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

Dissociabilidade das funções de inibição da expansão celular e de alcalinização do peptídeo AtRALF1 e identificação dos aminoácidos determinantes da atividade de alcalinização

Paulo Henrique de Oliveira Ceciliato

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

**Piracicaba
2015**

Paulo Henrique de Oliveira Ceciliato
Bacharel em Ciências Biológicas

Dissociabilidade das funções de inibição do crescimento de raiz e de alcalinização do peptídeo AtRALF1 e identificação dos aminoácidos determinantes da atividade de alcalinização

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

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

Piracicaba
2015

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

Ceciliato, Paulo Henrique de Oliveira

Dissociabilidade das funções de inibição da expansão celular e de alcalinização do peptídeo AtRALF1 e identificação dos aminoácidos determinantes da atividade de alcalinização / Paulo Henrique de Oliveira Ceciliato. - - Piracicaba, 2015.

88 p. : il.

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

1. Peptídeos hormonais 2. RALF 3. AtPEP1 4. Alcalinização do meio extracelular
5. Fluxo iônico I. Título

CDD 581.19256
C388d

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

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Carlos e Gisele, à minha esposa Keini, aos meus irmãos Fernanda e Carlos e a todos os meus professores durante essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Daniel Scherer de Moura. Foram mais de cinco anos me ajudando a me lapidar constantemente, em busca de realizar meus objetivos acadêmicos. Todos os conselhos e lições foram imprescindíveis para minha formação. Muito obrigado!

Ao CNPq, CAPES, FAPESP e ESALQ, pelo auxílio financeiro e estrutura disponibilizada;

Aos meus avós, Maria Amália e Frank, meus pais Carlos e Gisele, meus irmãos Fernanda e Carlos e meu sobrinho Vinícius, pela união e apoio tão necessários;

À minha família aqui não citada, por todo o apoio que sempre recebi;

Aos meus queridos amigos do laboratório de Bioquímica de Proteínas, cuja vivência nos permitiu crescermos juntos, literalmente;

Aos meus caros amigos Guilherme Hosaka, Geraldo Silva, Wellington Campos, Andrés Ortiz e Rafael Aguiar, um agradecimento especial pelo companheirismo total;

À minha amada esposa, Keini Dressano, que começou esta jornada como minha companheira de bancada, e hoje se tornou minha companheira para a vida toda. Muito obrigado por todo o amor, carinho, compreensão e ajuda no trabalho e no resto;

À minha nova família, Maria Helena e Walter, por todo o carinho com que me receberam; e à memória da minha querida vó Helena Rossi Caproni, pela juventude de alma e carinho infinito para com seus netos;

A todos os professores da ESALQ que de alguma forma participaram do meu aprendizado, seja com aulas, seja com conversas acaloradas sobre ciência. Vocês foram fundamentais;

Um agradecimento especial ao Professor Lázaro E. P. Peres e à Professora Helaine Carrer, pelo apoio fundamental para realização do meu doutorado no exterior;

A todos os funcionários, professores e colegas que não foram citados, mas que de alguma forma sempre contribuíram para minha formação.

“That which does not kill us makes us stronger”

Friedrich Nietzsche

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Peptídeos hormonais	19
2.1.1 Peptídeos envolvidos em defesa vegetal	19
2.1.1.1 Sistemina e defesa contra insetos herbívoros	19
2.1.1.2 Peptídeos elicitores de defesa vegetal AtPEPs	20
2.1.2 Peptídeos hormonais ligados ao desenvolvimento vegetal	21
2.1.2.1 Peptídeos fitosulfoquinas e proliferação celular	21
2.1.2.2 Peptídeos CLAVATA3 e manutenção meristemática	22
2.3 Peptídeos RALF	23
2.3.1 Descoberta, estrutura e ocorrência	23
2.3.2 Atividades biológicas	24
2.3.3 Sinalização	25
2.3.4 Alterações na atividade de bombas de próton-ATPase e inibição de crescimento de raízes	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Ensaio de Alcalinização e Ensaio do Volume de Células Decantadas (VCD)	31
3.2 Material vegetal e condições de crescimento	31
3.3 Extração de DNA genômico de arabidopsis	31
3.4 Extração de RNA total de arabidopsis e síntese de cDNA	32
3.5 Transformação de <i>Escherichia coli</i>	32
3.5.1 Preparação de células eletrocompetentes de <i>E. coli</i>	32
3.5.2 Eletroporação de <i>E. coli</i>	33
3.6 Extração de DNA plasmidial de <i>Escherichia coli</i>	33
3.7 Produção e purificação dos peptídeos AtRALFs	34
3.8 Inibição de crescimento de raiz	36
3.9 Inibição de alongamento de hipocótilo	36
3.10 Digestão das proteínas recombinantes por tripsina e análise por espectrometria de massas	

.....	37
3.11. qRT-PCR	37
3.12 Gel indicador de pH	38
3.13 Análises estatísticas	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Avaliação do pH extracelular e inibição do aumento do volume de células através da técnica do volume de células decantadas (VCD).....	39
4.2 Tamponamento do meio extracelular não impede o efeito inibitório do AtRALF1 no VCD	41
4.3 A acidificação do meio extracelular não impede o efeito inibitório do AtRALF1 no VCD	43
4.4 Produção heteróloga de peptídeos mutantes	45
4.5 As atividades biológicas dos peptídeos mutantes revelam a essencialidade da alanina do motivo -ANPY- para a inibição da expansão celular	46
4.6 Genes responsivos a AtRALF1 são induzidos somente pelos peptídeos mutantes que inibem a expansão celular	51
4.7 Moduladores da próton-ATPase da membrana plasmática não alteram a expressão de genes induzidos por AtRALF1	55
4.8 A inibição da expansão celular causada por AtRALF1 é independente do tamponamento do meio extracelular	57
4.9 O pH da rizosfera de plantas que superexpressam AtRALF1 ou que são tratadas com diferentes peptídeos não condiciona a inibição da expansão celular à alcalinização	58
4.10 O peptídeo de defesa AtPEP1 alcaliniza a rizosfera e a alcalinização é independente de sua percepção pelos receptores AtPEPR1 e AtPEPR2	61
4.11 Efeito de moduladores da próton-ATPase da membrana plasmática na expressão de genes induzidos por AtPEP1	62
5 DISCUSSÃO	65
6 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	75
ANEXOS	83

RESUMO

Dissociabilidade das funções de inibição do crescimento de raiz e de alcalinização do peptídeo AtRALF1 e identificação dos aminoácidos determinantes da atividade de alcalinização

RALFs são peptídeos hormonais de aproximadamente 5kD que regulam negativamente o alongamento celular. Dentre suas atividades biológicas, a alcalinização do meio extracelular e a inibição do alongamento celular são tidas como associadas, pois a acidificação do meio extracelular é necessária para a expansão celular. A atividade de alcalinização e a de inibição do crescimento são medidas em dois ensaios distintos: o ensaio de alcalinização do meio extracelular de células em suspensão e o ensaio do crescimento de raiz primária de plantas jovens. Buscando-se fazer ambas as avaliações da inibição da expansão celular e da alcalinização em um único modelo de estudo, tomou-se como medida da expansão celular o volume das células decantadas (VCD). Quando o tampão MES ou o pré-tratamento com “Fusicoccin” foi utilizado para se atenuar o efeito de alcalinização do AtRALF1, verificou-se que o efeito de inibição do alongamento celular não sofreu alteração. Em *arabidopsis* são encontrados nove peptídeos RALF, que apresentam alta similaridade com o RALF original de tabaco. Com exceção do AtRALF4, todos são capazes de alcalinizar o meio extracelular e inibir raízes. A comparação da estrutura primária do AtRALF4 com os demais RALFs mostra que poucos resíduos são distintos entre eles, sugerindo que estes possam ser os determinantes das atividades de inibição e alcalinização. A alteração de um destes resíduos, AtRALF4(N92A), é capaz de restaurar a capacidade do AtRALF4 de inibir as raízes sem, no entanto, recuperar a atividade de alcalinização. Quando três outros resíduos exclusivos do AtRALF4 foram substituídos pelos seus correspondentes do AtRALF1, observa-se uma restauração parcial da alcalinização, desta vez, sem alterar a capacidade de inibir as raízes. Recentemente, foi mostrado pelo nosso grupo que o peptídeo AtRALF1 induz a expressão de genes relacionados ao rearranjo da parede celular. Quando verificado por PCR quantitativa, constatou-se que somente os peptídeos mutantes que apresentam atividade de inibição do crescimento são capazes de promover uma indução semelhante. Ainda, utilizando gel indicador de pH, verificou-se que plantas transgênicas super-expressando AtRALF1 (35S:AtRALF1) acidificam o meio durante seu crescimento de maneira semelhante a plantas selvagens. O peptídeo de defesa AtPEP1, a exemplo dos peptídeos RALF, também promove a alcalinização do meio extracelular. A utilização de drogas para reproduzir ou atenuar o efeito de alcalinização promovido por este peptídeo sugere que a expressão dos genes responsivos a AtPEP1 também não está relacionada à alteração na atividade das próton-ATPases. Finalmente, quando mutantes para ambos os receptores de AtPEPs foram utilizados (*atpepr1/r2*) em gel indicador de pH, verificou-se que estes alcalinizam o pH da rizosfera na presença do peptídeo. Nossos dados somados sugerem uma dissociação das atividades biológicas de alcalinização do meio extracelular e de inibição da expansão celular. A alteração na atividade das próton-ATPases pode não ser apenas uma mensagem secundária do efeito biológico, mas sim outra fonte de informação independente e ainda pouco explorada como tal.

Palavras-chave: Peptídeos hormonais; RALF; AtPEP1; Alcalinização do meio extracelular; Fluxo iônico

ABSTRACT

The dissociability of the root growth inhibition and extracellular alkalization activities of the AtRALF1 peptide and the identification of the essential amino acids for the alkalization activity

RALFs are 5kD peptide hormones that negatively regulates cell expansion. Among the biological activities of the RALF peptide, the extracellular alkalization and cellular expansion inhibition were previously suggested to be associated, once the extracellular acidification is required to cell expansion. Usually, the alkalization and cell expansion inhibition activities are evaluated in two different assays, the cell suspension medium alkalization and the plantlet root growth inhibition. We manage to set an assay in which both cell expansion inhibition and extracellular alkalization activities could be evaluated. Using the package suspension cell volume through decantation as a value of cell expansion, we evaluated the relation between alkalization and cell expansion inhibition in different conditions. When the MES buffer or the pre-treatment with Fusicoccin was used to arrest the AtRALF1 extracellular alkalization, the package cell volume inhibition activity was not affected. There are 9 RALF peptides encoded in arabidopsis plants that are closely related with the first isoform isolated from tobacco. With exception of the AtRALF4, all those isoforms are able to alkalize the extracellular medium and arrest root growth. Comparing the AtRALF4 with other eight isoforms, we verified that are few different amino acids between them, suggesting that those amino acids could be essential for the biological activities. The rescue of one of those amino acids, AtRALF4(N92A), was able to regain the root growth inhibition activity of the AtRALF4 peptide, although the extracellular alkalization activity was not restored. When three other AtRALF4 amino acids were substituted by their AtRALF1 correspondent, there is a partial rescue of the extracellular alkalization activity, but no alterations in the root growth inhibition. We had recently shown that the AtRALF1 peptide induces the expression of genes related to cell wall rearrangement. The quantitative PCR analyses demonstrates that only the mutant peptides that are able to arrest root growth are also able to induce the gene expression. When submitted to a pH indicator, it was verified that AtRALF1 overexpressing plants acidifies it during its growth, as much as wild type plants. The defense peptide AtPEP1, similarly of AtRALF1, also triggers extracellular alkalization. The use of proton-pump chemical modulators to simulate or arrests AtPEP1 extracellular alkalization activity suggests that the gene expression of the AtPEP1-responsive genes is not related to changes in plasma membrane proton pump activity. Finally, when double mutants for both the AtPEP1 receptors (*atpepr1/r2*) were submitted to a pH gel indicator, it was seen that they alkalize the rhizosphere pH in the presence of the AtPEP1 peptide. Our data suggests that the extracellular alkalization and arrest of cell expansion activities are dissociated. The proton pump modulation activity may not be only a secondary messenger, but another source of information independent and yet to be explored.

Keywords: Hormone peptides; RALF; AtPEP1; Extracellular alkalization; Ionic fluxes

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

Abreviação ou símbolo	Significado
E	Einstein
°C	Graus Celsius
TA	Temperatura ambiente
L	Litro
d	Dia
h	Hora
min	Minuto
s	Segundo
Ω	Ohm
F	Farad
V	Volt
g	Grama
x g	Aceleração da Gravidade
rpm	Rotação por minuto
U	Unidade
ABS	Absorbância
Psi	Libra força por polegada quadrada
OD	Densidade óptica
V	Volts
M	Mol
m	Metro
VCD	Volume de células decantadas
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance

1 INTRODUÇÃO

Peptídeos hormonais são pequenas proteínas com funções sinalizadoras, ocorrendo em todo o reino vegetal e atuando tanto no desenvolvimento quanto na defesa de plantas (MURPHY; SMITH; SMEDA, 2012; ALBERT, 2013; GHORBANI et al., 2014). Peptídeos RALF, (do inglês “*Rapid Alkalinization Factor*”) foram descobertos em ensaio de alcalinização de moléculas extraídas de folha de tabaco e são ubíquos no reino vegetal (PEARCE et al., 2001). Em arábido, peptídeos RALF formam uma família multigênica, composta por 37 isoformas (LAMESCH et al., 2012; MORATO DO CANTO et al., 2014). As atividades biológicas relacionadas aos peptídeos RALF até o momento envolvem: inibição do crescimento de raiz primária, inibição do alongamento de hipocótilo, alcalinização do meio extracelular, mobilização de cálcio, indução de uma quinase ativada por mitógeno (MAPK) e inibição do crescimento de tubo polínico (PEARCE et al., 2001; MATOS et al., 2008; HARUTA et al., 2008; MINGOSSO et al., 2009; COVEY et al 2010). O peptídeo AtRALF1, uma isoforma específica de raízes de arábido, também induz genes relacionados a rearranjo da parede celular e genes envolvidos com a via de biossíntese dos brassinosteróides (BERGONCI ET AL, 2014; BERGONCI; SILVA-FILHO; MOURA, 2014). Apesar das atividades biológicas dos peptídeos RALF serem bem conhecidas, ainda não se sabe a inter-relação existente entre as mesmas, ou seja, se elas compartilham a mesma forma de percepção ou, até mesmo, a mesma via de transdução de sinais.

Recentemente, Haruta e colaboradores (2014) caracterizaram um dos receptores do peptídeo AtRALF1, FERONIA, uma proteína de membrana com atividade quinase no domínio intracelular. A ligação do peptídeo AtRALF1 em FERONIA causa uma diminuição da atividade da bomba de próton-ATPase “AHA2”, levando a uma alcalinização do meio extracelular. Esta alcalinização é apontada como parte do mecanismo responsável pela inibição do crescimento da raiz primária uma vez que antagoniza a acidificação do meio extracelular, condição tida como necessária para a expansão celular (RAYLE; CLELAND, 1992).

O objetivo deste trabalho foi investigar a relação existente entre as atividades de alcalinização do meio extracelular e a inibição da expansão celular promovidas pelo peptídeo AtRALF1. Para tal finalidade duas ferramentas foram desenvolvidas ao longo do trabalho: um ensaio biológico no qual ambas as atividades podem ser estudadas simultaneamente e peptídeos mutantes que possibilitam a avaliação de cada uma das atividades em separado. Além destas duas ferramentas novas, foi utilizada PCR quantitativa para verificação da

relação existente entre alcalinização e resposta gênica, e utilizou-se outro peptídeo hormonal, AtPEP1, para a comprovação de que o observado para AtRALF1 pode ser generalizado para outros peptídeos alcalinizadores mas que não estão relacionados com o desenvolvimento vegetal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Peptídeos hormonais

Organismos pluricelulares necessitam de um arsenal de sinais químicos para coordenar o desenvolvimento frente as alterações do ambiente. No caso de organismos sésseis, como as plantas, os sinais moleculares recrutados são ainda mais importantes para que as mesmas alterem sua fisiologia em resposta a diferentes estímulos.

Peptídeos hormonais são pequenas proteínas que, juntamente aos hormônios vegetais, coordenam as diferentes respostas fisiológicas das plantas (ALBERT, 2014). Em geral, os peptídeos de sinalização são pequenos, podem variar de 5 a pouco mais de 50 aminoácidos e são derivados de precursores maiores (MURPHY et al., 2012). Atualmente já foram relatadas mais de 15 famílias de peptídeos hormonais que atuam em processos básicos como controle do crescimento e proliferação celular até resistência a insetos herbívoros ou patógenos (MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006; GHORBANI et al., 2014).

