

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

**Estudo do direcionamento das proteases FtsH plastidiais às
membranas dos tilacóides**

Ricardo Augusto de Oliveira Rodrigues

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

**Piracicaba
2011**

Ricardo Augusto de Oliveira Rodrigues
Bacharel em Ciências Biológicas

**Estudo do direcionamento das proteases FtsH plastidiais às membranas dos
tilacóides**

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

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

Piracicaba
2011

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

Rodrigues, Ricardo Augusto de Oliveira
Estudo do direcionamento das proteases FtsH plastidiais às membranas dos tilacóides /
Ricardo Augusto de Oliveira Rodrigues. - - Piracicaba, 2011.
123 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

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

CDD 581.19245
R696e

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

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcio de Castro Silva Filho, pela orientação, apoio e amizade ao longo desses quatro anos;

À FAPESP, pela bolsa concedida e, acima de tudo, pelo modelo de excelência na gestão de recursos destinados à pesquisa no estado de São Paulo;

À CAPES, pela bolsa sanduíche concedida;

Ao Prof. Dr. Kenneth Cline, pelo acolhimento no laboratório e fundamental participação para a obtenção deste trabalho;

Ao Rafael Colombi e Mike McCaffery, pela excelente ajuda técnica no desenvolvimento da tese;

À Universidade da Flórida, pela excelente infraestrutura disponibilizada durante minha estadia;

Ao Departamento de Biologia Celular da FMRP/USP pela disponibilização de microscópio confocal e, além disso, ao técnico Lenaldo Rocha pela excelente ajuda com o manuseio do equipamento;

Ao Dr. Wataru Sakamoto, por gentilmente ceder o anticorpo anti-var1, o que nos auxiliou grandemente nos experimentos;

À Dra. Maria Helena Goldman, por gentilmente ceder materiais que foram utilizados neste trabalho;

Aos amigos do laboratório nos EUA, Jose Celedon, Cassie Aldridge, Xianyue Ma e Jonathan Martin pelas excelentes discussões científicas e exemplo de pessoas com verdadeiro amor pela ciência;

Aos amigos de Gainesville Guilherme, Ronaldo e Mayra pela amizade e grande ajuda;

Aos inseparáveis amigos de Ribeirão Preto, Fernando Trigo, Paulo Roberto e Ricardo Soares, pela amizade e pelos incontáveis momentos de diversão;

Ao amigo Michael Brito pela amizade, companheirismo e excelentes discussões depois de uma partida de tênis;

Ao amigo Celso Fiori, pelos ótimos momentos passados juntos e inestimável ajuda no laboratório;

À Christine Petrina, pela ajuda com os experimentos de duplo-híbrido;

À Flávia Franco, pela amizade e organização do laboratório;

Ao Marcelo Brandão, pela amizade e excelentes cuidados com o laboratório;

Aos colegas de laboratório Camila, Carol, Daniele, Elaine, Eveline, Fabiana, Joze, Larissa, Ligia, Marcela, Renata, Wellington e Wiliane;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e não tem o nome citado nestes agradecimentos;

E por fim à minha família, Ricardo, Vera, Ana, Gabriel, Leticia e Júnior.

Uma coisa que se esclarece deixa de nos interessar. - Que queria dizer o deus que aconselhou: "Conhece a ti mesmo"? Isto significava talvez: "Deixa de interessar-te por ti! torna-te objetivo!" - E Sócrates? - E o homem científico?

Friedrich Nietzsche

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Transporte em procariotos	19
2.1.1 A via Sec-SRP	20
2.1.1.1 Peptídeos sinais	20
2.1.1.2 Transporte	21
2.1.2 A via TAT de transporte.....	22
2.1.2.1 Peptídeos sinais	23
2.1.2.2 Transporte	23
2.1.3 Transportadores ABC.....	25
2.1.3.1 Peptídeos sinais	25
2.1.3.2 Transporte	25
2.2 Transporte para o cloroplasto.....	26
2.2.1 Quatro vias independentes de transporte presentes na membrana do tilacóide...27	
2.2.2 A via SRP	28
2.2.3 A via Sec	28
2.2.4 A via TAT.....	29
2.2.5 A via espontânea.....	30
2.3 Proteases FtsH.....	31
2.3.1 Família gênica	32
2.3.2 Expressão e análise genética.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Isolamento de plasmídeos.....	35
3.1.1 Mini-preparação de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> (Utilizando Kit QIAGEN)	35
3.1.2 Mini-preparação de DNA plasmidial de <i>Escherichia coli</i>	35
3.2 Quantificação da concentração de DNA.....	36
3.3 Digestões enzimáticas do DNA	36
3.4 Eletroforese em gel de agarose	36

3.5 Purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose	37
3.6 Clonagens.....	37
3.7 Preparação de células eletrocompetentes de <i>Escherichia coli</i>	38
3.8 Eletroporação de <i>Escherichia coli</i>	38
3.9 Preparo de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
3.10 Eletroporação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
3.11 Transformação estável de <i>Nicotiana tabacum</i>	40
3.11.1 Obtenção de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> em condições estéreis.....	40
3.11.2 Obtenção dos segmentos foliares.....	40
3.11.3 Infecção dos segmentos foliares.....	40
3.11.4 Obtenção de brotos transgênicos	41
3.11.5 Transferência para a terra	41
3.12 Transformação transiente de <i>Nicotiana tabacum</i>	42
3.13 Preparo de protoplastos.....	42
3.14 Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i>	42
3.14.1 Cultivo das plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	42
3.14.2 Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
3.14.3 Seleção das plantas transformadas.....	43
3.15 Mini-extração de DNA genômico de planta.....	43
3.16 Extração de RNA total	44
3.17 Quantificação da concentração de RNA.....	44
3.18 Tratamento dos RNAs com a enzima DNase	44
3.19 Síntese de cDNA	45
3.20 Análises <i>in-silico</i>	45
3.21 Transcrição <i>in-vitro</i>	45
3.22 Preparação do gérmen de trigo	46
3.23 Tradução <i>in-vitro</i>	46
3.24 Isolamento de cloroplastos intactos	47
3.25 Importação <i>in-vitro</i> em cloroplastos isolados e integração ao tilacóide	48
3.26 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	48
3.27 Eletroforese em géis nativos.....	49

3.28 Coloração com azul de Comassie	49
3.29 Coloração com prata	49
3.30 Fluorografia	50
3.31 Duplo-híbrido de levedura	50
3.31.1 Transformação da linhagem AH109 com a isca de interesse	50
3.31.2 Transformação em larga-escala da linhagem AH109 com a biblioteca de <i>Arabidopsis</i>	51
3.31.3 Teste de crescimento em SC-HIS e SC-ADE	51
3.31.4 Análise dos clones positivos.....	52
3.32 Expressão em de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	52
3.33 Purificação de proteínas.....	53
3.33.1 Purificação utilizando resina de níquel (Ni-NTA)	53
3.33.2 Purificação utilizando “beads” de agarose.....	53
3.34 <i>GST-Pull Down</i>	54
3.35 <i>Western blot</i>	54
3.36 Microscopia confocal de fluorescência	54
4 RESULTADOS	57
4.1 As FtsHs tipo A e tipo B diferem pela presença/ausência da dupla arginina.....	57
4.2 pFtsH2 e pFtsH5 são integradas <i>in-vitro</i> através de um mecanismo de duas etapas	59
4.3 pFtsH2 requer o gradiente de prótons enquanto pFtsH5 requer o estrato estromal e NTPs para integração nos tilacóides.....	62
4.4 A integração da pFtsH2 é concorrida com um precursor TAT enquanto pFtsH5 é concorrida com um precursor Sec	64
4.5 Anticorpos anti-Hcf106 inibem a integração de pFtsH2 enquanto anticorpos anti- SecY inibem pFtsH5	65
4.6 A região N-terminal das pFtsH2 e pFtsH5 é suficiente para a inserção em tilacóides	66
4.7 A região madura da pFtsH2 apresenta incompatibilidade com a via Sec.....	68
4.8 A cauda lumenal, âncora transmembrânica e região exposta ao estroma da FtsH2 são necessárias para a incompatibilidade	70

4.9 FtsH7 e FtsH9 não apresentam a dupla arginina nem o sítio de clivagem A-X-A ...	71
4.10 As FtsH7 e FtsH9 são direcionadas <i>in-vivo</i> e <i>in-vitro</i> para o cloroplasto	72
4.11 FtsH7 e FtsH9 são encontradas nas frações do envelope plastidial e tilacóides...	75
4.12 Uma proteína hipotética plastidial potencialmente interage com a protease FtsH5	77
4.13 A proteína FIP apresenta um domínio rico em cisteína conservado na região C-terminal.....	79
4.14 FIP interage com o domínio C-terminal de proteases FtsH do tipo A	80
4.15 FIP é direcionada <i>in-vivo</i> e <i>in-vitro</i> aos cloroplastos e está inserida nos tilacóides	82
4.16 A proteína FIP está associada a um complexo de aproximadamente 440 kDa	84
4.17 Expressão heteróloga em <i>E. coli</i> das construções GST::FIP e His::FtsH5.....	85
4.18 GST Pull-Down mostra que há a interação <i>in-vitro</i> entre FIP e FtsH5.....	86
5 DISCUSSÃO.....	89
5.1 Direcionamento das proteínas FtsH2 e FtsH5 ao tilacóide	89
5.2 Localização das FtsH7 e FtsH9	92
5.3 A proteína FIP e a interação com FtsH5.....	94
6 CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS	99
ANEXOS.....	117

RESUMO

Estudo do direcionamento das proteases FtsH plastidiais às membranas dos tilacóides

O complexo FtsH em *Arabidopsis*, presente nos tilacóides, é formado pelas subunidades FtsH1/FtsH5 (tipo A) e FtsH2/FtsH8 (tipo B). Os tipos A e B apresentam grande identidade em seus domínios maduros, porém nenhuma similaridade é observada na região amino-terminal do peptídeo de trânsito. Em um experimento de importação em cloroplastos isolados, FtsH2 e FtsH5 foram importadas e subsequentemente integradas aos tilacóides através de um mecanismo de processamento em duas etapas que resultou em um domínio luminal amino-proximal, uma única âncora transmembrânica e um domínio carboxi-proximal estromal. A integração da FtsH2 em tilacóides isolados foi totalmente dependente do gradiente de prótons, enquanto que a integração da FtsH5 foi dependente de NTPs, sugerindo que a inserção na membrana ocorre pelas vias TAT e Sec, respectivamente. Tal observação foi corroborada por experimentos de competição *in-organello* e inibição por anticorpos específicos. Os domínios amino-proximais até as âncoras transmembrânicas foram suficientes para a correta integração aos tilacóides. A região madura da FtsH2 apresentou incompatibilidade com a maquinaria Sec, como demonstrado pela troca de peptídeos de trânsito. A incompatibilidade não parece ser determinada por qualquer elemento específico da FtsH2, uma vez que nenhum domínio isolado apresentou incompatibilidade com a via Sec de transporte. Tal fato sugere uma incompatibilidade estrutural que requer a FtsH2 intacta. A descoberta que as subunidades FtsH do tipo A e B, que apresentam grande identidade e usam diferentes vias de integração para formar o mesmo complexo multimérico é uma observação nova e interessante para o estudo da biogênese de proteínas de membranas. O mecanismo de regulação que governa a atividade do complexo FtsH em *Arabidopsis* é ainda desconhecido, entretanto é proposta a existência de fatores adicionais. Dessa forma, a proteína plastidial FtsH de *Arabidopsis* foi usada como isca em um rastreamento por duplo-híbrido de levedura. O rastreamento resultou em 48 colônias que ativaram os genes repórteres histidina e adenina. Entre todos os cDNAs sequenciados, foi encontrado um candidato em potencial denominado FIP (**F**tsH5 **I**nteracting **P**rotein). Experimentos GST *Pull-Down* também indicam uma interação entre FtsH5 e FIP. O precursor FIP radioativo foi incubado com cloroplastos de ervilha. Após a incubação, os cloroplastos foram lisados e separados em estroma e tilacóides. FIP permaneceu associada exclusivamente à fração membranosa dos tilacóides. A inserção na membrana foi verificada através da resistência ao tratamento com álcali e o tratamento dos tilacóides com protease resultou em um fragmento protegido, característico de proteínas inseridas na membrana. A construção FtsH5::GFP transformada em *Nicotiana tabacum* resultou no direcionamento do gene quimérico aos cloroplastos. Dessa forma, assim como FtsH5, FIP é uma proteína plastidial que está localizada na membrana dos tilacóides. Géis nativos utilizando FIP radioativa mostram que ela está associada a um complexo de aproximadamente 450 kDa, que é o tamanho esperado para o complexo tilacoidal FtsH em *Arabidopsis*. Como as proteínas FtsH apresentam tanto o domínio ATPase

quanto protease, acreditamos que FIP pode de alguma forma modular a atividade do complexo FtsH nos tilacóides.

