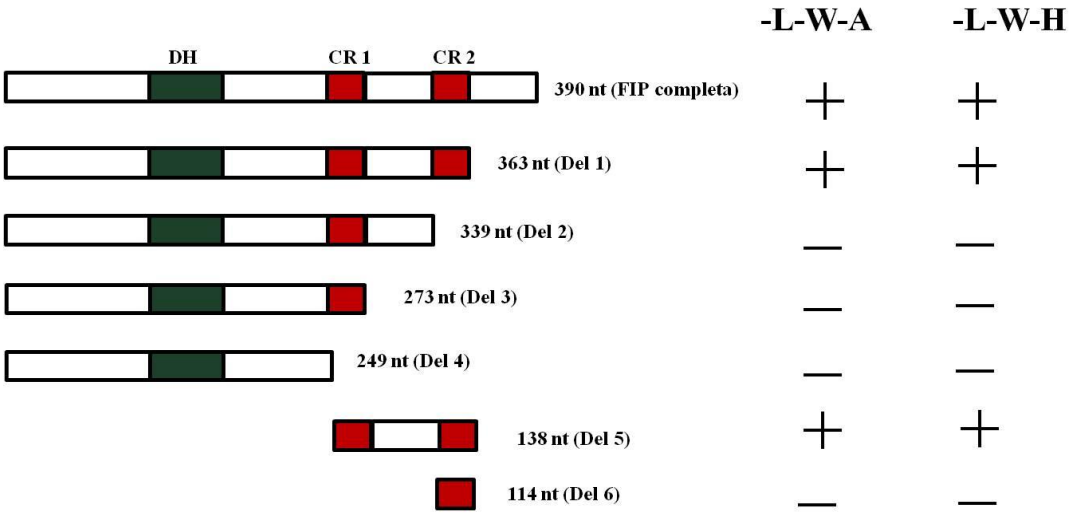


Figura 5 - Resultado esquemático dos experimentos de interação em duplo híbrido de levedura. Houve crescimento em meio seletivo, portanto, interação, somente nas construções contendo ambas as regiões ricas em cisteína

4.2 Substituições de cisteína por alanina

A porção de 46 aminoácidos de FIP que se mostrou necessária para a ocorrência de interação com FtsH5 nos ensaios de duplo híbrido possui 4 resíduos de cisteínas localizados em dois motivos CXXCXGXG. A posição de cada um deles, na sequência da proteína, é: 84, 87, 114,117. Para testar a hipótese de que estes resíduos são importantes para a interação, foram feitas substituições destes por resíduos de alanina, um aminoácido pouco reativo. As substituições foram construídas por PCR utilizando iniciadores com troca dos códons de cisteína por códon de alanina (Tabela 2). A Figura 6 esquematiza estas substituições, que foram clonadas por recombinação no vetor de expressão em levedura pDEST22, portanto, fusionadas ao domínio de ligação. A proteína FtsH5 foi fusionada ao domínio de ativação da transcrição presente no vetor pDET32, e cada substituição foi testada para interação utilizando o sistema *ProQuest*^{TM} *Two-Hybrid System* (Invitrogen).

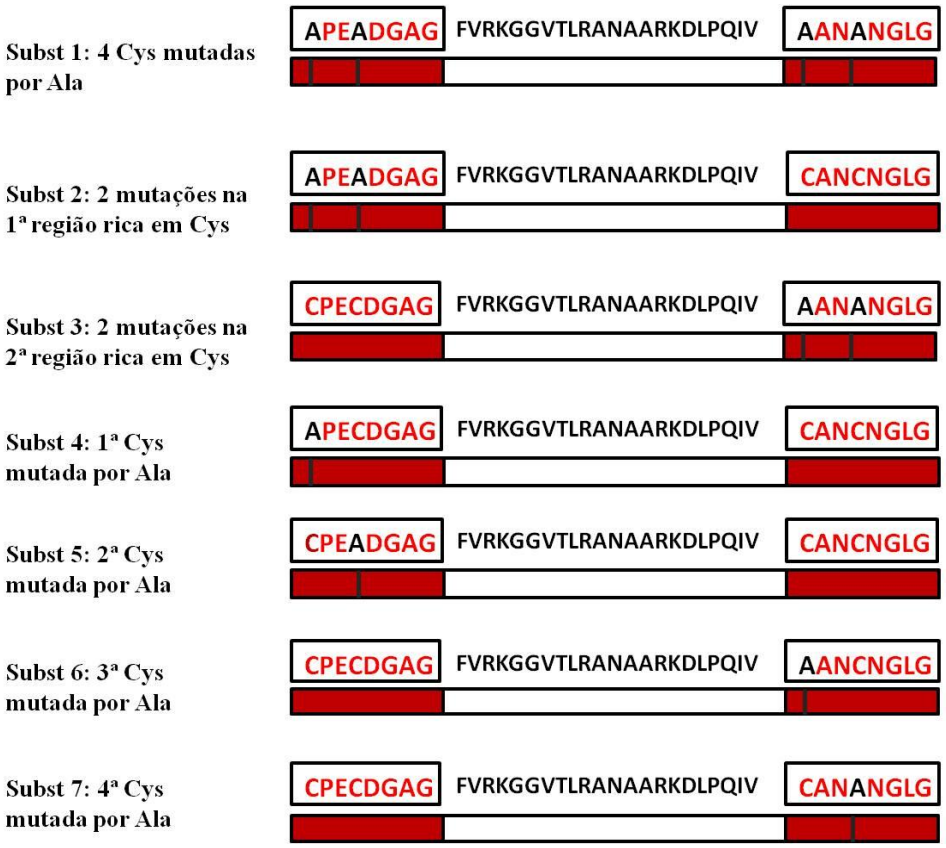


Figura 6 - Esquema das 7 substituições de Cys por Ala

Para esses ensaios, foi adicionado 25 mM de 3-amino-1,2,4-triazol (3AT) ao meio deficiente em histidina. O composto 3AT atua como inibidor competitivo do produto do gene repórter HIS3 (que apresenta níveis basais de expressão da proteína imidazol glicerol fosfato desidratase _ EC 4.2.1.19, envolvida na síntese de histidina). Assim, sua adição em pequenas concentrações no meio de crescimento aumenta a sensibilidade da técnica por diminuir a incidência de falsos positivos (CAUSIER; DAVIES, 2002).