2.1.1 Peptídeos envolvidos em defesa vegetal

2.1.1.1 Sistemina e defesa contra insetos herbívoros

Muitas plantas superiores são capazes de produzir proteínas de defesa, quando submetidas a injúrias em seus tecidos vegetais. Dentre as proteínas de defesa vegetal melhor caracterizadas estão as proteínas inibidoras de serino-proteases, as quais foram detectadas em solanáceas como tomate e batata (GREEN; RYAN, 1972; PLUNKETT et al., 1982). Esses inibidores atuam retardando a digestão em insetos herbívoros, culminando no atraso do crescimento e desenvolvimento dos mesmos (RYAN, 1990).

Folhas intactas de tomateiro, quando expostas a extratos proteicos de folhas atacadas por inseto são capazes de produzir proteínas de defesa, sugerindo que existe um sinal sistêmico indutor deste tipo de resposta (RYAN, 1974). Ensaio bioquímicos, realizados com o intuito de identificar estes sinais moleculares indutores de proteínas de defesa, isolaram um peptídeo de 18 aminoácidos, o qual recebeu o nome de sistemina (PEARCE et al., 1991). Peptídeos sistemina são capazes de induzir a expressão dos genes que codificam para os inibidores de proteinases, além de mostrarem certa mobilidade em plantas (NARVAEZ-VASQUEZ et al., 1995; PEARCE et al., 1991). Atualmente sabe-se que peptídeos sistemina

levam a um aumento na síntese de ácido jasmônico em tecidos vasculares, o qual levaria à resposta de defesa contra herbivoria a longas distâncias na planta (SCHILMILLER; HOWE, 2005).

Sisteminas são proteoliticamente derivadas de precursores maiores, com cerca de 200 aminoácidos, chamados de pró-sisteminas (MCGURL et al., 1992; MCGURL; RYAN, 1992; RYAN; PEARCE, 2003), e são encontrados especificamente em solanáceas. A via de sinalização da sistemina em tomateiro foi bem caracterizada: através de ferimentos nos tecidos vegetais, este peptídeo é produzido através da clivagem de seu precursor em células do parênquima e translocado no feixe vascular, onde provavelmente se liga a seu receptor. Uma vez percebido, este acarreta em modulação do fluxo iônico (FELIX; BOLLER, 1995; MOYEN; JOHANNES, 1996), aumento da concentração de cálcio citoplasmático, aumento da expressão de genes “calmodulinas”, inativação das bombas de próton-ATPases e ativação de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), levando a ativação da fosfolipase A₂, responsável pela liberação de ácido linoleico. Esta via leva à produção de ácido jasmônico que aumenta a expressão da própria sistemina, acarretando em uma magnificação da resposta sistêmica a herbivoria (Revisado em MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006).

2.1.1.2 Peptídeos elicitores de defesa vegetal AtPEPs

Plantas, a exemplo dos animais, são capazes de recrutar um arsenal de moléculas sinalizadoras e de defesa para reconhecer e interromper o ataque de patógenos (RYAN et al., 2007). Comumente, elicitores de defesa endógenos em plantas são fragmentos de oligossacarídeos derivados da parede celular, decorrentes da ação enzimática ocorrida durante o ataque de patógenos (DARVILL et al., 1992; OROZCO-CÁRDENAS; RYAN, 2003; DI MATTEO et al., 2006). Peptídeos AtPEP são pequenas proteínas de 23 amino ácidos isolados de arabidopsis, que formam um novo tipo de elicitor endógeno vegetal, o qual ativa genes de defesa associados a respostas de imunidade inata (HUFFAKER et al., 2006). AtPEP1 é um peptídeo derivado de um precursor maior, cujo gene é induzido em resposta a ferimentos, metil-jasmonato, etileno e ao próprio AtPEP1 (HUFFAKER et al., 2006; HUFFAKER; RYAN, 2007). Quando adicionado em células em suspensão de arabidopsis, este peptídeo é capaz de causar uma forte alcalinização do meio extracelular, de maneira dose-dependente (HUFFAKER et al., 2006). A super-expressão do gene precursor do AtPEP1 (35S:PROPEP1) produz um fenótipo de aumento da resistência contra o oomiceto *Pythium irregulare*, além da

expressão constitutiva do gene que codifica para a defensina, PDF1.2 (HUFFAKER et al., 2006).

Um dos receptores do peptídeo AtPEP1, PEPR1, foi identificado em células em suspensão de arábids. Trata-se de uma proteína de membrana que possui domínios que a caracterizam como um LRR-RLK (*Leucine rich repeat-Receptor like kinase*), com domínio quinase intracelular. A descoberta se deu através da marcação do peptídeo com iodo radioativo, seguido da purificação do complexo (YAMAGUCHI et al., 2006). Curiosamente, a transformação de células em suspensão de tabaco com a construção 35S:AtPEPR1 resultou em células transgênicas capazes de reconhecer o peptídeo AtPEP1, acarretando em alcalinização do meio extracelular (YAMAGUCHI et al., 2006).

Já em 2010, Krol e colaboradores definiram que o gene homólogo ao PEPR1, PEPR2, codifica para um receptor de membrana semelhante ao PEPR1, e que ambos fazem parte do reconhecimento do peptídeo AtPEP1. Em um experimento de inibição do crescimento de raízes promovida pelo peptídeo, verificou-se que somente o duplo mutante dos receptores (*atpepr1/r2*) é totalmente insensível ao tratamento (KROL et al., 2010).

A via de sinalização dos peptídeos AtPEP está longe de ser elucidada, porém, estudos mostram que estes peptídeos, quando percebidos pelos seus receptores, ativam canais de entrada de Ca^{2+} em membranas das células do mesófilo, resultando em aumento da concentração de cálcio citosólico (QI et al., 2010). A indução dos genes de defesa responsivos a AtPEP1 (PDF1.2, MPK3 e WRKY33) é mediada e dependente da via de sinalização de Ca^{2+} associada aos peptídeos AtPEP e aos seus receptores (QI et al., 2010).

2.1.2 Peptídeos hormonais ligados ao desenvolvimento vegetal

2.1.2.1 Peptídeos fitosulfoquinas e proliferação celular

Estudos visando encontrar os fatores que controlam a proliferação celular em calos oriundos de explantes vegetais descobriram que meio de cultura oriundo de células de aspargos eram capazes de aumentar o crescimento dos calos consideravelmente (MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 1996). Deste sistema, identificou-se um peptídeo sulfatado composto por apenas 5 aminoácidos, o qual foi nomeado fitosulfoquina. Este peptídeo é capaz de induzir diferenciação e proliferação de células oriundas de mesófilo de aspargos em concentrações nanomolares.

Peptídeos fitosulfoquina apresentam uma alta conservação de estrutura primária, e já foram encontrados em diferentes culturas como aspargo (MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 1996), arroz (MATSUBAYASHI; TAKAGI; SAKAGAMI, 1997), milho e *arabidopsis* (YANG, 2001), sugerindo uma ampla abrangência no reino vegetal.

Em relação à estrutura, precursores com cerca de 80 aminoácidos são processados para dar origem às fitosulfoquinas, os quais apresentam uma sequência de direcionamento para a via secretória na sua porção N-terminal (YANG et al., 1999). Curiosamente, a expressão dos genes que codificam este peptídeo não é restrita somente em tecidos com alta taxa de proliferação celular, sendo encontrada em folhas maduras, caules e raízes (YANG et al., 2001).

Foi demonstrado que este peptídeo é capaz de promover vários estágios do crescimento vegetal, como embriogênese somática (HANAI et al., 2000; IGASAKI, 2003), formação de gemas adventícias (YAMAKAWA et al., 1998), formação de raízes adventícias e germinação de grãos de pólen (CHEN; MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2000). O peptídeo marcado foi usado para se avaliar a constante de dissociação entre este e seu receptor, que foi na ordem de 4,2 nM (MATSUBAYASHI et al., 2002). Ao se ligar em seu receptor (PSKR1), o peptídeo promove alongamento de hipocótilo e expansão de protoplastos. A via de sinalização das fitosulfoquinas ainda não foi elucidada, mas já se conhece que a regulação da proliferação das células do centro quiescente mediada por PSK5 envolve um “cross-talk” com os hormônios etileno e brassinoesteróides (HEYMAN et al., 2013).

2.1.2.2 Peptídeos CLAVATA3 e manutenção meristemática

O meristema apical da parte aérea em plantas é formado por um importante grupo de células, cuja função varia desde a formação da epiderme de folhas e flores até o desenvolvimento de tecidos vasculares. Este meristema pode ser dividido em três zonas, sendo que a zona central funciona como uma porção provedora de células para as demais (FLETCHER, 2002). Proteínas CLAVATA (CLV) são codificados por um grupo de genes e possuem um papel importante na manutenção do crescimento do meristema apical da parte aérea (CLARK, 2001). Plantas mutantes em três “loci”, *clv1*, *clv2* e *clv3*, possuem um fenótipo similar de aumento dos meristemas vegetativos e reprodutivos (CLARK; RUNNING; MEYEROWITZ, 1993; CLARK; RUNNING; MEYEROWITZ, 1995; KAYES; CLARK, 1998). O gene *CLV1* codifica uma proteína de membrana serina/treonina quinase com domínio extracelular (CLARK; WILLIAMS; MEYEROWITZ, 1997). Já o gene *CLV2*

codifica para uma proteína semelhante à CLV1, porém intracelular e sem domínio quinase (JEONG; TROTOCHAUD; CLARK, 1999). Foi sugerido que estas duas proteínas formam um hetero-dímero, o qual é responsável pelo reconhecimento dos peptídeos CLV3 (TROTOCHAUD et al., 1999). Estes peptídeos são derivados de precursores de 96 aminoácidos, e assim como as fitosulfoquinas, possuem uma região de endereçamento para a via secretória na porção N-terminal (FLETCHER et al., 1999). A ligação CLV3-CLV1/CLV2 leva a uma regulação negativa dos fatores de transcrição WUSCHEL (WUS), que por sua vez promovem atividade de células meristemáticas (MAYER, 1998). Desta forma, quando super-expressos, os fatores de transcrição WUS levam a proliferação descontrolada de células meristemáticas, além de controlar positivamente a expressão de CLV3 (BRAND et al., 2002). Assim sendo, peptídeos CLV3 e fatores de transcrição WUS formam um “feedback” negativo, no qual a atividade de WUS leva a produção de CLV3, que por sua vez acarreta em uma via de sinalização que culmina na regulação negativa da expressão do fator transcricional. Este refinado controle é fundamental para a correta manutenção do meristema apical em plantas.

Peptídeos CLV3 possuem uma região altamente conservada de aproximadamente 14 aminoácidos, da qual se origina a menor porção capaz de manter atividade biológica. Com base nesta conservação, foram encontrados cerca de 25 pequenos peptídeos codificados no genoma de *Arabidopsis*. Estes genes são chamados de CLE (CLAVATA3/ESR related) e, de maneira oposta à CLV3, são expressos em diferentes tecidos vegetais, sugerindo o seu papel no desenvolvimento de vários órgãos da planta (SHARMA; RAMIREZ; FLETCHER, 2003).

2.3 Peptídeos RALF

2.3.1 Descoberta, estrutura e ocorrência

Durante a purificação de sistemina em tabaco, outro peptídeo foi isolado e, quando adicionado em meio de cultivo de suspensões celulares, causou uma rápida e forte alcalinização, sem, contudo, causar indução de resposta de defesa. Este peptídeo foi denominado de RALF, do inglês “*Rapid Alkalinization Factor*” (PEARCE et al., 2001). Peptídeos RALF são formados por aproximadamente 50 aminoácidos, derivados de precursores maiores. A pré-pro-proteína tem em torno de 115 aminoácidos, e possui três regiões distintas: uma sequência de direcionamento para a via secretória na porção N-terminal, uma região intermediária de função ainda desconhecida e a região C-terminal onde

reside o peptídeo ativo (PEARCE et al., 2001). Sabe-se que o processamento destes peptídeos é realizado por convertases, que reconhecem um sítio dibásico composto por duas argininas e clivam o precursor para a liberação do peptídeo maduro (MATOS et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2009). Em arabis, peptídeos AtRALFs formam uma família multigênica composta de 37 isoformas, das quais grande parte é tecido-específica, sugerindo uma função básica no desenvolvimento completo da planta (LAMESCH et al., 2012; ZHANG et al., 2010; CAO; SHI, 2012; MORATO DO CANTO et al., 2014).

2.3.2 Atividades biológicas

Quando o peptídeo RALF foi isolado e adicionado em meio de cultura onde plântulas de tomate se desenvolviam, este acarretou em uma severa inibição do crescimento das raízes primárias (PEARCE et al., 2001). A partir de então, todos os estudos funcionais realizados demonstram o envolvimento dos peptídeos RALF em processos básicos da biologia celular, tais como o alongamento e a expansão celular (HARUTA; CONSTABEL., 2003; MATOS et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2009; MINGOSSÍ et al., 2010; ATKINSON et al., 2013; MORATO DO CANTO et al., 2014; HARUTA et al., 2014; BERGONCI et al., 2014).

No genoma de *Nicotiana attenuata*, foi encontrada apenas uma isoforma do peptídeo RALF, denominada *NaRALF*. Quando silenciada, as plantas transgênicas apresentaram um aumento do crescimento de raízes primárias e perturbação do desenvolvimento de pelos radiculares (WU et al., 2007). Ao contrário, quando os peptídeos AtRALF1, 8 e 23 foram expressos de maneira constitutiva em arabis, essas plantas apresentaram fenótipo semi-anão, com severa redução em vários órgãos vegetais quando comparadas a plantas selvagens, sugerindo seu papel tanto na regulação de raízes quanto de órgãos da parte aérea (MATOS et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2009; ATKINSON et al., 2013).

Mingossi e colaboradores (2010), caracterizando o peptídeo de cana-de-açúcar SacRALF1, constataram que quando este peptídeo é adicionado ao meio de cultivo de microcallus, ocorre a inibição do crescimento e não são observadas células alongadas, que são indicativas da expansão celular. Constatou-se, no mesmo trabalho, a diminuição do crescimento de hipocótilos desenvolvidos no escuro na presença do peptídeo RALF de arabis. Uma vez que hipocótilos de arabis apresentam entre 7 e 8 células, e que estas não sofrem divisão, o crescimento dos hipocótilos reflete alongamento celular. Desta forma, o trabalho sugere a função dos peptídeos RALF especificamente na expansão celular.

A função de peptídeos RALF no controle da germinação de grãos de pólen também foi estudada, sugerindo o papel destes sinais moleculares também na regulação do alongamento do tubo polínico (ZHANG et al., 2010; COVEY et al., 2010; MORATO DO CANTO et al., 2014).

Outras funções biológicas inerentes aos peptídeos RALF, como regulação do desenvolvimento do gametófito feminino e do tamanho do fruto, também foram relatadas (CHEVALIER; LOUBERT-HUNDON; MATTON, 2013).

2.3.3 Sinalização

A descoberta dos peptídeos RALF se deu através da forte (cerca de uma unidade de pH) e rápida (em torno de cinco minutos) resposta de alcalinização apresentada por este em células em suspensão de tabaco (PEARCE et al., 2001). Constatou-se, no mesmo trabalho, a indução de uma quinase ativada por mitógeno (MAPK).

A alcalinização do meio extracelular é uma das respostas rápidas mais importantes na via de transdução de sinais em plantas, e possui grande importância para diversos peptídeos hormonais (FELIX; BOOLER 1995, FELIX et al., 1999; PEARCE et al., 2001; HUFFAKER et al., 2006). Apesar de ser amplamente discutida, essa atividade ainda é muito pouco compreendida.

Foi sugerido anteriormente que a alcalinização do meio extracelular é causada por uma inibição da bomba de próton-ATPase presente na membrana plasmática das células, em uma via que inclui íons como o cálcio, assim como quinases cálcio dependentes. (SCHALLER; OECKING, 1999). Concomitantemente à atividade de alcalinização, existe um influxo de prótons e um efluxo de íons potássio (FELIX; BOLLER, 1995; MOYEN; JOHANNES, 1996; SCHALLER; OECKING, 1999). A inibição das bombas de próton-ATPase, que leva a uma queda no consumo de ATP, poderia ser um importante “*switch*” utilizado pelas plantas para mudar, do metabolismo primário, para outro contexto celular, uma vez que essa atividade é frequentemente acompanhada por uma regulação negativa do metabolismo primário (FRICK; SCHALLER, 2002; MYSORE et al., 2002; HALITSCHKE et al., 2003; IZAGUIRRE et al., 2003).

A busca pela(s) proteína(s) responsável(eis) pelo reconhecimento dos peptídeos RALF começou em 2005, utilizando peptídeos marcados com iodo radioativo. Neste trabalho, duas proteínas de membrana foram co-purificadas, porém suas identidades não foram determinadas (SCHEER; PEARCE; RYAN, 2005). Utilizando a técnica de fosfoproteômica, Haruta e

colaboradores (2014) identificaram cinco proteínas de membrana que diferiram em abundância quando submetidas a tratamento com o AtRALF1. Dentre essas proteínas, destacou-se a proteína “Feronia” como responsável por um incremento de fosforilação da ordem de vinte vezes quando exposta ao peptídeo. Outra proteína que aumentou seus níveis de fosforilação quando exposta ao AtRALF1 foi a próton-ATPase AHA2. A fosforilação da AHA2 leva à inibição do transporte de prótons através da membrana, que culmina com a alcalinização do meio extracelular. A proteína “Feronia” não é responsável pelo reconhecimento completo do peptídeo AtRALF1, uma vez que mutantes *fer4* apresentam 40% da ligação do peptídeo marcado em relação a plantas selvagens, além de serem sensíveis a AtRALF1 em ensaios de inibição do crescimento de raízes em doses acima de 1 μ M. Este trabalho salientou a função determinante dos peptídeos AtRALF1 no controle negativo da expansão celular.