Palavras-chave: FtsH; *Arabidopsis*; Cloroplasto; Tilacóide; Importação *in-vitro*

ABSTRACT

Study of plastidial FtsH proteases targeting to thylakoid membranes

The *Arabidopsis* thylakoid FtsH protease complex is composed of FtsH1/FtsH5 (type A) and FtsH2/FtsH8 (type B) subunits. Type A and type B subunits display a high degree of sequence identity throughout their mature domains, but no similarity in their amino-terminal targeting peptide regions. In chloroplast import assays, FtsH2 and FtsH5 were imported and subsequently integrated into thylakoids by a two-step processing mechanism that resulted in an amino-proximal luminal domain, a single transmembrane anchor, and a carboxyl proximal stromal domain. FtsH2 integration into washed thylakoids was entirely dependent on the proton gradient, whereas FtsH5 integration was dependent on NTPs, suggesting their integration by Tat and Sec pathways, respectively. This finding was corroborated by *in organello* competition and by antibody inhibition experiments. The amino proximal domains through the transmembrane anchors were sufficient for proper integration. The mature FtsH2 protein was found to be incompatible with the Sec machinery as determined with targeting peptide-swapping experiments. Incompatibility does not appear to be determined by any specific element in the FtsH2 domain as no single domain was incompatible with Sec transport. This suggests an incompatible structure that requires the intact FtsH2. That the highly homologous type A and type B subunits of the same multimeric complex use different integration pathways is a striking example of the notion that membrane insertion pathways have evolved to accommodate structural features of their respective substrates. The regulation mechanism which governs the *Arabidopsis* FtsH complex's activity is still unknown, but it is proposed the presence of additional factors. For this reason, the plastidial *Arabidopsis* FtsH5 was used as bait in a yeast two hybrid screening. The screening resulted in 48 colonies that activated the histidine and adenine reporter genes. Among all the sequenced cDNAs we have found a potential candidate named FIP (FtsH5 Interacting Protein). GST Pull-Down experiments also indicate an interaction between FtsH5 and FIP. Radiolabeled FIP was incubated with intact isolated chloroplasts. After incubation, intact chloroplasts were lysated and separated into stroma and thylakoids. FIP remained associated exclusively with the thylakoid membrane fraction. The insertion into membrane was verified throughout resistance to alkali treatment and the thylakoid protease treated fraction resulted in a protected fragment, characteristic of membrane-inserted proteins. Agroinfiltrated *Nicotiana tabacum* leaves with a FtsH5::GFP construct resulted that the chimeric gene was targeted to chloroplasts. Thus, as FtsH5, FIP is a plastidial protein which is located into thylakoid membrane. Blue native gels using radiolabeled FIP protein show that it runs associated with a complex around 450 kDa, which is the expected size for the *Arabidopsis* FtsH thylakoidal complex. As FtsH proteins present both ATPase and protease domains, we believe that FIP can somehow modulates the activity of the thylakoidal FtsH complex.

Keywords: FtsH; *Arabidopsis*; Chloroplast; Thylakoid; *In-vitro* import

1 INTRODUÇÃO

O transporte de proteínas é um mecanismo essencial para o funcionamento dos seres vivos. Em eucariotos, na maior parte dos casos, o processo é específico para cada compartimento subcelular e envolve uma complexa maquinaria de importação, incluindo receptores específicos, chaperonas e sequências de sinalização distintas. O cloroplasto é uma organela interessante para os estudos de direcionamento, pois importa do citossol cerca de 90% da totalidade de suas proteínas. Além disso, possui um intrincado sistema de transporte intraorganelar, sendo que um substrato traduzido no citoplasma pode ser destinado à membrana externa, espaço de intermembranas, membrana interna, estroma, membrana dos tilacóides e lúmen. Para alcançarem o tilacóide, os substratos contam com pelo menos quatro vias distintas: A via SRP, a via Sec, a via TAT e a via espontânea (CLINE; DABNEY-SMITH, 2008). Entre os substratos que são direcionados aos cloroplastos estão as proteínas FtsH. As FtsH são metaloproteases dependentes de ATP que pertencem à família AAA, sendo que, em plantas, verificou-se que sua principal função está na degradação da proteína D1 do fotossistema II (SAKAMOTO, 2006). Foi mostrado, por nosso grupo de pesquisa, que as FtsHs plastidiais podem ser agrupadas em três clados distintos e que, provavelmente, estão associados ao mecanismo de transporte às membranas dos tilacóides. Estas observações abriram novas possibilidades para a compreensão dos mecanismos de transporte protéico no cloroplasto, notadamente no que se refere ao transporte à membrana dos tilacóides.

Este trabalho visou o melhor entendimento dos mecanismos de transporte e regulação das proteínas FtsH e pode ser dividido em três partes. A primeira parte (itens 4.1 a 4.8) é relacionada ao estudo do direcionamento e integração à membrana dos tilacóides dos substratos FtsH2 e FtsH5, componentes do complexo hetero-hexâmero FtsH nos tilacóides. O objetivo foi compreender a diferença encontrada na sequência de direcionamento de tais proteínas, uma vez que apresentam alta similaridade na sequência funcional ativa e são integrantes do mesmo complexo.

A segunda parte (itens 4.9 a 4.11) se baseou no estudo dos pares FtsH7 e FtsH9. Tal grupo não apresenta os domínios clássicos necessários para o transporte ao

tilacóide e, além disso, não são conhecidos dados básicos como localização intra-plastidial, formação de complexos e função.

Por fim, a terceira parte (itens 4.12 a 4.18) focou a identificação e caracterização de fatores em potencial que estejam envolvidos na regulação do complexo FtsH2/5 nos tilacóides. Apesar da topologia do complexo apresentar dados bem refinados, o mecanismo de regulação do mesmo ainda é desconhecido. Pressupõe-se a existência de fatores protéicos que participem do mecanismo de regulação da proteólise em cloroplastos, uma vez que em *E. coli* o complexo FtsH está associado à um outro complexo de alto peso molecular (SAIKAWA; AKIYAMA; ITO, 2004).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Uma célula eucariótica típica pode conter até 10.000 tipos diferentes de proteínas. A vasta maioria é sintetizada por ribossomos citossólicos, sendo que muitas permanecem no próprio citoplasma. Entretanto, mais da metade dos diferentes tipos de proteínas produzidas em uma célula pode ser destinada a uma membrana celular em particular, a um compartimento aquoso além do citoplasma ou a superfície celular para secreção. Por exemplo, vários receptores hormonais protéicos devem ser transportados para a membrana plasmática, algumas enzimas como RNA ou DNA polimerase são direcionadas para o núcleo e os componentes da matriz extracelular são destinados a superfície celular para secreção. Estas e todas as outras proteínas produzidas pela célula devem alcançar seus locais adequados para o funcionamento correto da célula.

O direcionamento protéico (“protein targeting” ou “protein sorting”) envolve dois tipos de processos muito distintos. O primeiro processo geral envolve o direcionamento de proteínas à membrana de organelas intracelulares, podendo ocorrer tanto durante como após a tradução da proteína no ribossomo. Para proteínas de membrana, o direcionamento leva a inserção do peptídeo na bicamada lipídica e, para proteínas solúveis, o direcionamento leva ao transporte da proteína inteira ao interior aquoso da organela. Através deste processo, as proteínas são destinadas ao retículo endoplasmático, mitocôndria, cloroplasto, peroxissomo e núcleo (Figura 1, *direita*). O segundo processo envolve as proteínas que são inicialmente direcionadas à membrana do retículo endoplasmático, constituindo a via secretória. Estas proteínas incluem não somente proteínas solúveis e de membrana (que residem no próprio retículo endoplasmático), mas também proteínas que são secretadas da célula, enzimas e outras proteínas residentes no complexo de Golgi, lisossomos e vacúolo (Figura 1, *esquerda*).

As proteínas exportadas são geralmente sintetizadas como precursores que apresentam um peptídeo sinal amino-terminal, que é reconhecido e decifrado por uma maquinaria celular de transporte. Peptídeos sinais consistem de pequenas sequências de aminoácidos que, após a entrega da proteína ao compartimento subcelular, são geralmente removidos por peptidases específicas. Em geral, a pré-proteína é

inicialmente reconhecida por fatores que a transportam à membrana alvo, onde se associa ao complexo de transporte. Em seguida, a cadeia polipeptídica é transportada através de um canal protéico. Na maioria dos casos o transporte é movido por um “motor” de transporte que hidrolisa ATP. Por fim, o peptídeo sinal é removido, resultando na liberação da cadeia madura da proteína.

A seguir, são apresentados os dados mais recentes dos modelos de transporte protéico em organismos procariotos e em cloroplastos, sendo o último o principal objeto de estudo desta tese.