Como mostrado na Figura 7, não houve crescimento em meio seletivo para interação em nenhum dos testes substituindo resíduos de cisteína por alanina. Esses ensaios corroboram a hipótese de que os resíduos de cisteína são necessários para a ocorrência da interação com a protease FtsH5.

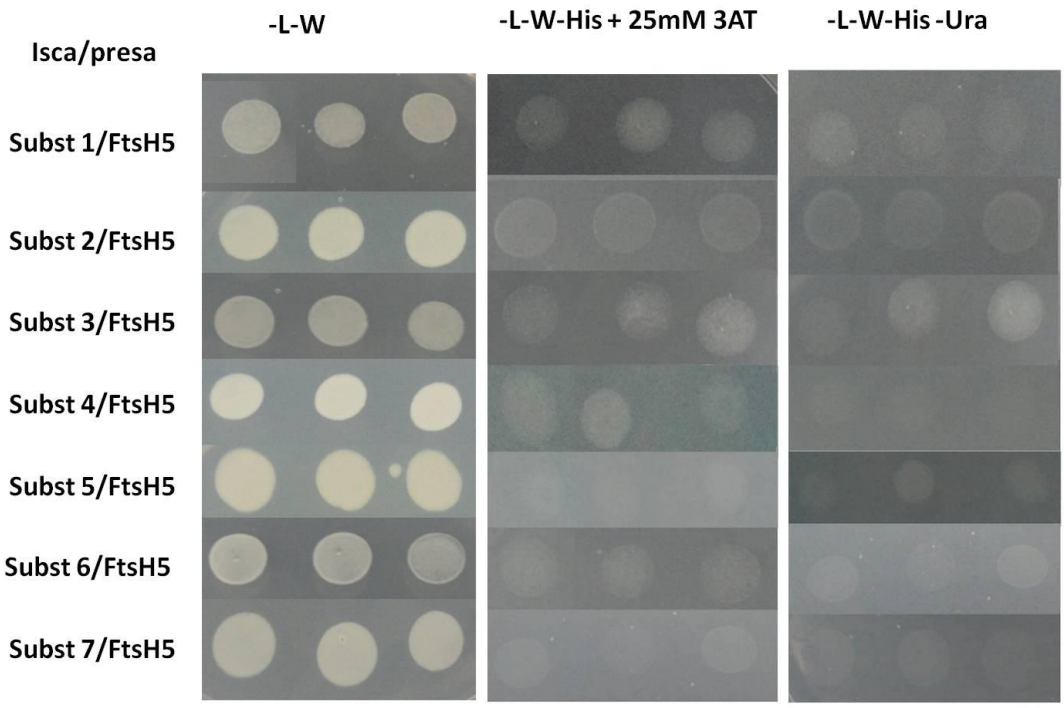


Figura 7 - Teste de crescimento de *Sacharomyces cerevisiae* MaV203 transformada com as substituições por Ala fusionadas ao domínio de ligação ao DNA, e FtsH5 fusionada ao domínio de ativação. –L-W: meio deficiente em leucina e triptofano, que seleciona células contendo ambos os plasmídeos; -L-W-His + 25mM 3AT: meio seletivo para interação, deficiente em leucina, triptofano e histidina, contendo 25mM de 3-Amino-1,2,4-triazole; -L-W-Ura: meio seletivo, deficiente em leucina, triptofano e uracila

4.3 Análise da expressão relativa de FIP e FtsH5

A proteína FIP apresenta na sua extremidade N-terminal uma sequência sinal de direcionamento para cloroplasto, e como foi mostrado por Rodrigues (2011), ela é inserida na

membrana dos tilacóides. Também foi mostrado que ela interage com a proteína FtsH5 e que o domínio rico em cisteína é importante para a região de contato (itens 4.1 e 4.2). Para realizar as análises de expressão, primeiramente foi feita análise *in sílico*, utilizando a ferramenta *e-FPBrowser* (WINTER et al., 2007), que se encontra disponível no banco de dados TAIR. Por essa ferramenta foi observado que a proteína FIP é mais abundante na parte vegetativa da planta, semelhantemente às proteínas do complexo FtsH. Essa informação vai de encontro aos resultados anteriormente gerados pelo nosso grupo, que mostram que FIP é uma proteína cloroplastidial. Os dados *in silico* indicam também que, sob certas condições de estresse abiótico, a expressão gênica de FIP é diminuída, e sob as mesmas condições, a expressão de FtsH5 não se altera de modo significativo. Esses dados nos chamaram atenção e dois experimentos foram delineados: estresse a frio e estresse salino, como descrito no item 3.7.

No tratamento de estresse a frio, plantas de 14 dias, crescidas em placa, foram divididas em grupo controle e grupo tratado. Aquelas do primeiro grupo foram mantidas a 22^0C e a região vegetativa foi coletada nos intervalos de tempo 0h, 1h, 4h, 8h e 12h, contados 2h após o início do fotoperíodo. Para o grupo tratado as coletas foram feitas da mesma forma, porém as placas foram submetidas a 4^0C em câmara de germinação. Os resultados das análises de expressão para esse experimento, utilizando a técnica de PCR em tempo real, estão descritos na Figura 8.