A expansão celular em plantas é resultado de um complexo rearranjo da parede celular controlado tanto por luz quanto por sinais moleculares internos. BERGONCI et al. (2014), comparando genes diferencialmente expressos em plantas que super-expressam AtRALF1 em relação a plantas selvagens, identificaram quatro genes relacionados a modificação de parede celular que são induzidos por tratamento exógeno com o peptídeo hormonal AtRALF1, são eles: dois genes codificadores de proteínas ricas em prolina (AtPRP1, At1g54970 e AtPRP3, At3g62680), um gene codificador de uma glicoproteína rica em hidroxiprolina (AtHRGP2, At5g19800) e um gene que codifica uma proteína xiloglucana endotransglucosilase, a TOUCH4 (TCH4, At5g57560). A indução de genes relacionados a modificações da parede celular sugere que a inibição do crescimento de raízes causada pelo peptídeo AtRALF1 poderia ser resultado de modificações que culminariam com um enrijecimento precoce, impedindo a célula de se expandir plenamente.

2.3.4 Alterações na atividade de bombas de próton-ATPase e inibição de crescimento de raízes

Segundo a teoria do crescimento ácido, a acidificação do apoplasto promovida pela ação indutora das auxinas junto às bombas de próton-ATPase, ativam as expansinas, que levam a um afrouxamento da parede celular e, conseqüentemente, ao alongamento das células (RAYLE; CLELAND, 1992). Vários são os peptídeos de sinalização que alcalinizam o pH extracelular e, no caso do RALF, Haruta et al. (2014) propuseram que esta alcalinização seria a responsável pelo efeito inibitório de crescimento radicular. Existem, entretanto, relatos na

literatura que indicam uma possível dissociação entre os efeitos de alcalinização do meio extracelular e os demais efeitos fisiológicos dos sinais moleculares alcalinizadores. Por exemplo, o peptídeo de origem bacteriana flagelina (flg22) é capaz de inibir em cerca de 20% o crescimento de raízes na dose de 1 μ M, enquanto que o peptídeo AtRALF1, na mesma dose e produzindo o mesmo efeito alcalinizador, inibe o crescimento de raízes em 75% (HARUTA et al., 2014; MORATO DO CANTO et al., 2014). Outro exemplo é o peptídeo sistemina, um indutor de inibidores de proteinases e forte alcalinizador do meio extracelular, mas que já foi relatado como indutor de crescimento de raízes em tomateiro (PEARCE et al., 1991; FELIX; BOLLER 1995; HOLTON et al., 2007). Ainda, HIGGINS et al. (2007), modulando o pH extracelular através das bombas de próton-ATPase, demonstraram que a ativação de MAP quinases (quinases ativadas por mitógeno) induzidas tanto pela sistemina quanto pela toxina de fungo “fusicoccin”, é independente de pH.

Vários foram os estudos que procuraram avaliar a atividade de alcalinização do meio extracelular dos peptídeos RALFs, porém as metodologias empregadas geralmente são indiretas ou não são capazes de avaliar a inibição da expansão celular e alcalinização no mesmo sistema (PEARCE et al., 2001; WU et al., 2007; MINGOSSI et al., 2009; SRIVASTAVA et al., 2009). Nesse sentido, um único modelo no qual se possam avaliar ambas as atividades é imprescindível para uma maior compreensão da relação existente entre ambas. Para tanto, este trabalho propõem um estudo de VCD (Volume de Células Decantadas) atrelado à medição do pH extracelular de maneira direta. Além disso, realizou-se um estudo de estrutura e atividade dos peptídeos AtRALFs. PEARCE et al. (1993); MEINDL et al. (1998); KONDO et al. (2010) e PEARCE et al. (2010) estudaram a relação entre estrutura e atividade de peptídeos sinais com suas respectivas funções fisiológicas em plantas. Tais estudos podem auxiliar na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na percepção e nas diferentes respostas iniciadas após a percepção. No caso do peptídeo RALF de tomateiro, Pearce et al. (2010) identificaram como sequência fundamental para a atividade biológica motivo de sequência conservado -YISY-. Tanto a deleção do motivo quanto a substituição do aminoácido Ile por uma Ala, causaram uma severa redução na alcalinização do meio extracelular e também a perda do efeito de inibição do crescimento de raízes, mostrando assim a importância destes aminoácidos.

Em uma comparação de estrutura primária entre os 37 RALFs de arabidopsis e o RALF originalmente isolado de tabaco (NtRALF), nove foram os que se destacaram como altamente semelhantes. Estes nove peptídeos foram produzidos de maneira heteróloga e testados quanto às suas atividades biológicas (MORATO DO CANTO et al., 2014). A

isoforma pólen-específica AtRALF4 foi a única dentre as nove estudadas que não apresentou efeito biológico de inibição de crescimento de raiz e alongamento do hipocótilo, apesar de apresentar forte inibição de alongamento de tubo polínico. Além disso, este peptídeo apresenta um padrão singular no ensaio de alcalinização, sendo inativo em concentrações tão altas quanto 500 nM. Uma análise da estrutura primária desta isoforma revelou que somente sete são os aminoácidos discrepantes entre esta e as demais oito isoformas juntamente caracterizadas. Baseado nesta comparação, um estudo de estrutura e função foi então realizado neste projeto.

O motivo conservado -ANPY-, presente em todas as nove isoformas, apresenta uma alteração de uma Ala por uma Asn no peptídeo AtRALF4 (-NNPY-). Quando esta alteração foi revertida, peptídeo recombinante AtRALF4(N92A), a capacidade de inibição do crescimento de raiz e hipocótilo foi restituída, porém, o padrão de alcalinização do meio extracelular não foi alterado. Para confirmação, a alteração inversa foi feita na isoforma AtRALF1, ou seja, o motivo no peptídeo recombinante AtRALF1(A105N) recebeu uma Asn no local da Ala (-NNPY-). Conforme esperado, este peptídeo teve uma redução na habilidade de inibir o crescimento de raiz e alongamento de hipocótilo. Buscando, então, aminoácidos determinantes para o efeito de alcalinização, um peptídeo mutante contendo mudança de três resíduos, também com base nas outras oito isoformas, foi produzido AtRALF4(RRR89GAQ). Este peptídeo recuperou cerca de 70% da capacidade de alcalinização do meio extracelular sem, contudo, ser capaz de inibir o crescimento de raiz ou alongamento de hipocótilo. Visando obter mais evidências da relação entre a alcalinização e a inibição do crescimento de raízes, plantas que expressam a isoforma AtRALF1 de maneira constitutiva (35S:AtRALF1), foram crescidas em placas verticais e transferidas para placas contendo gel indicador de pH (WU et al., 2007; SRIVASTAVA et al., 2009). Apesar de apresentarem fenótipo semi-anão e raízes muito reduzidas, as plantas não apresentam alcalinização na rizosfera, mas sim acidificação, comportando-se de maneira semelhante às plantas selvagens. Estes resultados também sugerem uma dissociação entre alcalinização e inibição das raízes.

Este projeto vem propor um estudo de VCD e estrutura e atividade de peptídeos AtRALFs que objetiva provar a hipótese da dissociação entre os efeitos de alcalinização do meio extracelular e inibição do crescimento de raízes. As estratégias que foram adotadas são a obtenção de peptídeos com modificações nos aminoácidos determinantes das funções de alcalinização e de inibição do crescimento de raízes e o uso de químicos capazes de modular a atividade das bombas de próton-ATPases. Além disso, o AtPEP1, um peptídeo envolvido na resposta a patógenos (HUFFAKER et al., 2006) também capaz de alcalinizar o meio

extracelular e inibir o crescimento de raízes (FELIX et al., 1995), foi investigado quanto a dissociação da alcalinização e das demais atividades biológicas. Com o uso do AtPEP1 busca-se verificar se a dissociabilidade é exclusiva do RALF ou válida para outros peptídeos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ensaio de Alcalinização e Ensaio do Volume de Células Decantadas (VCD)

Células em suspensão de *arabidopsis* MM1 (MENGES; MURRAY, 2002) foram mantidas sob luz contínua a 25 °C em meio de cultura modificado de Murashige e Skoog (MURASHIGE; SKOOG, 1962). As culturas foram mantidas por transferência de 8 mL de células para 80 mL de meio de cultura a cada 7 d, e mantidas sob agitação a 120 rpm. As células são utilizadas para os ensaios entre o quarto e o quinto dia de crescimento, distribuídas em placas de 24 poços (1 mL /poço) e equilibradas a 130 rpm por 1 h antes de utilizá-las. Os peptídeos purificados são adicionados e a resposta é mensurada a partir do pH extracelular utilizando-se o pHmetro modelo Orion 350 com uma sonda de pH semi-micro Orion. Para ensaios de VCD, células no quarto dia de subcultivo são distribuídas em Erlenmeyers de 50 mL (5 mL/ Erlenmeyer) e deixados em agitação de 100 rpm por 30 min. Dado este tempo, os tratamentos são adicionados e a avaliação do pH extracelular se dá em 5 min após a adição (ou em outros tempos determinados para cada ensaio). O VCD é verificado por decantação em seringas de 5 mL, registrado após 30 min de decantação. Os tempos utilizados para decantação variam de 6 a 48 h após o início do experimento. Todos os experimentos foram repetidos no mínimo três vezes, com resultados similares.

3.2 Material vegetal e condições de crescimento

Plantas de *Arabidopsis thaliana* do ecótipo Columbia-0 foram usadas como selvagem. As condições de crescimento das plantas de *arabidopsis* foram descritas por BOYES et al. (2001). Resumidamente, as sementes foram incubadas a 4°C por 3 d e germinadas em solo (2:1 substrato:vermiculita expandida). O cultivo das plantas foi feito em câmaras de crescimento sob fotoperíodo controlado [16 h luz, 150 $\mu\text{E m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (E, Einstein; 1 E = 1 mol of photons) e 8 h escuro] a 23°C.

3.3 Extração de DNA genômico de *arabidopsis*

O reagente Plant DNA_{ZOL}[®] (Life Technologies) foi utilizado para extração e purificação de DNA genômico de plantas de *arabidopsis*, seguindo instruções dos fabricante. Resumidamente, 50 mg de tecido vegetal foi macerado e homogeneizado em 1 mL do

reagente. A solução foi centrifugada por 10 min a 4°C, 10000 x g. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e o DNA foi precipitado com a adição de 0,5 mL de etanol 100%. Após 3 min, a solução foi centrifugada por 2 min a 4°C, 4000 x g. O DNA foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% e eluído em água ultra-pura autoclavada.

3.4 Extração de RNA total de *arabidopsis* e síntese de cDNA

Para a extração de RNA total de *arabidopsis*, o reagente TRI_{ZOL}[®] (Life Technologies) foi utilizado. O tecido vegetal (50-100 mg) foi macerado com o auxílio de N₂ líquido e homogeneizado em 1 mL de TRI_{ZOL}. Após 5 min de incubação a temperatura ambiente (TA), clorofórmio (200 µL) foi adicionado à amostra, agitando vigorosamente por 15 s. Após 5 min de incubação a TA, a amostra foi centrifugada a 12000 x g por 15 min, 4°C. A fase superior foi coletada e transferida para novo tubo de 1,5 mL. Foram adicionados 500 µL de isopropanol e a solução foi incubada a TA por 10 min e, em seguida, centrifugada a 12000 x g por 10 min, 4°C para precipitação do RNA. O sobrenadante foi descartado e o RNA lavado com etanol 75%. Após agitação, a amostra foi centrifugada a 7.500 x g por 5 min, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet seco foi resuspendido em água ultra-pura autoclavada.

A síntese de cDNA foi realizada usando-se o kit ImProm-II[™] Reverse Transcriptase (Promega), de acordo com as recomendações dos fabricantes. O RNA total (1 µg) e 1 µL de OligodT (50 µM) foram incubados a 70°C e, em seguida foram colocados no gelo (5 min). Uma solução contendo tampão ImProm-II 1X, MgCl₂ (1,5 mM), dNTPmix (10 mM) e ImProm-II Reverse Transcriptase (1 U) foi adicionada. A reação foi incubada a 25°C por 5 min, 42°C por 60 min e 70°C por 15 min. Uma alíquota de 2 µL de cDNA sintetizado foi utilizada em reações de PCR.

3.5 Transformação de *Escherichia coli*

3.5.1 Preparação de células eletrocompetentes de *E. coli*

Células de *E. coli* cepa TOP10 (Life Technologies) foram estriadas em placa contendo meio 2xYT (16 g/L triptona, 10 g/L extrato de levedura e 5 g/L NaCl) acrescido de 12 g/L de ágar. A placa foi incubada por 16 h a 37°C. Uma colônia isolada foi pré-inoculada em 50 mL de meio 2xYT líquido sem antibióticos por 16 h a 200 rpm, 37°C. Em seguida, a cultura do pré-inóculo foi adicionada em 500 mL de meio 2xYT líquido. Este inóculo foi incubado a

37°C sob agitação de 200 rpm até atingir a densidade óptica (ABS_{600}) de 0,6. As células foram sedimentadas a 1100 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 500 mL de água ultra-pura autoclavada gelada. As células foram novamente sedimentadas a 1100 x g por 10 min a 4°C e lavadas mais uma vez com 250 mL de água ultra-pura autoclavada gelada. Após a centrifugação a 1600 x g por 10 min a 4°C, a última lavagem das células foi realizada com 10 mL de glicerol 10% gelado. As células foram sedimentadas novamente a 1600 x g por 10 min a 4°C e ressuspensas em 3-5 mL de glicerol 10% gelado. Foram feitas alíquotas de 70 μ L, as quais foram congeladas em N₂ líquido e armazenadas em freezer -80°C.

3.5.2 Eletroporação de *E. coli*

A fim de inserir os vetores em células de *E. coli*, o vetor de interesse foi adicionado a 70 μ L de células competentes. A mistura foi colocada em uma cubeta de eletroporação (largura da ranhura 2 mm, BioRad) previamente resfriada. A eletroporação foi efetuada no eletroporador Gene Pulse II (BioRad) usando resistência 200 Ω , capacitância 25 μ F e voltagem 2,5 kV. Em seguida, 1 mL de meio 2xYT foi adicionado na cubeta e a solução foi transferida para tubo de 1,5 mL e incubada por 1 hora a 37°C, 200 rpm. A solução foi centrifugada a 4000 x g por 5 min, 800 μ L do sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 μ L de meio restante. Por fim, os 200 μ L da solução bacteriana foram plaqueados em meio 2xYT contendo ágar (12 g/L) mais antibióticos (canamicina 50 μ g/ mL ou ampicilina 100 μ g/ mL). A placa foi incubada a 37°C por 16 h.

3.6 Extração de DNA plasmidial de *Escherichia coli*

Colônias isoladas de *E. coli* foram crescidas em 5 mL de meio 2xYT líquido com os antibióticos apropriados (canamicina 50 μ g/ mL ou ampicilina 100 μ g/ mL) por 16 h a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Em seguida, 1 mL de cultura bacteriana foi centrifugado a 13000 x g sob TA. As células sedimentadas foram ressuspensas em 100 μ L de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA), adicionando-se em seguida 200 μ L de tampão TENS (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaOH, 0,5% SDS). Após agitação por inversão, a solução foi incubada por 3 min a TA. Posteriormente, foram adicionados 150 μ L de acetato de potássio 3 M (pH 5,2), agitando a solução por inversão e incubando por 5 min no gelo. O lisado foi centrifugado a 13000 x g por 20 min, 4°C, e o sobrenadante tratado com 3 μ L de

RNAse (10 U/ μ L) a 37°C por 20 min. A precipitação do DNA plasmidial foi feita com a adição de 1 mL de etanol 100% e a sedimentação por centrifugação a 13000 x g por 5 min, 4°C. O plasmídeo foi lavado com 1 mL de etanol 70%. Após centrifugação de 13000 x g por mais por 5 min, 4°C, o DNA foi seco a 37°C por 20 min e ressuspensão em água ultra-pura autoclavada.