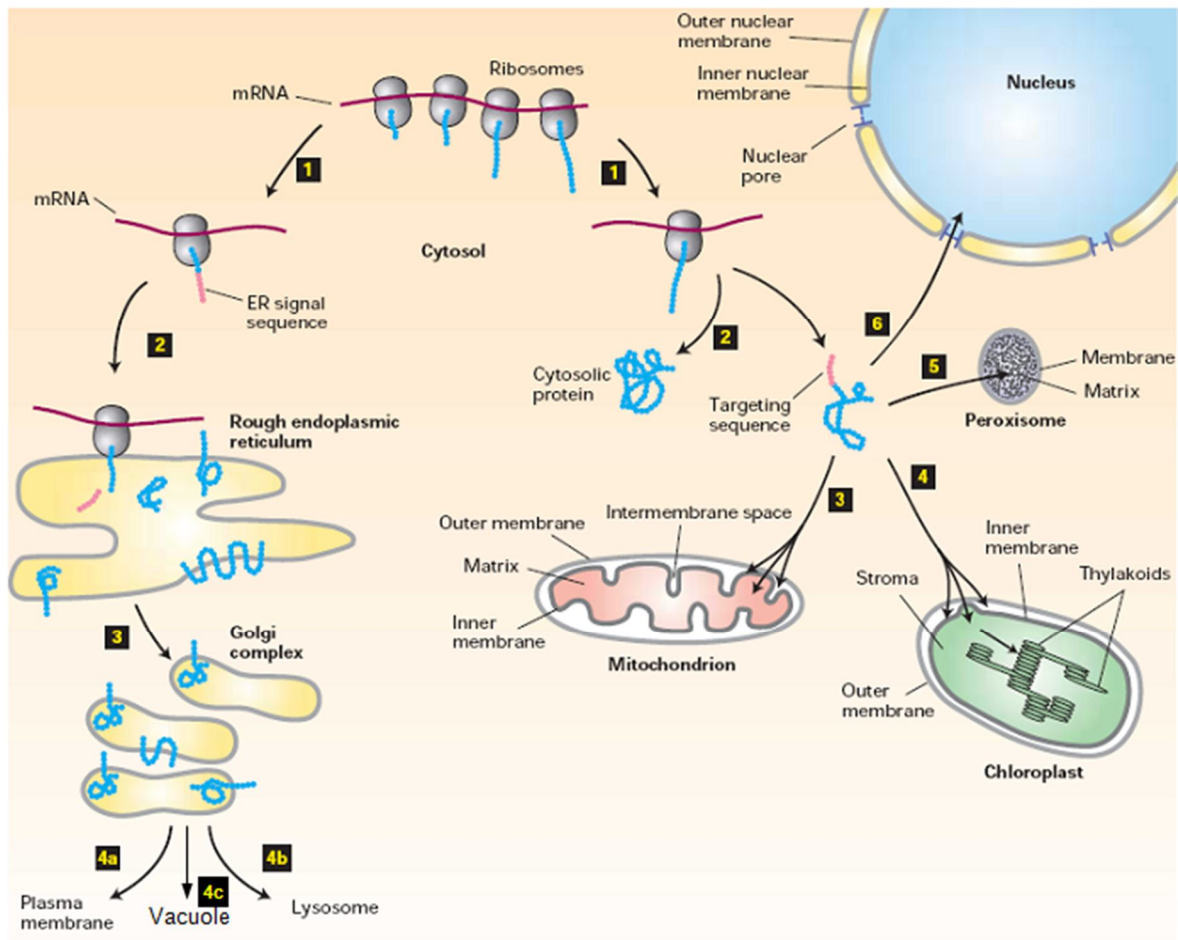


Figura 1 - Visão geral das principais rotas de transporte proteico em células eucarióticas. Todos os RNAs mensageiros codificados pelo núcleo são traduzidos em ribossomos citossólicos. *Esquerda (via secretória)*. Os ribossomos sintetizam proteínas nascentes que são direcionadas para o retículo endoplasmático rugoso por uma sequência sinal (rosa; passos 1 e 2). Após o término da tradução, estas proteínas podem ser mover através de vesículas de transportes para o complexo de Golgi (passo 3). Em seguida, tais proteínas podem ser destinadas à membrana plasmática (passo 4a), aos lisossomos (passo 4b) ou ao vacúolo (4c). *Direita (via não secretória)*. Síntese de proteínas que não apresentam um sinal de direcionamento ao retículo endoplasmático é realizada em ribossomos livres (passo 1). Estas proteínas que não contém uma sequência de destino são liberadas no citoplasma e lá permanecem (passo 2). As proteínas com uma sequência de direcionamento específica de organelas (rosa) são inicialmente liberadas no citoplasma (passo 2) porém em seguida são importadas para mitocôndrias, cloroplastos, peroxissomos e núcleo (passos 3 – 6). Proteínas mitocondriais e cloroplastidiais normalmente passam através das membranas internas e internas para entrarem na matriz ou estroma, respectivamente. Outras proteínas são direcionadas a outros sub-compartimentos destas organelas, através de passos adicionais modificado de (LODISH, 2000)

2.1 Transporte em procaríotos

Ao contrário do que ocorre em células eucarióticas, o transporte em células bacterianas é limitado a poucos compartimentos, como a membrana citoplasmática, parede celular, periplasma e membrana externa, além da secreção direta no meio de

crescimento. Em geral, as proteínas recém-sintetizadas podem ser destinadas e translocadas através da membrana celular, via uma diversidade de rotas presentes nos organismos procariontes. Até então, quatro vias distintas para a exportação de proteínas, a partir do citoplasma, são descritas. O maior número de proteínas é transportado através da via de cooperação Sec-SRP (YAMANE; BUNAI; KAKESHITA, 2004). Por outro lado, a via TAT (**T**win **A**rginine **T**ranslocation) (JONGBLOED et al., 2000), os transportadores ABC (**A**TP-**B**inding **C**assete) (QUENTIN; FICHANT; DENIZOT, 1999) e a via de exportação pseudopilina (DUBNAU, 1997) podem ser colocados como vias especiais, através das quais somente uma pequena parcela de proteínas são transportadas. As vias Sec-SRP e TAT são consideradas funcionais não somente na secreção de proteínas ao meio de cultura e parede celular, mas também para inserção protéica à membrana citoplasmática.

2.1.1 A via Sec-SRP

O sistema SRP de destino protéico à membrana celular e a maquinaria Sec de transporte de proteínas constituem a principal via de transporte de proteínas em organismos procariontes. A secreção de proteínas através da via Sec-SRP pode ser dividida em três estágios funcionais: marcação, transporte e dobramento/liberação. As proteínas nessa via são transportadas em uma conformação “desdobrada” e, após a translocação, são dobradas em suas conformações nativas. O destino das proteínas que utilizam a via Sec de transporte pode ser a membrana citoplasmática, parede celular ou o meio extracelular (MORI; ITO, 2001; VAN WELY et al., 2001; LI; ZHOU; LU, 2004).

2.1.1.1 Peptídeos sinais

Os peptídeos sinais que direcionam as proteínas à via Sec-SRP podem ser divididos em duas classes: peptídeos sinais de secreção (tipo Sec) e peptídeos sinais lipoprotéicos. Os peptídeos do tipo Sec atuam direcionando as pré-proteínas do citoplasma para o meio de crescimento, enquanto os precursores protéicos, com peptídeos sinais lipoprotéicos, são retidos no lado citoplasmático da membrana. Os peptídeos sinais apresentam pelo menos três funções, que incluem prevenir a formação

de cadeias nascentes mal-formadas dentro das células, reconhecimento e direcionamento à maquinaria de secreção (DALBEY et al., 2000) e determinante topológico para pré-proteínas na membrana (VAN ROOSMALEN et al., 2004).

Embora os diferentes peptídeos sinais apresentem pequena identidade na sequência de aminoácidos, três domínios distintos podem ser identificados: uma região N-terminal positivamente carregada (região N), uma região hidrofóbica central (região H) e uma região C-terminal polar (região C). A região N, que apresenta dois ou três resíduos de arginina (R) ou lisina (L), determina a orientação do peptídeo sinal na membrana devido à sua alta carga positiva. Resíduos de prolina (P) ou glicina (G) são frequentemente encontrados na metade da região H. Acredita-se que tal estrutura adota uma conformação do tipo α -hélice na membrana. A região C comumente carrega um sítio de clivagem SPase do tipo I, com a sequência consenso Ala-X-Ala ou Val-X-Ala, nas posições -1 e -3 do sítio de clivagem (SIMONEN; PALVA, 1993; TJALSMA et al., 2004).

2.1.1.2 Transporte

As proteínas a serem transportadas são sintetizadas nos ribossomos como proteínas precursoras, com um peptídeo sinal N-terminal (do tipo Sec). Inicialmente há a interação e reconhecimento entre o peptídeo sinal e o complexo SRP. O complexo SRP (**S**ignal **R**ecognition **P**article) atua no reconhecimento do peptídeo sinal de uma cadeia polipeptídica nascente, a partir do ribossomo. O SRP consiste de um RNA citoplasmático pequeno (scRNA) com 271 nucleotídeos, uma Ffh (uma GTPase que é homóloga a subunidade de 54 kDa do SRP eucariótico) e duas moléculas da proteína Hbsu. Em seguida, o complexo SRP-substrato é destinado ao complexo Sec. Em geral, as translocases Sec consistem das subunidades SecA (proteína motora), SecYEG (poro) e SecDF. SecA é uma ATPase associada à membrana, com afinidade pelo complexo SRP-substrato e pelas proteínas de membrana (SecYEG e SecDF), promovendo a energia necessária para o transporte protéico (TJALSMA et al., 2004). Logo após, o domínio N carregado positivamente do peptídeo sinal interage com os fosfolípidos da membrana carregados negativamente, levando a inserção do domínio

H. Após o domínio H ser inserido, a primeira parte da pré-proteína é empurrada através da membrana (VAN ROOSMALEN et al., 2004).

Durante (ou logo após o transporte) o peptídeo sinal é clivado por uma SPase, resultando na liberação da proteína madura do complexo de transporte. As SPases do tipo I removem os peptídeos sinais das proteínas através da clivagem da sequência Ala/Val-X-Ala. O processo se baseia na ancoragem da SPase e da região H do peptídeo sinal na membrana, permitindo o reconhecimento da sequência de clivagem correta (CARLOS et al., 2000). Após a clivagem, AppA e TepA são necessários para a subsequente degradação do peptídeo sinal clivado. Tal peptídeo, se não for degradado, promove a inibição de outros ciclos de transporte (BOLHUIS et al., 1999).

Por fim, chaperonas estão envolvidas no dobramento da proteína secretada. Em *Bacillus subtilis* encontram-se dois tipos de chaperonas, intracelular e extracitoplasmática. As séries GroE e DnaK são chaperonas intracelulares que promovem o dobramento protéico, minimizam o agregamento e mantêm as pré-proteínas em conformações competentes para o transporte (HOMUTH et al., 1997).

2.1.2 A via TAT de transporte

A via TAT (**T**win-**A**rginine **T**ranslocation) é um mecanismo de transporte alternativo, presente em cloroplastos e vários organismos procariontes. É importante para uma variedade de processos biológicos, incluindo divisão celular, patogenicidade, respiração anaeróbica e degradação/aquisição de compostos orgânicos e inorgânicos (OCHSNER et al., 2002; DING; CHRISTIE, 2003; IZE et al., 2003). Excetuando-se os cloroplastos, a via TAT não é encontrada em eucariontes. Os substratos TAT e Sec podem ser distinguidos pelas suas naturezas pré-secretórias. Em contraste aos substratos Sec, que são transportados não dobrados através de um poro na membrana, os substratos TAT adquirem uma estrutura terciária, aparentemente como um pré-requisito para a translocação (DELISA; TULLMAN; GEORGIU, 2003). Os substratos TAT devem ser transportados de maneira temporalmente controlada, de modo que os eventos de dobramento específicos (inserção de cofatores, dobramento por chaperonas ou oligomerização de proteínas) ocorram anteriormente ao transporte.

2.1.2.1 Peptídeos sinais

A via de transporte de determinado substrato é determinada pela sequência sinal N-terminal da proteína (VON HEIJNE; STEPPUHN; HERRMANN, 1989). Neste contexto, poderia afirmar-se que as sequências de direcionamento que separam as vias de transporte são bem distintas. Entretanto, os sinais de destino TAT e Sec são muito similares: ambos possuem resíduos carregados positivamente na extremidade N-terminal, seguidos por um alongamento hidrofóbico e, frequentemente, um sítio de clivagem (BERKS, 1996).

Três domínios distintos (domínios N, H e C) estão presentes nos peptídeos sinais que direcionam as proteínas na via TAT. Especificamente, as proteínas carregam peptídeos sinais com uma dupla de aminoácidos arginina na região carregada positivamente (os quais dão o nome à via). Até então, a sequência conservada de resíduos era definida por **S/T R R F L K** (BERKS, 1996). Acreditava-se que a dupla arginina era indispensável para o transporte, através de estudos em que a substituição de qualquer um destes aminoácidos resultou em retardo na secreção. Entretanto, a descoberta de peptídeos sinais KR, nos quais um resíduo de lisina substitui o primeiro resíduo da dupla invariável de arginina, mostra que a predição dos peptídeos sinais para a via TAT não podem ser baseadas exclusivamente na presença da dupla de aminoácidos (JONGBLOED et al., 2002).

Em *B. subtilis*, de 69 proteínas com peptídeos sinais do tipo **RR-/KR-**, 14 foram detectadas no meio de crescimento. Destas, oito foram preditas a apresentar sinais do tipo RR, as restantes a conter peptídeos do tipo KR (JONGBLOED et al., 2002). Surpreendentemente, das 14 proteínas com peptídeos sinais RR/KR, 13 foram independentes da via TAT, mostrando que a maquinaria TAT não reconhece seus domínios RR/KR. No momento, somente duas proteínas –RR apresentam secreção dependente de TAT (JONGBLOED et al., 2004). Portanto, o critério de predição de verdadeiros peptídeos sinais RR/KR necessita ser refinado.

2.1.2.2 Transporte

A atividade da maquinaria TAT, para transporte através da membrana interna de *E. coli*, requer a presença de três proteínas de membrana: TatA, TatB e TatC (ALAMI et

al., 2003; MALDONADO et al., 2011). O substrato é inicialmente ligado ao complexo TatBC, em um passo independente de energia (PORCELLI et al., 2002). Experimentos de foto-afinidade sugerem que TatC se liga à sequência consenso do peptídeo sinal, sendo, portanto, o primeiro local de reconhecimento dos peptídeos TAT (ALAMI et al., 2003).