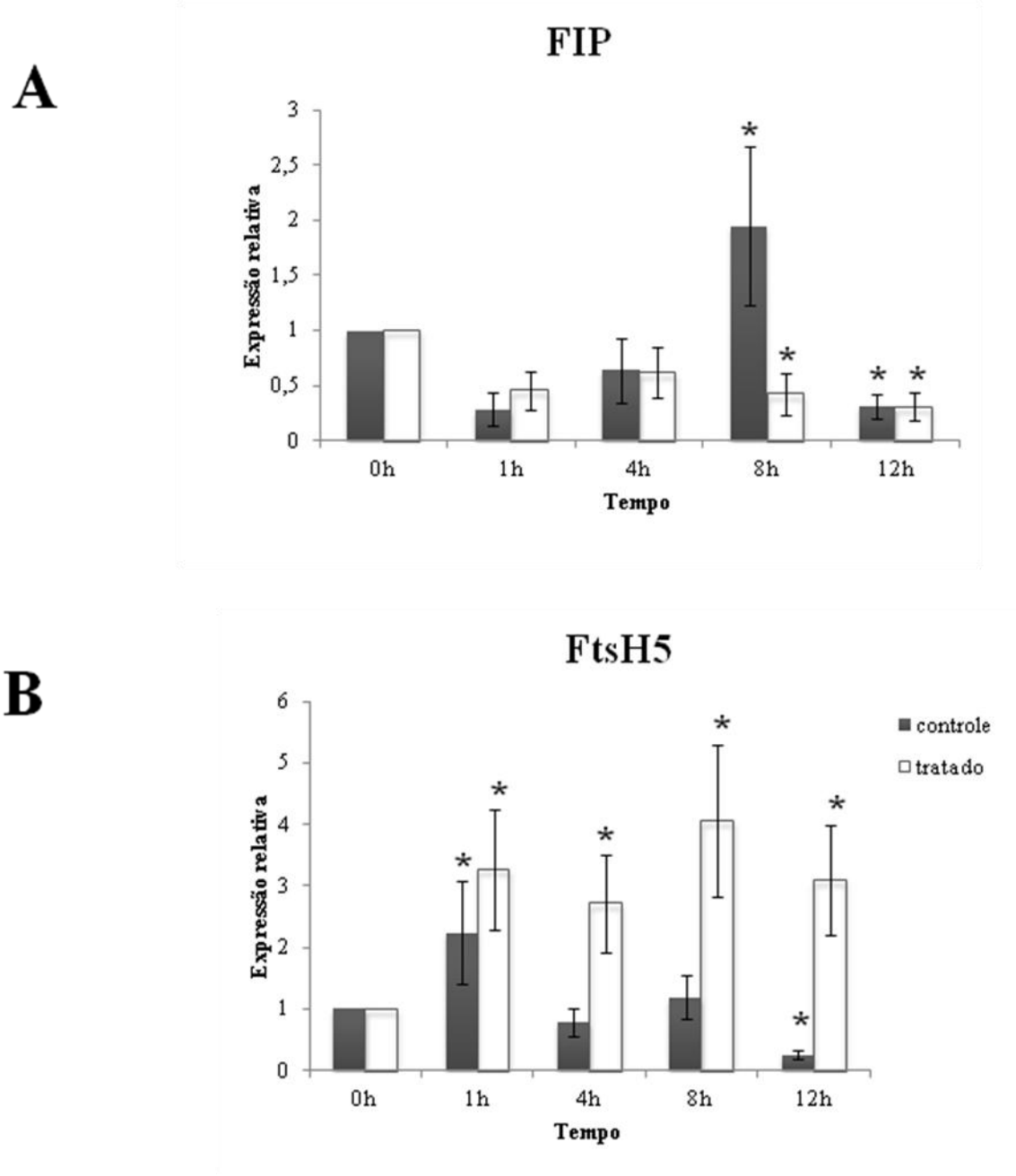


Figura 8 - Expressão relativa dos genes que codificam FIP (A) e FtsH5 (B), sob condições de estresse a frio. RNA total foi extraído de plantas submetidas a 4^0C (tratado) e plantas mantidas a 22^0C (controle) nos intervalos de tempo descritos

Os resultados mostram que a expressão de FIP é pouco afetada pelo tratamento a frio, à exceção de 8h, quando a expressão é reduzida em relação às plantas controles (Figura 8A). Já na expressão de FtsH5 houve um progressivo aumento, atingindo 4 vezes a expressão no tempo 0h 8h após o início do tratamento (Figura 8B). Pode-se notar, então, que nas condições

descritas, os genes que codificam FIP e FtsH5 têm sua expressão reguladas de forma antagônica 8h após o início do tratamento.

No tratamento de estresse salino, plantas de 14 dias foram removidas do meio e transferidas para placas contendo MS meia força contendo 150 mM de NaCl. Como grupo controle, plantas foram transferidas para placas contendo apenas meio MS, e as coletas foram realizadas nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h (Figura 9).

Os resultados do tratamento de estresse salino também mostram que FIP e FtsH5 apresentam níveis de expressão antagônicos nas condições do experimento. A expressão de FIP é diminuída já a partir da primeira hora de tratamento, sendo que após 8h tem-se a maior diferença em relação ao controle (Figura 9A). Por outro lado, FtsH5 possui um aumento de expressão, mais acentuado 8h após o início do tratamento (Figura 9B). Esse perfil antagônico de expressão gênica pode sugerir que FIP seja um regulador negativo do complexo proteolítico FtsH.

