

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

**Identificação de interatores putativos envolvidos na localização de proteínas
de duplo direcionamento em *Arabidopsis thaliana***

Larissa Spoladore

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

**Piracicaba
2011**

Larissa Spoladore
Bacharel em Ciências Biológicas

Identificação de interatores putativos envolvidos na localização de proteínas de duplo direcionamento em *Arabidopsis thaliana*

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

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

Piracicaba
2011

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

Spoladore, Larissa

Identificação de interatores putativos envolvidos na localização de proteínas de duplo direcionamento em *Arabidopsis thaliana* / Larissa Spoladore. - - Piracicaba, 2011.
77 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.
Bibliografia.

1. Clonagem 2. Cloroplastos 3. Linhagem celular 4. Mitocôndrias vegetais 5. Papaverales
6. Proteínas de plantas - Interação I. Título

CDD 581.19245
S762i

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

Dedico a minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço meu orientador, Marcio de Castro Silva Filho, pela orientação e por compartilhar seu entusiasmo e visão. Agradeço especialmente pela confiança e tranquilidade mesmo durante a resolução dos problemas mais difíceis com os projetos.

Muitos agradecimentos ao professor Daniel Scherer de Moura pela ajuda na resolução de diversas situações aparentemente impossíveis que a biologia molecular nos apresenta.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Aos amigos do laboratório, Isabela, Renata, Elaine, Wellington, Fabiana, Thais, Ligia, Ricardo, Flávia e Uiliane por compartilharem a experiência de vocês e se mostrarem sempre dispostos a ajudar uns aos outros e tornar o nosso lab um ótimo ambiente de trabalho.

Agradeço especialmente a Marcela, minha amiga do início ao fim, que me deu apoio em todos os momentos, dentro e fora do lab. Sua amizade e auxílio com o trabalho foram essenciais para mim, espero que você saiba o quanto. E não se preocupe, vamos continuar amigas sempre.

Agradecimentos a Marcelo Brandão pela ajuda com as redes de PPI, que foram essenciais ao direcionamento do trabalho e à Christine Stock, pela orientação com o desenvolvimento dos experimentos de duplo-híbrido. Obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar e esclarecer dúvidas.

Agradeço muito ao Rafael, que é uma pessoa fantástica e que faz de tudo para ajudar. Obrigada pelo apoio e amizade todos os dias.

A meus amigos Izabela, Gabriela, Viviane, Sheila, Aline, Gustavo e Felipe, por continuarem a existir em minha vida. Também agradeço Eveline, Juliana, Luiza, Keini, Juliano, Tiago, Alex, Fernanda, Silvana, Lila e Jeannie, pela companhia e amizade. E a todos meus amigos que mesmo estando distantes, continuam próximos.

A meus pais Edna e Airton, e a meu irmão Felipe, por serem companheiros todos os dias, e por estarem sempre presentes para me ajudar com tudo que eu possa precisar. A meus avós Laura, Benedicto e Arilton (*in memoriam*) e a meus primos, pela amizade sempre.

"What lies behind us and what lies before us are tiny matters compared to what lies within us." — Ralph Waldo Emerson

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Localização subcelular e duplo direcionamento de proteínas	17
2.2 Interação entre proteínas e estudos de redes de PPI (protein-protein interaction)	21
2.3 As proteínas 14-3-3	22
2.4 As tiorredoxinas	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Estudo de redes de interação proteína-proteína	29
3.2 Construções gênicas para os ensaios de duplo-híbrido	29
3.2.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA	29
3.2.2 Amplificação e clonagem das seqüências nos vetores para duplo-híbrido	30
3.3 Ensaios de duplo-híbrido em levedura	31
3.3.1 Biblioteca de cDNA	31
3.3.2 Transformação de levedura para ensaios de duplo-híbrido por varredura (screening)	31
3.3.3 Extração de DNA plasmidial de colônias de levedura com interação positiva	33
4 RESULTADOS	35
4.1 Análises proteína-proteína com redes	35
4.2 Interações proteína-proteína identificadas na varredura (<i>screening</i>) em ensaios de duplo-híbrido em levedura	38
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXOS	69

RESUMO

Identificação de interatores putativos envolvidos na localização de proteínas de duplo direcionamento em *Arabidopsis thaliana*

A maioria das proteínas organelares são codificadas pelo núcleo, sintetizadas no citosol e direcionadas especificamente ao seu destino final. O direcionamento aos diferentes subcompartimentos subcelulares é feito por uma complexa e ampla maquinaria que envolve sequências de direcionamento, proteínas citossólicas e receptores organelares específicos. Entretanto, relativamente pouco se conhece sobre o processo na qual uma proteína recém sintetizada é transportada ao seu destino final. Parte significativa das proteínas destinadas às organelas possui a informação necessária ao seu transporte localizada na extremidade N-terminal. Vários estudos têm buscado caracterizar as etapas que envolvem a localização de uma proteína, desde os estágios iniciais após a sua síntese até os fatores que regulam o seu correto endereçamento. Modificações pós-traducionais, regiões 5'-UTR, região C-terminal, transporte por vias alternativas e interações proteína-proteína podem agir na localização subcelular de proteínas. O estudo de redes biomoleculares se tornou um dos focos de estudo da biologia de sistemas e demonstra um enorme potencial na descoberta de diversos processos biológicos, como as interações proteína-proteína. As proteínas que possuem duplo direcionamento (DD) em *Arabidopsis thaliana* foram analisadas em redes de interação proteína-proteína (PPI) e proteínas que interagem com proteínas de DD foram escolhidas quanto a função e localização para a verificação de um eventual papel dessas proteínas na localização subcelular de outras proteínas. Para tanto, foram realizadas varreduras em ensaios de duplo-híbrido em levedura para os genes de GRF9 (14-3-3) e ATH7 (tiorredoxina tipo h). Os resultados para GRF9 incluem as proteínas peroxidase PRXR1 e dihidrolipoamida acetiltransferase. Já os resultados para ATH7 mostram a interação com glutamina sintetase (AT5G35630.3). A combinação dos estudos *in silico* com a varredura via duplo-híbrido de levedura abrem novas perspectivas no entendimento do controle da localização subcelular de proteínas.

Palavras-chave: Localização subcelular, Duplo direcionamento, Interações proteína-proteína

ABSTRACT

Identification of putative interactors involved in the localization of dual-targeted proteins in *Arabidopsis thaliana*

Most organellar proteins are nuclear encoded, synthesized in the cytosol and then targeted to their destination. Specific subcellular targeting is conducted by a complex machinery for the specific localization of the proteins, which includes targeting sequences, cytosolic proteins and specific organellar receptors. However, little is known about the process that happens from the synthesis of a protein and the transport to its final destination. Most organellar proteins contain the information for their localization in the N-terminal sequence. Many studies have searched to characterize the steps involved in protein targeting, from the early stages after its synthesis to the cytosolic factors regulating its correct localization. Post-translational modifications, 5'-UTR regions, the C-terminal extension on the protein, alternative transport pathways and protein-protein interactions may influence the subcellular location of some proteins. The use of biomolecular networks has become one of the main focus of systems biology studies and possess a major potential in the discovery of several biological processes, such as protein-protein interactions (PPI). Dual-targeted (DT) proteins in *Arabidopsis thaliana* were analyzed through a PPI network, and the proteins displaying interactions with DT proteins were selected by their function and location. The selected proteins were analyzed for their eventual role in the subcellular targeting of other proteins. Screenings in yeast two-hybrid assays were performed for the genes GRF9 (14-3-3) and ATH7 (h-type thioredoxin). The results for GRF9 include a peroxidase (PRXR1) and dihydrolipamide acetyltransferase. The results for ATH7 include glutamine synthetase (AT5G35630.3). Combination of *in silico* analysis with yeast two-hybrid screenings provide new perspectives for understanding the control of subcellular localization.

Keywords: Subcellular localization, Dual targeting, Protein-protein interactions

1 INTRODUÇÃO

Os produtos de milhares de genes em plantas são direcionados a locais específicos na célula por uma maquinaria elaborada de localização que utiliza diversos mecanismos para garantir sua especificidade e eficácia, como informações contidas na seqüência de aminoácidos da proteína (HAEZLEWOOD et al., 2005; PUJOL; MARECHAL-DROUARD; DUCHENE, 2007; MITSCHKE et al. 2009).

Proteínas cujas funções aparentam ser redundantes em estudos *in vitro*, podem possuir papéis bastante diferentes *in vivo* devido a diferenças na destinação subcelular das proteínas, sendo o ambiente específico no qual se encontra essencial a sua correta função em vias metabólicas complexas. A identificação da sub-localização de proteínas auxilia na compreensão de funções celulares como um todo (HAEZLEWOOD et al., 2005).

Durante a evolução dos cloroplastos e mitocôndrias, a maior parte de sua informação genética foi transferida para o núcleo, como informações genéticas altamente especializadas necessárias às funções destas organelas, como fosforilação oxidativa e fotossíntese, dentre outras. No entanto, há genes cujos produtos apresentam funções comuns a ambas organelas, como os genes relacionados à manutenção e expressão do genoma, proteção contra radicais livres, etc. Assim, existem proteínas codificadas por um único gene que são transportadas simultaneamente a mais de uma organela. Estas proteínas são chamadas de proteínas de duplo direcionamento (MACKENZIE, 2005). A localização de parte das proteínas com duplo direcionamento às mitocôndrias e cloroplastos surgiu por um processo de neo-funcionalização, como pode ser observado com as aminoacil-tRNA sintetases (BRANDÃO; SILVA-FILHO, 2011).

O surgimento do duplo direcionamento é anterior à divergência de plantas monocotiledôneas e eudicotiledôneas (UEDA et al, 2008). Interessantemente, o duplo direcionamento é observado com maior frequência para as mitocôndrias e cloroplastos (MORGANTE et al., 2009). Duas hipóteses podem ser associadas a este fato: sobreposição de funções nas duas organelas e a observação de que devido ao estabelecimento de um sistema de transporte de proteínas para as mitocôndrias (primeiro evento endossimbionte), algumas das proteínas cloroplastidiais (evento endossimbionte posterior) puderam utilizar a mesma rota previamente estabelecida para as proteínas mitocondriais (PEETERS; SMALL 2001; SILVA-FILHO 2003).

Ultimamente, estudos têm mostrado a existência de diversos fatores celulares que influenciam na localização de proteínas. Ainda existem diversos casos em que a localização subcelular não é explicada pela seqüência de direcionamento presente na região N-terminal do peptídeo (CHRISTENSEN et al., 2005; LEE et al., 1999; IZETA et al., 2003), o que indica que existe ainda muito a se descobrir sobre os métodos de regulação e controle da localização subcelular de proteínas.

Uma maneira de se identificar mecanismos e vias de sinalização envolvidas na localização subcelular, é através do estudo de interações protéicas, que podem fornecer dados importantes sobre interações proteína-proteína, modificações estruturais envolvidas na localização ou sobre proteínas associadas que possuam papel no reconhecimento de proteínas por membranas.

Assim, o objetivo deste estudo foi identificar interações entre proteínas de duplo direcionamento e outras proteínas de *A. thaliana* que pudessem exercer funções na regulação dos mecanismos de direcionamento subcelular em plantas, particularmente no duplo direcionamento a mitocôndrias e cloroplastos.

O estudo visa identificar proteínas que interagem com proteínas de duplo direcionamento utilizando-se a plataforma AtPIN (*Arabidopsis thaliana* Protein Interaction Network: <http://bioinfo.esalq.usp.br/atpin/atpin.pl>) e baseando-se nessa informação, caracterizar experimentalmente as interações de proteínas associadas às de duplo direcionamento através de bibliotecas de cDNA de *A. thaliana* inseridas no sistema duplo-híbrido de levedura.

Esse estudo é importante na elucidação de mecanismos de regulação do duplo direcionamento de proteínas em plantas, nos quais tais proteínas associadas poderiam exercer papel importante.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Localização subcelular e duplo direcionamento de proteínas

A compartimentalização da célula eucariota permitiu a separação de processos bioquímicos, e esses compartimentos encontram condições específicas, como a manutenção de gradientes metabólicos, íons, pH e o estado redox, para a ocorrência de vias metabólicas distintas. As células vegetais compartimentalizaram os processos de fosforilação oxidativa e fotossíntese após os eventos endossimbiontes (MILLAR; WHELAN; SMALL, 2006).

A origem endossimbiótica das organelas se baseia na hipótese que as mitocôndrias e os plastídeos em tempos passados consistiam de bactérias de vida livre que foram incorporadas como compartimentos metabólicos complexos em células eucariotas (TIELENS et al., 2002; VAN DER GIEZEN, 2009). As mitocôndrias e cloroplastos mantiveram seu próprio DNA, sendo que os genomas dessas organelas são bastante reduzidos em comparação a seus ancestrais de vida livre (GRAY, 1999).

Durante milhões de anos de evolução, essas organelas perderam ou transferiram a maior parte de seus genes para o núcleo (MARTIN et al., 1993, WOESE et al. 2000; DYALL; BROWN; JOHNSON, 2004). Os genes transferidos obtiveram sinais de direcionamento para que a proteína codificada pudesse ser traduzida em ribossomos citosólicos e importadas na organela onde realiza suas funções (SCHATZ; DOBBERSTEIN, 1996; AGARRABERES; DICE, 2001; GABRIEL; BUCHANAN; LITHGOW, 2001; MACKENZIE, 2005; MILLAR; WHELAN; SMALL, 2006; MARTIN, 2010).

Assim que a cópia hospedeira do gene tornou-se funcional, com mecanismos para expressão, tradução, importação e função corretos, a cópia do gene na organela foi perdida, completando a transferência gênica endossimbiótica (ALLEN, 2003). A transferência de genes individuais, de mitocôndrias e cloroplastos, provavelmente ocorreu por meio de cDNA transcrito reversamente a partir do mRNA da organela, e este processo aparentemente ainda está ocorrendo (ADAMS; PALMER, 2003).

Assim, a maioria das proteínas organelares são codificadas pelo núcleo, e essas proteínas sintetizadas no citosol devem ser direcionadas à organela correta. Proteínas são importadas a mitocôndrias e aos plastídeos pela ação combinada de translocases protéicas com múltiplas subunidades localizadas nas membranas externas e internas dessas organelas.

A maquinaria de importação na membrana externa cloroplastidial é coordenada pelo complexo TOC. Esse complexo é composto de uma proteína canal (Toc75), dois receptores de GTPase (Toc159 e Toc34), e dois componentes associados dinamicamente (Toc64 e Toc12) (OREB et al., 2008). O principal receptor de pré-proteínas do complexo TOC é o Toc34, que está ancorado à membrana por uma hélice transmembrana na região C-terminal e contém um domínio GTPase localizado no citosol (BALSERA; SOLL; BÖLTER, 2009; MAY; SOLL, 1998; SUN et al., 2002; KOENIG et al., 2008).

Existem visões divergentes sobre os exatos processos de reconhecimento e translocação em cloroplastos, com dois modelos que explicam o reconhecimento de proteínas precursoras, sendo realizado por Toc159 (HILTBRUNNER et al., 2001; SMITH et al., 2004), ou Toc34 (SVESHNIKOVA et al., 2000; BECKER et al., 2004).

O complexo da membrana interna depende do complexo TIC, que em plantas superiores é formado de 7 a 8 proteínas, incluindo Tic110 e Tic20, que formam o canal translocase, a chaperona Tic40 e as proteínas associadas a translocase, Tic55, Tic32 e Tic62 (STENGEL et al., 2007). As funções individuais dessas proteínas ainda são desconhecidas. No entanto, sabe-se que Tic110 possui papel essencial no reconhecimento de pré-proteínas da membrana externa (KOVACHEVA et al., 2005).

A importação de proteínas às mitocôndrias requer a ação de diversos complexos ligados à membrana: as translocases das membranas externa e interna (TOM e TIM), além dos complexos SAM (Sorting and Assembly Machinery), PAM (presequence translocase associated motor) e MIA (mitochondria import and assembly) (CHACINSKA, 2004).

As proteínas organelares contêm em sua seqüência de aminoácidos as informações necessárias ao direcionamento correto. A maioria das proteínas cloroplastidiais codificadas pelo núcleo contêm um sinal de direcionamento N-terminal, que é clivado pela peptidase de processamento estromal (SPP) após sua importação (BRUCE, 2001).

Os sinais de direcionamento ao cloroplasto não possuem motivos definitivos ou características estruturais específicas, sendo na verdade heterogêneos em sua seqüência e em sua maior parte, pouco estruturados (BRUCE, 2001). As características gerais dos sinais de direcionamento cloroplastidiais são a baixa quantidade de resíduos ácidos, são ricos em aminoácidos básicos (principalmente serina), carregados positivamente, e variam em extensão de 20-150 aminoácidos. Essas características são similares às encontradas em sinais de

direcionamento mitocondriais. No entanto, diferentemente dos sinais mitocondriais, não exibem estrutura secundária em solução aquosa (KRIMM et al., 1999). Também já foi observado que alguns sinais de direcionamento formam uma estrutura típica ao entrarem em contato com o ambiente lipídico da membrana externa cloroplastidial que possui composição única que a distingue da membrana externa mitocondrial (WIENK et al., 2000; BRUCE, 2001).