3.7 Produção e purificação dos peptídeos AtRALFs

A amplificação dos fragmentos para a posterior clonagem foi feita através da reação padrão de PCR. Os iniciadores utilizados foram sintetizados (Life Technologies™) já com as modificações necessárias para que os fragmentos amplificados apresentassem as mutações nas bases nitrogenadas correspondentes aos aminoácidos candidatos. A sequência do peptídeo ativo foi definida pela posição do sítio dibásico -RR- (MATOS et al., 2008) e pelo motivo conservado YI(S/G)Y. Todos os códons alterados se encontram no Anexo A. Uma vez amplificado, o conteúdo da reação foi aplicado em gel de agarose (Agarose I Amresco™, Grau de biotecnologia) 2% (p/v) em tampão TAE (242 g de Tris, 73,2 g de EDTA e 57,1 mL de ácido acético glacial, completando o volume para um litro). A separação eletroforética ocorreu por 30 min a 100 V e o gel foi corado com o agente intercalante de DNA brometo de etídio (0,5 μ g/mL). A verificação do peso molecular do produto da reação de PCR foi feita por comparação com o padrão de peso molecular “1Kb ladder plus” (Invitrogen®). O produto de PCR amplificado foi extraído e purificado do gel utilizando-se o “QIAEX I Gel Extraction Kit” (Qiagen®) de acordo com as instruções do fabricante. A clonagem foi feita através do sistema “Gateway” (Invitrogen®). Neste sistema, o produto de PCR é direcionalmente clonado pela adição de quatro bases nitrogenadas ao iniciador “forward” (CACC). O vetor de entrada possui uma extremidade contendo as bases nitrogenadas “GTGG”, de tal forma que o produto de PCR se anele na orientação correta, e a topoisomerase I, isolada do vírus *Vaccina*, catalisa a ligação do inserto ao vetor. A reação de clonagem por este sistema ocorre na presença de vetor linearizado e inserto (ambos em concentrações iguais a 20 ng/ μ L), água ultra pura e solução de sal (1,2 M NaCl e 0,06 M MgCl₂) diluída de 1:4, totalizando 6 μ L. Terminada a reação, 1,5 μ L são eletroporados em 50 μ L de *E. coli* (genótipo Top10) eletrocompetente e após 1 h de crescimento em meio 2xYT (16 g de triptona, 10 g de extrato de levedura e 5 g de NaCl em 1 L de água, pH 7,5) a 37 °C e 200 rpm de rotação são plaqueadas neste mesmo meio nutritivo, agora semi-sólido (12 g/L de ágar) contendo o antibiótico canamicina (50 μ g/ mL), uma vez que o vetor de entrada possui um gene que

confere resistência às células transformadas para este agente seletivo. Após 18 h em placa, a 37 °C, selecionam-se 5 colônias para a extração de DNA plasmidial. A extração do plasmídeo é feita com a solução TENS (1 M Tris-HCl pH 7,4, 0,5 M EDTA, 5 M NaOH e 10 % SDS), permitindo que as células sejam lisadas e o DNA plasmidial seja posteriormente precipitado e isolado. Estes plasmídeos são então verificados quanto à clonagem tanto por PCR utilizando-se iniciadores específicos do inserto e vetor, como por sequenciamento. Quando encontrado o vetor positivo, iniciou-se a reação de recombinação. O pDEST17™ foi escolhido por ser um vetor de expressão regulado pelo forte promotor T7 que fusiona a proteína traduzida a uma cauda de histidina (6x His tag) na porção N-terminal, que é utilizada para posterior purificação da proteína recombinante através da cromatografia de afinidade.

O kit utilizado então é o “Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix”. A reação é montada, a temperatura ambiente, em tubo de centrífuga contendo 150 ng de vetor de entrada, 150 ng de vetor de destino (pDEST17™) e tampão TE (10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA, pH 8,0) totalizando 8 µL de reação. Neste volume, adicionam-se 2 µL da enzima que promoverá a recombinação e o conjunto é incubado a 25 °C por pelo menos 1 hora (Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix). O mesmo processo de seleção de colônias positivas é utilizado posteriormente, agora com o antibiótico ampicilina (100 µg/ mL) como agente seletivo. Os insertos recombinados foram transformados em *E. coli* do genótipo Rosetta DE3 e isto se deve ao fato de que esta cepa possui correção para códons que são raros em bactérias desta espécie.

Um pré-inóculo da transformação da cepa Rosetta DE3 contendo o vetor de destino recombinado é crescido em meio 2xTY durante 18 h a 37 °C submetido a uma rotação de 200 rpm. Este pré-inóculo é, então, transferido para um frasco contendo 500 mL deste mesmo meio de cultura, também nas mesmas condições de rotação e temperatura. Quando atingida a densidade ótica (O.D.) entre 0,6 e 0,8, o agente indutor de expressão “IPTG” (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) é adicionado ao meio na concentração final de 1 mM. A indução permanece por 4 h e logo após esse período, as bactérias são centrifugadas e o precipitado bacteriano é mantido a -20 °C. A purificação foi adaptada de MATOS et al. (2008). Para a purificação da proteína de interesse, o precipitado bacteriano é suspenso em tampão de lise (100 mM NaH₂PO₄, 20 mM Tris-HCl, 8 M uréia, pH 8,0) e deixado em agitação por 40 min, posteriormente lisados sob pressão de 1500 psi em bomba de ruptura celular por pressão de gás nitrogênio (Parr Instrument Co., Moline, IL, USA), seguido de uma centrifugação a 22 °C por 40 min. O sobrenadante é aplicado em coluna de cromatografia de afinidade, resina de níquel (Ni-NTA Qiagen®), a qual exhibe alta afinidade e seletividade pela extensão de

histidina fusionada à proteína recombinante, que pode ser eluída posteriormente por competição por imidazol, histidina, ou até por diminuição de pH. A resina de níquel é previamente equilibrada com 10 volumes de tampão de ligação (100 mM NaH_2PO_4 , 20 mM Tris-HCl, 8 M uréia, pH 8.0). A coluna foi lavada com 5 volumes de tampão de lavagem (100 mM NaH_2PO_4 , 20 mM Tris-HCl, 8 M uréia, pH 6.3) e as proteínas de interesse foram eluídas com 3 mL de tampão de eluição (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, 8 M uréia, pH 3.3). O volume eluído da coluna foi dialisado contra 16 L de solução 0,2% (v/v) de ácido fórmico divididos em 4 períodos de aproximadamente 12 h (4 °C, sob leve agitação). Após a diálise, as amostras foram liofilizadas e analisadas por HPLC. A suspensão da proteína liofilizada foi feita em 0,1 % (v/v) de ácido fórmico, centrifugada a 12000 xg durante 30 min a 4 °C. A injeção foi de 10 % do volume total de amostra. A coluna utilizada foi a fase reversa C18 (5 μm 4,6 x 250 mm, Agilent). A coluna foi equilibrada com 0,1 % (v/v) ácido fórmico e eluída com gradiente de acetonitrila/0,1 % (v/v) ácido fórmico. O gradiente de acetonitrila utilizado vai de 0 a 50 % em 30 min. O fluxo da bomba foi ajustado para 1 mL/min.

3.8 Inibição de crescimento de raiz

Os ensaios de inibição de crescimento de raízes de plântulas de *arabidopsis* foram previamente descritos por PEARCE et al. (2001). As sementes de *arabidopsis* foram esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 50% por 20 min e em seguida lavadas quatro vezes com água milli-Q esterilizada. As sementes desinfetadas foram mantidas por 3 d a 4°C e em seguida colocadas para germinar em meio contendo sais MS 0,5X sem vitaminas e sem sacarose, pH 5,6, durante 48 h em placas de 24 poços. Em seguida, foram submetidas a fotoperíodo de 16 h de luz (150 $\mu\text{E m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e 8 h de escuro, à 24°C. Após a germinação, foi adicionado o peptídeo AtRALF1 (em alguns ensaios foi adicionado outro peptídeo recombinante ou peptídeo sintético inativo) no meio na concentração de 10 μM e o crescimento de raízes foi medido em 48 h após a adição do mesmo com o auxílio do programa "Image J" (ABRAMOFF; MAGALHAES, 2004). Todos os experimentos foram repetidos no mínimo três vezes, com resultados similares.

3.9 Inibição de alongamento de hipocótilo

Sementes de *arabidopsis* esterilizadas superficialmente foram mantidas por 3 d a 4°C e colocadas em meio contendo sais MS 0,5X (2,165 g/L mistura sais MS,

Phytotechnology[®] M524) sem vitaminas e sacarose (pH 5,6) em placas de 24 poços. Em seguida, foram submetidas à luz ($150 \mu\text{E m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) por 1 h e no escuro por 24 h, a 24°C. Após este tempo, foi adicionado 1, 5 ou 10 μM dos peptídeos e o alongamento do hipocótilo foi medida em 48 h após a adição dos mesmos com o auxílio do programa "Image J" (ABRAMOFF; MAGALHAES, 2004). Todos os experimentos foram repetidos no mínimo três vezes, com resultados similares.

3.10 Digestão das proteínas recombinantes por tripsina e análise por espectrometria de massas

A digestão por tripsina dos diferentes peptídeos recombinantes foi realizada após sua separação em HPLC. O pico majoritário correspondente à proteína de interesse foi coletado e incubado com 75 nM de bicarbonato de amônio em 40% (v/v) de etanol por 60 min a temperatura ambiente. Após este tempo, 5 mM de ditioneitol (DTT) em 25 mM de bicarbonato de amônio foi adicionado por 30 min a 60°C para a redução da proteína, seguida de uma reação de alquilação usando 55 mM de iodoacetamida em 25 mM de bicarbonato de amônio por mais 30 min a temperatura ambiente e no escuro. Para a reação de digestão, uma solução contendo 40 mg/mL de tripsina em 50 mM de bicarbonato de amônio foi adicionada por 45 min no gelo, seguida de uma incubação a 30°C por 16 h. A reação final foi seca à vácuo e enviada para a Central Analítica da Universidade de São Paulo (USP) para análise usando a técnica de ESI-TOF (*Electrospray Ionization-Time of Flight*).

3.11. qRT-PCR

Células em suspensão de arabidopsis MM1 (MENGES; MURRAY, 2002) foram tratadas com os diferentes peptídeos ou químicos para posterior análise da indução de genes por PCR semi-quantitativo. Foi utilizado 1 mL de células em suspensão para cada tratamento. Células em suspensão utilizadas como controle foram incubadas nas mesmas condições porém sem os peptídeos ou químicos. Em seguida, o RNA total foi isolado usando o reagente Trizol (Life Technologies), seguindo recomendações dos fabricantes. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 μg de RNA usando o sistema *ImProm-II Reverse Transcription* (Promega). A análise de qRT-PCR foi realizada usando cDNA diluído 10 vezes, Maxima SyBR Green Rox/qPCR Master Mix (Thermo Scientific) e um StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Foram analisados os genes induzidos por AtRALF1: “*proline-*

rich protein 3” (PRP3) e “*hydroxyproline-rich glycoprotein*” (HRGP2). O gene “*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*” (GAPDH) foi usado novamente como controle, para expressão gênica não alterada durante o experimento. Reações sem cDNA foram usadas como controle negativo. Três replicatas foram analisadas para cada amostra biológica. Duas amostras biológicas foram utilizadas. O ciclo limiar (CT) foi determinado automaticamente pelo aparelho e a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) foi usada para calcular o nível de expressão de cada gene. O valor arbitrário 1 foi atribuído aos tratamentos controle. Todos os experimentos foram repetidos no mínimo três vezes, com resultados similares.

3.12 Gel indicador de pH

Para confecção do gel indicador de pH foram adicionados em água destilada 0,006% de bromocresol purple, 1 mM de CaSO_4 em pH final de 5,7 (WU et al., 2007). Plantas de *arabidopsis* foram crescidas por 7 d em placa vertical contendo meio com sais MS 0,5X (2,165 g/L mistura sais MS, Phytotechnology® M524) sem vitaminas e sacarose (pH 5,6) e, posteriormente, transferidas para o gel indicador de pH. Para que não haja danos na retirada das plântulas das placas, foi utilizado 12 g de Phytigel® por litro de meio. No caso das plantas tratadas com peptídeos RALF, um buquê de aproximadamente 25 plantas é retirado da placa e tratado com os peptídeos recombinantes nas diferentes doses (0, 0,3 e 10 μM) por 15 min. Após o tratamento, as plantas são colocadas, brevemente, em contato com um papel filtro para retirada do excesso de solução, e são então transferidas para o gel indicador de pH. O registro da mudança de coloração no gel se dá 30 min após transferência das plantas. Todos os experimentos foram repetidos no mínimo três vezes, com resultados similares.

3.13 Análises estatísticas

O software Infostat Statistics Base package (version 2012e, Córdoba, Argentina) foi usado para as análises estatísticas. A comparação das médias foi realizada usando o teste de Tukey, juntamente com análise de variância (STEEL et al., 1996). Para a comparação de médias, o teste de Student T (http://www.chem.uoa.gr/applets/AppletTtest/Appl_Ttest2.html) foi usado com significância de $P < 0,1$, 0,05 e 0,01.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do pH extracelular e inibição do aumento do volume de células através da técnica do volume de células decantadas (VCD)

O volume de células decantadas (VCD) é uma técnica utilizada para avaliação de alterações no volume de células em suspensão. A alteração do volume das células é um somatório dos efeitos da expansão e da divisão celular. Uma vez que AtRALF1 inibe a expansão celular, espera-se uma redução do VCD em células tratadas com o peptídeo. Como a avaliação do pH do meio extracelular é feita em células em suspensão, a técnica do VCD possibilita que as atividades de alcalinização e expansão celular sejam avaliadas em uma mesma unidade experimental, fato este que não é possível em nenhum outro ensaio.

Frascos contendo células em suspensão de arabisidopsis tiveram o pH do meio extracelular avaliados em 0 e 5 min e, posteriormente, em 6 h, 24 h e 48 h após os tratamentos. Como não é esperada uma alteração rápida do volume das células, o VCD foi avaliado nos mesmos tempos exceto aquele que seria feito em 5 min. A adição do peptídeo AtRALF1 resultou em um aumento de aproximadamente uma unidade de pH. Esta alcalinização foi percebida em 5 min após a adição do peptídeo. Após 6 h da adição do peptídeo, o pH do meio de cultivo retornou aos níveis iniciais, mantendo-se assim até o final do experimento (Figura 1A). O VCD de células tratadas com AtRALF1 permaneceu inalterado no primeiro tempo de coleta, 6 h, aumentou 5% após 24 h e somente mostrou aumento significativo, 45%, após 48 h do início do tratamento (Figura 1B). Células tratadas com água, tratamento controle, apresentaram incremento no VCD na ordem de 27% após 6h, 33% após 24 h e, em 48 h, o VCD das células controle teve um aumento de 63% em relação ao início do experimento (Figura 1B). Na Figura 1C são mostradas imagens representativas do VCD de células tratadas com AtRALF1 e controle após 24 h do início do experimento. A alcalinização causada pelo peptídeo AtRALF1 é rápida e efêmera, diferente do efeito no VCD que é tardio e duradouro. Estes resultados sugerem uma falta de relação causa-efeito entre a alcalinização e redução do VCD.

Figura 1- Efeito do AtRALF1 na alcalinização e no volume de células decantadas (VCD). (A) Medidas do pH do meio extracelular de células em suspensão de arabis (MM1) tratadas com água (linha tracejada) ou 2 μ M de AtRALF1 (linha cheia). O pH foi medido nos tempos 0, 5 min, 6 h, 24 h e 48 h. (B) VCD. Frascos contendo 5 mL de células em suspensão foram decantados em cilindros graduados (seringas) nos tempos indicados. (C) imagens representativas do VCD avaliados 24 h após o tratamento com água (Ctr) ou 2 μ M de AtRALF1. Ctr, controle. R, AtRALF1.

4.2 Tamponamento do meio extracelular não impede o efeito inibitório do AtRALF1 no VCD

Células em suspensão de arabisopsis foram mantidas em meio tamponado com ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico (MES, pH 5,4) para avaliação do efeito do AtRALF1 em condições de pH extracelular estável. A avaliação do efeito do peptídeo foi feita por intermédio do VCD. O pH inicial do meio extracelular em células com ou sem MES foi semelhante, 5,3. Após a adição de AtRALF1, o meio de cultivo de células não tamponadas aumentou o pH de 5,3 para 6,5 em 5 min. Com a mesma dose de AtRALF1, o meio de cultivo de células tamponadas com MES aumentou o pH de 5,3 para 5,4 (Figura 2A). Nos demais tempos avaliados houve uma queda de pH em todos os tratamentos, sendo que células tratadas com AtRALF1 acidificaram mais o meio extracelular em relação ao controle (Figura 2A). A análise do VCD no tempo zero mostra que os frascos contendo meio de cultivo tamponado começaram com um volume pouco maior de células em relação ao controle, de 400 μ L para 300 μ L, respectivamente. Em 6 h de experimento, ambas as células tamponadas ou não já apresentam redução de VCD quando tratadas com o peptídeo, sendo que as células não tamponadas apresentam redução maior, de 33%. Células tamponadas, neste mesmo intervalo, apresentam redução de VCD de 16%. Já na avaliação em 24 h e 48 h, percebe-se que a inibição do VCD foi semelhante entre o tratamento e o controle. Células tamponadas e acrescidas de peptídeo tiveram uma redução de PCV de 30%, enquanto que células controle tiveram a redução de 40%. Em 48 h de experimento, células cujo meio de cultivo foi tamponado e acrescido de AtRALF1, apresentam VCD ainda menor em relação ao controle, na ordem de 45% de redução em relação ao controle (Figura 2B). A imagem representativa do experimento é mostrada na figura Figura 2C. Quando o peptídeo AtRALF1 teve seu efeito alcalinizador do meio extracelular inibido, devido à presença do tampão MES, a atividade biológica de redução do VCD foi mantida.