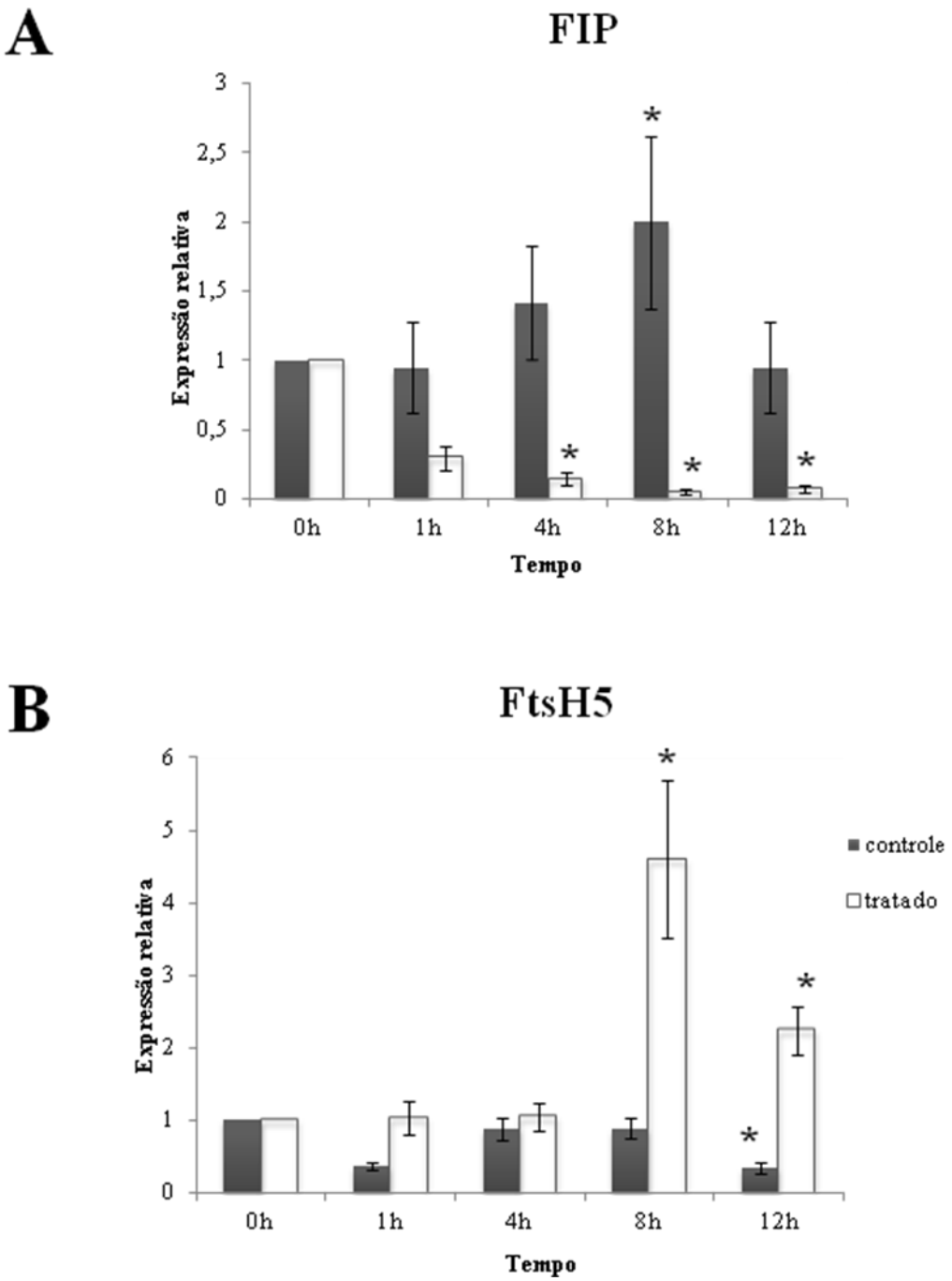


Figura 9 - Expressão relativa dos genes que codificam FIP (A) e FtsH5 (B), sob condições de estresse salino. RNA total foi extraído de plantas mantidas em meio MS meia força (controle) e plantas transferidas para meio acrescido de 150 µM de cloreto de sódio. As coletas foram realizadas nos intervalos de tempo descritos

5 DISCUSSÃO

5.1 Mapeamento da região de interação de FIP com FtsH

O genoma da planta modelo *Arabidopsis thaliana* foi completamente sequenciado pela associação *The Arabidopsis Genome Iniciative*, em 2000. No entanto, ainda é grande o número de genes preditos que não possuem função atribuída, o que evidencia a necessidade de estudos direcionados ao esclarecimento de seus papéis biológicos. Uma proteína em particular, de função ainda não determinada, mostrou-se interagir com a proteína FtsH5 através de ensaios de duplo híbrido de leveduras (RODRIGUES, 2011). Sua localização cloroplastidial, bem como sua presença em um complexo do tamanho esperado para o complexo FtsH e sua interação *in vitro* com FtsH5 fundamentaram o interesse em esclarecer a relação dessa nova proteína com o complexo proteolítico.

Para avaliar a hipótese de que a região rica em cisteína presente em FIP é a responsável pela interação com FtsH5 foram feitos ensaios de duplo híbrido utilizando deleções de FIP. Seis deleções foram testadas (Figura 3), sendo que houve interação apenas quando os dois motivos CXXCXGXG foram mantidos (Figura 4). Esses resultados sustentam a hipótese de que a interface de contato entre FIP e FtsH5 ocorre nessa região.

O aminoácido cisteína possui o grupo tiol (-SH) como cadeia lateral, característica que confere propriedades interessantes quando este resíduo está presente em estruturas proteicas. Resíduos de cisteína podem funcionar como “sensores” do estado redox, alterando da forma protonada para a forma desprotonada em função do pH do ambiente. Também é possível a formação de ligações dissulfeto entre dois grupos tiol próximos, o que é uma importante característica da estrutura terciária de muitas proteínas (GILES et al., 2003). Outra característica interessante é propriedade de coordenar ligações a íons metálicos, formando estruturas como as observadas nos domínios dedos de zinco (GILES et al., 2003; KLOMSIRI; KARPLUS; POOLE, 2011). Já resíduos de alanina são quimicamente inertes dentro de estruturas proteicas, pois em sua cadeia lateral encontra-se o grupo metil ($-CH_3$), pouco reativo (MORRISON; WEISS, 2001). Devido a essas características, os resíduos de cisteína da região conservada de FIP foram substituídos por resíduos de alanina em sete diferentes combinações, e com elas foram feitos novos ensaios de duplo híbrido. O objetivo desse experimento foi verificar se a interação com FtsH5 era mantida mesmo quando as cisteínas

eram substituídas. O resultado revelou que nenhuma das substituições foi capaz de interagir com FtsH5, o que reforça a hipótese de que os resíduos de cisteína são fundamentais da região de contato de FIP com FtsH5.

A sequência de FIP possui na sua região C-terminal uma região rica em cisteína, composta por dois motivos CXXCXGXG. Este motivo é característico de ligação a zinco e está presente em proteínas DnaJ (SHI et al., 2005). Proteínas DnaJ apresentam, entre outras, atividade de chaperonas juntamente com DnaK, propiciando também regulação da atividade desta última.