Em seguida, o complexo TatBC-substrato associa com TatA (ALAMI et al., 2003). Essa associação persiste até o substrato ser transportado através da membrana (MORI; CLINE, 2002). Após, o peptídeo sinal do substrato é clivado pela peptidase LepB, uma enzima que é também utilizada em processos da via Sec. A atividade de LepB é localizada no lado periplasmático da membrana. Visto que o local de clivagem é imediatamente adjacente ao domínio da proteína madura, pode-se inferir que a remoção do peptídeo sinal ocorre tardiamente no ciclo de transporte, somente após o domínio maduro ter alcançado o lado periplasmático da membrana (BERKS; SARGENT; PALMER, 2000). Em contrapartida, na via Sec, o peptídeo sinal é clivado antes do transporte da proteína madura.

Devido aos substratos TAT apresentarem até 70 Å de diâmetro, a movimentação dos substratos através da membrana requer um canal consideravelmente largo. É proposto que este canal seja formado primariamente por TatA, devido a este componente atuar subsequente ao reconhecimento por TatBC. Em estudos de microscopia eletrônica, TatA parece apresentar uma cavidade de 70 Å de diâmetro, uma vez que o complexo TatBC não apresentam características comparáveis à estruturas de canais (SARGENT et al., 2001).

O mecanismo de transporte TAT é especialmente intrigante, visto que é o único mecanismo geral de translocação que transporta proteínas montadas através de forças iônicas. Como seria possível o sistema TAT transportar proteínas sem deixar a membrana permeável a prótons (e outros íons) e como a energia do gradiente eletroquímico é transferida para efetuar o transporte unidirecional, ainda são questões pouco esclarecidas.

2.1.3 Transportadores ABC

Os transportadores ABC (**A**T**P**-**B**inding **C**assette), presentes em eucariontes e procariontes, constituem uma ampla superfamília de permeases que exportam ou importam vários tipos de moléculas (íons, aminoácidos, peptídeos, antibióticos, polissacarídeos, proteínas, entre outros) através de membranas biológicas, com relativa especificidade por um determinado substrato (FATH; KOLTER, 1993). Algumas proteínas secretadas e peptídeos antimicrobianos, que são incompatíveis com as vias Sec-SRP ou TAT, podem ser exportados pelos transportadores ABC, facilitando assim a secreção.

2.1.3.1 Peptídeos sinais

Os peptídeos sinais que direcionam a secreção de antibióticos ou feromônios no meio são comumente chamados de peptídeos líderes, com região N-terminal clivável. Estes peptídeos líderes consistem somente dos domínios N- e C-, estando completamente ausente o domínio hidrofóbico H (TJALSMA et al., 2004). Peptídeos líderes lantibióticos apresentam de 23 a 30 resíduos de aminoácidos de comprimento. Especificamente, os peptídeos líderes apresentam uma importante função na modificação pós-traducional dos lantibióticos (MCAULIFFE; ROSS; HILL, 2001).

2.1.3.2 Transporte

Assim como o sistema Sec-SRP, todos os transportadores ABC necessitam de energia para facilitar o transporte, utilizando a hidrólise de ATP como fonte de energia. Um exportador típico consiste de dois domínios hidrofóbicos, localizados na face citoplasmática da membrana, promovendo a hidrólise de ATP para processar o transporte (QUENTIN; FICHANT; DENIZOT, 1999). Em *B. subtilis* há dois sistemas principais de transporte: SpaT e SunT. O sistema SpaT foi descrito para atuar em uma etapa de transporte da via biossintética da subtilina (KLEIN et al., 1992). O sistema SunT foi primeiramente descrito como transportador da sublancina 168. Os transportadores contêm uma dupla função apresentando, além da atividade transportadora, atividade proteolítica. Os mecanismos moleculares de translocação dos transportadores do tipo ABC ainda estão pouco esclarecidos.

2.2 Transporte para o cloroplasto

Os cloroplastos realizam uma variedade de funções bioquímicas dentro das células vegetais, embora tais organelas sejam mais conhecidas como o local da fotossíntese. O cloroplasto possui um sistema de membrana que representa o modelo procariótico (tilacóides), eucariótico (membrana externa do envelope) e estruturas mistas (membrana interna do envelope). Conseqüentemente, entre os mecanismos de transporte de proteínas presentes, podem ser encontradas vias de exportação procariótica e de importação eucariótica. Embora possuam seu próprio genoma, os plastídios codificam somente uma pequena porção de proteínas. A grande maioria é codificada pelo núcleo, traduzida no citoplasma e encaminhada a diferentes destinos dentro do cloroplasto, por vias de transporte específicas.

O primeiro passo para o transporte de proteínas ao cloroplasto é comum a todas as rotas de transporte, envolvendo a síntese das moléculas precursoras no citoplasma e posterior transporte através da membrana do cloroplasto. Com exceção de poucos exemplos descritos (MIRAS et al., 2002; NADA; SOLL, 2004), todas as proteínas codificadas pelo núcleo (e importadas para o cloroplasto) são sintetizadas como moléculas precursoras que apresentam peptídeos de trânsito na região N-terminal, sendo responsáveis por direcionar os precursores através das duas membranas do envelope plastidial. Embora tais peptídeos apresentem variações consideráveis no tamanho e sequência de aminoácidos, eles podem compartilhar algumas características gerais como um alto conteúdo de resíduos hidroxilados, ausência de resíduos ácidos e, em geral, uma natureza hidrofílica (VON HEIJNE; STEPPUHN; HERRMANN, 1989).

O transporte através do envelope da membrana do cloroplasto é mediado por complexos de translocação de proteínas denominados TOC (**T**ranslocon at the **O**uter envelope membrane of **C**hloroplasts) para a membrana externa e TIC (**T**ranslocon at the **I**nnner envelope membrane of **C**hloroplasts) para a membrana interna. Após atravessar as duas membranas do cloroplasto há o processamento do peptídeo de trânsito por uma peptidase presente no estroma (SPP - **S**tromal **P**rocessing **P**eptidase).

2.2.1 Quatro vias independentes de transporte presentes na membrana do tilacóide

O transporte de proteínas à ou através da membrana do tilacóide se dá através de quatro vias independentes de transporte, denominadas via de transporte Sec, via SRP, via TAT e espontânea. Cada uma opera com um mecanismo único e são específicas para um conjunto de proteínas do tilacóide, como detalhadas a seguir (Figura 2).

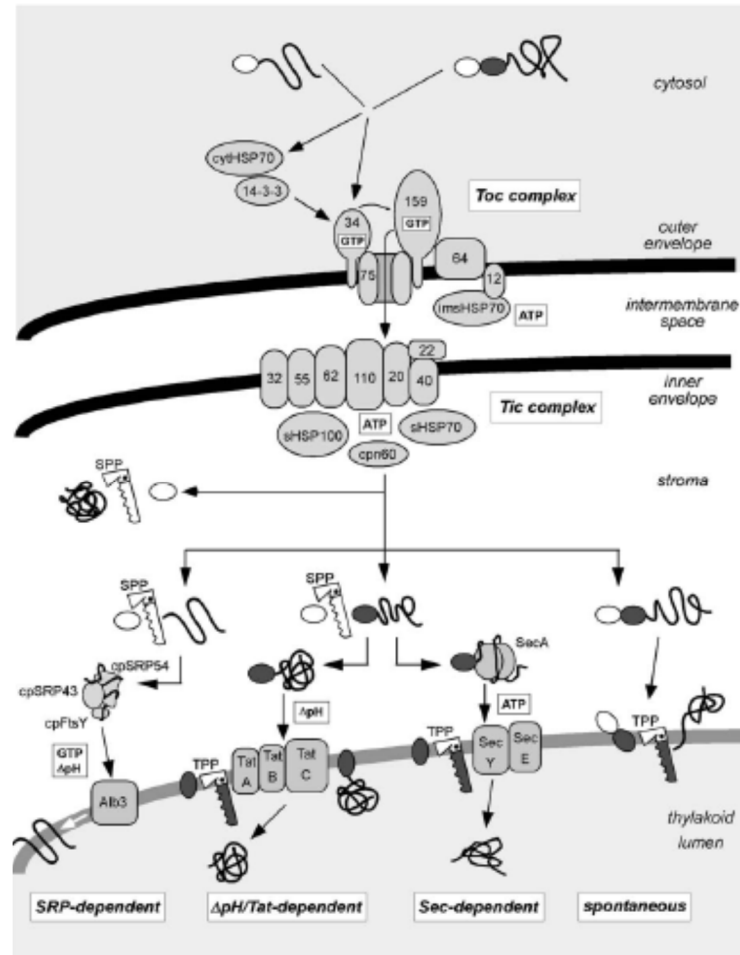


Figura 2 - Modelo dos mecanismos de importação de proteínas ao cloroplasto. Os componentes dos complexos TIC e TOC (Translocon at the Outer/Inner envelope membrane of Chloroplasts) estão representados de acordo com seus pesos moleculares. Sinais de importação para o estroma são mostrados como círculos abertos; Peptídeos sinais de importação ao tilacóide são representados como círculos preenchidos. Da mesma forma, as peptidases do estroma e tilacóide são representadas como serras brancas e cinzas, respectivamente. Para cada via, as respectivas fontes de energia estão indicadas (14-3-3: 14-3-3 protein, cpFtsY: chloroplast SRP receptor FtsY, cpn60: chaperonin 60, cpSRP: chloroplast signal recognition particle, cyt-/ims-/s-HSP70: cytosolic-/intermembrane space-/stromal-heatshock protein 70 kDa, SPP: Stromal Processing Peptidase, TAT: Twin Arginine Translocation, TPP: Thylakoidal Processing Peptidase) modificado de (GUTENSOHN et al., 2006)

2.2.2 A via SRP

A via SRP (**S**ignal **R**ecognition **P**article) é utilizada para direcionar um conjunto de proteínas hidrofóbicas à membrana do tilacóide, constituindo a principal via de integração protéica à membrana do tilacóide. Em eucariontes, procariontes e archaea, uma via SRP relacionada promove o transporte e inserção na membrana de proteínas co-traduzidas. Em plantas, a via SRP é melhor conhecida no processo pós-traducional de direcionamento e inserção na membrana, processo realizado pelas LHCPs (**L**ight-**H**arvesting **C**hlorophyll-binding **P**roteins) codificadas pelo núcleo (SCHUNEMANN, 2004; RICHTER; BALS; SCHUNEMANN, 2010).

De maneira geral, a proteína cpSRP54 (homóloga a subunidade SRP54 de mamíferos e bactérias) junto com cpSRP43 (uma proteína exclusiva da via pós-traducional de plantas) formam o complexo cpSRP que, ao contrário dos outros complexos SRPs conhecidos, não apresenta moléculas de RNA em sua constituição. Esse complexo se liga à LHCP, formando um “complexo de trânsito”. O processo também necessita de GTP, cpFtsY e Alb3. cpFtsY é um receptor e forma um complexo com cpSRP e Alb3 (MOORE et al., 2003). A interação de cpSRP com cpFtsY parece promover a ligação de GTP às GTPases cpSRP54 e cpFtsY, que direcionam o complexo a Alb3 na membrana do tilacóide (YANG et al., 2011). Alb3 é homóloga à proteína bacteriana YidC e à mitocondrial Oxa1, que são necessárias para a inserção de proteínas na membrana plasmática ou membrana interna da mitocôndria, respectivamente. A proteína cpSRP43 não apresenta função no direcionamento de Alb3, mas pode estar envolvida na regulação do ciclo das GTPases (MOORE et al., 2003). Alguns candidatos a serem transportados por tal via incluem as proteínas D2, CP43, PSI-A e CFoIII, que se mostraram interagir com Alb3 em sistemas de duplo-híbrido de levedura (PASCH; NICKELSEN; SCHUNEMANN, 2005).

2.2.3 A via Sec

A segunda principal via de transporte de proteínas, presente no tilacóide, é a via Sec. Esta via é muito similar à via Sec encontrada em bactérias, que é responsável pela exportação de proteínas através da membrana plasmática para o periplasma ou meio externo. Em bactérias, o complexo Sec é formado pela subunidade SecA e o canal de

translocação SecYE. SecA é uma ATPase que atua como um “motor”, “empurrando” as proteínas precursoras pelo canal (DALBEY; CHEN, 2004). Para o complexo cloroplastidial, foram identificadas as cpSecY (LAIDLER et al., 1995), cpSecE (SCHUENEMANN et al., 1999) e cpSecA (NAKAI et al., 1994). Anticorpos anti-cpSecY inibem o transporte dependente de cpSecA, sugerindo que cpSecA e cpSecY trabalhem em conjunto, como em bactérias.