O sinais de direcionamento mitocondriais localizam-se geralmente na região N-terminal e possuem de 20 a 60 aminoácidos, ricos em resíduos básicos carregados positivamente e possuem a habilidade de formar uma α -hélice anfipática. Esses sinais também são clivados após importação.

Existem produtos gênicos únicos que são localizados em mais de um compartimento celular, onde podem possuir a mesma função. Uma mesma proteína pode ser direcionada diferentemente em resposta a estímulos celulares ou ambientais (KIRCHER et al., 2002), ou ser transportada a organelas onde atuam em vias distintas (MIHARA et al., 2003).

A maioria das proteínas de duplo direcionamento em plantas é direcionada a mitocôndrias e cloroplastos, mas existem outros exemplos de duplo direcionamento, que incluem mitocôndrias, plastídeos e citosol (SMALL et al., 1998), mitocôndrias e retículo endoplasmático (BHAGWAT et al., 1999), mitocôndrias e núcleo (KRAUSE; KRUPINSKA, 2009), peroxissomos e mitocôndrias (PETROVA et al., 2004), plastídeos e citosol (KIESSLING et al., 2004) e mitocôndrias e citosol (REGEV-RUDZKI et al., 2005).

Nos últimos anos, o número de estudos que identificaram proteínas de duplo direcionamento aumentou (KOROLEVA et al., 2005; HEAZLEWOOD et al., 2007) e muitos trabalhos têm sido feitos para se compreender os mecanismos envolvidos no duplo direcionamento. Alguns desses mecanismos envolvem *splicing* alternativo de transcritos ou a tradução a partir de códons de iniciação alternativos. Ambos são eventos transcricionais ou pós-transcricionais que podem produzir proteínas com sinais de direcionamento distintos (CHABREGAS et al., 2001; HASHIMOTO et al., 2002; DINKINS et al., 2008). Outros mecanismos incluem diferenças no início da tradução (WAMBOLDT et al., 2009, PUYAUBERT; DENIS; ALBAN, 2008), direcionamento competitivo, modificações pós-traducionais e sinais de direcionamento ambíguos (DANPURE, 1995; PEETERS; SMALL, 2001; KARNIELY; PINES, 2005).

As seqüências ambíguas são seqüências de direcionamento reconhecidas por mais de um compartimento subcelular, possuindo diferentes sítios de interação com complexos protéicos de membrana responsáveis pela importação (MACKENZIE, 2005). Os sinais de direcionamento ambíguos são similares aos sinais de direcionamento cloroplastidiais e mitocondriais, sendo ricos em resíduos carregados positivamente, hidrofóbicos e básicos, com rara presença de resíduos ácidos, como glicina. No entanto, não possuem características distinguíveis que possam separá-los dos sinais que direcionam exclusivamente a mitocôndrias ou cloroplastos. Eles parecem possuir características intermediárias em relação ao conteúdo de resíduos de serina e arginina (PUJOL et al., 2007).

Apesar de não haver uma regra geral que determina o duplo direcionamento, a região N-terminal se mostra essencial na importação dupla em mitocôndrias e cloroplastos (BERGLUND et al., 2009). No entanto, os mecanismos que controlam o direcionamento subcelular de proteínas não são totalmente compreendidos. Fatores como modificações pós-traducionais, a influência da região 5'-UTR, a participação da região C-terminal ou o transporte por vias alternativas estão envolvidos na localização de diversas proteínas.

A cooperação de múltiplos fatores presentes na extensão N-terminal de proteínas pode ser necessária para o direcionamento a proteínas, como MITS1 (Mitochondrial-Targeting Signal 1), que possui uma seqüência N-terminal responsável pelo direcionamento a mitocôndrias, além de um resíduo de triptofano C-terminal essencial para o correto direcionamento. Além dessas seqüências, a proteína possui um sinal que pode levar a redistribuição da mesma pela via secretória (CHARTRE et al., 2009).

Um exemplo de modificação pós-traducional é a fosforilação de proteínas precursoras, que se mostra essencial para o correto direcionamento de algumas proteínas cloroplastidiais (WAEAGEMANN; SOLL, 1996; MARTIN et al., 2006).

Estudos sugerem que regiões não traduzidas (UTRs) do mRNA que codifica a proteína de duplo direcionamento também pode possuir papel importante no direcionamento de proteínas (BISWAS; GETZ, 2004). Em *A. thaliana* foi mostrada a ocorrência de tradução a partir de códons de iniciação alternativos, diferentes do AUG (CHRISTENSEN et al., 2005).

Diversos transcritos que codificam proteínas mitocondriais em levedura, realizam o transporte do mRNA às organelas por proteínas que reconhecem sinais na região UTR (MARC et al., 2002). Há evidências de proteínas direcionadas a mitocôndrias em mamíferos, que não

possuem seqüência de direcionamento e são importadas de modo co-traducional por polissomos ligados a receptores específicos presentes na superfície da mitocôndria (MACKENZIE, 2004).

Além disso, existem evidências de proteínas que são levadas às organelas por rotas alternativas, como uma anidrase carbônica plastidial que é direcionada pela via secretória através do retículo endoplasmático e Golgi (onde é glicosilada) antes de chegar, por mecanismos desconhecidos, aos cloroplastos (VILLAREJO et al., 2005; CHEN et al., 2004).

2.2 Interação entre proteínas e estudos de redes de PPI (protein-protein interaction)

Existe uma grande quantidade de informação sobre as funções e propriedades moleculares de proteínas individuais, devido a avanços em estudos de bioquímica, biologia celular, biologia estrutural e técnicas de mutagênese. No entanto, as proteínas se encontram geralmente associadas, formando complexos protéicos que são entidades dinâmicas, podendo se associar ou se desassociar conforme a ocorrência de mudanças nas condições celulares (ALBERTS, 1998; WODAK et al., 2009). Complexos maiores podem ser formados pela associação de complexos menores pré-existentes (VALADKHAN, 2007) e, além disso, um mesmo tipo de proteína pode participar de diversos complexos simultaneamente, ou interagir com proteínas diversas, quando estão expostas a condições celulares específicas (WODAK et al., 2009).

A detecção de interações proteína-proteína é importante para o estudo da regulação da proliferação celular, diferenciação, e apoptose, pela identificação de proteínas que interagem com componentes chave nas vias de sinalização (HAIAN et al. 2000).

Interações proteína-proteína também possuem papel na localização subcelular. A translocação de proteínas precursoras aos cloroplastos, por exemplo, depende de sua interação com as proteínas de membrana que compõem os complexos TOC e TIC, além da associação de proteínas que auxiliam no direcionamento ou na translocação, como as proteínas 14-3-3 (MAY & SOLL, 2000).

Uma família de quinases citosólicas é capaz de fosforilar especificamente peptídeos de trânsito cloroplastidiais em *A. thaliana* (MARTIN et al., 2006). As seqüências de direcionamento das proteínas precursoras destinadas ao cloroplasto possuem um resíduo de serina ou treonina fosforilado, e os aminoácidos próximos a esse sítio compõem um motivo de ligação a proteínas 14-3-3. A associação conjunta de proteínas cHsp70 a proteínas precursoras impede que a proteína se torne ativa prematuramente, levando a formação de complexos protéicos (14-3-3-Hsp70-

proteína precursora) acelerando a translocação (MAY & SOLL, 2000, SCHEMENEWITZ et al., 2007, NAKRIEKO et al., 2004).

No entanto, ainda não foram completamente elucidados diversos aspectos do direcionamento a organelas, como a importância relativa das vias e os sinais que levam à formação dos diferentes complexos (OREB et al., 2008).

O estudo de redes biomoleculares se tornou um dos focos chave de biologia de sistemas e bioinformática, e incluem diversos tipos de redes moleculares, como interações proteína-proteína (PPI), redes de genes regulatórios (GRN), redes metabólicas (MN) e redes de co-expressão gênica (GCEN). Essa área demonstra um enorme potencial na descoberta de funções básicas e de mecanismos essenciais para a ocorrência de fenômenos biológicos, já que integra os sistemas biológicos em nível de sistema e não como componentes isolados (ZHANG et al., 2007). A bioinformática pode ser usada como uma ferramenta preliminar no direcionamento de estudos sobre alvos de interação proteína-proteína mais específicos (BRANDÃO; DANTAS; SILVA-FILHO, 2009).

2.3 As proteínas 14-3-3

As 14-3-3 formam uma família altamente conservada de proteínas diméricas ácidas e receberam esta denominação em 1967 durante uma classificação sistemática de proteínas cerebrais, sendo que os números presentes no nome são baseados no fracionamento de coluna após cromatografia DEAE-celulose e sua mobilidade eletroforética (MOORE, PEREZ, 1976 apud DE LILLE et al., 2001). Durante os anos 60-70 se acreditava que a família 14-3-3 estava limitada ao tecido nervoso e presente apenas entre os mamíferos, no entanto, as proteínas 14-3-3 foram encontradas em praticamente todos os eucariotos, de mamíferos a *Saccharomyces cerevisiae* (VAN HEUSDEN et al., 1992, 1995) e em todo tipo de tecido (DE LILLE et al., 2001). As proteínas 14-3-3 exibem seqüências bastante conservadas entre espécies, o que indica um alto grau de conservação funcional (WANG; SHAKES, 1996).

Estudos sobre as 14-3-3 se multiplicaram e atualmente são consideradas um grupo multifuncional de proteínas que modulam a função e a atividade de um grande número de proteínas reguladoras importantes. Em qualquer organismo, a família 14-3-3 geralmente consiste de múltiplos genes e isoformas. Essas isoformas correspondem a diferentes funções, assim foi criada uma nomenclatura para diferenciá-las (as 14-3-3 são atualmente designadas por letras

gregas, com as isoformas de mamíferos com as primeiras letras do alfabeto e as isoformas de plantas, pelo fim do alfabeto) (DE LILLE et al., 2001).

As 14-3-3 atuam no processo de transdução de sinais, se ligando a um alvo fosforilado, e assim completando a mudança estrutural que regula a atividade protéica. Essa característica depende da região central do dímero das 14-3-3, que possui resíduos que direcionam a interação com fosfoserinas na região chamada Domínio Box-1, que é extremamente bem conservada em todas as espécies e isoformas de 14-3-3, e oferece superfícies para a ligação de dois peptídeos fosforilados (ICHIMURA et al., 1995). A diversidade encontrada entre as isoformas 14-3-3 deve-se às extremidades N e C-terminais (SEHNKE AND FERL, 2000).

A ligação com as 14-3-3 ocorre geralmente em um resíduo fosforilado, sendo a fosforilação das proteínas alvo o mecanismo primário que controla a interação com as 14-3-3 (FURUKAWA et al., 1993; MUSLIN et al., 1996; HAIAN et al. 2000). A fosforilação é importante para o motivo de ligação 14-3-3, no entanto, muitas proteínas que interagem com as 14-3-3 não possuem esse motivo, sugerindo que outros modos de contato também permitam a ligação (MUSLIN et al. 1996; HAIAN et al., 2000, SOROKINA et al., 2011).

E apesar de necessária, a fosforilação não é suficiente para a formação de um complexo já que resíduos âncora também possuem função crítica na estabilização da interação proteína-proteína. Existem resíduos além dos presentes no domínio de ligação 14-3-3, que são essenciais para a interação entre uma proteína 14-3-3 e um parceiro fosforilado (UHART et al., 2011).

A desfosforilação também pode ser um componente importante na regulação da interação, como na proteína supressora de tumor p53, que possui uma região com motivos fosforilados e quando a desfosforilação é induzida, é criado um sítio de ligação para as 14-3-3, o que aumenta a afinidade de p53 por seqüências específicas de DNA (WATERMAN et al., 1998).

Uma característica marcante das proteínas 14-3-3 é a habilidade de se ligar a um grande número de proteínas sinalizadoras funcionalmente diversas, incluindo quinases, fosfatases e receptores transmembrana. Essa abundância de proteínas interatoras permite que as 14-3-3 atuem em papéis importantes em diversos processos regulatórios, como transdução de sinais, apoptose, resposta ao estresse, controle do ciclo celular, organização do citoesqueleto e transformação maligna em tecidos animais (VAN HEMERT et al. 2001, HUNTER 1997; FORD et al., 1994). Em animais, as 14-3-3 participam do desenvolvimento neural, controle do crescimento celular e patogênese viral e bacteriana (HAIAN et al. 2000).

Também podem participar na regulação da atividade de enzimas, e agir como moléculas adaptadoras ou *scaffolds*, estimulando interações proteína-proteína; e também regulam a localização subcelular de proteínas (VAN HEMERT et al. 2001).

As proteínas 14-3-3 foram primeiramente estudadas em tecido nervoso de mamíferos, mas nas últimas décadas, foi descoberto seu papel indispensável em várias vias metabólicas e regulatórias de plantas.

As plantas necessitam de um grande número de reguladores capazes de lidar com mudanças ambientais complexas, e a grande família de proteínas 14-3-3 presente em plantas pode auxiliar nessa regulação. A localização das 14-3-3 em diversos compartimentos subcelulares, como o cloroplasto, mitocôndria e núcleo, além do citoplasma, demonstra seu potencial regulatório em toda a célula (SEHNKE et al., 2000; BIHN et al., 1997; SEHNKE; FERL, 2000; DE LILLE et al., 2001).

Sabe-se que os membros da 14-3-3 regulam processos fundamentais na assimilação de nitrogênio e carbono, que são executados pelas enzimas nitrato redutase e fosfato sintase (SEHNKE; FERL, 2000; FULGOSI et al., 2002).

As proteínas 14-3-3 também estão envolvidas em processos de sinalização que influenciam na germinação, como a sinalização do etileno, ABA e no metabolismo de açúcar e nitrato (SCHULTZ et al., 1998; MOORHEAD et al., 1999; COTELLE et al., 2000). Quando localizadas no núcleo, as isoformas participam de complexos juntamente com fatores de transcrição, e interagem com componentes da maquinaria que controla a expressão de genes induzidos pelo ácido abscísico (SHULTZ et al., 1998).

Um dos processos regulados pelas proteínas 14-3-3 em animais é a localização de proteínas (MUSLIN; XING, 2000). Na maioria dos casos, a ligação das 14-3-3 é responsável pelo seqüestro da proteína alvo em um compartimento subcelular, e a liberação da 14-3-3 permite que o alvo se realoque. Geralmente essa realocação ocorre devido à exposição de uma seqüência de direcionamento subcelular que antes estaria mascarada pelo dímero 14-3-3 (JIANG et al., 2003). Este mecanismo de regulação contribui na retenção nuclear de proteínas, como a transcriptase reversa telomerase humana (TERT) (SEIMIYA et al., 2000). Também atua na movimentação (*shuttling*) citoplasma-mitocôndria (NOMURA et al., 2003) e núcleo-citoplasmático (KUMAGAI; DUNPHY, 1999; YANG et al., 1999; GROZINGER; SCHREIBER, 2000; BASU et al., 2003; CAHILL et al., 2001; DOUGHERTY; MORRISON, 2004). As proteínas 14-3-3

freqüentemente promovem a acumulação citoplasmática ou o direcionamento nuclear das proteínas alvo (SEIMIYA et al., 2000).

Em plantas, uma proteína 14-3-3 participa de movimentação (*shuttling*) núcleo-citoplasmática do fator de transcrição RSG, em *Nicotiana tabacum*, que controla a via biossintética do ácido giberélico. Mutantes de RSG incapazes de interagir com o ligante 14-3-3 não realizam a movimentação, levando a acumulação de RSG no núcleo, mesmo na presença de ácido giberélico (ISHIDA et al., 2004).

Outro exemplo é o da proteína 14-3-3 (isoforma G) que afeta a distribuição núcleo-citoplasmática do fator de transcrição DBP1 (DNA-binding protein phosphatase 1), regulando positivamente a transcrição de um gene de defesa em *Nicotiana tabacum*. Esse fator de transcrição, quando ligado ao promotor do gene de defesa CEV11 inibe sua transcrição (CARRASCO et al., 2003). Em caso de dano foliar à planta ou infecção por patógenos, a expressão de 14-3-3G aumenta, e sua concentração se eleva no núcleo, onde interage com DBP1. Esse complexo protéico é exportado do núcleo e mantido no citoplasma, impedindo a ligação de DBP1 com o promotor de CEV11, e assim, sua inibição. AtDBP1 (At2g25620) em *A. thaliana*, similar ao DBP1 em tabaco, interage com GRF6 (At5g10450), uma proteína 14-3-3 de *Arabidopsis* (CARRASCO et al., 2006).

Membros citoplasmáticos das 14-3-3 podem formar um complexo guia com pré-proteínas destinadas ao cloroplasto e facilitar sua importação a essas organelas (SEHNKE et al., 2000). Recentemente, a localização de várias proteínas 14-3-3 foi atribuída aos cloroplastos, onde poderiam estar envolvidas no direcionamento e inserção de proteínas nos tilacóides (FULGOSI et al., 2002).