Figura 2 – Efeito do AtRALF1 na alcalinização e no volume de células decantadas (VCD) em meio de cultivo tamponado com MES. (A) Medidas do pH do meio extracelular de células em suspensão de arabidopsis (MM1) tratadas com água (barras cinzas) ou 2 μ M de AtRALF1 (barras pretas). O pH foi medido nos tempos 0, 5 min, 6 h e 24 h em meio de cultivo controle e tamponado. (B) VCD. Frascos contendo 5 mL de células em suspensão foram decantados em cilindros graduados (seringas) por 30 min, nos tempos indicados. (C) Imagens representativas do VCD avaliados 24 h após o tratamento com água (Ctr) ou 2 μ M de AtRALF1. Ctr, controle. R, AtRALF1.

4.3 A acidificação do meio extracelular não impede o efeito inibitório do AtRALF1 no VCD

Células em suspensão de arábido *arabidopsis* foram pré-tratadas com “fusiococcin” (FC) no intuito de avaliar se a alcalinização do meio extracelular é necessária para a redução do VCD. FC se liga ao domínio auto-inibitório das bombas de próton-ATPase localizadas na membrana plasmática, mantendo-as ativas e, conseqüentemente, causa uma redução do pH extracelular (WURTELE et al., 2003). O peptídeo AtRALF1 foi adicionado 10 min após a FC, quando o meio extracelular já apresentava uma acidez de 0,8 unidades de pH em relação ao tratamento controle (Figura 3A). Sem o tratamento prévio com FC e 5 min após a adição do AtRALF1, foi observado um aumento do pH do meio extracelular em 1,1 unidades. Quando AtRALF1 foi adicionado após o pré-tratamento com FC, foi observado um aumento de 0,3 unidades de pH aos 5 min. Mesmo com a adição do peptídeo, o pH do meio extracelular do tratamento com FC seguida de AtRALF1 permaneceu abaixo do pH das células não tratadas em 5 e 30 min após a adição do peptídeo (Figura 3A). Passadas 6 h do início do experimento, o pH extracelular dos quatro tratamentos se assemelhou, em torno de 5,5, sendo que após 24 h e 48 h, o pH destes é praticamente idêntico (Figura 3A). A análise do VCD feita 6 h após o início do experimento mostra que células tratadas com o peptídeo, com ou sem o pré-tratamento com FC, tiveram seu VCD reduzido em 20% quando comparadas ao controle, sendo que o tratamento somente com FC não alterou o VCD (Figura 3B). Após 24 h de experimento, a redução do VCD nos dois tratamentos também é semelhante, em torno de 25%, não sendo observado efeito do tratamento com FC. O mesmo é observado após 48 h do início do experimento, ou seja, a redução do VCD promovida por AtRALF1 em ambos os tratamentos é semelhante (Figura 3B). Fotos representativas dos quatro tratamentos após 24 h de experimento são mostradas na figura 3C. Pode-se notar que ambos os tratamentos com AtRALF1 e FC+AtRALF1 apresentam diminuição de VCD em relação ao controle. Estes resultados permitem concluir que a acidificação do meio extracelular feita de maneira a neutralizar a alcalinização promovida pelo AtRALF1 não impede a redução do VCD causada pelo peptídeo.

Figura 3 – Efeito do AtRALF1 na alcalinização e no volume de células decantadas (VCD) em meio de cultivo pré-tratado com FC. (A) Medidas do pH do meio extracelular de células em suspensão de arabisopsis (MM1) tratadas com água, 2 μ M de AtRALF1, 1 μ M de FC ou 1 μ M de FC + 2 μ M de AtRALF1. O pH foi medido nos tempos 5 min, 30 min, 6 h e 24 h após a adição de AtRALF1 em meio de cultivo controle ou pré-tratado com FC. (B) VCD. Frascos contendo 5 mL de células em suspensão foram decantados por 30 min nos tempos indicados. Controle (Ctr), AtRALF1 (R), pré-tratados com Fusicoccin (FC em vermelho) (C) imagens representativas do VCD avaliados 24 h após o tratamento com água (Ctr), 2 μ M de AtRALF1, 1 μ M de FC ou 1 μ M de FC + 2 μ M de AtRALF1.

4.4 Produção heteróloga de peptídeos mutantes

Uma segunda estratégia adotada para investigar a relação existente entre as atividades de alcalinização e inibição da expansão celular foi o uso de peptídeos mutantes em ensaios de inibição do crescimento de raiz primária e de alcalinização do meio extracelular de células em suspensão. Morato do Canto et al. (2014) caracterizaram nove isoformas do peptídeo RALF de *arabidopsis* e sugeriram, com base na alta identidade de estrutura primária, que são poucos os aminoácidos determinantes da atividade de alcalinização (Figura 4).

NtRALF	ATKK---	YISYGALQKNSVPCS-RRGASYYN--C-KPGAOANP	YSRGC	SAITRORS
ATRAlF1	ATTK---	YISYQSLKNSVPCS-RRGASYYN--C-QNGAOANP	YSRGC	SKTARORS
ATRAlF4	ARGRR--	YICYDALKKNNVPCS-RRGRSYD--C-KKR	RNNP	YSRGC
ATRAlF19	AARRS--	YISYGALRKNNVPCS-RRGRSYD--C-KKRKRANP	YSRGC	SVITHCYRYAR
ATRAlF22	AQKK---	YISYGAMRRNSVPCS-RRGASYYN--C-QRGAQANP	YSRGC	STITRORR
ATRAlF23	ATRR---	YISYGALRRNTIPCS-RRGASYYN--C-RRGAOANP	YSRGC	SAITRORRS
ATRAlF24	MMRKQ--	YISYETLRRDMVPCQ-KPGASYA--C-RSG-OANA	YSRGC	SVITROARDTNDIKT
ATRAlF31	MAQKR--	YICYETLRRDMVPCQ-KPGASYD--C-RSG-OANS	YSRGC	DTITRCARDTNDINT
ATRAlF33	ATTK---	YISYGALRRNTVPCS-RRGASYYN--C-RRGAOANP	YSRGC	SAITRORR
ATRAlF34	YWRRTKY	YISYGALSANRVPCPPRSGRSYYTHNCFRARGPVHP	YSRGC	SSITRORR

Figura 4 – Alinhamento da estrutura primária dos nove peptídeos AtRALFs maduros. O peptídeo originalmente isolado de tabaco (NtRALF) foi incluído para comparação. O sítio dibásico envolvido no processamento do precursor foi usado para determinar o começo dos peptídeos maduros. Os aminoácidos estão representados pelo código de uma letra. Letras com fundo preto indicam aminoácidos idênticos. Aminoácidos mutados estão representados em vermelho.

Com base no alinhamento de estrutura primária dos AtRALFs já caracterizados, foram eleitas 4 alterações (aminoácidos em vermelho na Figura 4), dando origem a três peptídeos mutantes: AtRALF4(N92A), que restaura o motivo -ANPY- ausente na isoforma AtRALF4 que não alcaliniza o meio extracelular; AtRALF4(RRR89GAQ), que restaura o motivo -GAQ- também ausente na isoforma AtRALF4 e presente em 5 outras isoformas ativas quanto a alcalinização; e AtRALF1(A105N), que altera o motivo -ANPY- presente na isoforma AtRALF1 para -NNPY-, assemelhando este peptídeo mutante ao peptídeo AtRALF4. Estes peptídeos mutantes foram clonados, produzidos em *E.coli* e posteriormente quantificados em HPLC. Três perfis cromatográficos são apresentados para demonstrar a pureza dos peptídeos (Figura 5A-C). Os peptídeos recombinantes foram eluídos com 30% de acetonitrila e apresentaram um tempo de retenção, nas condições utilizadas, de aproximadamente 17 min. A identidade dos três peptídeos mutantes foi confirmada por espectrometria de massa (Anexo B). O rendimento de produção para os três peptídeos é semelhante, na ordem de 1,2 mg/L de cultura de bactéria induzida.

Figura 5 – Cromatogramas dos peptídeos mutantes purificados. (A) AtRALF4(N92A). (B) AtRALF4(RRR89GAQ). (C) AtRALF1(A105N). Os peptídeos purificados (50 μ g de cada) foram injetados em uma coluna de fase reversa C18 (5 μ m, 4.6 x 250 mm, Agilent) e foram eluídos com um gradiente de 2 a 30 min de 0 a 50% acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico.

4.5 As atividades biológicas dos peptídeos mutantes revelam a essencialidade da alanina do motivo -ANPY- para a inibição da expansão celular

O peptídeo AtRALF4 não apresenta atividade inibitória da expansão celular e possui uma $\frac{1}{2}$ atividade máxima no ensaio de alcalinização 1000 vezes inferior aos demais peptídeos RALF testados (MORATO DO CANTO et al., 2014). Quando o peptídeo mutante AtRALF4(N92A) foi adicionado ao meio de cultivo contendo plantas de *Arabidopsis*, verificou-se que a restauração do motivo -ANPY- encontrado nos demais peptídeos RALF foi suficiente para resgatar o efeito inibitório da expansão celular, avaliado neste experimento por meio da inibição da raiz primária e do hipocótilo (Figura 6A e B). Raízes primárias de plantas controle cresceram 0,18 cm, enquanto que raízes de plantas tratadas com 2, 5 e 10 μ M do peptídeo mutante AtRALF4(N92A) cresceram 0,15, 0,14 e 0,11 cm respectivamente. Precedendo o motivo -ANPY-, a isoforma AtRALF4 apresenta um motivo tribásico, -RRR-, onde a maioria das isoformas apresentam o motivo -GAQ- ou semelhante a ele, GQ/P (Figura 4). Plantas tratadas com o peptídeo mutante AtRALF4(RRR89GAQ), que restaura o motivo -GAQ- no peptídeo AtRALF4, não tiveram suas raízes primárias inibidas, mesmo na dose de 10 μ M (Figura 6A). No ensaio de alongamento de hipocótilos, os resultados foram semelhantes (Figura 6B). O peptídeo mutante AtRALF4(N92A) inibiu o alongamento em 40% e 50% nas doses de 5 e 10 μ M respectivamente. Já o peptídeo AtRALF4(RRR89GAQ) não causou inibição do alongamento superior a 15% na maior dose utilizada (Figura 6B). A

alteração da asparagina pela alanina não teve efeito na atividade de alcalinização do meio extracelular (Figura 6C). Mesmo doses altas como 300 nM do peptídeo mutante AtRALF4(N92A) não surtiram efeito na alcalinização quando comparadas ao tratamento controle com o peptídeo AtRALF1. A alcalinização promovida pelo peptídeo mutante foi de 0,1 unidade de pH. Esta mesma dose para o peptídeo AtRALF1 gera uma alcalinização aproximadamente 85% maior (Figuras 6C, gráfico superior).

Quando o peptídeo mutante AtRALF4(RRR89GAQ) foi adicionado em suspensões celulares na concentração de 300 nM, observou-se uma alcalinização correspondente a 85% da observada no controle positivo AtRALF1 (Figura 6C, gráfico inferior).

Figura 6 – Atividades biológicas dos peptídeos AtRALF4(N92A) e AtRALF4(RRR89GAQ). (A) Ensaio de inibição do crescimento da raiz primária. Plantas de arabidopsis de 3 d foram colocadas em meio contendo 2, 5 e 10 μM dos peptídeos e o tamanho da raiz principal foi registrado após 48 h de tratamento. Valores são médias de no mínimo 20 plantas. (B) Ensaio de inibição do alongamento de hipocótilos. Plantas de arabidopsis de 1 d foram colocadas em meio contendo 2, 5 e 10 μM dos peptídeos e o tamanho do hipocótilo foi registrado após 24 h de tratamento. Os peptídeos AtRALF1 e AtRALF4 foram usados como controles. Ctr, controles. Médias com letras idênticas não são significativamente diferentes umas das outras (Teste Tukey $P \leq 0.01$). (C) Medidas do pH do meio extracelular de células em suspensão de arabidopsis (MM1) tratadas com AtRALF1 (linha contínua), peptídeo mutante AtRALF4(N92A) (gráfico superior), peptídeo mutante AtRALF4(RRR89GAQ) (gráfico inferior) (linha tracejada) e AtRALF4 (linha pontilhada). Nove diferentes concentrações (0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 e 300 nM). Foram avaliadas e as mudanças de pH (Δ pH) foram registradas após 5 min.

Para comprovação da importância da alanina do motivo -ANPY- em RALFs, testou-se o peptídeo mutante AtRALF1(A105N). Neste peptídeo o motivo -ANPY- do AtRALF1 é modificado para -NNPY-, idêntico ao encontrado no peptídeo AtRALF4. O AtRALF1(A105N) mostrou uma redução na sua atividade de inibição da expansão celular medida nos ensaios de inibição da raiz primária e hipocótilo (Figura 7A e B). Nas doses de 2 e 5 μ M o peptídeo mutante não é capaz de causar inibição da expansão celular, porém na dose de 10 μ M o peptídeo mutante inibe em torno de 20%. Quando o mutante AtRALF1(A105N) foi testado no ensaio de alcalinização, a atividade observada foi cerca de 40% menor em relação à isoforma não mutante AtRALF1 (Figura 7C). A análise das atividades biológicas dos peptídeos mutantes sugere que existe um motivo conservado nos peptídeos RALF que é responsável pela atividade de alcalinização do meio extracelular e outro motivo pela atividade de inibição da expansão celular.

Figura 7 - Atividades biológicas do peptídeo mutante AtRALF1(A105N). (A) Ensaio de inibição do crescimento da raiz primária. Plantas de arabisopsis de 3 d dias foram colocadas em meio contendo 2, 5 e 10 μM dos peptídeos e o tamanho da raiz principal foi registrado após 48 h de tratamento. Valores são médias de no mínimo 20 plantas. (B) Ensaio de inibição do alongamento de hipocótilos. Plantas de arabisopsis de 1 d foram colocadas em meio contendo 2, 5 e 10 μM dos peptídeos e o tamanho do hipocótilo foi registrado após 24 h de tratamento. Os peptídeos AtRALF1 e AtRALF4 foram usados como controles. Ctr, controles. Médias com letras idênticas não são significativamente diferentes umas das outras (Teste Tukey. $P \leq 0.01$). (C) Medidas do pH do meio extracelular de células em suspensão de arabisopsis (MM1) tratadas com AtRALF1 (linha contínua), peptídeo mutante AtRALF1(A105N) (linha tracejada) e AtRALF4 (linha pontilhada). Nove diferentes concentrações (0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 e 300 nM). Foram avaliadas e as mudanças de pH (Δ pH) foram registradas após 5 min.

4.6 Genes responsivos a AtRALF1 são induzidos somente pelos peptídeos mutantes que inibem a expansão celular

O peptídeo AtRALF1 induz quatro genes envolvidos em rearranjo de parede celular: os genes que codificam as proteínas ricas em prolina 1 e 3 (*AtPRP1* e *AtPRP3*), a glicoproteína rica em hidroxiprolina 2 (*AtHRGP2*) e a xiloglucana transglicosilase (*TOUCH4*) (BERGONCI et al., 2014). Dois destes genes, *AtPRP3* e *AtHRGP2*, foram utilizados para investigar a indução de genes responsivos a AtRALF1 pelos peptídeos mutantes em células em suspensão. Os peptídeos AtRALF1(A105N) e AtRALF4(N92A), na dose de 100 nM, não alcalinizaram o meio extracelular e somente o AtRALF4(N92A) induziu os genes *AtPRP3* e *AtHRGP2* (Figura 8A-C). O peptídeo AtRALF4(RRR89GAQ) alcalinizou o meio extracelular porém, não foi capaz de induzir os dois genes analisados (Figura 8A-C). Quando uma concentração maior foi utilizada, 500 nM, todos os peptídeos mutantes causaram alcalinização do meio extracelular porém, apenas o AtRALF4(N92A) foi capaz de induzir os dois genes (Figura 9A-C). Na maior dose utilizada, 1000 nM, todos os peptídeos mutantes apresentaram uma elevação do pH superior a 0,6 unidades e, novamente, o peptídeo mutante AtRALF4(N92A) foi o único que induziu os genes responsivos a AtRALF1 (Figura 10A-C). Os dados acima indicam que a simples alcalinização do meio extracelular promovida pelos peptídeos não é suficiente para a indução dos genes responsivos a AtRALF1. Além disso, constata-se que os genes analisados são induzidos, especificamente, por peptídeos que apresentam atividade de inibição da expansão celular.

Figura 8 – Relação entre a alcalinização do meio extracelular e a indução da expressão de genes induzidos por AtRALF1 em suspensões celulares de arabidopsis. A alcalinização causada pelos peptídeos mutantes AtRALF1(A105N), AtRALF4(N92A) e AtRALF4(RRR89GAQ) e pelos peptídeos usados como controle AtRALF1, AtRALF4 e RALF1(9-49) foi avaliada 60 min após a adição de cada peptídeo. Também após 60 min, o RNA total das células foi extraído para análise da expressão gênica por qRT-PCR. O gene “gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase” (*GAPDH*) foi usado como normalizador. Todos os peptídeos foram utilizados na concentração de 100 nM (A) Alcalinização (B) Expressão do gene “glicoproteína rica em hidroxiprolina 2” (*AtHRGP2*). (C) Expressão do gene “proteína rica em prolina 3” (*AtPRP3*). *, ** e *** = $P < 0,1$, $0,05$ e $0,01$ respectivamente (Teste *t*). ns = não significativo. Ctr = controle.