O complexo SecYE transporta substratos em estado não-montados, sendo a energia para o transporte originada de hidrólise de ATP. Quando destinada ao tilacóide, a EGFP (enhanced green fluorescent protein) é transportada eficientemente pela via TAT, enquanto o transporte mediado pela via Sec é ineficiente (MARQUES et al., 2004). O rápido dobramento da EGFP no estroma parece impedir o transporte pela via Sec, confirmando a necessidade do estado não-montado. Além disso, o sistema não requer um gradiente de prótons através da membrana do tilacóide, embora um potencial de membrana tenha um efeito estimulatório em alguns casos (MANT et al., 1995). Substratos comuns da via Sec são a plastocianina, subunidade PsaF do fotossistema I e uma proteína de 33 kDa envolvida no sistema do oxigênio (HULFORD et al., 1994; ROBINSON et al., 1994; KARNAUCHOV; HERRMANN; KLOSGEN, 1997). Acredita-se que os cloroplastos possuem um segundo sistema Sec de transporte, presente no envelope (SKALITZKY et al., 2011).

2.2.4 A via TAT

A via de transporte TAT (**T**win **A**rginine **T**ranslocation) tem seu nome derivado de uma dupla invariável de aminoácidos arginina (RR), presentes na região N-terminal do peptídeo sinal. Com exceção de dois substratos atípicos (uma única proteína de membrana e a proteína Rieske FeS (SUMMER et al., 2000; MOLIK et al., 2001), todos os substratos específicos da via TAT apresentam o domínio RR, que é essencial para o correto direcionamento. A substituição de qualquer arginina da dupla, até mesmo por lisina, acarreta no completo bloqueio do transporte pela via TAT. Nesse caso, o substrato é corretamente importado ao cloroplasto, porém permanece no estroma (CHADDOCK et al., 1995).

Estudos em cloroplastos mostraram que quase todos os substratos da via TAT apresentam peptídeos sinais compostos por três domínios distintos: um domínio N-terminal carregado, um domínio central hidrofóbico e um domínio C-terminal polar, com um grupo Ala-Xaa-Ala, que indica o local de clivagem à peptidase TPP (Thylakoidal Processing Peptidase) (SHACKLETON; ROBINSON, 1991). Uma das principais características deste sistema está no tipo de energia utilizada. O transporte não é mediado pela hidrólise de ATP, mas sim por um gradiente de pH trans-membrânico (CLINE; ETTINGER; THEG, 1992). Outra característica importante é a capacidade de transportar proteínas completamente dobradas (ou domínio protéicos) através da membrana do tilacóide (MARQUES et al., 2004).

Até o momento, três proteínas (Tha4, Hcf106 e cpTatC) foram identificadas como constituintes do sistema TAT em plantas (SETTLES et al., 1997; WALKER et al., 1999). Um estudo de importação de proteínas *in-vitro* revelou que, em tilacóides isolados, as subunidades TAT estão presentes em dois complexos distintos: complexo cpTatC-Hcf106 e o complexo Tha4. Os substratos se ligam preferencialmente ao complexo cpTatC-Hcf106 que funciona como um receptor. A interação e a presença de um gradiente de pH proporcionam o recrutamento do complexo Tha4, formando o complexo de translocação (CLINE; MORI, 2001; MORI; CLINE, 2002). Dados recentes indicam que o transporte de proteínas pela via TAT envolve uma íntima associação do peptídeo sinal com o receptor (GERARD; CLINE, 2007), sendo que múltiplos precursores se ligam ao receptor TAT (MA; CLINE, 2010).

2.2.5 A via espontânea

Até então, foram descritas as vias de direcionamento de proteínas do tilacóide, envolvendo interações com maquinais de transporte protéicas. O quarto grupo parece ser diferente. As proteínas pertencentes a este grupo são todas proteínas integrais de membrana, sendo as principais características não necessitar qualquer maquinaria protéica de transporte conhecida e nem energia para a inserção na membrana do tilacóide. Esta é uma via incomum e única a cloroplastos. A ausência de qualquer necessidade energética ou fatores de direcionamento sugere a possibilidade de um

mecanismo espontâneo de inserção (SCHLEIFF; KLOSGEN, 2001; CLINE; DABNEY-SMITH, 2008).

Como exemplos de proteínas que se inserem “espontaneamente” podem ser as subunidades W e X do Fotossistema II (PsbW e PsbX), PsaK do Fotossistema I e a subunidade SecE (cpSecE) (GUTENSOHN et al., 2006). Os dois primeiros compartilham uma pré-sequência bipartida, porém são inseridas na membrana do tilacóide na ausência de SRP, NTPs ou maquinaria Sec. Além do mais, proteólise do tilacóide ou inativação de Alb3 não influencia a inserção (WOOLHEAD et al., 2001).

2.3 Proteases FtsH

As proteases FtsH (Filamentous temperature sensitive H – também conhecidas como HflB) foram descritas originalmente em *E. coli* como uma proteína essencial (TOMOYASU et al., 1993), com papel na degradação de várias proteínas de vida curta (TOMOYASU et al., 1995; AKIYAMA et al., 1996). As FtsHs possuem no mesmo polipeptídeo os domínios de ATPase e protease, formando um complexo homooligomérico. Os homólogos de FtsH têm sido alvo de estudo em mitocôndrias de levedura, que apresentam três homólogos (Yta10-12p) presentes na membrana interna (LANGER, 2000). Baseado em análises cristalográficas de raio-X, o domínio ATPásico das FtsH de *E. coli* constituem um anel hexamérico que contém resíduos aromáticos conservados, voltados para a estrutura em anel, sendo que a energia de quebra do ATP é usada para translocação dos substratos e carregamento até a câmara proteolítica (KRZYWDA et al., 2002; BIENIOSSEK; NIEDERHAUSER; BAUMANN, 2009). As FtsH plastidiais são quase idênticas às de *E. coli*, o que implica uma estrutura hexamérica similar.

A FtsH de *E. coli* apresenta dois domínios transmembrânicos na região N-terminal que a ancora na membrana plasmática, sendo que o domínio proteásico na região C-terminal está exposto ao citoplasma (ITO; AKIYAMA, 2005). A FtsH está associada à um complexo grande através da interação com outras proteínas de membrana, como a HflKC (SAIKAWA; AKIYAMA; ITO, 2004). Em cloroplastos, há um único domínio transmembrânico que ancora na membrana dos tilacóides, sendo que o domínio catalítico está exposto ao estroma (RODRIGUES; SILVA-FILHO; CLINE,

2011). Em mitocôndrias, há dois tipos de proteínas, uma com um único domínio transmembrânico (Yta11p) e outras com dois (Yta10p e Yta12p). Estas duas proteínas apresentam diferentes topologias com respeito à membrana mitocondrial interna. O domínio proteásico está exposto tanto ao espaço de intermembranas (i-AAA) quanto à matriz (m-AAA), sendo que as duas proteínas m-AAA formam um complexo grande com outros componentes chamados proibitinas (TATSUTA; LANGER, 2009).

2.3.1 Família gênica

A multiplicação dos genes codificantes das FtsH é correlacionado com a evolução da fotossíntese, sendo muito maior em organismos fotossintéticos que em bactérias não fotossintéticas e mitocôndrias de eucariotos (MANN et al., 2000). Quatro isômeros foram identificados em *Synechocystis* sp. A inativação de dois dos isômeros é letal. A perda de um dos isômeros restantes leva a uma dramática sensibilidade à exposição à luz intensa e deficiência no aparato fotossintético nos tilacóides, particularmente no PSII (SILVA et al., 2003). A FtsH parece ser a principal protease envolvida na reparação do ciclo do PSII, particularmente na reparação da proteína D1 (NIXON et al., 2010). Em *Arabidopsis* há 12 genes FtsH (FtsH 1-12). Além disso, quatro outros genes aparentemente codificam proteínas homólogas a FtsH, porém não apresentam o motivo de ligação ao zinco, o que possivelmente as tornam inativas para proteólise (SOKOLENKO et al., 2002). Dos 12 genes FtsH, 3 são destinados às mitocôndrias (FtsH3, 4 e 10), 8 aos cloroplastos (FtsH1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 e 12) e a FtsH11 apresenta duplo-direcionamento para mitocôndrias e cloroplastos (SAKAMOTO et al., 2003; URANTOWKA et al., 2005).

Assim como em *Synechocystis*, as FtsH em cloroplastos aparentemente apresentam um papel na degradação da proteína D1 danificada e outras proteínas no PSII. Foi mostrado que em tilacóides, isolados de espinafre, expostos a luz intensa, a proteína D1 é degradada em dois passos distintos, através da geração de produtos intermediários e subsequente degradação (LINDAHL et al., 2000). Foi mostrado também que a protease FtsH1 recombinante, expressa por *E. coli*, pode atuar nessa etapa. Além disso, a expressão da FtsH é reduzida drasticamente em resposta ao vírus

do mosaico do tabaco, indicando que as FtsH em cloroplastos apresentam múltiplas funções celulares.

2.3.2 Expressão e análise genética

As FtsHs em cloroplastos estão entre as proteases melhores caracterizadas, em termos genéticos. Alguns genes mutados de FtsHs apresentam um fenótipo típico de variegação nas folhas, bem conhecido em *Arabidopsis* (SAKAMOTO, 2003). Os mutantes são chamados de var1 e var2, correspondendo aos locos que codificam as FtsH5 e FtsH2, respectivamente. Os mutantes para outras FtsHs plastidiais, com FtsH1, 6 e 8 não resultam em fenótipos visíveis (SAKAMOTO et al., 2003). A perda de uma FtsH pode não causar letalidade devido a intercambialidade funcional entre os homólogos de FtsH.

FtsH2 é a proteína FtsH mais abundante nos cloroplastos, seguida pela FtsH5 e por fim, com valores muito menores, FtsH8 e FtsH1. A expressão gênica dos isômeros FtsH indica que algumas FtsH plastidiais, como a FtsH8, respondem a luz intensa (SINVANY-VILLALOBO et al., 2004). Entretanto, no geral, a quantidade de proteína FtsH não responde a condições de estresse (SINVANY-VILLALOBO et al., 2004).

As proteases FtsH2 e FtsH5 formam, nos tilacóides, um complexo entre 400 a 450 kDa (SAKAMOTO et al., 2003). Estudos de proteômica revelaram que, além das subunidades FtsH2 e FtsH5, o complexo FtsH dos tilacóides é composto também, respectivamente, pelos genes duplicados FtsH1 e FtsH8 (YU; PARK; RODERMEL, 2004). Dessa forma, o complexo é constituído por dois tipos de subunidades: FtsH1 e FtsH5 (tipo A) e FtsH2 e FtsH8 (tipo B). Os fenótipos var1 e var2 podem ser resgatados através da superexpressão da FtsH1 e FtsH8, respectivamente (YU; PARK; RODERMEL, 2004; 2005). Dessa forma, somente um de cada isômero é necessário para a correta função do complexo FtsH tilacoidal (ZALTSMAN; ORI; ADAM, 2005) e o tipo B, apesar de necessário para a montagem do complexo, a atividade proteásica é completamente desnecessária (ZHANG et al., 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento de plasmídeos

3.1.1 Mini-preparação de DNA plasmidial de *E. coli* (Utilizando Kit QIAGEN)

Em todos os procedimentos onde se necessitou de um DNA apresentando maior grau de pureza, utilizou-se o QIAGEN Plasmid Mini Kit. Para tal, inoculou-se uma colônia de *E. coli* em 5ml de meio LB líquido, com antibiótico apropriado. Deixou-se por 16 horas a 37 °C, sob agitação de 250rpm. Transferiu-se parte da cultura para um tubo Eppendorf de 1,5ml. Centrifugou-se por 2 minutos a 13.000 rpm e descartou-se o meio de cultura. Repetiu-se essa última etapa por duas vezes. Ressuspendeu-se o precipitado celular em 300µl de solução P1 (Tris-HCl 50mM pH 8,0; EDTA 10mM; RNase 100µg/ml). Adicionou-se 300µl de solução P2 (NaOH 200mM; SDS 1%) e incubou-se a temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 300µl de solução P3 (acetato de potássio 3 M; pH 5,5) e centrifugou-se por 15 minutos a 13.000rpm. Aplicou-se o sobrenadante sobre a coluna QIAGEN-tip 20, previamente equilibrada com 1 ml de tampão QBT (750 mM NaCl; 50mM MOPS pH 7,0; 15% etanol; 0,15% Triton X-100). Lavou-se a coluna com 2 ml de tampão QC (1,0M NaCl; 50mM MOPS pH7,0, 15% etanol). Eluiu-se o DNA pela adição de 0,8ml da solução QF (1,25 M NaCl; 50mM Tris-HCl; pH 8,5; 15% etanol). Ao eluído adicionou-se 0,5 volume de isopropanol e centrifugou-se a 13.000rpm por 30 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 0,1ml de etanol 70%. Centrifugou-se a 13.000rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante, deixou-se o DNA precipitado secar e ressuspendeu-se o mesmo em um volume apropriado de TE (Tris 10mM; EDTA 1mM).