As 14-3-3 também estão envolvidas na importação de proteínas a mitocôndrias (ALAM et al., 1994). A proteína 14-3-3 MSF, em animais, reconhece especificamente proteínas precursoras mitocondriais e as levam aos receptores TOM70-TOM37 para translocação. Após a liberação da precursora, MSF é liberada ao citosol onde permanece disponível para o recrutamento de mais precursoras (KOMIYA et al., 1997).

Também foi mostrado que proteínas mitocondriais desacopladoras (UCP), da família de proteínas carreadoras de ânions mitocondriais, interagem com as isoformas θ , ζ e β das 14-3-3. Apesar dessa interação ocorrer independentemente da seqüência de direcionamento N-terminal,

supõe-se que essa 14-3-3 pode afetar o direcionamento das UCPs à mitocôndria (PIERRAT et al., 2000).

O mecanismo de movimentação (*shuttling*) também ocorre para proteínas que se movem do citoplasma para a membrana plasmática, como as envolvidas na sinalização por Ras e a proteína heterodimérica G. Essas proteínas são ligadas à membrana, no entanto, muitos de seus efetores e reguladores estão localizados no citoplasma e precisam ser translocados para a superfície da célula. Vários componentes dessas vias interagem com 14-3-3, e quando essa ligação é rompida, muitas dessas moléculas são liberadas e exibem níveis elevados de associação à membrana (ORY et al., 2003).

O envolvimento de membros da família 14-3-3 em mecanismos de acompanhamento e direcionamento de pré-proteínas a organelas de plantas precisa ser melhor investigado (FULGOSI et al., 2002).

2.4 As tiorredoxinas

Tiorredoxinas são definidas por sua estrutura e suas características catalíticas (capacidade de reduzir pontes dissulfeto). Além disso, são proteínas bastante estáveis contendo aproximadamente 110 aminoácidos em sua forma madura (exceto pelos peptídeos de trânsito de isoformas cloroplastidiais e mitocondriais). A característica mais marcante das tiorredoxinas é a presença de dois resíduos cisteinil, envolvidos no sítio catalítico WC[G/P]PC que é bastante conservado (GELHAYE et al., 2005).

A oxidação-redução de resíduos de cisteinil é realizada por proteínas sensoras e transmissoras de sinais redox e é um fator importante na regulação da atividade de diversas enzimas, permitindo sua modulação. As tiorredoxinas são proteínas presentes em todos os organismos. Enquanto que *E. Coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e humanos possuem de dois a três genes Trx, o genoma de *A. thaliana* codifica ao menos 20 genes (GELHAYE et al., 2005). A localização subcelular das diferentes isoformas é um fator importante na divisão do sistema tiorredoxina em plantas. Baseando-se em análises da sequência primária e na localização subcelular, as tiorredoxinas podem ser classificadas em isoformas que se classificam em tipos *f*, *h*, *m*, *o*, *x* e *z* (SCHURMANN; BUCHANAN, 2008; MEYER et al., 2009). Os diferentes grupos de tiorredoxinas estão igualmente presentes em plantas superiores, o que sugere que a diversidade de tiorredoxinas encontrada em *A. thaliana* é representativa (GELHAYE et al., 2005).

Trxs *m*, *f*, *x* e *y* são localizadas nos cloroplastos, apesar de que Trxs *f* e *m* estarem presentes em tecidos não fotossintéticos (BALMER et al., 2006a; de DIOS BARAJAS-LÓPEZ et al., 2007; TRAVERSO et al., 2008). As seqüências de aminoácidos dessas isoformas possuem uma extensão N-terminal com peptídeo de trânsito para direcionamento ao cloroplasto (COLLIN et al., 2003; RUELLAND; MIGINIAC-MASLOW, 1999; MOTOHASHI et al., 2001).

Trxs *o* se localizam em mitocôndrias e Trx *h* são tipicamente citosólicas, mas também já foram identificadas em outros compartimentos celulares, como o núcleo, retículo endoplasmático e mitocôndria (GELHAYE et al., 2005).

O genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica oito Trx tipo h (MEYER et al., 2005), no entanto, houve pouco progresso na identificação de funções específicas para cada isoforma de Trx *h* em *A. thaliana* e em outras plantas. Existem indicações da presença das Trx *h* em seiva do floema, sugerindo papel como mensageiras em plantas (ISHIWATARI et al., 1995). No entanto, a maioria das funções descritas até hoje para Trx *h* estão relacionadas a germinação de sementes (YANO et al., 2001; MAEDA et al., 2004; ALKHALFIOUI et al., 2007, SHAHPIRI; SVENSSON; FINNIE, 2009). As tiorredoxinas h, podem agir no início da germinação para a mobilização de nitrogênio e carbono no endosperma (KOBREHEL et al., 1992). Através da redução de pontes dissulfeto intramoleculares, as tiorredoxinas h promovem a degradação de proteínas de reserva importantes, a inativação de proteínas inibidoras de enzimas, e a ativação de uma protease substrato-específica (BESSE et al., 1996).

Estudos recentes mostram que tiorredoxinas h de *A. thaliana* diferem em seus tipos celulares e especificidade na expressão (REICHHELD et al., 2002). A expressão de *Attrxh1* e *Attrxh4* (subgrupo I de tiorredoxinas h) está relacionada com o ciclo celular, sugerindo um papel do controle redox na proliferação celular (MENGES et al., 2002). Em contraste, *AtTrxh5* parece estar envolvida na resposta a patógenos e estresse oxidativo (LALOI et al., 2004).

Para a compreensão dos papéis do sistema tiorredoxina em plantas, será necessária a identificação de proteínas reduzidas por tiorredoxinas e o efeito da redução em suas atividades ou funções. Vários estudos de proteômica estão sendo usados na identificação de proteínas que podem ser reduzidas por tiorredoxinas (YANO et al., 2001).

As tiorredoxinas estão envolvidas em diversos processos celulares como a modulação da atividade de fatores de transcrição e vias de sinalização baseadas em fosforilação e possuem papel essencial na proteção contra o estresse oxidativo (BENHAR 2000).

Dentre as enzimas que mediam a denitrosilação estão as tiorredoxinas, que regulam a sinalização influenciando em diversas respostas celulares. A regulação por denitrosilação pode influenciar a sinalização celular promovendo ativação de enzimas ou afetando interações proteína-proteína (OZAWA et al., 2008). As reações de denitrosilação feitas pelo sistema de tiorredoxinas participa em mecanismos de transdução de sinais tanto em animais (BENHAR et al., 2000) como em plantas (LINDERMAYR; DURNER, 2009; TADA et al., 2008).

O sistema tiorredoxina também atua na transmissão de sinais celulares ao controlar níveis redox, pois influencia em modificações pós traducionais protéicas relacionadas a oxidação-redução (PTMs redox) (NAVROT et al., 2011). Essas modificações PTM redox são importantes na regulação da atividade de enzimas e no controle de processos biológicos em plantas, sendo que as tiorredoxinas, que controlam o estado redox da célula, aparentemente atuam na manutenção da resistência ao estresse oxidativo e na regulação de vias de transdução de sinais por meio das PTMs redox (NAVROT et al., 2011).

As tiorredoxinas possuem diversos modos de atuação em toda a célula e também fora das células, estando envolvida em vias de sinalização. Nem todas as funções das tiorredoxinas já foram elucidadas, e seu papel em sinalização e alteração conformacional em proteínas poderia possuir influência em vias de direcionamento de proteínas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estudo de redes de interação proteína-proteína

A fim de verificar um possível papel de proteínas de *A. thaliana* na regulação da localização subcelular de proteínas de duplo direcionamento, foi feito o estudo das interações entre as proteínas de duplo direcionamento de *Arabidopsis thaliana* (com comprovação experimental no direcionamento para cloroplastos e mitocôndrias), juntamente com as demais proteínas de *A. thaliana* utilizando-se a plataforma AtPIN (*Arabidopsis thaliana* Protein Interaction Network) (BRANDÃO; DANTAS; SILVA-FILHO, 2009). Os dados foram analisados com auxílio do programa Cytoscape 2.7.0 (SHANNON et al., 2003).

As proteínas que apresentaram interações com pelo menos duas proteínas de duplo direcionamento foram analisadas quanto à existência de dados experimentais que confirmassem as interações. Em seguida, foram escolhidas proteínas com possível importância para o sistema, para a realização de confirmação da interação proteica, quando não havia confirmação experimental sobre essas interações no banco de dados. Essa escolha foi feita pela verificação de ocorrência de diversas associações com proteínas de duplo direcionamento, pelas proteínas de duplo direcionamento envolvidas na interação e pela confiabilidade da interação medida pelo parâmetro FSW para as proteínas do grupo de interação.

3.2 Construções gênicas para os ensaios de duplo-híbrido

3.2.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA

A extração de RNA total de tecido foliar de *Arabidopsis thaliana*, ecótipo Columbia, foi feita pela maceração do tecido em nitrogênio líquido seguida de extração utilizando-se Trizol® (Invitrogen), seguindo-se as instruções do fabricante. As amostras foram tratadas com DNase (Fermentas, EN0521) por 20 minutos a 37°C, ao que se seguiu uma nova extração do RNA para purificação da amostra.

O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro a 260nm. Para síntese de cDNA se utilizou 1µg de RNA, 2,5µM de primer oligoDT e 1µl de transcriptase reversa Inpron-II™ Reverse Transcriptase (Promega), seguindo instruções do fabricante.

3.2.2 Amplificação e clonagem das seqüências nos vetores para duplo-híbrido

As seqüências codificadoras das proteínas escolhidas para a análise experimental foram obtidas pelo banco de dados TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*-www.arabidopsis.org) e utilizadas para a construção de iniciadores específicos contendo os sítios de restrição *EcoRI* e *BamHI* (ANEXO 1), para clonagem no vetor para duplo-híbrido pGBKT7.

A amplificação das seqüências foi realizada por PCR utilizando-se a enzima TrueStart™ Hot Start Taq DNA Polymerase (Fermentas) seguindo instruções do fabricante.

Para amplificação do gene *ATH7* as condições de reação foram as seguintes: 95°C por 5 minutos; 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, sendo os três últimos passos repetidos 30 vezes; 72°C por 8 minutos e armazenados a 8°C.

A reação de PCR continha 5 µl de tampão para PCR 10X, 3 µl de MgSO₄ 25mM, 1 µl para cada um dos iniciadores (10 µM), 1 µl de dNTPs 10 µM, 2 µl de cDNA, 0,25 µl de TrueStart™ Hot Start Taq DNA Polymerase (Fermentas) e água mili-Q para atingir o volume de 50 µl.

Para o gene *GRF9* as condições foram: 95°C por 5 minutos; 95°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos, sendo os três últimos passos repetidos 40 vezes; 72°C por 8 minutos e armazenados a 8°C.

A reação de PCR continha 5 µl de tampão para PCR 10X, 9 µl de MgSO₄ 25mM, 1 µl para cada um dos iniciadores (10 µM), 1 µl de dNTPs 10 µM, 2 µl de cDNA, 0,25 µl de TrueStart™ Hot Start Taq DNA Polymerase (Fermentas) e água mili-Q para atingir o volume de 50 µl.

A verificação das reações de PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE [tris-fosfato 0,08M, EDTA 0,002M].

Para a clonagem das seqüências em vetor de duplo-híbrido pGBKT7 (ANEXO 2) os produtos de amplificação, assim como os vetores, foram tratados com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* por 2h a 37°C, e em seguida as amostras foram aplicadas em gel para purificação de banda utilizando-se o QIAquickGel Extraction Kit da Qiagen.

Em seguida foi feita ligação utilizando-se T4 DNA Ligase (Invitrogen), com incubação a 16°C por aproximadamente 16h. As reações de ligação foram precipitadas com isopropanol (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e ressuspendidas em 4µl de água mili-Q. Foram utilizados 2µl para a transformação de 70µl de células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α, seguido de

incubação em meio SOC [20 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 0,5 g/L de NaCl, pH 7,5] por 1h a 37°C em agitação de 200rpm e plaqueadas em meio LB sólido [10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl, 15 g/L de agar bacteriológico, pH 7,5] contendo 50µg/ml de canamicina.

As colônias transformadas foram selecionadas para crescimento em meio LB líquido contendo 50µg/ml de canamicina durante 16h, a 37°C sob agitação de 200rpm. As extrações de DNA plasmidial foram feitas seguindo-se protocolo de minipreparação (Sambrook; Russel, 2001). A confirmação da eficácia da transformação de colônias foi feita por PCR utilizando-se iniciador T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') cuja seqüência está presente no vetor pGBKT7 e os iniciadores reversos de GRF9 ou ATH7 (ANEXO 1).

Os plasmídios foram então seqüenciados para confirmação da transformação.

3.3 Ensaios de duplo-híbrido em levedura

3.3.1 Biblioteca de cDNA

A biblioteca de cDNA de *Arabidopsis thaliana*, ecótipo Columbia, foi obtida utilizando-se o banco de dados TAIR (The Arabidopsis Information Resource – www.arabidopsis.org) e clonada no vetor pACT (ANEXO 3). A biblioteca CD4-10 foi produzida a partir da transcrição reversa do mRNA extraído de todos os tecidos da planta utilizando-se iniciadores aleatórios seguindo-se método descrito por Durfee e colaboradores (DURFEE et al., 1993).

3.3.2 Transformação de levedura para ensaios de duplo-híbrido por varredura (screening)

Para a realização de transformação para varredura (*screening*) das interações proteína-proteína em ensaios de duplo-híbrido, foi feita transformação de levedura com a construção contendo a seqüência codificadora de ATH7 e GRF9 e a biblioteca de cDNA de *Arabidopsis thaliana*, seguindo protocolo descrito por Agatep e colaboradores (AGATEP et al., 1998).

Para a transformação, foi utilizada *Saccharomyces cerevisiae* cepa AH109, estocadas a -80°C (1 mL de meio YPDA [10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glicose, 100 mg/L de hemissulfato de adenina] e glicerol 10%) foram inoculadas em YPDA sólido [10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glicose, 100 mg/L de hemissulfato de adenina, 20 g/L de agar bacteriológico] e incubadas a 30°C por 16h. As colônias foram então

incubadas em 5ml de meio líquido YPDA em tubo falcon de 50ml a 30°C em agitação de 200rpm por 16h.

Após esse período, 1ml (para cada transformação) da suspensão foi centrifugada em tubos eppendorf estéreis e centrifugados por 30s a 8000 rpm, seguido de lavagem do precipitado com 500µl de água mili-Q estéril, e novamente de centrifugação nas mesmas condições. Após descarte do sobrenadante, foram adicionados ao precipitado 240 µl de PEG (polietilenoglicol) a 50%, 36 µl de acetato de lítio 1M, 50 µl de sal de DNA de salmão (Sigma® Life Sciences), e 5 µl da extração plasmidial da construção contendo a sequência codificadora de AHT7 ou GRF9 clonados no vetor pGBKT7 e 29 µl de água estéril. A mistura foi agitada em vortex até completa ressuspensão das células. Os tubos foram incubados a 42°C por 40 minutos e durante esse período, misturados por inversão a cada 5 minutos.

As células foram precipitadas por centrifugação a 8000rpm por 30s, o sobrenadante foi descartado, as células foram então ressuspensas em 200 µl de água estéril e este volume plaqueado em meio seletivo TRAF0 na ausência de triptofano [20 g/L de nitrogênio básico, 2 g/L da mistura sintética de nutrientes Drop Out Powder (USBiological®), 160 mg/L de leucina, 20mg/L de histidina, 40 mg/L de adenina e 20 g/L de ágar bacteriológico].

As placas foram incubadas a 30°C por aproximadamente 4 dias.

Os clones transformantes foram inoculados em 50mL de meio seletivo líquido Trip- (ausência de triptofano) sob agitação de 200 rpm por 16h a 30°C. Após esse período foi determinada a titulação celular e calculado o volume da suspensão que continha 7.5×10^8 células para 150 mL de cultura necessária. O volume determinado foi precipitado por centrifugação em tubo estéril a 3000 x g por 5 minutos, o sobrenadante descartado e as células foram ressuspensas em 150 mL de meio YPDA líquido pré aquecido a 30°C e agitada a 200 rpm por aproximadamente 4h (quando a titulação celular de 7.5×10^8 células/mL foi atingida) a 30°C.

Após esse período a suspensão foi centrifugada a 3000 x g por 5 minutos, o meio sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em 50mL de água mili-Q estéril e novamente centrifugadas nas mesmas condições. Em seguida, o precipitado foi ressuspendido em 3mL de acetato de lítio 100mM estéril e incubado por 15 minutos a 30°C e após esse tempo novamente centrifugadas a 3000 x g por 5 minutos.