Figura 9 – Relação entre a alcalinização do meio extracelular e a indução da expressão de genes induzidos por AtRALF1 em suspensões celulares de arabidopsis. A alcalinização causada pelos peptídeos mutantes AtRALF1(A105N), AtRALF4(N92A) e AtRALF4(RRR89GAQ) e pelos peptídeos usados como controle AtRALF1, AtRALF4 e RALF1(9-49) foi avaliada 60 min após a adição de cada peptídeo. Também após 60 min, o RNA total das células foi extraído para análise da expressão gênica por qRT-PCR. O gene “gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase” (*GAPDH*) foi usado como normalizador. Todos os peptídeos foram utilizados na concentração de 500 nM (A) Alcalinização (B) Expressão do gene “glicoproteína rica em hidroxiprolina 2” (*AtHRGP2*). (C) Expressão do gene “proteína rica em prolina 3” (*AtPRP3*). *, ** e *** = $P < 0,1$, $0,05$ e $0,01$ respectivamente (Teste *t*). ns = não significativo. Ctr = controle.

Figura 10 – Relação entre a alcalinização do meio extracelular e a indução da expressão de genes induzidos por AtRALF1 em suspensões celulares de arabidopsis. A alcalinização causada pelos peptídeos mutantes AtRALF1(A105N), AtRALF4(N92A) e AtRALF4(RRR89GAQ) e pelos peptídeos usados como controle AtRALF1, AtRALF4 e RALF1(9-49) foi avaliada 60 min após a adição de cada peptídeo. Também após 60 min, o RNA total das células foi extraído para análise da expressão gênica por qRT-PCR. O gene “gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase” (*GAPDH*) foi usado como normalizador. Todos os peptídeos foram utilizados na concentração de 1000 nM (A) Alcalinização (B) Expressão do gene “glicoproteína rica em hidroxiprolina 2” (*AtHRGP2*). (C) Expressão do gene “proteína rica em prolina 3” (*AtPRP3*). *, ** e *** = $P < 0,1$, $0,05$ e $0,01$ respectivamente (Teste *t*). ns = não significativo. Ctr = controle.

4.7 Moduladores da próton-ATPase da membrana plasmática não alteram a expressão de genes induzidos por AtRALF1

No intuito de verificar se a resposta dos genes induzidos por AtRALF1 independe do pH extracelular, dois químicos foram utilizados: eritrosina B (EB), um inibidor intracelular de fosfatases e próton-ATPases que induz alcalinização do meio extracelular e, novamente, a fusicoccin (FC), que se liga a porção auto inibitória das bombas de próton-ATPase, tornando-as constitutivamente ativas, acidificando o meio extracelular. Buscou-se com isso, simular ou anular o efeito alcalinizador do peptídeo AtRALF1. A dose utilizada de EB causa uma alcalinização do meio extracelular semelhante à causada pelo peptídeo AtRALF1 na dose de 1 μ M e a dose utilizada para FC foi suficiente para impedir a alcalinização do meio extracelular promovida pelo peptídeo (Figura 11A). Não houve indução dos genes *AtHRGP2* e *AtPRP3* quando o pH do meio extracelular foi elevado ou reduzido pelo uso da EB ou FC, respectivamente (Figura 11B e 11C). Quando as células foram tratadas simultaneamente com FC e AtRALF1, situação em que a alcalinização do meio causada pelo peptídeo é anulada, os genes *AtPRP3* e *AtHRGP2* foram induzidos de forma idêntica a células tratadas somente com AtRALF1 (Figura 11B e 11C). A modulação da atividade das bombas de próton-ATPase por si só não é capaz de alterar a expressão dos genes responsivos a AtRALF1 e, quando o peptídeo AtRALF1 não foi capaz de alcalinizar o meio extracelular, a indução dos genes se manteve inalterada.

Figura 11 – Relação entre a alcalinização do meio extracelular e a indução da expressão de genes induzidos por AtRALF1 em suspensões celulares de arábido. As alterações no pH extracelular causadas pelas drogas Eritrosina B (EB), Fusicoccin (FC) e pelo peptídeo AtRALF1 foram avaliada 60 min após a adição de cada tratamento. Também após 60 min, o RNA total das células foi extraído para análise da expressão gênica por qRT-PCR. O gene “gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase” (*GAPDH*) foi usado como normalizador. As concentrações utilizadas foram AtRALF1 1 μM , Eritrosina B 10 μM e Fusicoccin 1 μM . (A) Alcalinização (B) Expressão do gene “glicoproteína rica em hidroxiprolina 2” (*AtHRGP2*). (C) Expressão do gene “proteína rica em prolina 3” (*AtPRP3*). *, ** e *** = $P < 0,1$, $0,05$ e $0,01$ respectivamente (Teste *t*). ns = não significativo. Ctr = controle.

4.8 A inibição da expansão celular causada por AtRALF1 é independente do tamponamento do meio extracelular

Para a validação das observações feitas em suspensões celulares, plantas de *arabidopsis* foram crescidas em meio tamponado (tampão citrato/fosfato) nos pHs 3,8, 5,8 e 7,8. Nas duas concentrações de AtRALF1 utilizadas, 2 e 10 μM , foi observada uma inibição da raiz primária semelhante a observada no tratamento controle, no qual o meio não foi tamponado. O tratamento controle tem um maior crescimento das raízes primárias em relação aos tratamentos tamponados, de 0,09 cm para 0,06 cm. As porcentagens de inibição do alongamento celular verificadas através das raízes primárias, entretanto, são bem próximas quando analisadas em proporção. Tanto plantas controle como tamponadas apresentam inibição do crescimento de raízes primárias na ordem de 25% quando submetidas a 2 μM de AtRALF1. Da mesma forma, quando submetidas a 10 μM do peptídeo, ambos os tratamentos controle e tamponado apresentam inibição do crescimento de raízes primárias de 50% (Figura 12). Este experimento permite concluir que a atividade de inibição da expansão celular promovida por AtRALF1 independe do tamponamento do pH do meio de cultivo.

Figura 12 – Relação entre a inibição do crescimento de raízes primárias induzida por AtRALF1 e tamponamento do meio de cultivo de plantas de *arabidopsis*. Inibição do crescimento de raízes primárias de plantas de *arabidopsis* selvagens de 5 d tratadas com AtRALF1 (2 μM e 10 μM) em diferentes pHs (tampão citrato/fosfato). Meio não tamponado em pH 5,8 foi usado como controle positivo. *** = $P < 0,01$ (Teste t).

4.9 O pH da rizosfera de plantas que superexpressam AtRALF1 ou que são tratadas com diferentes peptídeos não condiciona a inibição da expansão celular à alcalinização

Plantas que superexpressam o peptídeo AtRALF1 (p35S:AtRALF1) possuem fenótipo semi-anão, raízes curtas de aproximadamente 35% do tamanho de raízes de plantas selvagens ou não-transgênicas e células radiculares menores, não expandidas (MATOS et al., 2008; BERGONCI et al., 2014). Plantas p35S:AtRALF1, quando crescidas em meio indicador de pH, mostram a mesma coloração amarela da rizosfera de plantas selvagens não-transgênicas, indicativo de que o pH é ácido. Esta observação foi feita 72 e 96 h após a transferência das plantas para o meio indicador de pH. Uma coloração amarela ainda mais intensa é observada 96 h após a transferência (Figura 13).

Figura 13 – Plantas que superexpressam o peptídeo AtRALF1 (p35S:AtRALF1) e plantas selvagens (wt) mostram coloração amarela na rizosfera, indicativo de acidificação do meio. Plantas de arabisopsis foram crescidas por 7 d em placa vertical e transferidas para meio indicador de pH (0,006% Bromocresol purple, 1mM CaSO₄, pH 5,7). As fotos foram tiradas 72 e 96 h após a transferência das plantas para o meio.

AtRALF4 não inibe o crescimento da raiz primária em doses tão altas quanto 10 μ M (MORATO DO CANTO et al., 2014 e Figura 6); no entanto, no ensaio de alcalinização usando células em suspensão, AtRALF4 causa alcalinização na dose de 1 μ M (Figura 10).

Para determinar o efeito do peptídeo AtRALF4 no pH da rizosfera, plantas tratadas com 0,3 e 10 μ M do peptídeo AtRALF4 foram colocadas em meio indicador de pH. A dose de 0,3 μ M de AtRALF4 não causou mudança na coloração do gel indicador de pH, entretanto, na dose de 10 μ M foi observada uma alteração na coloração do indicador (de amarelo para roxo), indicando aumento de pH (Figura 14). Os peptídeos AtRALF1 e AtRALF23 foram usados como controles positivos uma vez que são potentes indutores de alcalinização. Já o peptídeo mutante que não apresenta o domínio conservado -YISY- foi utilizado como controle negativo (Figura 14). Buquês contendo entre 25 e 30 plantas foram usados para maximizar a resposta e facilitar a visualização. A ausência de alcalinização da rizosfera de plantas que superexpressam AtRALF1, bem como a alcalinização promovida por AtRALF4 sugerem uma independência entre as atividades de alcalinização e inibição da expansão celular.

Figura 14 – O peptídeo AtRALF4 é capaz de promover alcalinização da rizosfera. Plantas de *Arabidopsis* foram crescidas por 7 d em placa vertical contendo MS 1/2F semi-sólido, e posteriormente tratadas com 0,3 ou 10 μM dos peptídeos. Peptídeos AtRALF1 e AtRALF23 foram usados como controle positivo (MORATO DO CANTO et al., 2014). O peptídeo mutante RALF1(9-49) foi usado como controle negativo (PEARCE et al., 2010).

4.10 O peptídeo de defesa AtPEP1 alcaliniza a rizosfera e a alcalinização é independente de sua percepção pelos receptores AtPEPR1 e AtPEPR2

Peptídeos elicitores de defesa AtPEP, a exemplo dos peptídeos RALF, alcalinizam o meio extracelular (HUFFAKER; PEARCE; RYAN, 2006). Para verificar se esta resposta de alcalinização é dependente dos receptores AtPEPR1/R2, utilizou-se o gel indicador de pH em plantas mutantes para ambos os receptores de AtPEP1 (*atpepr1/r2*). Plantas de *arabidopsis* quando tratadas com 0,1 μ M de AtPEP1 e colocadas em gel indicador de pH causaram alteração da coloração ao redor das raízes, de amarelo para roxo, indicando aumento de pH. Plantas mutantes *atpepr1/r2* tratadas de forma idêntica causaram uma mudança de coloração semelhante à apresentada por plantas selvagens (Figura 15A). A confirmação do duplo mutante foi feita por PCR. A análise mostra que os genes que codificam para os receptores AtPEPR1/R2 não são expressos em plantas mutantes (Figura 15B). Os dados mostram que a percepção do peptídeo AtPEP1 ainda ocorre em duplo mutante para os receptores (*atpepr1/r2*), sugerindo a existência de outros receptores.

Figura 15 - Alcalinização da rizosfera de plantas selvagens e do duplo mutante para os receptores de AtPEP1 (*atpepr1/r2*) em resposta a AtPEP1. (A) Plantas foram crescidas verticalmente em meio MS 0,5x por 7 d e depois transferidas para placas contendo gel indicador de pH (0,006% bromocresol purple, 1 mM CaSO₄, pH 5,7) (WU et al., 2007). Ambos os genótipos, selvagem e duplo mutante *atpepr1/r2*, foram submetidos à concentração final de 0,1 μ M do peptídeo. (B) Confirmação do duplo mutante *atpepr1/r2*. Análise de expressão dos mRNAs (cDNAs) dos genes *AtPEPR1* e *AtPEPR2* nos genótipos selvagens e *atpepr1/r2*. A expressão da ubiquitina foi usada como controle.

4.11 Efeito de moduladores da próton-ATPase da membrana plasmática na expressão de genes induzidos por AtPEP1

Para se verificar se os genes responsivos a AtPEP1 alterariam suas expressões em resposta a mudanças no pH extracelular, assim como foi feito para o AtRALF1, utilizou-se Eritrosina B (EB) e Fusicoccin (FC) para promover alcalinização e acidificação do meio extracelular respectivamente. Os genes escolhidos, responsivos ao AtPEP1, foram a defensina (*PDF1.2*) e um o fator transcricional *WRKY33* (QI et al., 2010).

O efeito da EB no pH do meio extracelular, na dose utilizada, foi semelhante ao causado por AtPEP1, ou seja, ambos causaram um aumento de 1,2 unidades de pH. A acidificação promovida pela FC foi de aproximadamente 0,6 unidades de pH. O pré-tratamento com FC seguido da adição do AtPEP1 não foi capaz de impedir a alcalinização promovida pelo peptídeo, mas sim de reduzir para aproximadamente 40% da resposta total (Figura 16A). Os genes *AtWRKY33* e *AtPDF1.2* não foram induzidos pela modulação do pH extracelular mediado pelo uso tanto da EB quanto da FC (Figura 16B e 16C). Além disso, a indução nos dois genes responsivos analisados promovida por AtPEP1 foi semelhante tanto para o tratamento somente com o peptídeo, quanto para o pré-tratamento com FC seguido da adição do peptídeo (Figura 16B e 16C). A modulação da atividade das bombas de próton-ATPase por si só não é capaz de alterar a expressão dos genes responsivos a AtPEP1. Além disso, quando o peptídeo teve sua atividade de alcalinização diminuída pela ação da FC, a sua atividade de indução dos genes se manteve inalterada.

Figura 16 - Relação entre a alcalinização do meio extracelular e a indução da expressão de genes induzidos por AtPEP1 em suspensões celulares de arabidopsis. As alterações no pH extracelular causadas pelas drogas Eritrosina B (EB), Fusicoccin (FC) e pelo peptídeo AtPEP1 foram avaliada 60 min após a adição de cada tratamento. Também após 60 min, o RNA total das células foi extraído para análise da expressão gênica por qRT-PCR. O gene “gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase” (*GAPDH*) foi usado como normalizador. As concentrações utilizadas foram AtPEP1 0,1 μ M, Eritrosina B 10 μ M e Fusicoccin 1 μ M. (A) Alcalinização (B) Expressão do gene *AtWRKY33*. (C) Expressão do gene defensina (*AtPDF1.2*). *, ** e *** = $P < 0,1$, 0,05 e 0,01 respectivamente (Teste *t*). ns = não significativo. Ctr = controle.

5 DISCUSSÃO

Peptídeos RALF foram descobertos por terem atividade no ensaio de alcalinização do meio extracelular de células em suspensão de tabaco (PEARCE et al., 2001). Uma vez que este ensaio é apropriado para se verificar o pH extracelular, buscou-se também avaliar no mesmo modelo de suspensões celulares, a atividade de inibição da expansão celular. Para tanto, utilizou-se o volume de células decantadas (VCD) em suspensões celulares de *arabidopsis* (Figura 1A-C). Os peptídeos RALF recebem este nome por apresentarem uma forte e rápida, porém transiente, alcalinização do meio extracelular (PEARCE et al., 2001; MORATO DO CANTO et al., 2014). No experimento de VCD (Figura 1A) pode-se notar que mesmo em doses altas como 2 μ M, a atividade de alcalinização mantém sua efemeridade. Após 6 h da adição do peptídeo AtRALF1, o pH extracelular já retornou aos valores encontrados em células não tratadas, enquanto que a maior inibição do VCD registrada se dá após 24 h da adição do peptídeo (Figura 1B). Embora o VCD seja um somatório dos efeitos na expansão celular e no aumento do número de células, pelo fato do RALF agir na inibição da expansão celular, assume-se que a diminuição do VCD causada pelo RALF seja uma consequência da inibição da expansão celular. Comparando-se o tempo em que ocorre a alcalinização com o da constatação da redução do VCD, percebe-se uma discrepância entre as duas atividades, incompatível com uma relação de causa e efeito. Para o hormônio vegetal auxina, por exemplo, a acidificação máxima do pH extracelular se dá após 4 h da adição do mesmo. O crescimento máximo promovido por este hormônio, de maneira semelhante, ocorre entre 3 e 4 h após sua adição. Já para peptídeos RALF, a alcalinização do meio extracelular deixa de ser percebida após 6 h de tratamento, enquanto que a redução do VCD ainda é observada mesmo após 48 h de tratamento. (Figura 1A-C) (KUTSCHERA; SCHOPFER, 1985).