3.1.2 Mini-preparação de DNA plasmidial de *Escherichia coli*

Colocou-se uma colônia de *E. coli* em 5ml de meio LB líquido, contendo antibiótico apropriado. Incubou-se a 37°C, sob agitação de 250rpm, por 16 horas. Transferiu-se parte da cultura para um tubo Eppendorf de 1,5ml. Centrifugou-se por 2 minutos a 13.000rpm e descartou-se o meio de cultura. Repetiu-se essa última etapa por duas vezes. Ressuspendeu-se o precipitado celular em 175µl de solução P1 (Tris-HCl 50mM pH 8,0; EDTA 10mM; RNase 100µg/ml). Adicionaram-se 20µl de solução de

lisozima (10mg/ml) e deixou-se por 10 minutos a temperatura ambiente. Incubou-se a 73°C por 15 minutos. Centrifugou-se por 15 minutos a 13.000rpm. Transferiu-se o sobrenadante para outro tubo Eppendorf de 1,5ml. Adicionou-se 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e 2,5 volumes de etanol absoluto. Deixou-se a -20°C por 1 hora. Centrifugou-se por 15 minutos a 13.000rpm. Descartou-se o sobrenadante, deixou-se secar e ressuspendeu-se com um volume adequado de TE.

3.2 Quantificação da concentração de DNA

Uma alíquota do DNA foi retirada, diluída e foi feita uma leitura no comprimento de onda 260nm em espectrofotômetro que permitiu calcular a concentração de ácidos nucléicos na amostra. No caso de DNA dupla-fita, uma DO (densidade óptica) igual a 1 corresponde a aproximadamente 50µg/ml.

3.3 Digestões enzimáticas do DNA

As digestões foram realizadas utilizando 1/10 do volume de tampão adequado e no mínimo 1 unidade de enzima por µg de DNA. O volume final da reação (20 a 50µl) variou de acordo com a quantidade de DNA utilizada. As amostras foram deixadas por no mínimo 2 horas à temperatura adequada (em geral 37°C). Ao final de tal período, uma alíquota foi extraída para aplicação em gel de agarose e submetida a uma corrida eletroforética, para verificação da completa digestão. Ao final, as digestões foram colocadas sob temperaturas elevadas, segundo as especificações do fabricante, para desnaturação das enzimas utilizadas.

3.4 Eletroforese em gel de agarose

As corridas eletroforéticas foram realizadas em gel de agarose 1%, em tampão 1X TBE (5x TBE: 54 g de Tris base, 27,5g de ácido bórico, 20ml de EDTA 0,5 M pH 8,0 e água destilada para completar 1000 ml), contendo 0,5µg/ml de brometo de etídeo. Foi adicionado às amostras 20% do volume de tampão de carregamento (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol e 15% ficol tipo 400-DL).

O gel de agarose (ainda líquido) foi colocado em uma bandeja apropriada para inserção de pentes, possibilitando a formação de canaletas, onde as amostras são

aplicadas. Após solidificação, o gel de agarose ficou disposto em uma cuba de acrílico, e esta foi preenchida com tampão 1X TBE, ligado a um gerador que polariza a cuba. Devido ao DNA possuir carga elétrica negativa, migra entre os poros do gel em direção ao pólo positivo da cuba. Tal fenômeno permite a formação de bandas separadas de acordo com o tamanho molecular do fragmento de DNA. O tamanho de tais fragmentos foi inferido através da comparação com a migração de fragmentos de marcador de peso molecular (1kb DNA ladder plus – GIBCO), também aplicado no gel. Ao final, as eletroforeses foram fotografadas ao lado de uma régua para referência.

3.5 Purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose

Foi utilizado o kit MinElute Gel Extraction (QIAGEN). Os fragmentos do gel (de até 4kb) foram recortados e pesados. Foram adicionados 3 volumes do tampão QG para 1 volume de gel (100mg ~ 100µl). Incubou-se a 50°C por 10 minutos até completa dissolução. Adicionou-se 1 volume de isopropanol. Posicionou-se uma coluna MinElute sobre um tubo coletor de 2ml. Adicionou-se a amostra sobre a coluna e centrifugou-se por 1 minuto. Descartou-se o líquido e adicionou-se 500µl de tampão QG, centrifugando por 1 minuto. Adicionou-se 750µl de tampão PE e centrifugou-se por 1 minuto. Descartou-se o líquido e centrifugou-se por 1 minuto adicional. Adicionou-se um volume adequado de tampão EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) sobre o centro da coluna MinElute, a qual foi colocada sobre um tubo Eppendorf de 1,5ml. O conjunto foi centrifugado por 1 minuto.

3.6 Clonagens

As clonagens foram realizadas de acordo com os procedimentos básicos descritos em (SAMBROOK; RUSSELL, 2001), com exceção da clonagem no vetor pK7FWG2, a qual foi feita utilizando o sistema Gateway de recombinação (Invitrogen). As trocas de sequências entre FtsH2 e FtsH5 foram realizadas de acordo com o método “splicing” (Horton *et al.*, 1989), i.e. primeiramente amplificando as regiões N- e C-terminais apropriadas, purificando os produtos de PCR e então amplificando o produto quimérico usando os primers externos. As construções para transcrição/tradução *in-vitro* foram todas clonadas no vetor pGEM-4Z (Promega). Para os experimentos de

rastreamento em sistema duplo-híbrido de levedura, foi utilizado o vetor pGBKT7 (Clontech). As construções para fusão com a GST e cauda de histidina foram clonadas, respectivamente, nos vetores pDEST15 (Initrogen) e pET28b (Novagen). A fusão com o gene repórter GFP foi feita utilizando o vetor pK7FWG2 (KARIMI; INZE; DEPICKER, 2002) para a proteína FIP. As proteínas FtsH7 e FtsH9 foram inicialmente clonadas no vetor pUCAP-GFP, um vetor pUCAP apresentando o cassete de expressão do vetor pCK-GFP3 (MENAND et al., 1998) e então transferidas para o vetor de expressão em plantas pBinPLUS (VAN ENGELEN et al., 1995). Todos os clones resultantes foram sequenciados em ambas as fitas.

3.7 Preparação de células eletrocompetentes de *Escherichia coli*

Estriou-se, com uma alça de platina, uma suspensão bacteriana de *E. coli*, cepa DH10B, em uma placa contendo meio LB (10g/l Triptona; 5g/l Extrato de levedura; 10g/l NaCl). A placa foi incubada durante 16 horas, a 37°C. Transferiu-se uma colônia para 5ml de meio LB líquido e incubou-se durante 16 horas, a 37°C, sob agitação de 300rpm. Transferiu-se 1ml da suspensão bacteriana para 500ml de meio LB, deixou-se a 37°C, sob agitação de 300rpm até a leitura da absorbância atingir o ponto ideal (A_{600} entre 0,5 e 0,8). Colocou-se a cultura no gelo durante 15 minutos. Centrifugou-se a 6.000rpm durante 15 minutos, a 4°C. Removeu-se o sobrenadante e as células foram ressuspendidas em 500 ml de água estéril a 4°C. Centrifugou-se novamente a 6.000 rpm durante 15 minutos, a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspendidas em 250ml de água estéril a 4°C. Centrifugou-se mais uma vez a 6.000rpm durante 15 minutos, a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e, desta vez, as células foram ressuspendidas delicadamente em 10ml de glicerol 10% a 4°C. Centrifugou-se a 6.000rpm durante 15 minutos, a 4°C. Nesta última etapa, as células foram ressuspendidas em um volume final de 2ml de glicerol 10% a 4°C. Foram feitas alíquotas de 40 μ l, as quais foram estocadas a -80°C.

3.8 Eletroporação de *Escherichia coli*

Antes da transformação, todas as reações de recombinação foram dialisadas (para retirar o sal excessivo). Para tal, adicionou-se todo o volume da ligação a uma

membrana (Millipore 0,025 μm , Type VS), a qual foi deixada em contato com água destilada estéril, por 30 minutos. Adicionou-se um volume adequado da mistura de ligação, já dialisada, a 40 μl do estoque de células competentes de *E. coli*, misturou-se delicadamente e deixou-se no gelo por 1 minuto. Colocou-se a mistura em uma cubeta de eletroporação previamente resfriada no gelo. Submeteu-se o conjunto a um pulso de 1,8kV/25 μF (eletroporador Gene Pulse, BioRad). Adicionou-se, imediatamente após a eletroporação, 500 μl de meio LB líquido e ressuspendeu-se delicadamente as células. Transferiu-se o conjunto para um tubo de ensaio, incubando-se durante 1 hora a 37°C, sob agitação de 200rpm. Plaqueou-se 250 μl em meio LB sólido, contendo antibióticos apropriados, e deixou-se a 37°C durante 16-20 horas.

3.9 Preparo de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

Estriou-se, com uma alça de platina, uma suspensão bacteriana de *Agrobacterium tumefaciens*, cepa GV3101 (pMP90), em uma placa contendo meio MAS sólido (200 ml meio 5x A; 10 ml sacarose 20%; 2ml MgSO_4 20%; 0,5 ml tiamina 10mg/ml; agar 12 g/l. Meio 5x A: 69 g/l $\text{K}_2 \text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 22,5 g/l $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$; 5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,5 g/l citrato de sódio). Incubou-se a 28°C durante 72 horas. Transferiu-se uma colônia para 50ml de meio LB 2X (20 g/l Triptona; 10 g/l Extrato de levedura; 20 g/l NaCl), incubando-se a 28°C por 16 horas, sob agitação de 150 rpm. Dividiu-se o volume em 20 tubos Eppendorf de 1,5 ml. Centrifugou-se a 12.000rpm, por 1 minuto. Ressuspendeu-se delicadamente as células em 0,5ml de HEPES 1mM, mantido a 4°C. Centrifugou-se a 12.000rpm, por 1 minuto. Repetiu-se esta última etapa por duas vezes. Ressuspendeu-se delicadamente as células em 0,5ml de glicerol 10%, mantido a 4°C. Centrifugou-se por 1 minuto, a 12.000rpm. Ressuspendeu-se delicadamente as células em 20 μl de glicerol 10% e juntou-se o conteúdo de dois tubos em um, totalizando 40 μl . As alíquotas foram estocadas a -80°C.

3.10 Eletroporação de *Agrobacterium tumefaciens*

Adicionou-se 1 μg de DNA plasmidial a 40 μl do estoque de células competentes de *A. tumefaciens*, misturou-se delicadamente e incubou-se no gelo por 2 minutos. Transferiu-se a suspensão para uma cubeta de eletroporação, a qual foi mantida no

gelo. Posicionou-se a cubeta no eletroporador e aplicou-se um pulso de 1,8kV/2,5µF. Adicionou-se, imediatamente após a eletroporação, 1ml de meio LB 2X líquido e ressuspendeu-se delicadamente as células. Transferiu-se o conjunto para um tubo de ensaio, incubando-se durante 6 horas a 28°C, sob agitação de 100rpm. Plaqueou-se 100µl da suspensão bacteriana em meio MAS sólido, contendo os antibióticos apropriados. Incubou-se a 28 °C durante 72 horas.