Este trabalho utilizou o sistema de duplo híbrido de leveduras, que foi primeiramente descrito por (FIELDS; SONG, 1989). Essa técnica baseia-se na fusão de proteínas a dois domínios individualizados do fator de transcrição GAL4: o domínio de ligação à região promotora e o domínio de ativação da transcrição. Se as duas proteínas interagirem, o fator de transcrição é reconstituído, ativando a transcrição de genes repórteres. No entanto, é importante salientar que a interação ocorre em um ambiente artificial, o núcleo da célula de levedura (FINLEY, 2007). Portanto, duas proteínas podem realmente interagir por esse sistema, mas não apresentarem interação no seu ambiente natural de ocorrência. Por isso, a interação pelo sistema de duplo híbrido deve ser considerada um indicativo de interação, não podendo ser considerado um resultado conclusivo.

Outras técnicas para estudo de interação proteína – proteína podem ser utilizadas, como BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*), que baseia-se na restauração da fluorescência da proteína YFP *in vivo* (WALTER et al., 2004). No entanto, por se tratar de duas proteínas de membrana, esses ensaios sejam prejudicados. Outra possibilidade é a produção de anticorpo para FIP, ferramenta que permitirá a realização de ensaios *in vitro* como *pull down* e coimunoprecipitação.

5.2 Análise da expressão de FIP e FtsH5 sob condições de estresse.

O estudo *in silico* da expressão de FIP chamou a atenção para condições em que a expressão gênica de FIP é diminuída, enquanto a expressão de FtsH5 não se alterava de modo significativo. Para avaliar experimentalmente esses dados, foi feita a análise de expressão, utilizando PCR em tempo real, de FIP e FtsH5 sob duas condições: estresse a frio e estresse salino.

Em plantas submetidas a 4^0C, a expressão de FIP foi diminuída 8h após o início do tratamento, enquanto a expressão de FtsH5, nesse mesmo tempo, foi cerca de 4 vezes maior que no tempo 0h (Figura 8). Nas condições do tratamento de estresse salino, a expressão de FIP diminui já a partir da primeira hora após o início do tratamento, sendo que 8h após tem-se a maior diferença em relação ao controle. A expressão de FtsH5, por outro lado, apresenta um aumento, como visto na Figura 9.

Os mecanismos de resposta a condições de estresse abiótico são altamente complexos, visto que englobam mudanças no perfil de expressão gênica, além de envolver alterações pós-transcricionais e traducionais. O conjunto dessas mudanças resulta em alterações metabólicas e fisiológicas para responder à nova condição ambiental (TAKAHASHI; MURATA, 2008; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006). Temperaturas baixas e alta salinidade são condições que veem sendo estudadas devido a seus efeitos prejudiciais, e diversos estudos comparativos analisando os perfis de expressão gênica nessas condições em relação a condições controle têm sido feitos (FOWLER; THOMASHOW, 2002; SEKI et al., 2002; XIONG; SCHUMAKER; ZHU, 2002). Sabe-se que os genes relacionados à fotossíntese sofrem regulação negativa sob condições de estresses bióticos (JANSKÁ et al., 2010) e a geração de ROS como mensageiro secundário pode ser um fator comum nos diferentes mecanismos de resposta.

Os resultados dos experimentos de expressão podem sugerir que FIP seja um regulador negativo do complexo FtsH. Estudos em plantas mutantes para essa proteína contribuirão para melhor esclarecer o seu papel na atividade proteolítica do complexo, bem como levantar outras funções no funcionamento de células vegetais.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A interação da proteína FIP com FtsH5, utilizando sistema de duplo híbrido de leveduras, foi mantida com os 46 resíduos de aminoácidos que compreendem os dois motivos ricos em cisteína (CXXCXGXG).

- Em sete diferentes combinações em que resíduos de cisteína foram substituídos por alanina, não houve interação de FIP com FtsH5 em sistema de duplo-híbrido.

- Em plantas de *Arabidopsis thaliana* submetidas a estresse a frio, a expressão de FIP é diminuída 8h após o início do tratamento, em relação a plantas não tratadas. Já a expressão de FtsH5 é aumentada em plantas submetidas ao mesmo tratamento em relação à expressão em plantas controle.

- No tratamento de estresse salino, a expressão de FIP é diminuída a partir de 1h após o início do estresse, tendo a maior diminuição em relação ao controle 8h após o início. Por outro lado, a expressão de FtsH5 sofre um aumento mais acentuado 8h após o início do estresse.

- Os resultados sugerem que FIP possa atuar como um modulador negativo da atividade proteásica do complexo FtsH. Estudos em plantas mutantes, que apresentem a proteína FIP superexpressa, bem como plantas knockout para esse gene, contribuirão para aumentar o conhecimento a respeito dessa nova proteína.

REFERÊNCIAS

ADAM, Z.; RUDELLA, A.; VAN WIJK, K.J. 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, June 2006.

ADAM, Z.; ZALTSMAN, A.; SINVANY-VILLALOBO, G.; SAKAMOTO, W. FtsH proteases in chloroplasts and cyanobacteria. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 123, p. 386-390, Apr. 2005.

AKIYAMA, Y. Quality control of cytoplasmic membrane proteins in Escherichia coli. **Journal of biochemistry**, Tokyo, v. 146, p. 449-454, Oct. 2009.

AKIYAMA, Y.; KIHARA, A., MORI, H.; OGURA, T.; ITO, K. Roles of the periplasmic domain of Escherichia coli FtsH (HflB) in protein interactions and activity modulation. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, p. 22326-22333, Aug. 1998.

AKIYAMA, Y.; KIHARA, A., TOKUDA, H.; ITO, K. FtsH (HflB) is an ATP-dependent protease selectively acting on SecY and some other membrane proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, p. 31196-31201, Dec. 1996.

AMMELBURG, M.; FRICKEY, T.; LUPAS, A.N. Classification of AAA+ proteins. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 156, p. 2-11, Oct. 2006.

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, Jan. 2002.

BIENIOSSEK, C.; NIEDERHAUSER, B.; BAUMANN, U. M. The crystal structure of apo-FtsH reveals domain movements necessary for substrate unfolding and translocation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** Washington, v. 106, p. 21579-21584, Dec. 2009.