O sobrenadante foi então descartado e foram adicionados ao precipitado de células 7,2 mL de PEG (polietilenoglicol) a 50%, 1,08 mL de acetato de lítio 1M, 1,5 mL de DNA carreador

(DNA de espermatozoides de salmão fita simples) (Sigma® Life Sciences), 200 µl da biblioteca de cDNA de *A. thaliana* clonada no vetor pACT e 800 µl de água mili-Q estéril. A mistura foi agitada em vortex por 1 minuto e incubada a 30°C por 30 minutos. Em seguida a mistura foi incubada a 42°C por 40 minutos e durante esse período, misturada por inversão a cada 5 minutos.

As células foram então coletadas por centrifugação por 5 minutos a 3000 x g, o sobrenadante descartado e o precipitado de células ressuspensionado em 40mL de água estéril. Em seguida esse volume foi plaqueado em meio seletivo na ausência de leucina, triptofano e histidina [20g/L de nitrogênio básico, 2 g/L da mistura sintética de nutrientes Drop Out Powder (USBiological®), 40mg/L de adenina e 20g/L de ágar bacteriológico].

As placas foram incubadas a 30°C por aproximadamente 7 dias e a seleção de transformantes seguindo sistema Matchmaker Two-Hybrid System (Clontech) utilizando-se meios de cultura seletivo TRAF0 Leu-Trp-His-Ade-.

3.3.3 Extração de DNA plasmidial de colônias de levedura com interação positiva

As colônias selecionadas para análise e sequenciamento foram as que apresentaram crescimento em meio seletivo Leu-Trp-His-Ade-. Para isso, foi realizada extração de DNA plasmidial das leveduras (HOFFMAN; WINSTON, 1987). As colônias positivas foram inoculadas em 5 mL de meio líquido TRAF0 ausente de leucina e triptofano e incubadas a 30°C durante 16h sob agitação de 200 rpm. Após esse período, a suspensão foi centrifugada a 3000 x g por 15 segundos, e o sobrenadante removido. As células precipitadas foram ressuspensionadas em 400 µL de tampão de lise [2% de triton X-100, 1% de SDS, 100mM de NaCl, 10mM de Tris-HCl (pH 8.0), 1mM de Na₂EDTA] em vórtex. Em seguida foram adicionados 400 µL de solução de 25% fenol: 24 % clorofórmio: 1% álcool isoamílico, seguido de vórtex. Foi adicionado 0,2 g de pérolas de vidro e a mistura foi novamente misturada por vórtex, por 2 minutos.

Em seguida, a mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 2 minutos para coleta da fase aquosa, à qual foram adicionados 20 µL de acetato de potássio 3M, e misturada por inversão dos tubos. Após adição de 1 mL de etanol 100%, os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 14000 rpm a 4°C. O precipitado foi lavado em etanol 70%, novamente centrifugado, e em seguida todo o sobrenadante removido para secagem, e em seguida ressuspensionado em 30 µL de água mili-Q.

As amostras de DNA plasmidial foram utilizadas para transformação em *E. coli* para o sequenciamento. Para isso, 3 μ L do DNA plasmidial foram eletroporados em 70 μ L de *E. coli* DH5 α eletrocompetentes e em seguida, as células foram agitadas em meio SOC a 37°C por 1h e plaqueadas em meio sólido LB com ampicilina (200 μ g/mL) para incubação por 16h a 37°C.

Após extração plasmidial, as amostras foram seqüenciadas utilizando-se iniciadores específicos para o vetor pACT e analisados pelo programa TAIR BLAST 2.2.8 (<http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>).

4. RESULTADOS

4.1 Análises proteína-proteína com redes

Para as análises de redes de interação proteína-proteína, foi gerada uma lista atualizada das proteínas de duplo direcionamento (mitocôndrias e cloroplastos) de *Arabidopsis thaliana* confirmadas *in planta* (MORGANTE et al., 2009; BERGLUND et al. 2009)-(ANEXO 4). Oito das proteínas de duplo direcionamento da lista não aparecem na rede de interação pois não possuem ligações listadas no AtPIN. A rede de interações proteína-proteína foi criada pelo sistema AtPIN (BRANDÃO; DANTAS; SILVA-FILHO) e visualizada utilizando-se o programa Cytoscape 2.8.1 (SHANNON et al., 2003) (Figura 1).

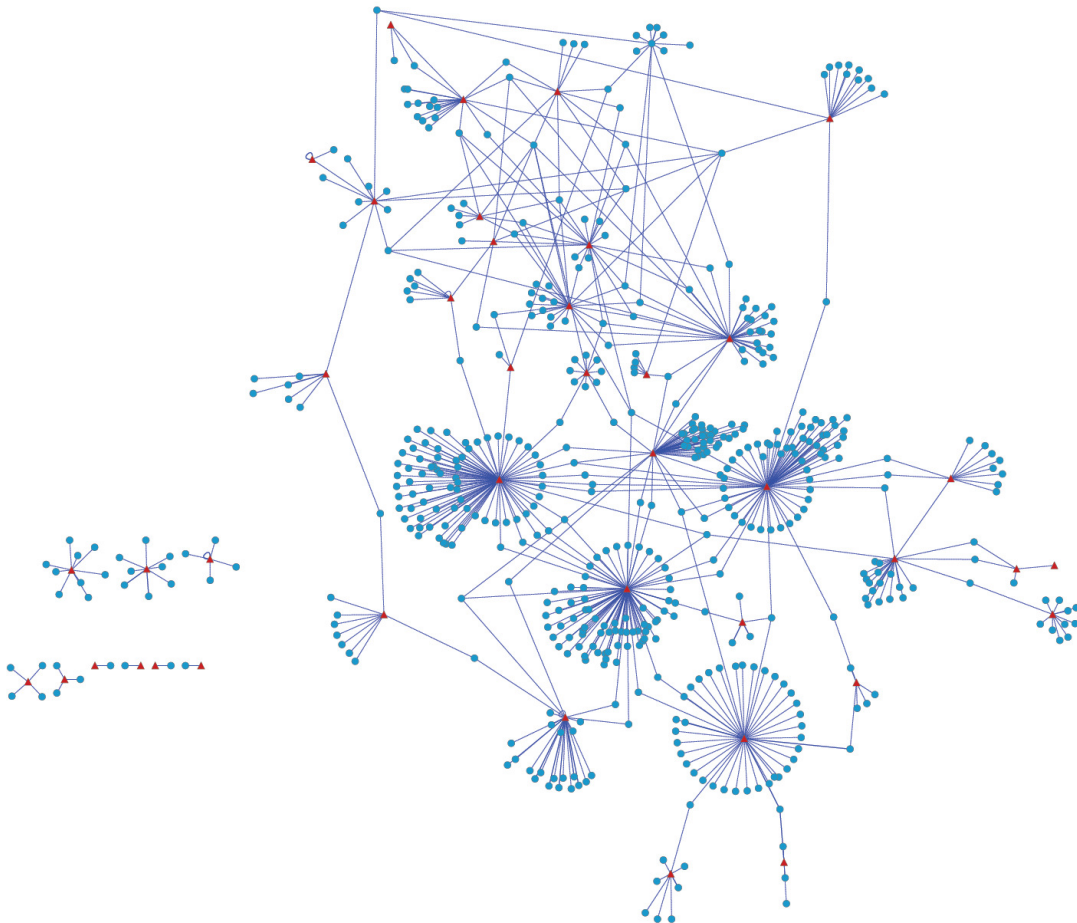


Figura 1- Rede de interações proteína-proteína gerada pelo sistema AtPIN e visualizada pelo programa Cytoscape v2.8.1. As proteínas de duplo direcionamento (mitocôndrial e cloroplastidial) estão representadas pela cor vermelha, enquanto que as proteínas de *A. thaliana* que apresentam interação com proteínas de duplo direcionamento estão representadas em azul

A partir da análise dessa rede, foram listadas 72 proteínas de *A. thaliana* cuja interação era predita com ao menos duas proteínas de duplo direcionamento para mitocôndrias e cloroplastos .

Das 72 proteínas listadas, foram eliminadas como opção para realização dos experimentos as proteínas cloroplastídias, ribossomais, heat-shock e as RNA polimerases. As proteínas foram então analisadas quanto à função, localização comprovada experimentalmente (GFP ou MS/MS), localização predita por diversas plataformas (UniProt, AmiGO, TAIR, iPSORT, LOCtree, MitoPred, MitoProt2, MultiLoc, PeroxP, Predotar, SubLoc, TargetP, WoLFPSORT) (HEAZLEWOOD et al., 2007) e quanto às proteínas de duplo direcionamento com as quais interagem. Essa análise foi feita para escolha de proteínas que pudessem estar envolvidas na regulação do direcionamento organelar de proteínas, e para análise experimental dessas proteínas por meio de varredura em ensaios de duplo-híbrido (ANEXO 5).

Dessa lista foram selecionadas 9 proteínas para continuidade do trabalho. Os valores de FSW para a interação dessas proteínas e as proteínas de duplo direcionamento associadas estão listados no ANEXO 6. O valor de FSW fornece um índice de confiabilidade à interação proteína-proteína e a proporção de parceiros de interação comuns entre 2 proteínas.

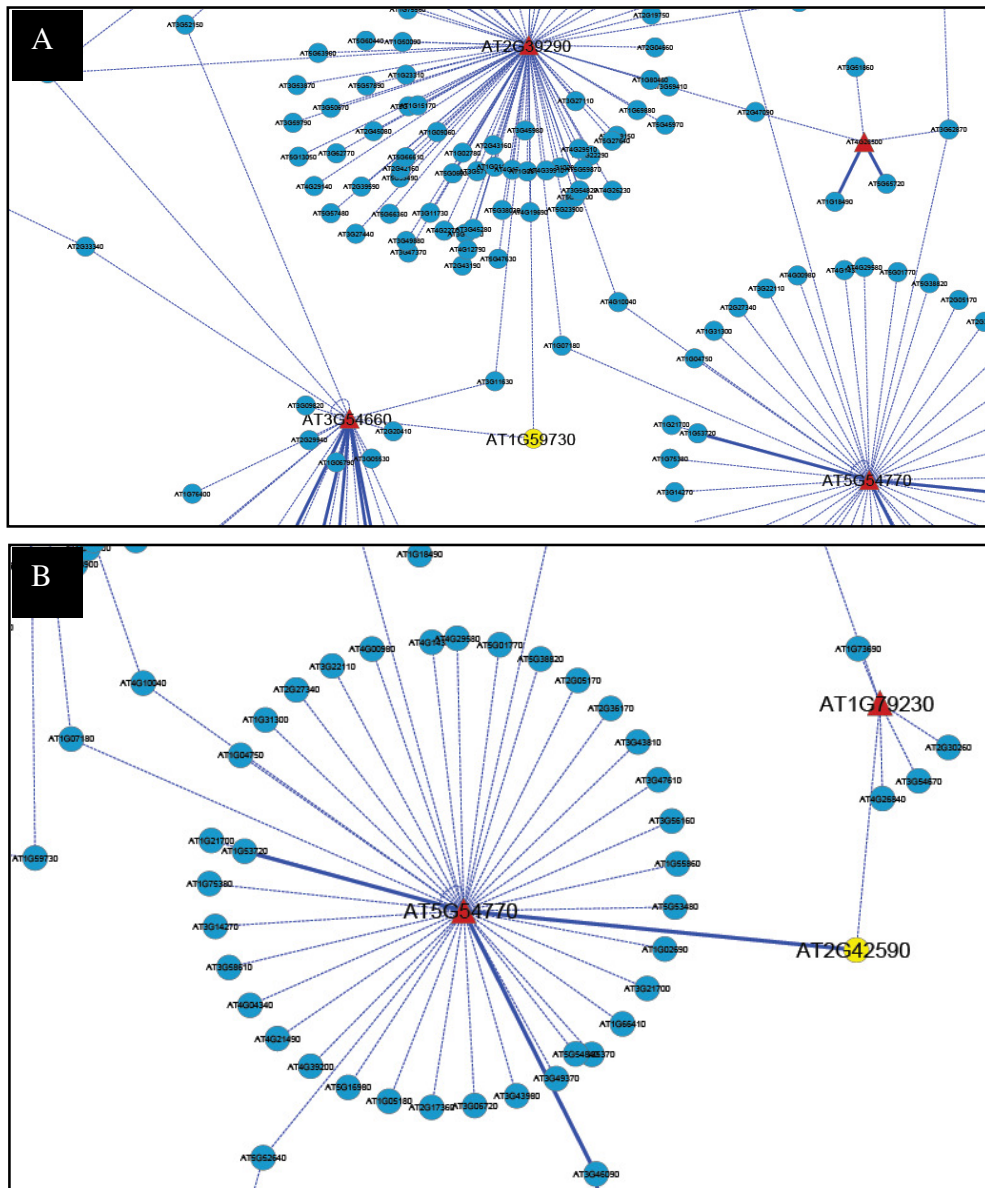


Figura 2- Detalhe da rede de PPI destacando proteínas escolhidas para o estudo experimental de interações protéicas por ensaios de duplo-híbrido em levedura: (A) a proteína ATH7, que interage com duas proteínas de duplo direcionamento (fosfatidil-glicerol fosfato sintase e glutatona redutase) (B) e GRF9, que interage com mercaptopiruvato sulfurtransferase e THI1

4.2 Interações proteína-proteína identificadas na varredura (*screening*) em ensaios de duplo-híbrido em levedura

Os experimentos para varredura em ensaios de duplo-híbrido foram conduzidos para as 9 proteínas de interesse listadas. Os resultados já obtidos foram para as proteínas 14-3-3 (GRF9 - AT2G42590.3) e tiorredoxina (ATH7 - AT1G59730.1). O estudo das demais encontra-se em diferentes fases de desenvolvimento.

A transformação do gene de ATH7 com a biblioteca de cDNA de *A. thaliana* resultou em colônias que foram selecionadas para crescimento em meio seletivo Leu-Trp-His-Ade-. 580 colônias foram inoculadas em meio seletivo, sendo que 79 cresceram e foram selecionadas para extração de DNA plasmidial e sequenciamento. Para o gene GRF9, 520 colônias foram inoculadas em meio seletivo, sendo que 94 apresentaram crescimento e foram então seqüenciadas. Os resultados obtidos no sequenciamento que apresentaram resultados positivos estão listados nas tabelas 1 e 2 (Tabela 1 e Tabela 2). Os demais clones mostraram ser falsos positivos.

Tabela 1- Proteínas identificadas após sequenciamento de clones positivos para interação com biblioteca de cDNA em ensaios de varredura com o gene de ATH7, e a localização, experimental (Loc GFP ou MS/MS) ou predita (Loc Pred), dessas proteínas

Número de clones	Acesso Tais	Proteína	Loc GFP	Loc MS/MS	Loc pred
9	AT5G35630.3	glutamina sintetase	Mitocôndrias e plastídeos	Plastídeos e membrana plasmática	Mitocôndrias e plastídeos
1	AT1G29980.1	Protein of unknown function		Membrana plasmática	Membrana plasmática, RE e citosol
1	AT5G11170.1	DEAD/DEAH box RNA helicase	Núcleo	Núcleo	Núcleo e citosol

Tabela 2- Resultados do estudo de proteínas que apresentaram interação com GRF9 identificadas após sequenciamento de clones positivos para interação com biblioteca de cDNA em ensaios de varredura; e a localização, experimental (Loc GFP ou MS/MS) ou predita (Loc Pred), dessas proteínas

Número de clones	Acesso Tair	Proteína	Loc GFP	Loc MS/MS	Loc pred
20	AT1G49480.1	RTV1 (related to vernalization)			Núcleo e citosol
4	AT4G27500.1	PPI1 (proton pump interactor)		Membrana plasmática e RE	Núcleo
2	AT3G50950.1	ZAR1 (HOPZ-ACTIVATED RESISTANCE)			Núcleo e citosol
2	AT2G25000.1	WRKY60 DNA-binding protein			Núcleo
2	AT2G34420.1	LHB1B2 (photosystem II light harvesting complex)		Plastídeos	Plastídeos, mitocôndrias, citosol
2	AT4G28510.1	ATPHB1 (prohibitin 1)	mitocôndrias	Mitocôndrias, membrana plasmática e vacúolo	Citosol, plastídeos e mitocôndrias
1	AT4G21960.1	PRXR1 (Peroxidase superfamily protein)		Membrana plasmática	Núcleo, RE e plastídeos
1	AT3G13930.1	Dihydrolipoamide acetyltransferase		Mitocôndrias, plastídeos e membrana plasmática	Mitocôndrias, plastídeos e núcleo
1	AT2G41110.2	CAM2 (calmodulin 2)			Núcleo e citosol
1	AT2G41090.1	Calcium-binding EF-hand family protein			Citosol e mitocôndrias
1	AT1G73480.1	alpha/beta-Hydrolases			Plastídeos e mitocôndrias
1	AT4G32940.1	GAMMA-VPE (gamma vacuolar processing enzyme)			Vacúolo e RE
1	AT1G29920.1	CAB2 (chlorophyll A/B-binding protein)		Plastídeos e membrana plasmática	Citosol, plastídeos e mitocôndrias
1	AT1G03680.1	ATHM1 (thioredoxin M-type)		Plastídeos	Plastídeos e mitocôndrias
1	AT2G43970.1	RNA-binding protein			Plastídeos e mitocôndrias e núcleo
1	AT4G17730.2	SYP23 (syntaxin of plants)		Membrana plasmática e vacúolo	Plastídeos e mitocôndrias
1	AT1G56280.1	ATDI19 (drought-induced)	Núcleo e peroxissomos		Núcleo e mitocôndrias

Dentre os dados obtidos a partir do sequenciamento do *screening* de ATH7 (AT1G59730.1), obteve-se parte do gene de glutamina sintetase (GS) (AT5G35630.3) (260-1007pb), que possui função na conversão de amônia em Gln e possui duplo direcionamento (TAIRA et al., 2004) (Figura 3).