3.11 Transformação estável de *Nicotiana tabacum*

3.11.1 Obtenção de plantas de *Nicotiana tabacum* em condições estéreis

Sementes de *Nicotiana tabacum* Petit Havana SR-1 foram tratadas com uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 4 – 6 % (Vetec), com algumas gotas de detergente comum, por 20 minutos, lavadas 5 vezes em água destilada autoclavada e, posteriormente, distribuídas em placas contendo meio MS sólido (Murashige e Skoog, 1962). As placas foram colocadas em condições adequadas de luminosidade (16 horas luz / 8 horas escuro) e temperatura (28°C) até a germinação em incubadora 437 CDG (FANEM). Posteriormente, as plântulas foram transferidas para caixas Magenta, com o mesmo meio de cultura, em condições estéreis.

3.11.2 Obtenção dos segmentos foliares

Para obtenção das plantas transgênicas foram utilizados fragmentos foliares extraídos de plantas com seis semanas de idade, crescidas em condições estéreis como descrito acima. Uma folha de cada vez foi cortada com bisturi sobre um papel de filtro estéril, embebido em água.

3.11.3 Infecção dos segmentos foliares

Pelo método de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*, os segmentos foliares cortados foram imediatamente transferidos para placas de Petri com a sua face abaxial em contato com o seguinte meio de incubação (20 ml de MS líquido, 0,2 ml de suspensão bacteriana). As placas foram seladas com Parafilm®. Após incubação a 28°C por dois dias, na ausência de luz, os segmentos foliares foram transferidos para placas

de Petri, contendo meio de indução de calos M300 (meio MS sólido contendo 200mg/ml de canamicina, 0,1µg/ml de NAA, 1µg/ml de BAP e 250µg/ml de cefotaxima) em condições adequadas de luminosidade (16 horas luz / 8 horas escuro) e temperatura (28°C).

3.11.4 Obtenção de brotos transgênicos

Os pequenos calos formados foram, então, separados dos segmentos foliares e distribuídos individualmente sobre uma placa contendo o meio de indução de calos e deixados por aproximadamente 15 dias em condições adequadas de luminosidade (16 horas luz / 8 horas escuro) e temperatura (28 °C). Após esse período, foram transferidos para potes maiores contendo meio de indução da parte aérea (meio MS sólido contendo 200mg/ml de canamicina e 1µg/ml BAP). Após a identificação dos brotos (maiores que 0,7cm), que foram surgindo a partir dos calos resistentes, eles foram excisados na base, procurando excluir tecidos do calo. Individualmente, os brotos foram transferidos para potes Magenta contendo meio de enraizamento sólido (meio MS), acrescido de canamicina (200µg/ml). Os brotos foram mantidos nesse meio até o desenvolvimento completo das raízes.

3.11.5 Transferência para a terra

Após o desenvolvimento das raízes, as plantas (10 a 15cm de altura) foram delicadamente retiradas dos potes Magenta, e o excesso de meio de cultura foi removido com água. As plantas foram então transplantadas para sacos plástico preto (de aproximadamente 25cm de altura) contendo a mistura solo: vermiculita. A parte aérea da planta foi coberta com um saco de plástico transparente umedecido, para evitar ressecamento. Após uma semana em casa de vegetação, o saco plástico transparente foi retirado. A planta cresceu na casa de vegetação até atingir uma altura de 30cm, neste momento, então, a planta pode ser transferida para um vaso maior contendo solo adubado. Deste modo, a planta se desenvolve normalmente na casa de vegetação.

3.12 Transformação transiente de *Nicotiana tabacum*

Uma cultura de *A. tumefaciens* contendo o plasmídeo de interesse foi ressuspensa em $MgCl_2$ 10 mM, em volume suficiente para permitir uma densidade óptica final de 0,2, medida a 550 nm. À suspensão bacteriana foi adicionada acetoseringona na concentração final de 150 μM , mantendo por três horas à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a infiltração em folhas de plantas de *N. tabacum* com aproximadamente 40 dias de idade. Para tal, foram feitas pequenas ranhuras na face abaxial das folhas e, com a ajuda de uma seringa de plástico sem agulha, a suspensão bacteriana foi infiltrada. As plantas foram mantidas a 25 °C, sob regime de 16 h de luz e 8 h de escuro e a fluorescência da GFP foi visualizada após 72 horas em microscópio confocal de fluorescência.

3.13 Preparo de protoplastos

As folhas infiltradas foram destacadas e imersas, em placa de Petri, em uma solução enzimática 1 x (para 100 mL de solução estoque 5 x: 0,2 g de macerozima, 0,5 g de driselase, 1 g de celulase Onuzuka) diluída em meio para protoplasto (para 1 L: 4,3 g de meio MS; 0,5 g MES; 20 g de sacarose; 80 g de manitol; KOH até pH 5,6). As folhas foram mantidas embebidas à 30 °C, durante 6 h, período suficiente para sua digestão total. Não houve necessidade de filtrar o material. Em pequenas alíquotas da solução, contendo as folhas digeridas, os protoplastos puderem ser visualizados diretamente ao microscópio confocal.

3.14 Transformação de *Arabidopsis thaliana*

3.14.1 Cultivo das plantas de *Arabidopsis thaliana*

Plantas de *Arabidopsis thaliana* ecótipo Col-0 foram semeadas em potes de 9 cm de diâmetro contendo uma mistura de solo/vermiculita (1:1) previamente esterilizada em autoclave. Foram dispostas aproximadamente 5 plantas por pote. Após a sementeação, os potes foram dispostos em bandejas de plástico e cobertos com filme plástico. As plantas foram mantidas em câmara de germinação (modelo Conviron AT26) sob regime de 16 horas de luz e 8 h escuro, a 22 °C e 70% de umidade. Após 2 semanas, a

cobertura plástica foi removida. Quando necessário, para obter maior número de botões florais, as inflorescências foram cortadas para remover a dominância apical e estimular a formação de múltiplos botões florais.

3.14.2 Transformação de *Arabidopsis thaliana*

Uma cultura de *Agrobacterium tumefaciens* com a construção de interesse foi ressuspensa em meio de infiltração (5% de sacarose; 0,05% Silwet L-77) a uma concentração de 0,8 (OD 550 nm). A parte aérea das plantas pré-cultivadas de *Arabidopsis* foram imersas na solução por 2 minutos, sendo os vasos dispostos em bandejas, cobertos com filme plástico (para manter a alta umidade) e incubados por 2 dias em câmara de crescimento. Após, o filme plástico removido e aguardou-se até a formação das sementes.

3.14.3 Seleção das plantas transformadas

Para a seleção dos transformantes, as sementes de *Arabidopsis* foram esterilizadas através da incubação em solução de hipoclorito de sódio (1,8%) contendo algumas gotas de detergente, por 10 minutos. A seguir as sementes foram lavadas em água estéril e plaqueadas em meio MS (contendo metade da quantidade de sais MS; 50 mg/l canamicina). As placas foram deixadas na geladeira por 2 dias e depois transferidas para câmara de germinação. As plantas transgênicas que cresceram em meio seletivo foram então transferidas para o solo.

3.15 Mini-extração de DNA genômico de planta

Coletou-se um pequeno pedaço de folha jovem de *N. tabacum*. Macerou-se a folha com um pequeno bastão plástico em um tubo de 1,5ml do tipo Eppendorf com tampão 1 (Tris-HCl 200mM; NaCl 250mM; EDTA 25mM; SDS 0,5%). Centrifugou-se por 1 minuto a 13.000rpm. Transferiu-se 300µl do sobrenadante para um tubo novo do tipo Eppendorf de 1,5ml. Adicionou-se 300µl de isopropanol e deixou-se por 5 minutos. Em seguida centrifugou-se por 5 minutos a 13.000rpm. Descartou-se o sobrenadante e secou-se o precipitado por 30 minutos. Adicionou-se 100µl de água estéril e aguardou-se dissolver sem agitação.

3.16 Extração de RNA total

Para extração do RNA total, 0,25g de material (macerado em nitrogênio líquido) foi misturado em vórtex por 2 min com 1mL de Trizol (Invitrogen). Logo após, foi adicionado 260 μ L de clorofórmio e levado a centrifugação a 12.000xg por 15 min a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para um tubo novo onde foram acrescentados 650 μ L de isopropanol, incubando por 10 min a temperatura ambiente e novamente centrifugado a 12.000xg por 10 min a 4°C. O *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 75%, o sobrenadante foi descartado e, após o tubo estar seco, o *pellet* foi ressuspenso em volume adequado de água tratada com DEPC, quantificado em espectrofotômetro e armazenado a -80°C.

3.17 Quantificação da concentração de RNA

Uma alíquota do RNA foi retirada, diluída e a concentração da mesma foi medida da seguinte maneira: foram feitas leituras nos comprimentos de onda 260nm (que permitiu calcular a concentração de ácidos nucleicos) e 280nm (para avaliar a qualidade) em espectrofotômetro. No caso do RNA, uma DO (densidade óptica) igual a 1 corresponde a aproximadamente 40 μ g/ml.

3.18 Tratamento dos RNAs com a enzima DNase

A uma alíquota de 20 μ g de RNA foram adicionados 5 μ l de DNase 1U/ μ l livre de RNase (Promega), 5 μ l de tampão 10x concentrado (Promega), 2,5 μ l de DTT 100mM e 0,5 μ l de RNase OUT (40U/ μ l - Invitrogen), completando o volume para 50 μ l com água tratada com DEPC. Em seguida, essa mistura foi colocada a 37°C por 1 hora. Uma alíquota de 2 μ l retirada e acrescida de 8 μ l de água. A partir desses 10 μ l, 1 μ l foi utilizado como molde em uma PCR em tempo real, com iniciadores específicos para o gene da β -actina. Tal procedimento permite checar a eficiência do tratamento. Depois de confirmada a ausência total de DNA genômico, cada amostra foi submetida à limpeza, utilizando fenol/clorofórmio e precipitadas utilizando 0,1V de acetato de sódio 3M e 2V de etanol absoluto. As amostras foram centrifugadas a 14.000g, durante 15 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 12 μ l de água tratada com DEPC.

3.19 Síntese de cDNA

As amostras de RNA foram convertidas a cDNA, por tratamento enzimático com transcriptase reversa (Superscript II - 200U/μl, Invitrogen). Foram misturados em um tubo de 1,5ml: 20μg de RNA (tratado com DNase), 1,5μl de oligonucleotídeo dTV (100pmoles/μl), 5μl de First Strand Buffer (5X - Gibco BRL), 2,5μl de DTT (100mM), 0,5μl de RNase OUT (40U/μl - Invitrogen) e 2,5μl de dNTPs (10mM cada). Cada amostra foi incubada a 42°C por 5 minutos. Adicionou-se, em seguida, 1μl de Superscript II (200U/μl - Invitrogen), permanecendo a 42°C por 1 hora. Ao cDNA já sintetizado foram acrescentados 45μl de água Milli-Q autoclavada, resultando em um volume final de 70 μl de cDNA.

3.20 Análises *in-silico*

As sequências das FtsHs de *Arabidopsis* foram obtidas no banco de dados TAIR (www.arabidopsis.org). As regiões de processamento para a peptidase estromal foram preditas utilizando CloroP (www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP) e os domínios transmembrânicos por TMPred (www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html). As predições para localização intracelular foram realizadas utilizando o programa WoLFPSORT (<http://wolfpsort.org/>). Os alinhamentos binários foram obtidos usando SIM e LALNVIEW (www.expasy.ch/tools/sim-prot.html). Os alinhamentos múltiplos foram realizados utilizando ClustalW2 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/).

3.21 Transcrição *in-vitro*

Os precursores radioativos foram produzidos por transcrição com a polimerase SP6 (Promega). Para a transcrição adicionou-se na seguinte ordem os reagentes, para o volume final de 100 μl: 55 μl de água, 20 μl de tampão 5X (Promega), 5 μl dTT (100 mM), 4 μl RNasin (Promega), 5 μl NTPs (10 mM), 4 μl DNA (1 mg/ml), 5 μl CAP (Promega) e 2 μl SP6 Polimerase. Incubou-se a mistura a 40 °C por 60 minutos. Após, o volume foi ajustado para 200 μl e extraído com fenol/clorofórmio. Após a limpeza, adicionou-se 135 ml de NH₄Ac, 850 ml de etanol 100% e incubou-se a -20 °C por pelo menos 16 horas. A seguir centrifugou-se a 13.000 rpm por 1 hora a 4 °C e, após secar

o precipitado, ressuspendeu-se em 35 ml de tampão (26 μ l de água, 5 μ l DTT (100 mM) e 4 μ l RNasin).