BIENIOSSEK, C.; SCHALCH, T.; BUMANN, M.; MEISTER, M., MEIER, R.; BAUMANN, U. The molecular architecture of the metalloprotease FtsH. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** Washington, v. 103, p. 3066-3071, Feb.2006.

CAUSIER, B.; DAVIES, B. Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. **Plant Molecular Biology,** Boston, v. 50, p. 855-870, Dec. 2002.

CHEN, M.; CHOI, Y.; VOYTAS, D. F.; RODERMEL, S. Mutations in the Arabidopsis VAR2 locus cause leaf variegation due to the loss of a chloroplast FtsH protease. **The Plant Journal,** Oxford, v. 22, p. 303-313. May 2000.

CHI, W.; SUN, X.; ZHANG, L. The roles of chloroplast proteases in the biogenesis and maintenance of photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1817, p. 239-246. Jan. 2012.

FIELDS, S.; SONG, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. **Nature**, London, v. 340, p. 245-246, July 1989.

FINLEY, R.L., Jr. A guide to yeast two-hybrid experiments. In: ZUK, D. (Ed.). **Evaluating techniques in biochemical research.** Cambridge: Cell Press, 2007. Disponível em: <http://www.cellpress.com/misc/page?page=ETBR>. Acesso em: 29 maio 2013.

FOWLER, S.; THOMASHOW, M.F. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. **The Plant Cell,** Rockville, v. 14, p. 1675-1690, Aug. 2002.

GIETZ, R.D.; WOODS, R.A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. **Methods in Enzymology**, New York, v. 350, p. 87-96, 2002.

GILES, N.M.; WATTS, A.B.; GILES, G.I.; FRY, F.H.; LITTLECHILD, J.A.; JACOB, C. Metal and redox modulation of cysteine protein function. **Chemistry and Biology**, London, v. 10, p. 677-693, Aug. 2003.

HANSON, P.I.; WHITEHEART, S.W. AAA+ proteins: have engine, will work. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 6, p. 519-529, July 2005.

ITO, K.; AKIYAMA, Y. Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. **Annual Review of Microbiology,** Palo Alto, v. 59, p. 211-231, 2005.

JANSKÁ, A.; MARSÍK, P.; ZELENKOVÁ, S.; OVESNÁ, J. Cold stress and acclimation - what is important for metabolic adjustment? **Plant Biology,** New York, v. 12, p. 395-405, May 2010.

JANSKA, H.; KWASNIAK, M.; SZCZEPANOWSKA, J. Protein quality control in organelles - AAA/FtsH story. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1833, p. 381-387, Feb. 2013.

KARATA, K.; INAGAWA, T.; WILKINSON, A.J.; TATSUTA, T.; OGURA, T. Dissecting the role of a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases. Site-directed mutagenesis of the ATP-dependent protease FtsH. **The Journal of Biological Chemistry,** Baltimore, v. 274, p. 26225-26232, Sept. 1999.

KATO, Y.; SAKAMOTO, W. Protein quality control in chloroplasts: a current model of D1 protein degradation in the photosystem II repair cycle. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 146, p. 463-469, Oct. 2009.

KATO, Y.; SUN, X.; ZHANG, L.; SAKAMOTO, W. Cooperative D1 degradation in the photosystem II repair mediated by chloroplastic proteases in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 159, p. 1428-1439, Aug. 2012.

KIHARA, A.; AKIYAMA, Y.; ITO, K. Host regulation of lysogenic decision in bacteriophage lambda: transmembrane modulation of FtsH (HflB), the cII degrading protease, by HflKC (HflA). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** Washington, v. 94, p. 5544-5549, May 1997.

KIHARA, A.; AKIYAMA, Y.; ITO, K. A protease complex in the Escherichia coli plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY. **The EMBO Journal,** London, v. 15, p. 6122-6131, Nov. 1996.

KLOMSIRI, C.; KARPLUS, P. A.; POOLE, L. B. Cysteine-based redox switches in enzymes. **Antioxidants and redox signaling,** Larchmont, v. 14, p. 1065-1077, Mar. 2011.

KRZYWDA, S.; BRZOZOWSKI, A.M.; VERMA, C.; KARATA, K.; OGURA, T.; WILKINSON, A.J. The crystal structure of the AAA domain of the ATP-dependent protease FtsH of Escherichia coli at 1.5 A resolution. **Structure**, London, v. 10, p. 1073-1083, Aug. 2002.

LANGKLOTZ, S.; BAUMANN, U.; NARBERHAUS, F. Structure and function of the bacterial AAA protease FtsH. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1823, p. 40-48, Jan. 2012.

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. **The EMBO Journal,** London, v. 15, p. 4218-4229, Aug. 1996.

LINDAHL, 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,** Rockville, v. 12, p. 419-431, Mar. 2000.

LINDAHL, M.; TABAK, S.; CSEKE, L.; PICHERSKY, E.; ANDERSSON, B.; ADAM, Z. Identification, characterization, and molecular cloning of a homologue of the bacterial FtsH protease in chloroplasts of higher plants. **The Journal of Biological Chemistry,** Baltimore, v. 271, p. 29329-29334, Nov. 1996.

LYSKA, D.; MEIERHOFF, K.; WESTHOFF, P. How to build functional thylakoid membranes: from plastid transcription to protein complex assembly. **Planta**, Berlin, v. 237, p. 413-428, Feb. 2013.

MARGULIS, L. **Oringins of eukaryotic cells**. New Haven: Yale University Press, 1970. 349 p.

MORRISON, K.L.; WEISS, G.A. Combinatorial alanine-scanning. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v.5, p. 302-307, June 2001.

NIWA, H.; TSUCHIYA, D.; MAKYIO, H.; YOSHIDA, M.; MORIKAWA, K. Hexameric ring structure of the ATPase domain of the membrane-integrated metalloprotease FtsH from Thermus thermophilus HB8. **Structure**, London, v. 10, p. 1415-1423, Oct. 2002.