Figura 3- Representação da seqüência de glutamina sintetase (GS) resultante da interação contra biblioteca de cDNA em varredura (em azul), e da seqüência completa da GS (1293 pb), utilizada na confirmação da interação ensaios de duplo híbrido

Resultados preliminares de ensaios de duplo-híbrido sugerem a ocorrência de interação entre ATH7 (AT1G59730.1) e a proteína completa da glutamina sintetase, clonada no vetor pGADT7 (clone isolado por Dantas, 2010) (Figura 4).

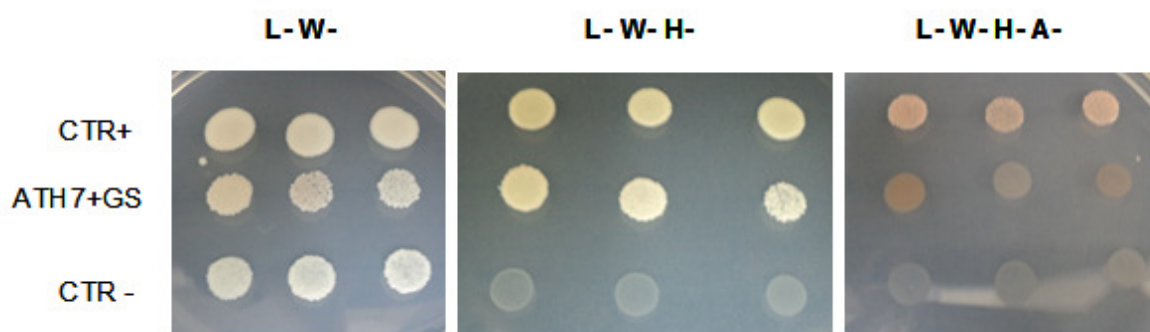


Figura 4- Resultado da confirmação da interação entre a proteína ATH7, utilizada nos ensaios de varredura em duplo-híbrido de levedura, cuja seqüência foi clonada no vetor pGBKT7, servindo de “isca” na interação, contra a proteína glutamina sintetase (GS), encontrada nos resultados de varredura. Para a confirmação da interação, a seqüência completa foi clonada em vetor pGADT7, servindo como “presa” na interação (DANTAS, 2010) e inoculada em meios seletivo na ausência de Leu e Trp, Leu, Trp e His, e de Leu, Trp, His e Ade. Estão também apresentados transformantes para o controle positivo e negativo, sendo o último resultado da transformação de ATH7 (clonada em pGBKT7) e o vetor pGADT7 original

Os dados de sequenciamento de transformantes positivos para GRF9 mostraram grande variedade de genes, alguns dos quais já reportados em outros trabalhos com proteínas 14-3-3, como a associação de proteínas 14-3-3 a genes relacionados ao florescimento (MAYFIELD Et al., 2007), associação a bombas de prótons (FUGLSANG et al., 1999) e aos fatores transcricionais WRKY (RUSHTON et al., 2010).

Também se obteve como resultado a seqüência do gene da peroxidase PRXR1, e do gene para dihidrolipoamida acetiltransferase, que já foi relatado associado a mitocôndrias e a cloroplastos (TAYLOR et al., 2004; HEAZLEWOOD et al., 2004; BRUGIÈRE et al., 2004, FROELICH et al., 2003; KLEFFMANN et al., 2004).

Foi realizada uma busca na seqüência de PRXR1 e Dihidrolipoamida acetiltransferase para verificar a presença de um motivo consenso de ligação a proteínas 14-3-3, e possíveis sítios de fosforilação, utilizando-se os programas Prosite (<http://kr.expasy.org/tools/scanprosite/>) e PhosPhat (<http://phosphat.mpimp-golm.mpg.de/>) (GASTEIGER et al., 2003; DUREK et al., 2009; HEAZLEWOOD et al., 2008).

PRXR1 (AT4G21960)

MGGKGVMMVAILCLWALSATSEAVTEAEPGLMMNFYKDTCPQAEDIVREQVKLLYKRHKNTA
FSWLRNIFHDCAVESCDASLLLDSTRELGEKEHDRSFGLRNFYIEEIKEALERECPGVVSCSDIL
VLSAREGIEAVGGPYIPLKTGRRDGLKSRTDMLESYLPDHNESISVVLEKFKSIGIDTPGLVALLGS
HSVGRTHCVKLVHRLYPEVDPSLNPDPHVPMLHMKCPD **STP**DPKAVQYVRNDRGTPMVLNYY
RNILDNKGLLLVDHQLAHDKRTRPIVKKMAKDQAYFFKEFTRAIQILSENNPLTGSKGEIRKQCN
LANKNH

Dihidrolipoamida acetiltransferase (AT3G13930)

MASRIINHSKCLKHVSALLRRDHAVAVRCFSNSTHPSLVGREDIFKARLNYSSVERISKCGTGNT
MLSGISTTSTKL **SSP**MAGPKLFKEFISSQMRSVRFSSSSDLPPHQEIGMPSLSPMTTEGNIARWLK
KEGDKVAPGEVLCEVETDKATVEMECMEEGFLAKIVKEEGAKEIQVGEVIAITVEDEDDIQKFKD
YTPSSDTGPAAPEAKPAP **SLP**KEEKVEKPA **SAP**EAKI **SKP** **SAP**SEDRIFASPLARKLAEDNNVPLS
SIKGTGPEGRIVKADVEDFLASGSKETTAKPSKQVDSKVPALDYVDIPHTQIRKVTASRLAFSKQT
IPHYLLTVDTVCVDMGLRSQNSFQEASGGKRISVNDLVKAAALALRKVPQCNSWTDEYIR
QFKNVNINAVQTEGLYVPVVKDADKKGLSTIGEEVRFLAQKAKENSLKPEDYEGGTFTVSNL
GGPFGIKQFCVINPPQAAILAIGSAEKRVVPGTGPDQYNVASYMSVTLSCDHRVIDGAIGAEWL
KAFKGYIETPESMLL

Como se pode ver nas seqüências analisadas, os únicos sítios presentes similares aos motivos consenso para ligação a 14-3-3 são SXP (destacados em verde) em que as serinas não são fosforiladas. Apesar de não apresentarem sítios clássicos de ligação a proteínas 14-3-3, o domínio SXP, já foi relatado como sítio alternativo de ligação às 14-3-3 (SOROKINA et al., 2011).

5 DISCUSSÃO

A GRF9 (AT2G42590.3) é uma proteína 14-3-3 que possui domínios de ligação a cálcio, proteínas e aminoácidos fosforilados. Sua localização foi confirmada experimentalmente com construções em ligação à proteína GFP no citosol (KOROLEVA et al., 2005), núcleo e na membrana plasmática (MARMAGNE et al., 2007), e por espectrometria de massa, no citosol, peroxissomo e membrana plasmática (REUMANN et al., 2009).

GRF9 pertence ao grupo 14-3-3 ϵ . A isoforma 14-3-3 ϵ é o membro mais conservado da família 14-3-3, desde leveduras, plantas até mamíferos (AITKEN, 2002; JONES et al., 1995; LIANG 2009).

Dentre as proteínas presentes no resultado da varredura por ensaios de duplo-híbrido da proteína GRF9 (14-3-3) se inclui uma peroxidase (PRXR1) (AT4G21960.1) presente na membrana plasmática e com localização predita ao retículo endoplasmático, cloroplastos e núcleo (HEAZLEWOOD et al., 2007).

A Prdx6 é uma peroxirredoxina presente no citosol de células de epitélio alveolar de pulmão que é direcionada ao retículo endoplasmático e em seguida aos lisossomos (lisossomos secretórios ou corpos lamelares). Essa peroxirredoxina tem sua localização afetada pela interação com uma proteína 14-3-3 ϵ , mesmo grupo ao qual a GRF9, do presente estudo, se inclui.

As peroxirredoxinas constituem uma família de peroxidases envolvida na defesa antioxidante das células e sua atividade catalítica deve-se a um resíduo de cisteína localizado na região N-terminal em uma sequência conservada, que caracteriza a família (HOFFMAN et al., 2002; WOOD et al., 2003; RHEE et al., 2005).

Prdx6 possui apenas um aminoácido fosforilado *in vitro*, e este não se localiza na sequência de direcionamento do peptídeo. Assim, o papel das MAPK no direcionamento é a ativação de uma 14-3-3 ϵ , conhecidas por agirem como chaperonas que facilitam o transporte de proteínas de sinalização no início da via secretória (SOROKINA et al., 2011; NUFER et al, 2003, SHIKANO et al., 2006, YUAN et al., 2003).

Aparentemente a fosforilação de Prdx6 não é necessária para a ligação com 14-3-3 ϵ ou para o direcionamento (SOROKINA et al., 2011).

As chaperonas 14-3-3 geralmente se ligam a proteínas alvo que expressam uma das seguintes sequências: modo 1: RSXpSXP; modo 2: RXXXpSXP, em que pS representa uma fosfoserina (NUFER et al, 2003, SHIKANO et al., 2006, YUAN et al., 2003).

O peptídeo de trânsito de Prdx6 (31-40 aa) inclui uma seqüência SXP terminal que se assemelha ao motivo de ligação modo 2, no entanto não possui o resíduo de arginina, e a S32 não é fosforilada. Assim, foi proposto que o peptídeo de direcionamento a lisossomos de Prdx6 pode representar uma nova seqüência de ligação a 14-3-3 ϵ (SOROKINA et al., 2011).

A seqüência de aminoácidos da PRXR1 não possui um motivo clássico de ligação a 14-3-3. No entanto, da mesma forma que a peroxirredoxina Prdx6, possui uma seqüência SXP, sendo que o resíduo de serina não é fosforilado. Mesmo não se incluindo nos motivos clássicos de ligação a proteínas 14-3-3, isso não exclui a possibilidade de interação, visto que Prdx6 possui sítio de ligação alternativo, e sua associação com a proteína 14-3-3 foi verificada, assim como sua participação no direcionamento da proteína.

A proteína PRXR1 se localiza na membrana plasmática, e existem evidências sobre a participação de proteínas 14-3-3 na movimentação (*shuttling*) de proteínas de membrana. Algumas 14-3-3 estão implicadas na retenção de proteínas regulatórias (direcionadas a membrana) no citoplasma, mascarando regiões da proteína alvo necessárias a translocação, interferindo na habilidade dessas proteínas em contatar as GTPases ligadas a membrana (BENZING et al., 2000; LIGHT et al., 2002; NIU et al., 2002; WANG et al., 2002), ou ocultando domínios envolvidos na ligação à membrana (ORY et al., 2003).

O modo em que a GRF9 está envolvida com a peroxidase PRXR1 precisa ser investigado por outros tipos de experimentos.

Os resultados encontrados pela varredura utilizando-se a seqüência para GRF9 inclui dihidrolipoamida acetiltransferase (AT3G13930) que é um componente enzimático do complexo piruvato desidrogenase que catalisa a conversão de piruvato em acetil-CoA e CO₂. Existem indicações a partir de dados de estudos de proteoma de que a proteína é localizada a mitocôndrias (TAYLOR et al., 2004; HEAZLEWOOD et al., 2004; BRUGIÈRE et al., 2004) e cloroplastos (FROEHLICH et al., 2003; KLEFFMANN et al., 2004). Assim, a proteína 14-3-3 GRF9 poderia ter papel na localização dupla a essas organelas, que deverá ser confirmado pelos métodos de BiFC e *GST-pulldown*.

A glutamina sintetase (GS) possui duplo direcionamento a mitocôndrias e cloroplastos (TAIRA, 2004) e apesar de sua interação com ATH7 não ter sido prevista pela rede de PPI realizada no estudo, foi identificada após varredura e sua interação confirmada pelos ensaios de duplo-híbrido em levedura.

A GS é uma enzima bem caracterizada cuja atividade é regulada negativamente quando oxidada (LEVINE et al., 1981). Já se sabe que a enzima é ativada por Trx em algas verdes e *Chlorella* (TISCHNER; SCHMIDT, 1982). A glutamina sintetase também foi encontrada em interação com tiorredoxinas em espinafre (MOTOHASHI et al., 2001).

A tiorredoxina ATH7 (At1g59730) pertence ao subgrupo IIB das tiorredoxinas h que inclui proteínas que possuem extensões N-terminais sendo que a maioria das isoformas do cluster IIB, ao serem submetidas ao programa de predição da localização iPSORT, exibem seqüência de direcionamento mitocondrial (GELHAYE et al., 2005).

A ATH7 sofre miristoilação, que é uma modificação necessária à função muitas proteínas regulatórias (RESH, 1999). Além de auxiliar na ancoragem de polipeptídeos à bicamada fosfolipídica, essa modificação participa em mecanismos de *switch* que permitem uma proteína circular de modo controlado entre membranas e o citosol e influenciando a conformação das proteínas, com conseqüências na estabilidade protéica e interações proteína-proteína.

Evidências experimentais mostram que a miristoilação promove a associação de proteínas específicas entre si, assim como a domínios na membrana, incluindo uma variedade de cascatas de transdução de sinal (Farazi; Waksman; Gordon, 2001). A N-miristoilação promove interações reversíveis de proteína-membrana, e proteína-proteína, e isso permite a regulação de mecanismos de interações entre as proteínas miristoiladas e membranas celulares ou outras proteínas (RESH, 1999; Farazi; Waksman; Gordon, 2001).

6 CONCLUSÕES

O estudo de redes de PPI levou a identificação de proteínas de *A. thaliana* que interagem com as proteínas de duplo direcionamento a mitocôndrias e cloroplastos.

O estudo de redes de PPI mostrou interações da proteína 14-3-3 GRF9 com proteínas de duplo direcionamento, e os ensaios de duplo híbrido por varredura indicam a possibilidade de interação entre a proteína GRF9 (14-3-3) com diversas proteínas.

A interação entre a tiorredoxina miristoilada ATH7 e a glutamina sintetase, que possui duplo direcionamento, pode estar relacionada a ativação da GS pela tiorredoxina no sistema de redução de nitrato, ou também possuir relação com modificações na conformação e estabilidade da proteína e suas interações protéicas, que pode influenciar sua localização.

REFERÊNCIAS

ADAMS, K.L.; PALMER, J.D. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 29, p. 380-395, 2003.

AGARRABERES, F.A.; DICE, J.F. Protein translocation across membranes. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, Amsterdam, v. 1513, p. 1-24, 2001.

AGATEP, R.; KIRKPATRICK, R.D.; PARCHALIUK, D.L.; WOODS, R.A.; GIETZ, R.D. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol. **Technical Tips Online**, 1998. Disponível em: <http://tto.trends.com/>. Acesso em: 06 Jul. 2010.

AITKEN, A. Functional specificity in 14-3-3 isoform interactions through dimer formation and phosphorylation. Chromosome location of mammalian isoforms and variants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 50, p. 993–1010, 2002.

ALAM, R.; HACHIYA, N.; SAKAGUCHI, M.; KAWABATA, S.; IWANAGA, S.; KITAJIMA, M.; MIHARA, K.; OMURA, T. cDNA cloning and characterization of mitochondrial import stimulation factor (MSF) purified from rat liver cytosol. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 116, p. 416–425, 1994.

ALBERTS, B. The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. **Cell**, Cambridge, v. 92, p. 291–294, 1998.

ALKHALFIOUI, F.; RENARD, M.; VENSEL, W.H.; WONG, J.; TANAKA, C.K.; HURKMAN, W.J.; BUCHANAN, B.B.; MONTRICHARD, F. Thioredoxin-linked proteins are reduced during germination of *Medicago truncatula* seeds. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 144, p. 1559–1579, 2007.

ALLEN JF. The function of genomes in bioenergetic organelles. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences**, London, v. 1429, p. 19-37, 2003.

BALMER, Y.; VENSEL, W.H.; CAI, N.; MANIERI, W.; SCHURMANN, P.; HURKMAN, W.J.; BUCHANAN, B.B. A complete ferredoxin/ thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, Washington, v. 103, p. 2988–2993, 2006.

BALSERA, M.; SOLL, J.; BÖLTER, B. Protein import machineries in endosymbiotic organelles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 66, p. 1903-1923, 2009.