Uma vez constatada a incompatibilidade temporal das atividades de alcalinização do meio extracelular e de inibição da expansão, decidiu-se por verificar se células em suspensão de *arabidopsis* teriam seu VCD reduzido mesmo em situações de experimentação nas quais o peptídeo AtRALF1 fosse incapaz de causar alcalinização. Para isso, utilizou-se o tampão MES, que já foi relatado como um forte tampão do pH apoplástico, tendo tamponado de maneira eficiente até mesmo plantas tratadas com o ativador de bombas de próton-ATPase “fusococcin” (BIBIKOVA et al., 1998). A alcalinização causada pelo AtRALF1 na presença de MES foi reduzida em mais de 90%, porém, a atividade de redução do VCD se manteve (Figura 2A-C).

A toxina “fusicoccin” (FC) é um forte ativador das bombas de próton-ATPase, utilizada para se estudar dinâmicas e trocas iônicas através da membrana (Revisado em BOER; LEEUWEN, 2012). Em um estudo sobre o peptídeo de defesa sistemina, a FC foi empregada para demonstrar que mudanças no pH não são necessárias nem suficientes para ativação de proteínas quinases ativadas por mitógeno, sugerindo duas vias de sinalização distintas nestes peptídeos (HIGGINS et al., 2007). No trabalho aqui apresentado, a FC foi utilizada de forma semelhante e os resultados também sugerem duas vias distintas para peptídeos RALF (Figura 3A-C). Os dados obtidos através da análise do VCD, em suma, sugerem que as atividades de alcalinização do meio extracelular e inibição da expansão celular promovidas por peptídeos RALF podem ser dissociadas.

Peptídeos RALF são ubíquos e apresentam alta conservação de estrutura primária em todo o reino vegetal (MOURA; SILVA-FILHO, 2006) e em *arabidopsis*, as 37 isoformas até agora identificadas possuem vários domínios conservados entre si (OLSEN et al., 2002). Quando nove peptídeos RALF de *arabidopsis* foram produzidos e testados quanto às suas atividades biológicas, foi constatado que somente o AtRALF4 possuía atividade diferenciada. AtRALF4 não inibe o crescimento de raízes e possui baixa atividade de alcalinização do meio extracelular (MORATO DO CANTO et al., 2014). Uma vez que poucos aminoácidos diferem entre a isoforma AtRALF4 e as demais, é de se supor que estes aminoácidos sejam responsáveis pela alteração nas atividades biológicas. O próximo passo para se testar nossa hipótese de dissociação das atividades biológicas foi produzir peptídeos mutantes e testá-los em relação às suas diferentes atividades biológicas. Os resultados obtidos através do uso destes peptídeos mutantes mostram que existem motivos conservados nos peptídeos RALF que reforçam a teoria da dissociação das atividades biológicas de alcalinização e inibição da expansão celular. Isto se dá pelo fato de terem sido identificados dois motivos conservados, sendo que um deles é essencial para a atividade de alcalinização e outro para a de inibição da expansão celular (Figuras 6 e 7). O peptídeo mutante AtRALF4(N92A), apesar de resgatar a função biológica de inibição da expansão celular, não possui a mesma atividade inibitória que o peptídeo controle AtRALF1 (Figura 6A-B). De forma semelhante, o peptídeo AtRALF4(RRR89GAQ) apresenta cerca de 80% da atividade de alcalinização do meio extracelular em relação a AtRALF1 (Figura 7A).

Isto poderia ser explicado pela estrutura dos peptídeos mutantes, que apesar de apresentarem importantes domínios restaurados, ainda diferem em alguns aminoácidos, o que poderia interferir na afinidade entre os peptídeos e os seus respectivos receptores, causando um efeito intermediário entre o AtRALF1 e AtRALF4. Portanto, em um cenário em que

existam ao menos dois receptores distintos para reconhecimento dos peptídeos RALF em raízes de *arabidopsis*, cada domínio acima citado manteria uma estrutura proteica adequada para a ligação nos seus respectivos receptores. De fato, vários indícios na literatura sugerem que peptídeos RALF têm mais de um receptor em *arabidopsis*, como os ensaios de saturação em células em suspensão e os ensaios de ligação com o peptídeo AtRALF1 marcado com radiação em mutantes *fer4* (MORATO DO CANTO et al., 2014; HARUTA et al., 2014).

Recentemente, nosso grupo identificou genes envolvidos no rearranjo da parede celular que respondem, de maneira dose-dependente, ao peptídeo AtRALF1. A hipótese levantada foi que estes genes, quando induzidos pelo peptídeo, levam ao engessamento precoce da parede celular, interrompendo a expansão natural da célula e causando a inibição do alongamento celular (BERGONCI et al., 2014). O próximo experimento visava a avaliação dos diferentes peptídeos mutantes produzidos quanto às suas capacidades de indução dos genes responsivos a AtRALF1. Quando estes peptídeos mutantes foram analisados, somente aqueles capazes de promover a inibição da expansão celular foram também capazes de induzir a expressão dos genes *AtHRGP2* e *AtPRP3* (Figuras 8-10). Vale ressaltar que, em doses acima de 500 nM, todos os peptídeos mutantes apresentam atividade de alcalinização do meio extracelular (Figura 9A e 10A), o que sugere que esta atividade por si só não é suficiente para a indução dos genes. Neste caso, fizemos uso de FC e EB, dois moduladores da H^+ -ATPase da membrana plasmática, para verificar a expressão dos genes responsivos a AtRALF1. De maneira esperada, nenhum destes moduladores foi capaz de afetar a expressão dos genes analisados, sugerindo novamente uma falta de relação entre os efeitos de alcalinização ou alteração de pH apoplástico e inibição da expansão celular (Figura 11).

De acordo com a teoria proposta por HARUTA e colaboradores (2014), existe uma relação direta entre a alcalinização do meio extracelular e a inibição da expansão celular. Os dados até aqui discutidos, entretanto, sugerem um cenário oposto no qual as alterações do pH do meio extracelular não são decisivas aos efeitos inibitórios da expansão celular. De fato, quando avaliamos se o peptídeo AtRALF1 promoveria inibição do crescimento de raízes primárias em meios de cultura tamponados em diferentes faixas de pH, constatamos que o efeito inibitório era independente do pH extracelular (Figura 12). Uma vez que os dados acima sugerem que os peptídeos RALF não precisam modificar o pH do meio extracelular para promoverem inibição da expansão celular, procurou-se verificar se plantas que superexpressam AtRALF1 e que possuem raízes curtas, alteram o pH do meio ao redor das suas raízes. Constatou-se que essas plantas, curiosamente, acidificam o pH da rizosfera de maneira semelhante as plantas selvagens (Figura 13).

A isoforma AtRALF23 quando superexpressa, a exemplo da AtRALF1, gera um severo fenótipo semi-anão, com raízes bastante reduzidas. Quando estas plantas transgênicas foram submetidas a gel indicador de pH, verificou-se que as raízes apresentavam alcalinização de suas rizosferas (SRIVASTAVA et al., 2009). Esta discrepância de resultados pode ser explicada pelo fato de que a isoforma AtRALF23 possui um efeito alcalinizador do meio extracelular mais potente em relação ao mesmo efeito causado por AtRALF1 (MORATO DO CANTO et al., 2014). De fato, quando plantas foram tratadas de maneira exógena com os peptídeos purificados AtRALF1, AtRALF4 e AtRALF23, observou-se que a alteração da coloração em gel indicador de pH se deu em diferentes intensidades, sendo mais intensa para a isoforma AtRALF23 e mais branda para a AtRALF4 (Figura 14). Mesmo que de maneira branda, a isoforma AtRALF4 é capaz de promover alcalinização em rizosferas das plantas a ela expostas, quando adicionada em doses altas como 10 μ M. Nesta mesma dose, contudo, a isoforma referida não é capaz de promover inibição do crescimento de raízes (Figura 6; MORATO DO CANTO et al., 2014). Este fato reforça ainda mais a hipótese da dissociação das atividades, pois não só é possível haver inibição da expansão celular promovida por AtRALF1 sem o efeito de alcalinização (Figuras 2 e 3), como também é possível haver alcalinização da rizosfera sem inibição do crescimento (Figura 14).

O ensaio de alcalinização do meio extracelular é, sobretudo, um experimento para se buscar proteínas biologicamente ativas. Por conseguinte, uma vez terem sido descobertos de forma semelhante, vários peptídeos hormonais em plantas são capazes de alcalinizar o meio extracelular. Peptídeos AtPEPs são exemplos disso, uma vez que são capazes de alcalinizar o meio extracelular em baixíssimas concentrações (HUFFAKER; PEARCE; RYAN, 2006). Dois receptores dos peptídeos AtPEPs foram descobertos e caracterizados em plantas: AtPEPR1 e AtPEPR2. A ausência destas duas proteínas de membrana leva a insensibilidade ao peptídeo AtPEP1, demonstrada tanto na inibição do crescimento de raízes quanto na indução dos genes responsivos (KROL et al 2010). Uma vez que nosso trabalho propõe a alcalinização do meio extracelular como sendo uma segunda fonte de informação inerente aos peptídeos AtPEP1 e AtRALF1, provavelmente percebida de maneira independente, resolveu-se investigar se duplos mutantes deficientes da produção dos dois receptores de AtPEPs acima citados (*atpepr1/r2*) seriam capazes de responder à AtPEP1 em relação à alcalinização da rizosfera. Quando tratado com AtPEP1, o duplo mutante para os receptores *atpepr1/r2* apresentou mudança na coloração do gel indicador de pH, indicando que houve alcalinização da rizosfera (Figura 15).

Na caracterização do receptor AtPEPR1, verificou-se que células em suspensão de tabaco transformadas com este receptor passavam a responder à AtPEP1 em ensaios de alcalinização (YAMAGUCHI et al., 2006). Este resultado poderia indicar que a resposta de alcalinização do meio extracelular é dependente de AtPEPR1, porém, outros relatos na literatura nos levam a reavaliar este resultado. Um estudo realizado com o intuito de se demonstrar que a proteína BRI (Brassinosteroid Insensitive I) de tomate seria o receptor de sistemina em plantas utilizou-se da mesma técnica: transformar células em suspensão de tabaco, insensíveis a sistemina, com o receptor BRI. O trabalho demonstra que a ligação sistemina-BRI passa a ocorrer neste modelo; contudo, ficou estabelecido que receptores BRI, na realidade, não fazem parte da via de sinalização da sistemina (MALINOWSKI et al., 2009). Neste contexto, pode-se supor que a transformação de células em suspensão com um receptor de outra espécie pode gerar uma via de sinalização inespecífica, não necessariamente similar à que ocorre na espécie estudada de origem. Além disso, os autores discutem a possibilidade de células de tabaco não transformadas já apresentarem algumas respostas a sistemina.

Quando avaliada a relação existente entre a alcalinização do meio extracelular e a indução da expressão de genes responsivos a AtPEP1, verificou-se novamente uma independência entre as duas atividades. A alcalinização promovida pela EB não foi capaz de induzir os genes de defesa *AtPDF1.2* ou *WRKY33*, tampouco a FC foi capaz de diminuir a indução dos mesmos (Figura 16). Nota-se que, ao contrário do ocorrido com o peptídeo AtRALF1, a FC não foi eficiente em inibir totalmente a alcalinização promovida por AtPEP1. Uma possibilidade para explicar tal fato seria que peptídeos AtPEP estão relacionados à defesa vegetal, e por esse motivo, teriam sido selecionados para se contrapor ao efeito de moléculas oriundas de patógenos, como é o caso da FC. Peptídeos RALF estão relacionados a desenvolvimento vegetal e, por isso, podem estar atuando em outro ponto de regulação das bombas de próton-ATPases.

Os dados aqui apresentados sugerem duas vias distintas de percepção e possibilitam a formulação de um modelo de percepção do AtRALF1 (Figura 17). Uma das vias de percepção estaria envolvida com fluxo iônico, seria uma via mais rápida. A outra via de percepção estaria relacionada à inibição da expansão celular e exigiria mais tempo para ser ativada. Apesar de dissociadas, estas vias provavelmente compartilham elementos, uma vez que mutantes *feronia*, os quais não respondem a AtRALF1 para fluxo iônico, apresentam também uma leve insensibilidade para o efeito de inibição do crescimento radicular (HARUTA et al., 2014). Desta forma, sugere-se que o peptídeo AtRALF1 é percebido por pelo menos dois

grupos de receptores distintos, sendo que para cada um deles um domínio conservado é reconhecido (Figuras 6-7). O receptor FERONIA é o responsável pela alteração de fluxo iônico, como alcalinização do meio extracelular através da fosforilação da bomba de próton AHA2, aumento da concentração de Ca^{2+} citossólico e, possivelmente, alterações na polarização da membrana plasmática. Essas alterações no fluxo iônico poderiam ser revertidas em uma pequena indução de resposta inibitória do alongamento celular, além de outras sinalizações ainda desconhecidas. Já o segundo complexo de percepção, de identidade ainda a ser revelada, quando da presença de AtRALF1, levaria à ativação de fatores transcricionais que culminariam na indução dos genes envolvidos com o rearranjo da parede celular (BERGONCI et al., 2014; BERGONCI; SILVA-FILHO; MOURA, 2014) resultando em inibição da expansão celular (Figura 17).

Figura 17 - Modelo de ação proposto para o peptídeo AtRALF1. O peptídeo AtRALF1 se liga no receptor FERONIA (FER), e a afinidade por este receptor é relacionada ao motivo conservado -GAQ-, representado em vermelho. Esta ligação inativa a bomba de próton-ATPase AHA2, alcalinizando o meio extracelular por inibir o efluxo de prótons (H⁺). A ligação do peptídeo em FER também promove o aumento na concentração de cálcio (Ca²⁺) no citoplasma e uma provável alteração na polarização da membrana plasmática, culminando em uma indução de genes responsivos no núcleo, com pequena inibição do alongamento celular. AtRALF1 também se liga em outro receptor de identidade desconhecida, pelo qual a afinidade esta relacionada ao domínio conservado -ANPY-, representado em azul, promovendo a indução dos genes responsivos relacionados ao rearranjo da parede celular: *AtPRP3* e *AtHRGP2*. AtRALF1, quando percebido por seus receptores, ativa uma MAP quinase e desencadeia uma cascata de fosforilação. Setas representam ativação e linhas com interseção indicam inibição.

6 CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos neste trabalho, conclui-se que as atividades de alcalinização do meio extracelular e inibição da expansão celular podem ser dissociadas, tanto para peptídeos RALF quanto para AtPEP. Além disso, através do uso do duplo mutante para os receptores de AtPEP, acredita-se que o reconhecimento destes peptídeos seja feito por dois complexos de receptores distintos e independentes. Os dados que embasam estas afirmações são:

- A efemeridade da atividade de alcalinização do meio extracelular promovida por AtRALF1;
- Mesmo em condições nas quais o peptídeo AtRALF1 não foi capaz de produzir alcalinização, o volume de células decantadas pôde ser inibido;
- A existência de dois domínios conservados distintos nos peptídeos ativos, cada qual responsável pela manutenção de uma das atividades biológicas;
- A resposta dos genes induzidos por AtRALF1 é independente de pH e específica para peptídeos capazes de inibir crescimento de raízes e hipocótilos;
- Plantas que super-expressam AtRALF1 não apresentam menor acidificação do gel indicador de pH;
- Peptídeos AtPEP1 são percebidos pelo duplo mutante dos seus receptores (*atpepr1/r2*) em relação à alcalinização da rizosfera.

REFERÊNCIAS

- ALBERT, M. Peptides as triggers of plant defence. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, p. 5269–5279, 2013.
- ATKINSON, N.J.; LILLEY, C.J.; URWIN, P.E. Identification of genes involved in the response of arabidopsis to simultaneous biotic and abiotic stresses. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 162, p. 2028-2041, 2013.
- BERGONCI, T.; RIBEIRO, B.; CECILIATO, P.H.O.; GUERREIRO-ABAD, J.C.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. Arabidopsis thaliana RALF1 opposes brassinosteroid effects on root cell elongation and lateral root formation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, p. 2219-2230, 2014.
- BERGONCI, T.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. Antagonistic relationship between AtRALF1 and brassinosteroid regulates cell expansion-related genes. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 9, p. e976146, 2014.
- BIBIKOVA, T.N.; JACOB, T.; DAHSE, I.; GILROY, S. Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in Arabidopsis thaliana. **Development**, Cambridge, v. 125, p. 2925-2934, 1998.
- BOER, A.H.; LEEUWEN, I.J.V. Fusicoccanes: diterpenes with surprising biological functions. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, p. 360-368, 2012.
- BOYES, D.C.; ZAYED, A.M.; ASCENZI, R.; MCCASKILL, A.J.; HOFFMAN, N.E.; DAVIS, K.R.; GÖRLACH, J. Growth stage–based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 1499–1510, 2001.
- BRAND, U.; GRUNEWALD, M.; HOBE, M.; SIMON, R. Regulation of CLV3 expression by two homeobox genes in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 129, p. 565–575, 2002.
- CAO, J.; SHI, F. Evolution of the RALF gene family in plants: gene duplication and selection patterns. **Evolutionary Bioinformatics**, Auckland, v. 8, p. 271–292, 2012.
- CHEVALIER, E.; LOUBERT-HUDON, A.; MATTON, D.P. ScRALF3, a secreted RALF-like peptide involved in cell–cell communication between the sporophyte and the female gametophyte in a solanaceous species. **The Plant Journal**, Oxford, v. 73, p. 1019–1033, 2013.
- CLARK, S.E.; RUNNING, M.P.; MEYEROWITZ, E.M. CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in Arabidopsis. **Development**, Cambridge, v. 119, p. 397–418, 1993.