NIXON, P.J.; MICHOUX, F.; YU, J.; BOEHM, M.; KOMENDA, J. Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II. **Annals of Botany,** Oxford, v. 106, p. 1-16, July 2010.

OGURA, T.; WILKINSON, A. J. AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. **Genes Cells**, Oxford, v. 6, p. 575-597, July 2001.

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**, Paris, v. 142, p. 279-282, Apr.1991.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLE, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 30, p. 1-10, May 2002.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 339, p. 62-66, Mar. 2003.

RODRIGUES, R.A.O. **Estudo do direcionamento das proteases FtsH plastidiais às membranas dos tilacóides**. 2011. 123p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

RODRIGUES, R.A.O.; SILVA FILHO, M.C.; CLINE, K. FtsH2 and FtsH5: two homologous subunits use different integration mechanisms leading to the same thylakoid multimeric complex. **The Plant Journal,** Oxford, v. 65, p. 600-609, Feb. 2011.

SAIKAWA, N.; AKIYAMA, Y.; ITO, K. FtsH exists as an exceptionally large complex containing HflKC in the plasma membrane of Escherichia coli. **Journal of Structural Biology,** San Diego, v. 146, p. 123-129, May 2004.

SAKAMOTO, W. Leaf-variegated mutations and their responsible genes in Arabidopsis thaliana. **Genes and Genetic Systems,** Mishima, v. 78, p. 1-9, Feb. 2003.

_____. Protein degradation machineries in plastids. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 599-621, 2006.

SAKAMOTO, W.; ZALTSMAN, A.; ADAM, Z.; TAKAHASHI, Y. Coordinated regulation and complex formation of yellow variegated1 and yellow variegated2, chloroplastic FtsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in Arabidopsis thylakoid membranes. **The Plant Cell,** Rockville, v. 15, p. 2843-2855, Dec. 2003.

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

SAUER, R.T.; BAKER, T.A. AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 80, p. 587-612, 2011.

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ISHIDA, J.; NANJO, T.; FUJITA, M.; OONO, Y.; KAMIYA, A.; NAKAJIMA, M.; ENJU, A.; SAKURAI, T.; SATOU, M.; AKIYAMA, K.; TAJI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; KAWAI, J.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **The Plant Journal,** Oxford, v. 31, p. 279-292, Aug. 2002.

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,** Rockville, v. 12, p. 917-932, June 2000.

SHI, Y.Y.; TANG, W.; HAO, S.F.; WANG, C.C. Contributions of cysteine residues in Zn2 to zinc fingers and thiol-disulfide oxidoreductase activities of chaperone DnaJ. **Biochemistry**, Washington, v. 44, p. 1683-1689, Feb. 2005.

SINVANY-VILLALOBO, G.; DAVYDOV, O.; BEN-ARI, G.; ZALTSMAN, A.; RASKIND, A.; ADAM, Z. Expression in multigene families. Analysis of chloroplast and mitochondrial proteases. **Plant Physiology,** Lancaster, v. 135, p. 1336-1345, July 2004.

SNIDER, J.; THIBAULT, G.; HOURY, W.A. The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins. **Genome Biology**, London, v. 9. p. 216-224, Apr. 2008.

SOKOLENKO, A.; POJIDAEVA, E.; ZINCHENKO, V.; PANICHKIN, V.; GLASER, V.M.; HERRMANN, R.G.; SHESTAKOV, S.V. The gene complement for proteolysis in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 and Arabidopsis thaliana chloroplasts. **Current Genetics,** New York, v. 41, p. 291-310, Aug. 2002.

TAKAHASHI, S.; MURATA, N. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 13, p. 178-182, Apr. 2008.

TOMOYASU, T.; YAMANAKA, K.; MURATA, 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. 175, p. 1352-1357, Mar. 1993.

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

VELASCO-GARCÍA, R.; VARGAS-MARTÍNEZ, R. The study of protein-protein interactions in bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 58, p. 1241-1257, Nov. 2012.

WAGNER, R.; AIGNER, H.; FUNK, C. FtsH proteases located in the plant chloroplast. **Physiologia plantarum**, Lund, v. 145, p. 203-214, May 2012.

WINTER, D.; VINEGAR, B.; NAHAL, H.; AMMAR, R.; WILSON, G.V.; PROVART, N.J. An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. **PLoS One**, San Francisco, v.2, p. e718, Aug. 2007.

XIONG, L.; SCHUMAKER, K.S.; ZHU, J.K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. **The Plant Cell,** Rockville, v. 14, p. 165-183, 2002.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 781-803, 2006.

YOSHIOKA, M.; YAMAMOTO, Y. Quality control of photosystem II: where and how does the degradation of the D1 protein by FtsH proteases start under light stress?--Facts and hypotheses. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, Lausanne, v. 104, p. 229-235, Aug. 2011.

YOSHIOKA, M.; NAKAYAMA, Y.; YOSHIDA, M.; OHASHI, K.; MORITA, N.; KOBAYASHI, H.; YAMAMOTO, Y. Quality control of photosystem II: FtsH hexamers are localized near photosystem II at grana for the swift repair of damage. **The Journal of Biological Chemistry,** Baltimore, v. 285, p. 41972-41981, Dec. 2010.