BASU, S.; TOTTY, N.F.; IRWIN, M.S.; SUDO, L.; DOWNWARD, J. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 11, p. 11- 23, 2003.

BECKER, T.; JELIC, M.; VOJTA, A.; RADUNZ, A.; SOLL, J.; SCHLEIFF, E. Preprotein recognition by the Toc complex. **EMBO Journal**, London, v. 23, p. 520-530, 2004.

BENHAR, M.; FORRESTER, M.T.; HESS, D.T.; STAMLER, J.S. Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. **Science**, New York, v. 320, p. 1050–1054, 2008.

BENZING, T.; YAFFE, M.B.; ARNOULD, T.; SELLIN, L.; SCHERMER, B.; SCHILLING, B.; SCHREIBER, R.; KUNZELMANN, K.; LEPARC, G.G.; KIM, E.; WALZ, G. 14-3-3 interacts with regulator of G protein signaling proteins and modulates their activity. **Journal of Biological Chemistry**, San Francisco, v. 275, p. 28167-28172, 2000.

BERGLUND, A-K.; PUJOL, C.; DUCHENE, A-M.; GLASER, E. Defining the determinants for dual targeting of amino acyl-tRNA synthetases to mitochondria and chloroplasts. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 393, p. 803–814, 2009.

BESSE, I.; WONG, J.H.; KOBREHEL, K.; BUCHANAN, B.B. Thiocalcin: a thioredoxin-linked, substrate-specific protease dependent on calcium. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 93, p. 3169-3175, 1996.

BHAGWAT, S.V.; BISWAS, G.; ANANDATHEERTHAVARADA, H.K.; ADDYA, S.; PANDAK, W.; AVADHANI, N.G. Dual targeting property of the N-terminal signal sequence of P4501A1. Targeting of heterologous proteins to endoplasmic reticulum and mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, San Francisco, v. 274, p 24014-24022, 1999.

BIHN, E.A.; PAUL, A.L.; WANG, S.W.; ERDOS, G.W.; FERL, R.J. Localization of 14-3-3 proteins in the nuclei of *Arabidopsis* and maize. **The Plant Journal**, New York, v. 12, p. 1439–1445, 1997.

BISWAS, T.K.; GETZ, G.S. Requirement of different mitochondrial targeting sequences of the yeast mitochondrial transcription factor Mtf1p when synthesized in alternative translation systems. **Biochemical Journal**, London, v. 383, p. 383-391, 2004.

BRANDÃO, M.M.; SILVA-FILHO, M.C. Evolutionary history of *Arabidopsis thaliana* aminoacyl-tRNA synthetase dual-targeted proteins. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 28, p. 79-85, 2011.

BRANDÃO, M.M.; DANTAS, L.L.; SILVA-FILHO, M.C. AtPIN: *Arabidopsis thaliana* Protein Interaction Network. **BMC Bioinformatics**, London, v. 10, p. 454, 2009.

BRUCE BD. The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1541, p. 2-21, 2001.

BRUGIÉRE, S.; KOWALSKI, S.; FERRO, M.; SEIGNEURIN-BERNY, D.; MIRAS, S.; SALVI, D.; RAVANEL, S.; D'HÉRIN, P.; GARIN, J.; BOURGUIGNON, J.; JOYARD, J.; ROLLAND, N. The hydrophobic proteome of mitochondrial membranes from *Arabidopsis* cell suspensions. **Phytochemistry**, New York, v. 65, p. 1693-1707, 2004.

CAHILL, C.M.; TZIVION, G.; NASRIN, N.; OGG, S.; DORE, J.; RUVKUN, G.; ALEXANDER-BRIDGES, M. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling inhibits DAF-16 DNA binding and function via 14-3-3-dependent and 14-3-3-independent pathways. **Journal of Biological Chemistry**, San Francisco, v. 276, p. 13402-13410, 2001.

CARRASCO, J.L.; CASTELLO, M.J.; VERA, P. 14-3-3 Mediates Transcriptional Regulation by Modulating Nucleocytoplasmic Shuttling of Tobacco DNA-binding Protein Phosphatase-1. **Journal of Biological Chemistry**, Bathesda, v. 281, p. 22875-22881, 2006.

CARRASCO JL, ANCILLO G, MAYDA E, VERA P. A novel transcription factor involved in plant defense endowed with protein phosphatase activity. **EMBO Journal**, London, v. 22, p. 3376-3384, 2003.

CHABREGAS, S.M.; LUCHE, D.D.; FARIAS, L.P.; RIBEIRO, A.F.; VAN SLUYS, M.A.; MENCK, C.F.; SILVA-FILHO, M.C. Dual targeting properties of the N-terminal signal sequence of *Arabidopsis thaliana* THI1 protein to mitochondria and chloroplasts. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 46, p. 639-650, 2001.

CHACINSKA, A.; PFANNSCHMIDT, S.; WIEDEMANN, N.; KOZJAK, V.; SANJUÁN SZKLARZ, L.K.; SCHULZE-SPECKING, A.; TRUSCOTT, K.N.; GUIARD, B.; MEISINGER, C.; PFANNER, N. Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. **EMBO Journal**, London, v. 23, p. 3735-3746, 2004.

CHATRE, L.; MATHESON, L.A.; JACK, A.S.; HANTON, S.L.; BRANDIZZI, F. Efficient mitochondrial targeting relies on co-operation of multiple protein signals in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p. 741–749, 2009.

CHEN, M.H.; HUANG, L.F.; LI, H.M.; CHEN, Y.R.; YU, S.M. Signal peptide dependent targeting of a rice α -amylase and cargo proteins to plastids and extracellular compartments of plant cells. **Plant Physiology**, Washington, v. 135, p. 1367-1377, 2004.

CHRISTENSEN, A.C.; LYZNIK, A.; MOHAMMED, S.; ELOWSKY, C.G.; ELO, A.; YULE, R.; MACKENZIE, S.A. Dual-domain, dual-targeting organellar protein presequences in *Arabidopsis* can use non-AUG start codons. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 2805-2816, 2005.

COLLIN, V.; ISSAKIDIS-BOURGUET E.; MARCHAND C.; HIRASAWA M.; LANCELIN J. M.; KNAFF D. B. The *Arabidopsis* plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity. **Journal of Biological Chemistry**, San Francisco, v. 278, p. 23747–23752, 2003.

COTELLE, V.; MEEK, S.E.M.; PROVAN, F.; MILNE, F.C.; MORRICE, N.; MACKINTOSH, C. 14-3-3s regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved *Arabidopsis* cells. **EMBO Journal**, London, v. 19, p. 2869–2876, 2000.

DANPURE, C.J. How can the products of a single gene be localized to more than one intracellular compartment? **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 5, p. 230-8, 1995.

DANTAS, L.L.B. **Caracterização do papel da glutamil-tRNA sintetase na localização subcelular de proteínas**. 2010. 112p. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

DE DIOS BARAJAS-LOPEZ, J.; SERRATO, A.J.; OLMEDILLA, A.; CHUECA, A.; SAHRAWY, M. Localization in roots and flowers of pea chloroplastic thioredoxin f and thioredoxin m proteins reveals new roles in nonphotosynthetic organs. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 145, p. 946–960, 2007.

DELILLE, J.M.; SEHNKE, P.C.; FERL, R.J. The *Arabidopsis* 14-3-3 family of signaling regulators. **Plant Physiology**, Washington, v. 126, p. 35–38, 2001.

DINKINS, R.D.; MAJEE, S.M.; NAYAK, N.R.; MARTIN, D.; XU, Q.; BELCASTRO, M.P.; HOUTZ, R.L.; BEACH, C.M.; DOWNIE, A.B. Changing transcriptional initiation sites and alternative 5'- and 3'-splice site selection of the first intron deploys *Arabidopsis* protein isoaspartyl methyltransferase2 variants to different subcellular compartments. The **Plant Journal**, New York, v. 55, p. 1-13, 2008.

DOUGHERTY, M.K.; MORRISON, D.K. Unlocking the code of 14-3-3. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 117, p. 1875-1884, 2004.

DUREK, P.; SCHMIDT, R.; HEAZLEWOOD, J.L.; JONES, A.; MACLEAN, D.; NAGEL, A.; KERSTEN, B.; SCHULZE, W.X. PhosPhAt: the *Arabidopsis thaliana* phosphorylation site database. An update. **Nucleic Acids Research**, Oxford, PMID: 19880383, 2009.

DURFEE, T.; BECHERER, K.; CHEN, P.L.; YEH, S.H.; YANG, Y.; KILBURN, A.E.; LEE, W.H.; ELLEDGE, S.J. The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, NY, v. 7, p. 555-569, 1993.

DYALL, S.D.; BROWN, M.T.; JOHNSON, P.J. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. **Science**, New York, v. 304, p. 253-257, 2004.

GELHAYE, E.; ROUHIER, N.; NAVROT, N.; JACQUOT, J.P. The plant thioredoxin system. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 62, p. 24–35, 2005.

FARAZI, T.A.; WAKSMAN, G.; GORDON, J.I. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, p. 39501–39504, 2001.

FORD, J.C.; AL-KHODAIRY, F.; FOTOU, E.; SHELDRIK, K.S.; GRIFFITHS, D.J. 14-3-3 protein homologs required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. **Science**, New York, v. 265, p. 533–535, 1994.

FROEHLICH, J.E.; WILKERSON, C.G.; RAY, W.K.; MCANDREW, R.S.; OSTERYOUNG, K.W.; GAGE, D.A.; PHINNEY, B.S. Proteomic study of the *Arabidopsis thaliana* chloroplastic envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 2, p. 413-425, 2003.

FUGLSANG, A.T.; VISCONTI, S.; DRUMM, K.; JAHN, T.; STENSBALLE, A.; MATTEI, B.; JENSEN, O.N.; ADUCCI, P.; PALMGREN, M.G. Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H⁺-ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr(946)-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr(947). **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, p. 36774–36780, 1999.

FULGOSI, H.; SOLL, J.; MARASCHIN, S.F.; KORTHOUT, H.A.A.J.; WANG, M.; TESTERINK, C. 14-3-3 proteins and plant development. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 50, p. 1019–1029, 2002.

FURUKAWA, Y.; IKUTA, N.; OMATA, S.; YAMAUCHI, T.; ISOBE, T. Demonstration of the phosphorylation-dependent interaction of tryptophan hydroxylase with the 14-3-3 protein. **Biochemical and biophysical research communications**, New York, v. 194, p. 144–149, 1993.

GABRIEL, K.; BUCHANAN, S.K.; LITHGOW, T. The alpha and the beta: protein translocation across mitochondrial and plastid outer membranes. **Trends in biochemical sciences**, Cambridge, v. 26, p. 36-40, 2001.

GASTEIGER, E.; GATTIKER, A.; HOOGLAND, C.; IVANYI, I.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 31, p. 3784-3788, 2003.

GRAY, M.W. Evolution of organellar genomes. **Current Opinion in Genetics and Development**, London, v. 9, p. 678-687, 1999.

GROZINGER, C. M.; SCHREIBER, S. L. Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, Washington, v. 97, p. 7835-7840, 2000.

HAIAN, F.U.; SUBRAMANIAN, R.R.; MASTERS, S.C. 14-3-3 PROTEINS: Structure, Function, and Regulation. **Annual review of pharmacology and toxicology**, Palo Alto, v. 40, p. 617–647, 2000.

HASHIMOTO, N.N.; CARNEVALLI, L.S.; CASTILHO, B.A. Translation initiation at non-AUG codons mediated by weakened association of eukaryotic initiation factor (eIF) 2 subunits. **Biochemical Journal**, London, v. 367, p. 359-368, 2002.

HEAZLEWOOD, J.L.; TONTI-FILIPPINI, J.S.; GOUT, A.M.; DAY, D.A.; WHELAN, J.; MILLAR, A.H. Experimental analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 241–256, 2004.

HEAZLEWOOD, J.L.; VERBOOM, R.E.; TONTI-FILIPPINI, J.; SMALL, I.; MILLAR, A.H.; SUBA: the Arabidopsis Subcellular Database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, p. D213-218, 2007.

HEAZLEWOOD, J.L.; DUREK, P.; HUMMEL, J.; SELBIG, J.; WECKWERTH, W.; WALTHER, D.; SCHULZE, W.X. PhosPhAt: A Database of phosphorylation sites in *Arabidopsis thaliana* and a plant specific phosphorylation site predictor. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 38, p. D1015-D1021, 2008.

HILTBRUNNER, A.; BAUER, J.; VIDI, P.A.; INFANGER, S.; WEIBEL, P.; HOHWY, M.; KESSLER, F. Targeting of an abundant cytosolic form of the protein import receptor at Toc159 to the outer chloroplast membrane. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 154, p. 309-316, 2001.

HOFFMAN, C.S.; WINSTON, F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. **Gene**, Amsterdam, v. 57, p. 267-272, 1987.

HOFMANN, B.; HECHT, H.J.; FLOHÉ, L. Peroxiredoxins. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 383, p. 347-364, 2002.

HUNTER, T. Oncoprotein networks. **Cell**, Cambridge, v. 88, p. 333–346, 1997.

ICHIMURA, T.; UCHIYAMA, J.; KUNIHIRO, O.; ITO, M.; HORIGOME, T.; OMATA, S.; SHINKAI, F.; KAJI, H.; ISOBE, T. Identification of the site of interaction of the 14-3-3 protein with phosphorylated tryptophan hydroxylase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, p. 28515–28518, 1995.

ISHIDA, S.; FUKAZAWA, J.; YUASA, T.; TAKAHASHI, Y. Involvement of 14-3-3 signaling protein binding in the functional regulation of the transcriptional activator REPRESSION OF SHOOT GROWTH by gibberellins. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 2641-2651, 2004.

ISHIWATARI, Y.; HONDA, C.; KAWASHIMA, I.; NAKAMURA, S.; HIRANO, H.; MORI, S.; FUJIWARA, T.; HAYASHI, H.; CHINO, M. Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. **Planta**, Berlin, v. 195, p. 456–463, 1995.

IZETA, A.; MALCOMBER, S.; O'ROURKE, D.; HODGKIN, J.; O'HARE, P. A C-terminal targeting signal controls differential compartmentalization of *Caenorhabditis elegans* host cell factor (HCF) to the nucleus or mitochondria. **European Journal of Cell Biology**, Stuttgart, v. 82, p. 495-504, 2003.

JIANG, K.; PEREIRA, E.; MAXFIELD, M.; RUSSELL, B.; GOUDELOCK, D.M.; SANCHEZ, Y. Regulation of Chk1 includes chromatin association and 14-3-3 binding following phosphorylation on Ser-345. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, p. 25207-25217, 2003.

JOHN, D.; MAYFIELD, K.M.; FOLTA, A-L.P.; FERL, R.J. The 14-3-3 Proteins m and y influence transition to flowering and early phytochrome response. **Plant Physiology**, Washington, v. 145, p. 1692–1702, 2007.

JONES, D.H.; LEY, S.; AITKEN, A. Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers *in vivo* and *in vitro*: implications for function as adapter proteins. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 368, p. 55-58, 1995.

KARNIELY, S.; PINES, O. Single translation-dual destination: mechanisms of dual protein targeting in eukaryotes. **EMBO Reports**, London, v. 6, p. 420-425, 2005.

KIESSLING, J.; MARTIN, A.; GREMILLON, L.; RENSING, S.A.; NICK, P.; SARNIGHAUSEN, E.; DECKER, E.L.; RESKI, R. Dual targeting of plastid division protein FtsZ to chloroplasts and the cytoplasm. **EMBO Reports**, London, v. 5, p. 889-894, 2004.

KIRCHER, S.; GIL, P.; KOZMA-BOGNA, R.L.; FEJES, E.; SPETH, V.; HUSSELSTEIN-MULLER, T.; BAUER, D.; ADAM, E.; SCHAFFER, E.; NAGY, F. Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 1541-1555, 2002.

KLEFFMANN, T.; RUSSENBERGER, D.; VON ZYCHLINSKI, A.; CHRISTOPHER, W.; SJÖLANDER, K.; GRUISSEM, W.; BAGINSKY, S. The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. **Current Biology**, Cambridge, v. 14, p. 354-362, 2004.

KOBREHEL, K.; WONG, J.H.; BALOGH, A.; KISS, F.; YEE, B.C.; BUCHANAN, B.B. Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin h. **Plant Physiology**, Washington, v. 99, p. 919-924, 1992.

KOENIG, P.; OREB, M.; HÖFLE, A.; KALTOFEN, S.; RIPPE, K.; SINNING, I.; SCHLEIFF, E.; TEWS, I. The GTPase cycle of the chloroplast import receptors Toc33/Toc34: implications from monomeric and dimeric structures. **Structure**, Cambridge, v. 16, p. 585-596, 2008.

KOMIYA, T.; ROSPERT, S.; SCHATZ, G.; MIHARA, K. Binding of mitochondrial precursor proteins to the cytoplasmic domains of the import receptors Tom70 and Tom20 is determined by cytoplasmic chaperones. **EMBO Journal**, London, v. 16, p. 4267-4275, 1997.