CLARK, S.E.; RUNNING, M.P.; MEYEROWITZ, E.M. CLAVATA3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as CLAVATA1.

Development, Cambridge, v. 121, p. 2057–2067, 1995.

CLARK, S.E.; WILLIAMS, R.W.; MEYEROWITZ, E.M. The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. **Cell**, Maryland Heights, v. 89, p. 575–585, 1997.

DARVILL, A.; AUGUR, C.; JONG-JOB, C.; EVERHAARD, S.; HAHN, M.; MARTA, V. Oligosaccharines, oligosaccharide regulatory molecules. **Accounts of Chemical Research**, Washington, DC, v. 25, p. 77–82, 1992.

DI MATTEO, A.; BONIVENTO, D.; TSENOGLOU, D.; FEDERICI, L.; CERVONE, F. 2006 Polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in plant defence: a structural view.

Phytochemistry, Oxford, v. 67, p. 528–533, 2006.

FELIX, G.; BOLLER, T. Systemin induces rapid ion fluxes and ethylene biosynthesis in *Lycopersicon peruvianum* cells. **The Plant Journal**, Oxford, v. 7, p. 381–389, 1995.

FELIX, G.; DURAN, J.D.; VOLKO, S.; BOLLER, T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. **The Plant Journal**, Oxford, v. 18, p. 265–276, 1999.

Fletcher, J.C. Shoot and floral meristem maintenance in arabidopsis. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 45–66, 2002.

FRICK, U.; SCHALLER, A. cDNA microarray analysis of fusicoccin-induced changes in gene expression in tomato plants. **Planta**, Berlin, v. 216, p. 83–94, 2002.

GHORBANI, S.; FERNANDEZ, A.; HILSON, P.; BEECKMAN, T. Signaling Peptides in Plants. **Cell and Developmental Biology**, Boston, v. 3, p. 1–11, 2014.

GREEN, T.R.; RYAN, C.A. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. **Science**, New York, v. 175, p. 776–777, 1972.

HALITSCHKE, R.; GASE, K.; HUI, D.; SCHMIDT, D.D.; BALDWIN, I.T. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VI. Microarray analysis reveals that most herbivore-specific Wc transcriptional changes are mediated by fatty acid-amino acid conjugates. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 131, p. 1894–1902, 2003.

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

HARUTA, M.; MONSHAUSEN, G.; GILROY, S.; SUSSMAN, M.R. A cytoplasmic Ca^{2+} functional assay for identifying and purifying endogenous cell signaling peptides in Arabidopsis seedlings: identification of AtRALF1 peptide. **Biochemistry**, Washington, v. 47, p. 6311–6321, 2008.

HARUTA, M.; SABAT, G.; STECKER, K.; MINKOFF, B.B.; SUSSMAN, M.R. A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion. **Science**, New York, v. 343, p. 408-411, 2014.

HEYMAN, J.; COOLS, T.; VANDENBUSSCHE, F.; HEYNDRICKX, K.S.; VAN LEENE, J.; VERCAUTEREN, I.; VANDERAUWERA, S.; VANDEPOELE, K.; DE JAEGER, G.; VAN DER STRAETEN, D.; DE VEYLDER, L. ERF115 controls root quiescent center cell division and stem cell replenishment. **Science**, New York, v. 342, p. 860-863, 2013.

HIGGINS, R.; LOCKWOOD, T.; HOLLEY, S.; YALAMANCHILI, R.; STRATMANN, J. Changes in extracellular pH are neither required nor sufficient for activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in response to systemin and fusicoccin in tomato. **Planta**, Berlin, v. 225, p. 1535-1546, 2007.

HOLTON, N.; CAÑO-DELGADO, A.; HARRISON, K.; MONTOYA, T.; CHORY, J.; BISHOP, G.J. Tomato BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 is required for systemin-induced root elongation in *Solanum pimpinellifolium* but is not essential for wound signaling. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 1709-1717, 2007.

HUFFAKER, A.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. An endogenous peptide signal in Arabidopsis activates components of the innate immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 103, p. 10098–10103, 2006.

HUFFAKER, A.; RYAN, C.A. Endogenous peptide defense signals in Arabidopsis differentially amplify signaling for the innate immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 104, p. 10732–10736, 2007.

IGASAKI, T.; AKASHI, N.; UJINO-IHARA, T.; MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y.; SHINOHARA, K. Phytosulfokine stimulates somatic embryogenesis in *Cryptomeria japonica*. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 44, p. 1412–1416, 2003.

IZAGUIRRE, M.; SCOPEL, A.L.; BALDWIN, I.T.; BALLARÉ, C.L. Convergent responses to stress. Solar UV-B radiation and *Manduca sexta* herbivory elicit overlapping transcriptional responses in Weld-grown plants of *Nicotiana longiflora*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 132, p. 1755–1767, 2003.

KAYES, J.M.; CLARK, S.E. CLAVATA2, a regulator of meristem and organ development in Arabidopsis. **Development**, Cambridge, v. 125, p. 3843–3851, 1998.

KONDO, T.; YOKOMINE, K.; NAKAGAWA, A.; SAKAGAMI, Y. Analogs of the CLV3 Peptide: Synthesis and Structure-Activity Relationship Focused in Proline Residues. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 52, p. 30-36, 2010.

KROL, E.; MENTZEL, T.; CHINCHILLA, D.; BOLLER, T.; FELIX, G.; KEMMERLING, B.; POSTEL, S.; ARENTS, M.; JEWORUTZKI, E.; AL-RASHEID, K.A.S.; BECKER, D.; HEDRICH, R. Perception of the arabidopsis danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 285, p. 13471–13479, 2010.

KUTSCHERA, U.; SCHOPFER, P. Evidence against the acid-growth theory of auxin action. **Planta**, Berlin, v. 163, p. 483-493, 1985.

LAMESCH, P.; BERARDINI, T.Z.; LI, D.; SWARBRECK, D.; WILKS, C.; SASIDHARAN, R.; MULLER, R.; DREHER, K.; ALEXANDER, D.L.; GARCIAHERNANDEZ, M.; KARTHIKEYAN, A.S.; LEE, C.H.; NELSON, W.D.; PLOETZ, L.; SINGH, S.; WENSEL, A.; HUALA, E. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, p. D1202-D1210, 2012.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, New York, v. 25, p. 402-408, 2001.

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

MATSUBAYASHI, Y.; TAKAGI, L.; SAKAGAMI, Y. Phytosulfokine- α , a sulfated pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells by means of specific high- and low-affinity binding sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 13357–13362, 1997.

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

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

MCGURL, B.; RYAN, C.A. The organization of the prosystemin gene. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 20, p. 405–409, 1992.

MEINDL, T.; BOLLER, T.; FELIX, G. The plant wound hormone systemin binds with the N-terminal part to its receptor but needs the C-terminal part to activate it. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 1561-570, 1998.

MENGES, M.; MURRAY, J.A.H. Synchronous Arabidopsis suspension cultures for analysis of cell cycle gene activity. **The Plant Journal**, Oxford, v. 30, p. 203-212, 2002.

MORATO DO CANTO, A.; CECILIATO, P.H.; RIBEIRO, B.; ORTIZ MOREA, F.A.; FRANCO GARCIA, A.A.; SILVA-FILHO M.C.; MOURA, D.S. Biological activity of nine recombinant AtRALF peptides: implications for their perception and function in Arabidopsis. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 75, p. 45-54, 2014.

MOURA, D.S.; SILVA-FILHO, M.C. Plant peptide hormones, from defense to pollen self-incompatibility, cell fate and development: small peptides as signaling molecules in plants. In: Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology. In: SILVA, J.A .TEIXEIRA da (Org). Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology. Advances and Topical Issues. London: **Global Science Books**, Londres, v. 1, p. 203-209, 2006.

MOYEN, C.; JOHANNES, E. Systemin transiently depolarizes the tomato mesophyll cell membrane and antagonizes fusicoccin-induced extracellular acidification of mesophyll tissue. **Plant Cell Environment**, Oxford, v. 19, p. 464–470, 1996.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473–497, 1962.

MURPHY, E.; SMITH, S.; SMETA, I.D. Small signaling peptides in Arabidopsis development: how cells communicate over a short distance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, p. 3198–3217, 2012.

MURPHY, E.; SMITH, S.; SMETA, I.D. Small signaling peptides in Arabidopsis development: how cells communicate over a short distance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, p. 3198–3217, 2012.

MYSORE, K.S.; CRASTA, O.R.; TUORI, R.P.; FOLKERTS, O.; SWIRSKY, P.B.; MARTIN, G.B. Comprehensive transcript profiling of Pto- and Prf-mediated host defense responses to infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v. 32, p. 299-315, 2002.

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

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

OROZCO-CÁRDENAS, M.L.; RYAN, C.A. Polygalacturonase beta-subunit antisense gene expression in tomato plants leads to a progressive enhanced wound response and necrosis in leaves and abscission of developing flowers. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 133, p. 693–701, 2003.

- PEARCE, G.; JOHNSON, S.; RYAN, C.A. Structure-activity of deleted and substituted systemin, an 18-amino acid polypeptide inducer of plant defensive genes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, p. 212-216, 1993.
- PEARCE, G.; MOURA, D.S.; STRATMANN, J.; RYAN, C.A. RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 12843–12847, 2001.
- PEARCE, G.; YAMAGUCHI, Y.; MUNSKE, G.; RYAN, C.A. Structure–activity studies of RALF, Rapid Alkalinization Factor, reveal an essential – YISY – motif. **Peptides**, New York, v. 31, p. 1973–1977, 2010.
- PLUNKETT, G.; SENEAR, D.F.; ZUROSKE, G.; RYAN, C.A. Proteinase inhibitors I and II from leaves of wounded tomato plants: purification and properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 213, p. 463–472, 1982.
- QI, Z.; VERMA, R.; GEHRING, C.; YAMAGUCHI, Y.; ZHAO, Y.; RYAN, C.A.; BERKOWITZ, G.A. Ca^{2+} signaling by plant *Arabidopsis thaliana* Pep peptides depends on AtPepR1, a receptor with guanylyl cyclase activity, and cGMP-activated Ca^{2+} channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 107, p. 21193–21198, 2010.
- RAYLE, D.L.; CLELAND, R.E. The Acid Growth Theory of auxin induced cell elongation is alive and well. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 99, p. 1271-1274, 1992.
- RYAN C.A. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 425–449, 1990.
- RYAN, C.A. Assay and biochemical properties of the proteinase inhibitor inducing factor, a wound hormone. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 54, p. 328–332, 1974.
- RYAN, C.A.; HUFFAKER, A.; YAMAGUCHI, Y. New insights into innate immunity in *Arabidopsis*. **Cellular Microbiology**, Washington, DC, v. 9, p. 1902-1908, 2007.
- RYAN, C.A.; PEARCE, G. Systemins: a functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in Solanaceae species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 100, p. 14577–14580.
- SCHALLER, A.; OECKING, C. Modulation of plasma membrane H^{+} -ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 263–272, 1999.
- SCHEER, J.M.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. LeRALF, a plant peptide that regulates root growth and development, specifically binds to 25 and 120kDa cell surface membrane proteins of *Lycopersicon peruvianum*. **Planta**, Berlin, v. 221, p. 667-674, 2005.
- SCHILMILLER, A.L.; HOWE, G.A. Systemic signaling in the wound response. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, p. 369-377, 2005.

- SHARMA, V.K.; RAMIREZ, J.; FLETCHER, J.C. The Arabidopsis CLV3-like (CLE) genes are expressed in diverse tissues and encode secreted proteins. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 51, p. 415–425, 2003.
- SRIVASTAVA, R.; LIU, J.; GUO, H.; YIN, Y.; HOWELL, S.H. Regulation and processing of a plant peptide hormone, AtRALF23, in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 59, p. 930–939, 2009.
- STEEL, R.G.; TORRIE, J.H.; DICKEY, D.A. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 1996. 672p.
- WU, J.; KURTEN, E.L.; MONSHAUSEN, G.; HUMMEL, G.M.; GILROY, S.; BALDWIN, I.T. NaRALF, a peptide signal essential for the regulation of root hair tip apoplastic pH in *Nicotiana attenuata*, is required for root hair development and plant growth in native soils. **The Plant Journal**, Oxford, v. 52, p. 877–890, 2007.
- WURTELE, M.; JELICH-OTTMANN, C.; WITTINGHOFER, A.; OECKING, C. Structural view of a fungal toxin acting on a 14-3-3 regulatory complex. **The EMBO journal**, London, v. 22, p. 987–994.
- YAMAGUCHI, Y., PEARCE, G., AND RYAN, C.A. The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in Arabidopsis, is functional in transgenic tobacco cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 103, p. 10104–10109, 2006.
- YAMAKAWA, S.; SAKURAI, C.; MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y.; KAMADA, H.; SATOH, S. The promotive effects of a peptidyl plant growth factor, phytosulfokine, on the formation of adventitious roots and expression of a gene for a root-specific cystatin in cucumber hypocotyls. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 111, p. 453–458, 1998.
- YANG, H.; MATSUBAYASHI, Y.; NAKAMURA, K.; SAKAGAMI, Y. Diversity of Arabidopsis genes encoding precursors for phytosulfokine, a peptide growth factor. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 127, p. 842–551, 2001.
- YANG, H.; MATSUBAYASHI, Y.; NAKAMURA, K.; SAKAGAMI, Y. *Oryza sativa* PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine- α , a sulfated peptide growth factor found in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 96, p. 13560–13565, 1999.
- ZHANG, G.Y.; WU, J.; WANG, X.W. Cloning and expression analysis of a pollen preferential rapid alkalization factor gene, BoRALF1, from broccoli flowers. **Molecular Biology Reports**, Secaucus, v. 37, p. 3273–3281, 2010.

ANEXOS

Anexo A - Primers usados para clonagem dos peptídeos mutantes. Em vermelho são destacados os códons alterados

Gene (locus)	Primer Name	Sequence (5' - 3')
At1g02900	AtRALF1(A105N)-Fw	CACCGCGACCACAAAATACATA AGCT
	AtRALF1(A105N)-Rv	CTAACTCCTGCAACGAGCAATT TTGCTGCAACCACGACTATAAG GATTATTCTGAGCTCC
At1g28270	AtRALF4(N92A)-Fw	CACCGCAAGAGGACGTCGTTA CATT
	AtRALF4(N92A)-Rv	TTAGCGAGCGTACCTATAGCAA TGCGTGATGGCACTGCATCCAC GCCTGTAAGGATTATTCTGAGC TCCAGCCTTGCAA
	AtRALF4(RRR89GAQ)-Fw	CACCGCAAGAGGACGTCGTTA CATT
	AtRALF4(RRR89GAQ)-Rv	TTAGCGAGCGTACCTATAGCAA TGCGTGATGGCACTGCATCCAC GCCTGTAAGGATTATTCTGAGC TCCCTTCTTGCAA

Gene (locus)	Primer Name	Sequence (5' - 3')
At1g13440	GAPDH-Fw	TTGGTGACAACAGGTCAAGCA
	GAPDH-Rv	AAACTTGTCGCTCAATGCAATC
At3g62680	PRP3-Fw	GTTCCGACCCAGCATCATAC
	PRP3-Rv	GCAAGTCTCGACCGGAGATA
At5g19800	HRGP2-Fw	CACAGTTGCTAATGGAAACGA
	HRGP2-Rv	CGGCGGTGAATATCTCTTGT
At5g44420	PDF1.2-Fw	AACCTTGAAGGAGCCAAACA
	PDF1.2-Rv	CACACGATTTAGCACCAAAGA
At2g38470	WRKY33-Fw	GAAACAAATGGTGGGAATGG
	WRKY33-Rv	TGTCGTGTGATGCTCTCTCC

Anexo B - Análise de espectrometria de massa dos peptídeos mutantes AtRALFs.

Análise por espectrometria de massa (MALDI) do peptídeo recombinante AtRALF4(N92A) digerido com tripsina. A massa de quatro fragmentos trípticos foi obtida: 932.6, 1098.7, 1147.7 e 2176.2 (fragmentos sublinhados na sequência completa do peptídeo acima do perfil cromatográfico). Em vermelho se encontra o aminoácido mutado.

Análise por espectrometria de massa (MALDI) do peptídeo recombinante AtRALF4(RRR89GAQ) digerido com tripsina. A massa de quatro fragmentos tripticos foi obtida: 1020.5, 1075.5, 1275.5 e 2348.1 (fragmentos sublinhados na sequência completa do peptídeo acima do perfil cromatográfico). Em vermelho se encontra o aminoácido mutado.

Análise por espectrometria de massa (MALDI) do peptídeo recombinante AtRALF4(A105N) digerido com tripsina. A massa de dois fragmentos trípticos foi obtida: 2162.0 e 2219.0. (fragmentos sublinhados na sequência completa do peptídeo acima do perfil cromatográfico). Em vermelho se encontra o aminoácido mutado.