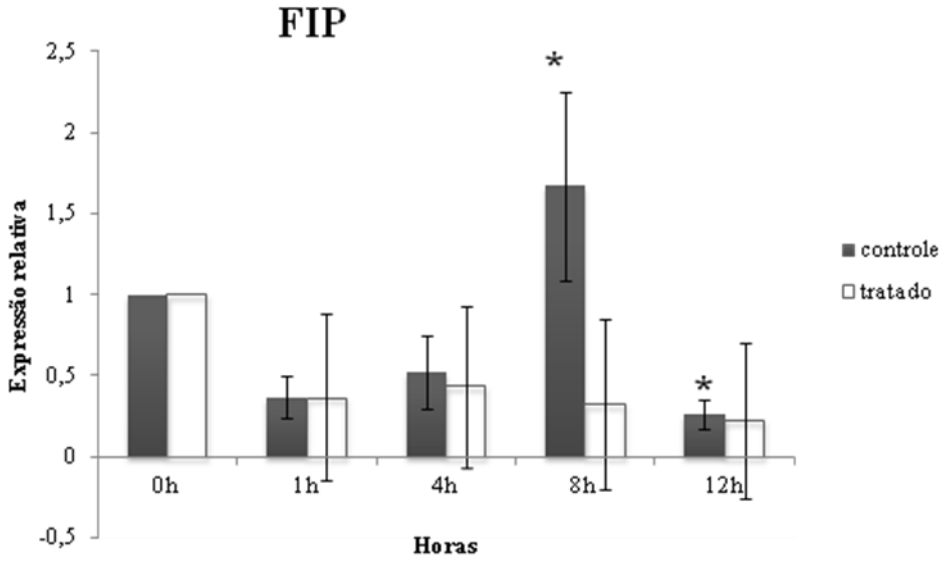
YU, F., PARK, S.; RODERMEL, S.R. The Arabidopsis FtsH metalloprotease gene family: interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes. **The Plant Journal,** Oxford, v. 37, p. 864-876, Mar. 2004.

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. **The Plant Journal,** Oxford, v. 42, p. 609-617, June 2005.

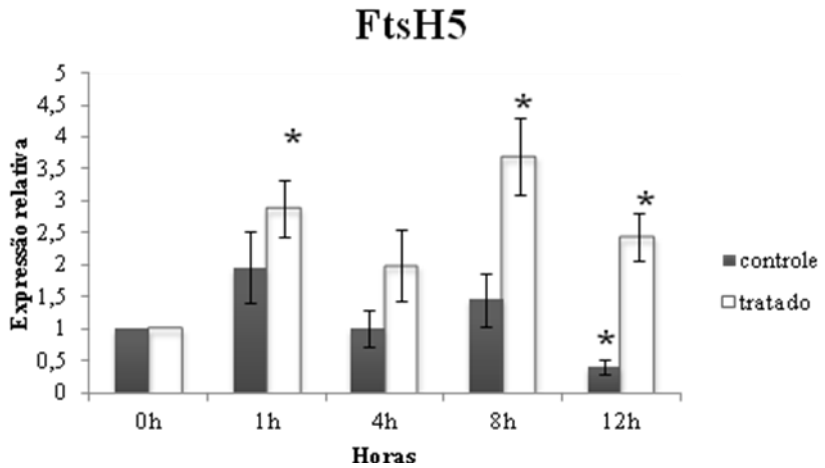
ANEXOS

Anexo A - Gráficos de expressão relativa referente ao experimento 2 de estresse a frio.

A

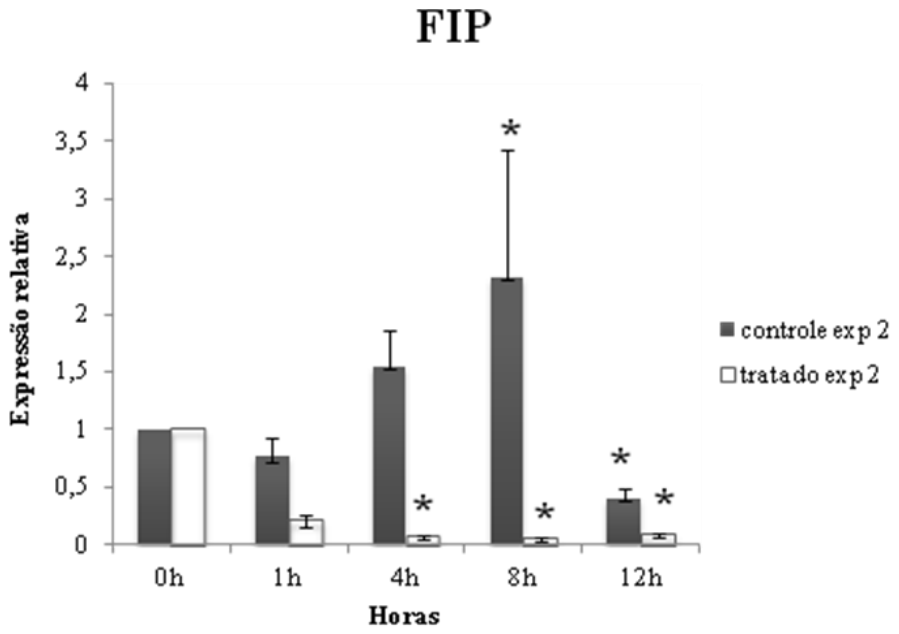
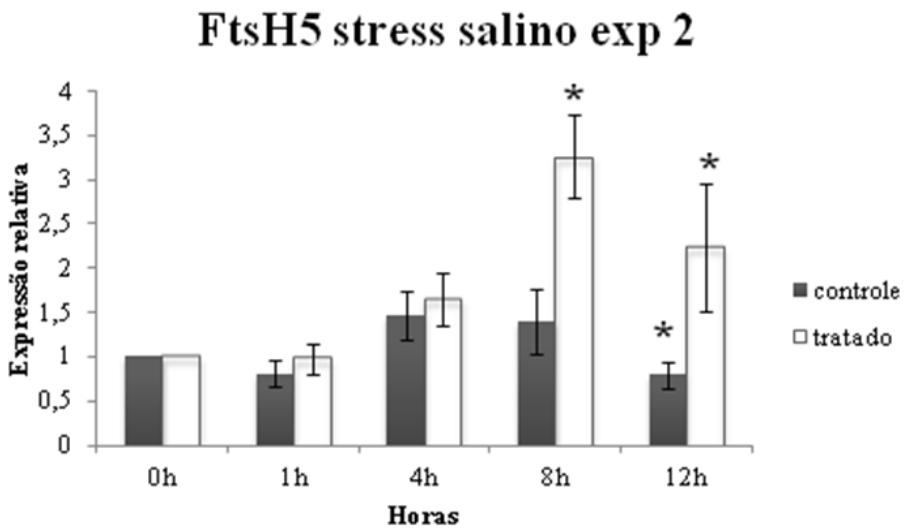


B



Anexo B - Gráficos de expressão relativa referente ao experimento 2 de estresse salino.

A



B