KOROLEVA, O.A.; TOMLINSON, M.L.; LEADER, D.; SHAW, P.; DOONAN, J.H. High-throughput protein localization in *Arabidopsis* using *Agrobacterium*-mediated transient expression of GFP-ORF fusions. **The Plant Journal**, New York, v. 41, p. 162-174, 2005.

KOVACHEVA, S.; BÉDARD, J.; PATEL, R.; DUDLEY, P.; TWELL, D.; RÍOS, G.; KONCZ, C.; JARVIS, P. *In vivo* studies on the roles of Tic110, Tic40 and Hsp93 during chloroplast protein import. **The Plant Journal**, New York, v. 41, p. 412-428, 2005.

KRAUSE, K.; KRUPINSKA, K. Nuclear regulators with a second home in organelles. **Trends in Plant Science**, Kidlington, Oxford, v. 14, p. 194-199, 2009.

KRIMM, I.; GANS, P.; HERNANDEZ, J.F.; ARLAUD, G.J.; LANCELIN, J.M. A coil-helix instead of a helix-coil motif can be induced in a chloroplast transit peptide from *Chlamydomonas reinhardtii*. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 265, p. 171-180, 1999.

KUMAGAI, A.; DUNPHY, W.G. Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. **Gene & Development**, Cold Springs Harbor, v. 13, p. 1067-1072, 1999.

LALOI C.; MESTRES-ORTEGA D.; MARCO Y.; MEYER Y.; REICHHELD J.P. The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor. **Plant Physiology**, Washington, v. 134, p. 1006-1016, 2004.

LEE, C.M.; SEDMAN, J.; NEUPERT, W.; STUART, R.A. The DNA helicase, Hmi1p, is transported into mitochondria by a C-terminal cleavable targeting signal. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, p. 20937-20942, 1999.

LEVINE, R.L.; OLIVER, C.N.; FULKS, R.M.; STADTMAN, E.R. Turnover of bacterial glutamine synthetase: oxidative inactivation precedes proteolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, Washington, v. 78, p. 2120-2124, 1981.

LIANG, S.; YU, Y.; YANG, P.; GU, S.; XUE, Y.; CHEN, X. Analysis of the protein complex associated with 14-3-3 epsilon by a deuterated-leucine labeling quantitative proteomics strategy. **Journal of chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 877, p. 627-634, 2009.

LIGHT, Y.; PATERSON, H.; MARAIS, R. 14-3-3 antagonizes Ras-mediated Raf-1 recruitment to the plasma membrane to maintain signaling fidelity. **Molecular and Cell Biology**, Washington, v. 22, p. 4984-4996, 2002.

LINDERMAYR, C.; DURNER, J. S-Nitrosylation in plants: Pattern and Function. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 7 3, p. 1 – 9, 2009.

MACKENZIE, S.A. Plant organellar protein targeting: a traffic plan still under construction. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 15, p. 548-554, 2005.

MACKENZIE, J.A.; PAYNE, R.M. Ribosomes specifically bind to mammalian mitochondria via protease-sensitive proteins on the outer membrane. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, p. 9803–9810, 2004.

MAEDA, K.; FINNIE, C.; SVENSSON, B. Cy5 maleimide labeling for sensitive detection of free thiols in native protein extracts: identification of seed proteins targeted by barley thioredoxin h isoforms. **Biochemical Journal, London**, v. 378, p. 479–507, 2004.

MARC, P.; MARGEOT, A.; DEVAUX, F.; BLUGEON, C.; CORRAL-DEBRINSKI, M.; JACQ, C. Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. **EMBO Reports**, London, v.3, p. 159-164, 2002.

MARMAGNE, A.; FERRO, M.; MEINNEL, T.; BRULEY, C.; KUHN, L.; GARIN, J.; BARBIER-BRYGOO, H.; EPHRITIKHINE, G. A high content in lipid-modified peripheral proteins and integral receptor kinases features in the *Arabidopsis* plasma membrane proteome. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 6, p. 1980-1996, 2007.

MARTIN, W. Evolutionary origins of metabolic compartmentalization in eukaryotes. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences**, London, v. 365, p. 847-855, 2010.

MARTIN, W.; BRINKMANN, H.; SAVONNA, C.; CERFF, R. Evidence for a chimeric nature of nuclear genomes: eubacterial origin of eukaryotic glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, Washington, v. 90, p. 8692-8696, 1993.

MARTIN, T.; SHARMA, R.; SIPPEL, C.; WAEGEMANN, K.; SOLL, J.; VOTHKNECHT, U.C. A protein kinase family in *Arabidopsis* phosphorylates chloroplast precursor proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 281, p. 40216-40223, 2006.

MAY, T.; SOLL, J. Positive charges determine the topology and functionality of the transmembrane domain in the chloroplastic outer envelope protein Toc34. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 141, p. 895-904, 1998.

MAY, T.; SOLL, J. 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 53-64, 2000.

MENGES, M.; HENNIG, L.; GRUISSEM, W.; MURRAY, J.A. Cell cycle-regulated gene expression in *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 277, p. 41987-42002, 2002.

MEYER, Y.; BUCHANAN, B.B.; VIGNOLS, F.; REICHHELD, J.P. Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 43, p. 335-367, 2009.

MEYER, Y., REICHHELD, J.P., VIGNOLS, F. Thioredoxins in *Arabidopsis* and other plants. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 86, p. 419-433. 2005.

MIHARA, M.; ERSTER, S.; ZAIKA, A.; PETRENKO, O.; CHITTENDEN, T.; PANCOSKA, P.; MOLL, U.M. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 11, p. 577-590, 2003.

MILLAR, A.H.; WHELAN, J.; SMALL, I. Recent surprises in protein targeting to mitochondria and plastids. **Current opinion in plant biology**, London, v. 9, p. 610-615, 2006.

MITSCHE, J.; FUSS, J.; BLUM, T.; HÖGLUND, A.; RESKI, R.; KOHLBACHER, O.; RENSING, S.A. Prediction of dual protein targeting to plant organelles. **The New Phytologist**, Oxford, v. 183, p. 224-235, 2009.

MOORHEAD, G.; DOUGLAS, P.; COTELLE, V.; HARTHILL, J.; MORRICE, N.; MEEK, S.; DEITING, U.; STITT, M.; SCARABEL, M.; AITKEN, A.; MACKINTOSH, C. Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. **The Plant Journal**, New York, v. 18, p. 1–12, 1999.

MORGANTE, C.V.; RODRIGUES, R.A.O.; MARBACH, P.A.S.; BORGONOV, C.M.; MOURA, D.S.; SILVA-FILHO, M.C. Conservation of dual-targeted proteins in *Arabidopsis* and rice points to a similar pattern of gene-family evolution. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 281, p. 525–538, 2009.

MOTOHASHI, K.; KONDOH, A.; STUMPP, M.T.; HISABORI, T. Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 11224–11229, 2001.

MUSLIN, A.J.; XING, H. 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. **Cellular Signaling**, Oxford, v. 12, p. 703-709, 2000.

MUSLIN, A.J.; TANNER, J.W.; ALLEN, P.M.; SHAW, A.S. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. **Cell**, Cambridge, v. 84, p. 889– 897, 1996.

NAKRIEKO, K.A.; MOULD, R.M.; SMITH, A.G. Fidelity of targeting to chloroplasts is not affected by removal of the phosphorylation site from the transit peptide. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 271, p. 509–516, 2004.

NAVROT, N.; FINNIE, C.; SVENSSON, B.; HÄGGLUND, P. Plant redox proteomics. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, 2011, In Press.

NIU, J.; SCHESCHONKA, A.; DRUEY, K.M.; DAVIS, A.; REED, E.; KOLENKO, V.; BODNAR, R.; VOYNO-YASENETSKAYA, T.; DU, X.; KEHRL, J. RGS3 interacts with 14-3-3 via the N-terminal region distinct from the RGS (regulator of G-protein signalling) domain. **Biochemical Journal**, London, v. 365, p. 677-684, 2002.

NOMURA, M.; SHIMIZU, S.; SUGIYAMA, T.; NARITA, M.; ITO, T.; MATSUDA, H.; TSUJIMOTO, Y. 14-3-3 interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, p. 2058-2065, 2003.

NUFER, O.; HAURI, HP. ER export: call 14-3-3. **Current Biology**, Cambridge, v. 13, p. R391-R393, 2003.

OREB, M.; TEWS, I.; SCHLEIFF, E. Policing Tic 'n' Toc, the doorway to chloroplasts **TRENDS in Cell Biology**, Cambridge, v. 18, p. 19-27, 2008.

ORY, S.; ZHOU, M.; CONRADS, T.P.; VEENSTRA, T.D.; MORRISON, D.K. Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. **Current Biology**, Cambridge, v. 13, p. 1356-1364, 2003.

OZAWA, K.; WHALEN, E.J.; NELSON, C.D.; MU, Y.; HESS, D.T.; LEFKOWITZ, R.J.; STAMLER, J.S. S-Nitrosylation of β -arrestin regulates β -adrenergic receptor trafficking. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 31, p. 395-405, 2008.

PEETERS, N.; SMALL, I. Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1541, p. 54-63, 2001.

PETROVA, V.Y.; DRESCHER, D.; KUJUMDZIEVA, A.V.; SCHMITT, M.J. Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. **Biochemical Journal**, London, v. 380, p. 393-400, 2004.

PIERRAT, B.; ITO, M.; HINZ, W.; SIMONEN, M.; ERDMANN, D.; CHIESI, M.; HEIM, J. Uncoupling proteins 2 and 3 interact with members of the 14.3.3 family. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 267, p. 2680-2687, 2000.

PUJOL, C.; MARÉCHAL-DROUARD, L.; DUCHÊNE, A.M. How can organellar protein N-terminal sequences be dual targeting signals? In silico analysis and mutagenesis approach. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 369, p. 356-367, 2007.

PUYAUBERT, J.; DENIS, L.; ALBAN, C. Dual targeting of *Arabidopsis* holocarboxylase synthetase1: a small upstream open reading frame regulates translation initiation and protein targeting. **Plant Physiology**, Washington, v. 146, p. 478-491, 2008.

REGEV-RUDZKI, N.; KARNIELY, S.; BEN-HAIM, N.N.; PINES, O. Yeast aconitase in two locations and two metabolic pathways: seeing small amounts is believing. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 16, p. 4163-4171, 2005.

REICHHELD, J.P.; MESTRES-ORTEGA, D.; LALOI, C.; MEYER, Y. The multigenic family of thioredoxin h in *Arabidopsis thaliana*: specific expression and stress response. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 40, p. 685–690, 2002.

RESH, M.D. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1451, p. 1–16, 1999.

REUMANN, S.; QUAN, S.; AUNG, K.; YANG, P.; MANANDHAR-SHRESTHA, K.; HOLBROOK, D.; LINKA, N.; SWITZENBERG, R.; WILKERSON, C.G.; WEBER, A.P.; OLSEN, L.J.; HU, J. In-depth proteome analysis of *Arabidopsis* leaf peroxisomes combined with *in vivo* subcellular targeting verification indicates novel metabolic and regulatory functions of peroxisomes. **Plant Physiology**, Washington, v. 150, p. 125-143, 2009.

RHEE, S.G.; CHAE, H.Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, Tarrytown, v. 38, p. 1543-1552, 2005.

RUELLAND, E.; MIGINIAC-MASLOW, M. Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition? **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 4, p. 136-141, 1999.

RUSHTON, P.J.; SOMSSICH, I.E.; RINGLER, P.; SHEN, Q.J. WRKY transcription factors. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 15, p. 247-258, 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3 ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, p. 1.31-1.34.

SCHATZ, G.; DOBBERSTEIN, B. Common principles of protein translocation across membranes. **Science**, New York, v. 271, p. 1519-1526, 1996.

SCHEMENEWITZ A, POLLMANN S, REINBOTHE C, REINBOTHE S. A substrate-independent, 14:3:3 protein-mediated plastid import pathway of ADPH:protochlorophyllide oxidoreductase A. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, Washington, v. 104, p. 8538–8543, 2007.

SCHULTZ, T.F.; MEDINA, J.; HILL, A.; QUATRANO, R.S. 14- 3-3 proteins are part of an abscisic acid VIVIPAROUS1 (VP1) response complex in the Em promoter and interact with VP1 and EmBP1. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 837–847, 1998.

SCHURMANN, P.; BUCHANAN, B.B. The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont, v. 10, p. 1235–1274, 2008.

SEHNKE, P.C.; FERL, R.J. Plant 14-3-3s: omnipotent metabolic phosphopartners? **Signal Transduction Knowledge Environment**, Washington, v. 56, pe1, 2000.

SEHNKE, P.C.; HENRY, R.; CLINE, K.; FERL, R.J. Interaction of a plant 14-3-3 protein with the signal peptide of a thylakoid-targeted chloroplast precursor protein and the presence of 14-3-3 isoforms in the chloroplast stroma1. **Plant Physiology**, Washington, v. 122, p. 235–241, 2000.

SEIMIYA, H.; SAWADA, H.; MURAMATSU, Y.; SHIMIZU, M.; OHKO, K.; YAMANE, K.; TSURUO, T. Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. **EMBO Journal**, London, v. 19, p. 2652-2661, 2000.

SHAHPIRI, A.; SVENSSON, B.; FINNIE, C. From proteomics to structural studies of cytosolic/mitochondrial-type thioredoxin systems in barley seeds. **Molecular Plant**, Oxford, England, v. 2, p. 378–389, 2009.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N.S.; WANG, J.T.; RAMAGE, D.; AMIN, N.; SCHWIKOWSKI, B.; IDEKER, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 13, p. 2498-2504, 2003.

SHIKANO, S.; COBLITZ, B.; WU, M.; LI, M. 14-3-3 proteins: regulation of endoplasmic reticulum localization and surface expression of membrane proteins. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 16, p. 370-375, 2006.

SILVA-FILHO, M.C. One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 589-595, 2003.

SMALL, I.; WINTZ, H.; AKASHI, K.; MIREAU, H. Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 38, p. 265-277, 1998.

SMITH MD, ROUNDS CM, WANG F, CHEN K, AFITLHILE M, SCHNELL DJ. atToc159 is a selective transit peptide receptor for the import of nucleus-encoded chloroplast proteins. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 165, p. 323-334, 2004.

SOROKINA, E.M.; FEINSTEIN, S.I.; ZHOU, S.; FISHER, A.B. Intracellular targeting of peroxiredoxin 6 to lysosomal organelles requires MAPK activity and binding to 14-3-3 epsilon. **American Journal of Physiology, Cell Physiology**, Bethesda, 2011. In Press.

STENGEL, A.; SOLL, J.; BÖLTER, B. Protein import into chloroplasts: new aspects of a well-known topic. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 388, p. 765-772, 2007.

SUN, Y.J.; FOROUHAR, F.; LI, H.M.; HM, T.U.; YEH, Y.H.; KAO, S.; CHOU, C.C.; CHEN, C.; HSIAO, C.D. Crystal structure of pea Toc34, a novel GTPase of the chloroplast protein translocon. **Nature Structure Biology**, New York, v. 9, p. 95-100, 2002.

SVESHNIKOVA, N.; SOLL, J.; SCHLEIFF, E. Toc34 is a preprotein receptor regulated by GTP and phosphorylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, Washington, v. 97, p. 4973-4978, 2000.

TADA, Y.; SPOEL, S.H.; PAJEROWSKA-MUKHTAR, K.; MOU, Z.; SONG, J.; WANG, C. Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. **Science**, New York, v. 321, p. 952-956, 2008.

TAIRA, M.; VALTERSSON, U.; BURKHARDT, B.; LUDWIG, R.A. *Arabidopsis thaliana* GLN2-encoded glutamine synthetase is dual targeted to leaf mitochondria and chloroplasts. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 2048-2058, 2004.

TAYLOR, N.L.; HEAZLEWOOD, J.L.; DAY, D.A.; MILLAR, A.H. Lipoic acid-dependent oxidative catabolism of α -keto acids in mitochondria provides evidence for branched-chain amino acid catabolism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Washington, v. 134, p. 838-848, 2004.

TIELENS, A.G.; ROTTE, C.; VAN HELLEMOND, J.J.; MARTIN, W. Mitochondria as we don't know them. **Trends in Biochemical Sciences**, Cambridge, v. 27, p. 564-572, 2002.

TISCHNER, R.; SCHMIDT, A. A thioredoxin-mediated activation of glutamine synthetase and glutamate synthase in synchronous *Chlorella sorokiniana*. **Plant Physiology**, Washington, v. 70, p. 113-116, 2002.

TRAVERSO, J.A.; VIGNOLS, F.; CAZALIS, R.; SERRATO, A.J.; PULIDO, P.; SAHRAWY, M.; MEYER, Y.; CEJUDO, F.J.; CHUECA, A. Immunocytochemical localization of *Pisum sativum* TRXs f and min in non-photosynthetic tissues. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, p. 1267-1277, 2008.

UEDA, M.; NISHIKAWA, T.; FUJIMOTO, M.; TAKANASHI, H.; ARIMURA, S.; TSUTSUMI, N.; KADOWAKI, K. Substitution of the gene for chloroplast RPS16 was assisted by generation of a dual targeting signal. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 25, p. 1566-1575, 2008.

UHART, M.; IGLESIAS, A.A.; BUSTOS, D.M. Structurally constrained residues outside the binding motif are essential in the interaction of 14-3-3 and phosphorylated partner. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 406, p. 552–557, 2011.

VALADKHAN, S. The spliceosome: caught in a web of shifting interactions. **Current Opinion in Structural Biology**, Oxford, v. 17, p. 310–315, 2007.

VAN DER GIEZEN, M. Hydrogenosomes and mitosomes: conservation and evolution of functions. **Journal of Eukariotic Microbiology**, Lawrence, v. 56, p. 221-231, 2009.

VAN HEMERT, M.J.; STEENSMA, H.Y.; VAN HEUSDEN, G.P.H. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. **Bioessays**, Cambridge, v. 23, p. 936-946, 2001.

VAN HEUSDEN, G.P.H.; WENZEL, T.J.; LAGENDIJK, E.L.; STEENSMA, H.Y.; VAN DEN BERG, J.A. Characterization of the yeast BMH1 gene encoding a putative protein homologous to mammalian protein kinase II activators and protein kinase C inhibitors. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 302, p. 145-150, 1992.

VAN HEUSDEN, G.P.H.; GRIFFITHS, D.J.; FORD, J.C.; CHIN, A.W-T.; SCHRADER, P.A.; CARR, A.M.; STEENSMA, H.Y. The 14-3-3 proteins encoded by the BMH1 and BMH2 genes are essential in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and can be replaced by a plant homologue. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 229, p. 45-53, 1995.

VILLAREJO, A.; BUREN, S.; LARSSON, S.; DEJARDIN, A.; MONNE, M.; RUDHE, C.; KARLSSON, J.; JANSSON, S.; LEROUGE, P.; ROLLAND, N. Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast. **Nature Cell Biology**, London, v. 7, p. 1224-1231, 2005.

WAEAGEMANN, K.; SOLL, J. Phosphorylation of the transit sequence of chloroplast precursor proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 271, p. 6545-6554, 1996.

WAMBOLDT, Y.; MOHAMMED, S.; ELOWSKY, C.; WITGREN, C.; DE PAULA, W.B.; MACKENZIE, S.A. Participation of leaky ribosome scanning in protein dual targeting by alternative translation initiation in higher plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, p. 157–167, 2009.

WANG, W.; SHAKES, D.C. Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 43, p. 384–398, 1996.

WANG, Y.; WALDRON, R.T.; DHAKA, A.; PATEL, A.; RILEY, M.M.; ROZENGURT, E.; COLICELLI, J. The RAS effector RIN1 directly competes with RAF and is regulated by 14-3-3 proteins. **Molecular Cellular Biology**, San Diego, v. 22, p. 916-926, 2002.

WATERMAN, M.J.; STAVRIDIS, E.S.; WATERMAN, J.L.; HALAZONETIS, T.D. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. **Nature Genetics**, New York, v. 19, p. 175–178, 1998.

WIENK, H.L.; WECHSELBERGER, R.W.; CZISCH, M.; DE KRUIJFF, B. Structure, dynamics, and insertion of a chloroplast targeting peptide in mixed micelles. **Biochemistry**, Washington, v. 39, p. 8219-8227, 2000.

WODAK, S.J.; PU, S.; VLASBLOM, J.; SÉRAPHIN B. Challenges and rewards of interaction proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 8, p. 3-18, 2009.

WOESE, C.R.; OLSEN, G.J.; IBBA, M.; SÖLL, D. Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. **Microbiol and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, p. 202-236, 2000.

WOOD, Z.A.; SCHRÖDER, E.; ROBIN HARRIS, J.; POOLE, L.B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends in Biochemical Sciences**, Cambridge, v. 28, p. 32-40, 2003.

YANG, J.; WINKLER, K.; YOSHIDA, M.; KORNBLUTH, S. Maintenance of G2 arrest in the *Xenopus* oocyte: a role for 14-3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import. **EMBO Journal**, London, v. 18, p. 2174-2183, 1999.

YANO, H.; WONG, J.H.; LEE, W.M.; CHO, M.; BUCHANAN, B.B. A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.98, P. 4794–4799, 2001.

YUAN, H.; MICHELSEN, K.; SCHWAPPACH, B. 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. **Current Biology**, Cambridge, v. 13, p. 638-646, 2003.

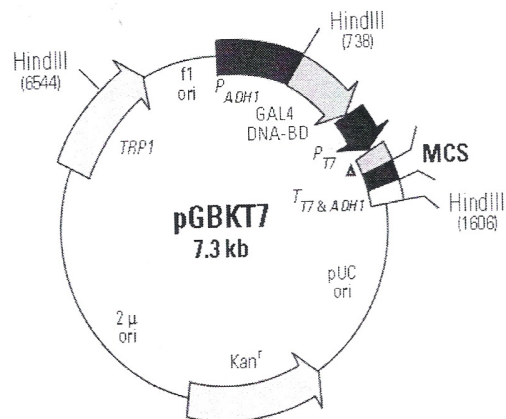
ZHANG, S.; JIN, G.; ZHANG, X.; CHEN, L. Discovering functions and revealing mechanisms at molecular level from biological networks. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, p. 2856–2869, 2007.

ANEXOS

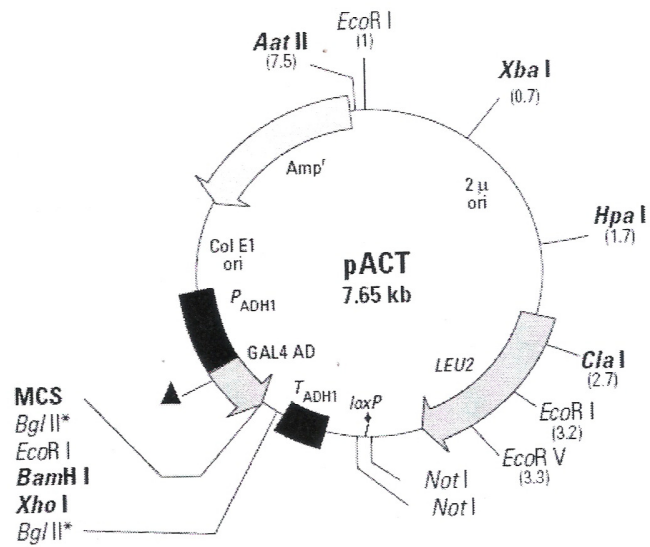
ANEXO 1- Sequências utilizadas na construção dos iniciadores específicos para GRF9 e ATH7, e os respectivos sítios de restrição EcoRI e BamHI (sublinhados), para clonagem no vetor pGBKT7.

	Iniciador	Iniciador reverso
GRF9	5' TTAG <u>AATTC</u> ATGGGTTCTGGAAAAGAGCGT 3'	5' TTAGGATCCTTAATTTGATTTACCCCGAGT 3'
ATH7	5' TTAG <u>AATTC</u> ATGGGTTCCAATGTTTCATCT 3'	5' TTAGGATCCTTAAACCCTATGTTGTTCAAT 3'

ANEXO 2- Vetor pGBKT7 utilizado nas clonagens dos genes GRF9 e ATH7 para os ensaios de duplo-híbrido em levedura



ANEXO 3- Vetor pACT utilizado para a clonagem da biblioteca de cDNA



ANEXO 4- Lista das proteínas com duplo direcionamento (DD) a mitocôndrias e cloroplastos confirmadas *in planta*, e seus respectivos códigos de acesso no banco de dados TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>), utilizada na análise de redes de interação proteína-proteína. Em negrito encontram-se as proteínas que não possuem interações listadas no AtPIN, e portanto não estão inclusas na rede de interação

(continua)

Acesso	Proteína DD
AT5G23060	unknown protein
AT5G08710	similar to UVR8
AT4G31210	similar to DNA topoisomerase III alpha
AT1G30680	similar to toprim domain-containing protein
At1g50200	Alanyl-tRNA synthetase
At5g22800	Alanyl-tRNA synthetase
At4g17300	Asparaginyl-tRNA synthetase
At4g33760	Aspartyl-tRNA synthetase
At2g31170	Cysteinyl-tRNA synthetase
At3g48110	Glycyl-tRNA synthetase
At5g64050	Glutamyl-tRNA synthetase
At3g46100	Histidyl-tRNA synthetase
At3g13490	Lysyl-tRNA synthetase
At3g55400	Methionyl-tRNA synthetase
At3g58140	Phenylalanyl-tRNA synthetase
At5g52520	Prolyl-tRNA synthetase
At1g11870	Seryl-tRNA synthetase
At2g04842	Threonyl- tRNA synthetase
At2g25840	Tryptophanyl-tRNA synthetase
At3g02660	Tyrosyl-tRNA synthetase
At3g25660	tRNA-dependant amidotransferase subunit A
At1g48520	tRNA-dependant amidotransferase subunit B
At4g32915	tRNA-dependant amidotransferase subunit C
At1g22660	tRNA nucleotidyltransferases
At3g19170	AtPreP metalloprotease1
At1g49630	AtPreP metalloprotease2
At4g26500	AtSufE
At5g15700	Phage-type RNA polymerase
At3g20540	γ -type DNA polymerase
At1g50840	γ -type DNA polymerase
At3g10690	DNA gyrase
At5g44785	OSB Proteins
At5g35630	Glutamine synthetase
At3g25740	Methionine aminopeptidase
At4g37040	Methionine aminopeptidase
At1g15390	Peptide deformylase
At5g14660	Peptide deformylase
At2g30320	Pseudouridine synthase
At5g24850	Cryptochrome

ANEXO 4- Lista das proteínas com duplo direcionamento (DD) a mitocôndrias e cloroplastos confirmadas *in planta*, e seus respectivos códigos de acesso no banco de dados TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>), utilizada na análise de redes de interação proteína-proteína. Em negrito encontram-se as proteínas que não possuem interações listadas no AtPIN, e portanto não estão incluídas na rede de interação

(conclusão)	
Acesso	Proteína DD
At5g24650	Preprotein and Amino Acid Transporter
At5g14780	Formate dehydrogenase
At4g08390	Ascorbate peroxidase
At1g63940	Monodehydroascorbate reductase
At3g54660	Glutathione reductase
At1g79230	Mercaptopyruvate sulfurtransferase
At2g39290	Phosphatidylglycerophosphate synthase I
At5g08740	NAD(P)H dehydrogenase C
At5g56940	Ribosomal protein S16
At5g54770	Thiazole biosynthetic enzyme

ANEXO 5- Proteínas associadas a mais de duas proteínas de duplo direcionamento (mitocôndrias e cloroplastos) resultantes da análise da rede de PPI feita utilizando-se o sistema AtPIN

(continua)

Acesso Tair	Proteína
ATCG00190	Chloroplast DNA-dependent poly B-plastid mitogenome
ATCG00740	RNA polymerase a-subunit
ATCG00180	RNA polymerase B-subunit
AT1G78630	Emb1473- constituent ribosome
AT4G33710	Patogenesis-related protein putative
AT1G54290	Translation initiation factor SUI1
AT4G28020	Unknown protein
AT3G24010	Inhibitor of growth- metilated histone binding
AT1G13950	Elongation factor 5a1-translation intiation factor
AT4G02930	Elongation factor tu
AT5G19150	Carbohydrate kinase
AT5G63680	Pyruvate kinase
AT2G36530	LOS copper ion binding-phosphopiruvate hidratase
AT3G11630	2-cys-peroxiredoxin chloroplast (BAS1)
AT1G59730	ATH7- thioredoxin H-type7
AT3G59280	TXR1- thaxomin A resistant 1
AT1G27970	NTF2B- nuclear transport factor
AT1G34580	Monossacaride transporter
AT3G05960	STP6- sugar transporter 6
AT5G09630	Protein binding/zinc ion binding
AT1G55300	TAF7 (TPB-associated factor)
AT4G25340	Imunophilin related FKBK
AT3G18660	PGSIP1 transferase
AT3G18850	LPAT5 acyltransferase
AT3G06470	GNS1/SUR4 membrane family protein
AT3G12280	RBR1-retinoblastoma related TF
AT3G59760	OASC (O-acetylserine)
AT3G52150	RNA recognition motif (RRM)
AT5G15450	CLPB3 (casein lytic proteinase B3)
AT2G33840	tRNA synthetase class I
AT1G07180	NDA1 (alternative NAP(P)H dehydrogenase
AT4G10040	CYTC-2 cytocrome c-2
AT2G42590	GRF9 general regulation factor 9
AT4G37910	mtHsc70-1 (mito Hsp)
AT5G52640	ATHSP901 heat shock protein
AT2G33210	Hsp60-2
ATCG01240	30S chloroplast ribossomal protein S7
AT3G13120	30S ribossomal protein S10 chloroplast
AT3G44890	RPL9 (ribossomal protein L9)
AT5G14320	30S ribossomal protein S13 chloroplast
ATCG00160	Chloroplast ribossomal protein S2
AT2G43030	Ribossomal protein L3
ATCG00800	Chloroplast ribossomal protein S3
ATCG00810	Chloroplast ribossomal protein L22
AT2G20060	Ribossomal protein L4

ANEXO 5- Proteínas associadas a mais de duas proteínas de duplo direcionamento (mitocôndrias e cloroplastos) resultantes da análise da rede de PPI feita utilizando-se o sistema AtPIN

		(conclusão)
Acesso Tair	Proteína	
AT2G33800	Ribossomal protein S5	
AT5G65430	General regulatory factor 8, G-BOX factor14 kappa	
AT1G06090	Fatty acid desaturase family protein	
AT2G36880	MAT3, methionine adenosyltransferase 3	
AT1G55690	SEC14 cytosolic factor / phosphoglyceride transfer family protein	
AT1G51770	Unknown protein	
AT3G26590	MATE efflux family protein- Multi antimicrobial extrusion protein	
AT2G02760	Ubiquitin conjugating enzyme UBC2	
AT1G78380	ATGSTU19	
AT4G38680	GRP2, glycine rich protein 2	
ATCG00830	Chloroplast ribosomal protein L2	
AT5G67270	ATEB1C, end binding protein 1C	
AT1G24240	Ribosomal protein L19 family protein	
AT3G23990	HSP60, heat shock protein 60-3B	
AT3G13860	HSP60-3A, heat shock protein 60-3A	
AT5G20000	26S proteasome AAA-ATPase subunit, putative	
AT4G18800	ATRABA1D, arabidopsis RAB GTPASE homolog A1D	
AT1G78770	Cell division cycle family protein; anaphase promoting complex	
AT2G29190	APUM2, arabidopsis pumilio 2	
AT5G52200	Unknown protein	
AT2G47090	Nucleic acid binding / protein binding / zinc ion binding	
AT3G62870	60S ribosomal protein L7A	
AT2G33340	MOS4-associated complex 3B	
ATCG00190	RNA polymerase subunit beta	
AT4G11060	MTSSB, mitochondrially targeted single-stranded dna binding protein	
AT2G33450	50S ribosomal protein L28, chloroplast (CL28);	
AT5G04130	DNA topoisomerase	

ANEXO 6- Proteínas selecionadas para o estudo utilizando-se bibliotecas de cDNA em ensaios de duplo-híbrido em levedura

Acesso Tair	Proteína selecionada	Proteínas de duplo direcionamento					
		DD	FSW	DD	FSW	DD	FSW
AT4G28020	unknown protein	peptide deformylase 1B	0.0745	Threonyl-tRNA synthetase	0.0306		
AT5G19150	carbohydrate kinase	Phosphatidilglycerol phosphate synthase	0.0880	Cysteiny-tRNA synthetase	0.1763		
AT5G63680	pyruvate kinase	Methionyl-tRNA synthetase	0.0082	Tyrosyl-tRNA synthetase	0.0353		
AT1G59730	ATH7-thioredoxin H-type7	Phosphatidilglycerol phosphate synthase	0.0294	Glutathione reductase	0.0355		
AT3G59280	TXR1- thaxomin A resistant 1	Phosphatidilglycerol phosphate synthase	0.0180	Glutathione reductase	0.0180	Seryl-tRNA synthetase	0.0085
AT2G42590	GRF9 general regulation factor 9	Mercaptopyruvate sulphurtransferase	0.0450	THI1	0.0045		
AT1G55690	SEC14 phosphoglyceride transfer family protein	Methionyl-tRNA synthetase	0.0948	Cysteiny-tRNA synthetase	0.1506		
AT1G51770	unknown protein	Methionyl-tRNA synthetase	0.0125	Cysteiny-tRNA synthetase	0.1920		
AT4G18800	ATRABA1D, ARABIDOPSIS RAB GTPASE HOMOLOG	Methionyl-tRNA synthetase	0.0509	AtPreP metalloprotease	0.0186		