3.22 Preparação do gérmen de trigo

Colocou-se gérmen de trigo (Sigma) em cadinho grande (15 cm) e gentilmente macerou-se até os grãos reduzirem para $\frac{1}{4}$ do tamanho original. A seguir, extraiu-se o gérmen de trigo com uma mistura clorofórmio-ciclohexano (15:1), utilizando uma taxa de 15 ml de solvente/g de gérmen de trigo. Dessa forma, dispensou-se 30 g de macerado em 450 ml de solvente e, após descansar, a camada superior foi transferida para um funil, sendo o solvente removido por aspiração após 2-3 minutos. O gérmen de trigo foi deixado secar durante a noite, a temperatura ambiente, em uma placa de Petri. Todo o procedimento a seguir foi realizado a 0-4 °C. Cinco gramas de gérmen de trigo seco foi colocado em um cadinho (8 cm) previamente resfriado a 0 °C. Em seguida, adicionou-se uma massa igual de “beads” de vidro e 5 ml de tampão de maceramento (10 mM HEPES, pH 7.6, 1 mM Mg(OAc)₂, 2 mM CaCl₂, 50 mM KCl, 1 mM DTT)/g de gérmen de trigo. Macerou-se por 5 minutos e, após obter um pó fino, transferiu-se para um tubo de centrifuga estéril, centrifugando a 23.000xg por 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo estéril, adicionou-se 0.01 volume de tampão 100X (1 M HEPES, pH 7.6, 100 mM Mg(OAc)₂) e centrifugou-se a 23.000xg por 10 minutos. Removeu-se o sobrenadante e aplicou-se em uma coluna Sephadex G-25 (2,5 x 40 cm) equilibrada com 2 volumes de tampão de coluna (20 mM HEPES, pH 7.6, 40 mM KOAc, 3 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT). A amostra se dividiu em uma banda escura de movimento rápido e uma banda amarela de movimento lento. Coletou-se frações de 3 ml assim que a banda escura emergiu. Mediu-se em espectrofotômetro A₂₆₀ e descartaram-se as frações que obtiveram valores menores que 75 e ajustou-se a concentração do restante para 75. As amostras foram aliqüotadas e congeladas rapidamente em banho de acetona/gelo seco, armazenando-se a -80 °C.

3.23 Tradução *in-vitro*

Os precursores foram traduzidos utilizando gérmen de trigo preparado em nosso laboratório, em presença de leucina ³[H]. Para tal, adicionou-se na seguinte ordem, em

uma reação de 100 μ l: 60 μ l de gérmen de trigo, 10 μ l de pré-mix (0,25 M ATP (pH 7,5), 0,1 M GTP (pH 7,5), 2 mM mix de amino ácidos (- leucina, pH 7,5), 0,2 M fosfocreatina, 0,2 M DTT, 10 mg/ml creatina fosfoquinase), 10 ml de sais (6 mM espermidina, 1,2 M KOAc), 1 μ l RNAsin (Promega), 9 μ l de leucina tritiada 5 mCi/ml) e 10 μ l de RNA). Incubou-se a 25 °C por 60 minutos, diluiu-se com um volume de leucina 60mM (não radioativa) em tampão de importação 2X (IB; 1X = 50mM HEPES/KOH, pH 8,0, 0,33M sorbitol) imediatamente antes do uso.

3.24 Isolamento de cloroplastos intactos

Para isolamento de cloroplastos intactos primeiramente preparou-se o gradiente de Percoll misturando 17,5 ml de tampão de homogeneização 2X (GR; 1X = 50 mM HEPES/KOH, pH 7,5, 0,33 M sorbitol, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 2 mM EDTA, 5 mM Na-ascorbato, 0.1% BSA) com 17,5 ml de Percoll e 1 mg de glutationa, centrifugando o conjunto por 40 minutos a 20.000 rpm. Plantas de ervilhas anãs (*Pisum sativum* cv. Laxton's Progress 9) foram crescidas em vermiculita por 9-11 dias, a 20 °C, sob 150 μ E de luz fluorescente, com fotoperíodo de 12h dia/12h noite. No dia de coleta, as plantas foram removidas da sala de crescimento e deixadas por, pelo menos, 1 hora sob luz baixa antes de serem coletadas, a fim de reduzir o conteúdo de amido. A seguir, coletou-se a porção aérea (50 g de tecido) das plantas e picotou-se em pedaços menores com uma tesoura, adicionando 200 ml de tampão GR gelado. Homogeneizou-se utilizando um "polytron" com ciclos de 3-5 segundos em velocidade média. Filtrou-se o homogeneizado através de 1 camada de "miracloth", apertando para aumentar o rendimento. O filtrado foi centrifugado a 2.000xg por 3 minutos em uma centrífuga de rotor livre. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o "pellet" em 5 ml de tampão GR, aplicando a seguir em 35 ml do gradiente de Percoll previamente preparado. Centrifugou-se a 2.000xg por 15 minutos. Cloroplastos rompidos correspondem à banda superior, enquanto os cloroplastos intactos se localizam na banda inferior. A banda inferior foi removida, diluída 3 vezes com tampão IB e submetida à centrifugação a 1.500xg por 5 minutos. Ressuspendeu-se o precipitado em 25 ml de tampão IB, submetendo-se a quantificação da clorofila. Para a quantificação, uma pequena alíquota foi retirada e diluída em solução de acetona 80% para a

determinação via espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 663 e 645 nm. A fórmula (Chl ($\mu\text{g/ml}$) = $[20,2(A_{645}) + 8,02(A_{663}) \times \text{fator de diluição}]$) foi usada para estimar a concentração de clorofila nas amostras. A seguir, centrifugou-se novamente a 1.500xg por 5 minutos e ressuspendeu-se os cloroplastos em volume adequado de tampão IB, mantendo a 1mg de clorofila/ml.

3.25 Importação *in-vitro* em cloroplastos isolados e integração ao tilacóide

A importação em cloroplastos intactos de ervilha ou transporte em tilacóides lavados ou lisado de cloroplastos (0,33 mg de clorofila/ml ou equivalente) foi conduzido na presença de 5 mM MgATP (a menos quando informado o contrário), a 25 °C, 70 a 100 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ de luz branca, pelo tempo indicado nas legendas das figuras. Quando indicado, cloroplastos, lisados ou tilacóides foram pré-incubados com nigericina (0,75 μM de concentração final) e valinomicina (1,0 μM de concentração final), azida sódica (10 mM de concentração final) no gelo, por 10 minutos. As reações foram iniciadas pela adição do produtos de tradução equivalentes a um sexto do volume do ensaio e terminados pela transferência para o gelo. Cloroplastos intactos foram recuperados, com ou sem tratamento por proteases, através de centrifugação através de um gradiente de 35% Percoll. Para o fracionamento, cloroplastos recuperados foram lisados pela ressuspensão em 20 mM Hepes KOH pH 8,0 e incubação no gelo por 5 minutos. As membranas dos tilacóides foram separadas da fração estromal por centrifugação por 8 minutos a 3.200 g. Os tilacóides foram tanto lavados com tampão de importação, extraídos com 100 mM de NaOH, 200 mM de Na_2CO_3 ou tratados com termolisina. O tratamento com termolisina de cloroplastos ou tilacóides foi feito com 1 mg de termolisina por micrograma de clorofila por, pelo menos, 40 minutos no gelo, seguido de lavagem com tampão de importação contendo 14 mM de EDTA. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE e fluorografia.

3.26 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As análises eletroforéticas de proteínas foram realizadas em gel de poliacrilamida segundo Laemmli (1970), utilizando o sistema Mini Protean R Tetra Cell (Bio-Rad), em tampão de corrida Tris-Glicina (10X: 30,3 g Trisbase (125mM); 10 g SDS

(0,5%); 144 g Glicina (960mM) e água destilada para completar o volume para 1000 mL). Às amostras foi adicionando tampão de corrida (4X: 1,25mL TrisHCl 1M, pH 6,8 (125mM); 4mL SDS10% (4%); 1mL glicerol (10%); 20mg azul de bromofenol (0,2%); 400µL β-mercaptoetanol (4%) e água destilada para completar o volume para 10mL) e em seguida submetidas ao banho a 100 °C por 10 minutos.

3.27 Eletroforese em géis nativos

Tilacóides lavados foram ressuspensos em tampão de ressuspensão (20% glicerol, 25 mM Bis Tris-HCl, pH 7,0) a 1,5 mg de clorofila/ml. Um volume igual de tampão de ressuspensão contendo duas vezes a concentração final do detergente usado foi adicionado à suspensão de tilacóides. Após a incubação a 4 °C por 1 hora, o material insolúvel foi removido por centrifugação a 200 kg por 20 minutos. O sobrenadante foi combinado com 1:10 do volume de 5% Serva blue G (100 mM Bis Tris-HCl, pH 7,0, 0,5 M 6-amino ácido capróico, 30% glicerol) e aplicado a gel de 0,75 mm de espessura a 5-13,5% de gradiente em gel de acrilamida em aparato Hoefer Mighty Small conectado a um circulador a 4 °C. A eletroforese foi conduzida por um total de 4 – 5 horas a 100-150V. O tampão catodo foi trocado por tampão sem corante após 1/3 do gel ter corado (após aproximadamente 2 horas).

3.28 Coloração com azul de Coomassie

Ao final da corrida eletroforética os géis foram corados com azul de Coomassie (50% metanol; 10% ácido acético glacial; 0,2% Coomassie Blue R-250) por 30 minutos. A seguir, os géis foram descorados na mesma solução (exceto o corante).

3.29 Coloração com prata

Para coloração com prata, os géis, após a eletroforese, foram fixados em solução fixadora (50% metanol; 12% ácido acético glacial; 0,05% formalina) por 2 horas. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens de 20 minutos com solução de lavagem (35% etanol) e sensibilizados (0,02% Na₂S₂O₃) por 2 minutos. Após, foram feitas 3 lavagens com água destilada por 5 minutos, sendo o gel corado com prata (0.2% nitrato de prata; 0.076% formalina) por 20 minutos. Os géis foram lavados em

água destilada e revelados por tempo adequado em solução reveladora (6% Na₂CO₃; 0,05% formalina; 0,0004% Na₂S₂O₃). O processo foi parado através da incubação em solução (50% metanol; 12% ácido acético glacial) por 5 minutos. Os géis foram mantidos em solução (1% ácido acético glacial).

3.30 Fluorografia

Após a eletroforese, os géis foram incubados em DMSO por 30 minutos. A seguir, foram transferidos para uma solução PPO/DMSO (20%) e incubados por 1 hora. Após, os géis foram enxaguados e incubados em água destilada por 30 minutos. Em seguida, os géis foram secos e expostos ao filme por tempo adequado a -70 °C, sendo os filmes revelados.

3.31 Duplo-híbrido de levedura

3.31.1 Transformação da linhagem AH109 com a isca de interesse

A linhagem AH109 de *Saccharomyces cerevisiae* (MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4 gal80 LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ) foi usada para os testes de duplo-híbrido. Para tal, a levedura foi estriada em meio YPDA (extrato de levedura 1%; peptona 2,5% ; glicose 2%; adenina 0,008%; pH 5,6) e incubada por 24-36 h a 30°C. Uma colônia foi adicionada à 5 ml de meio YPDA líquido e deixado sob agitação a 30°C por 16 horas. As células foram centrifugadas por 30 segundos a 8.000 rpm. Ao “pellet”, foram adicionados na seguinte ordem: 240 µL PEG MW 3350 (50%); 36 µL acetato de lítio (1 M); 50 µL ss-DNA de esperma de salmão (2 mg/mL, Sigma, cat No. L-1626); 1 µg do plasmídeo contendo a isca de interesse e água ultrapura para 360 µL finais. Após a ressuspensão em vortex, as células foram submetidas a choque térmico a 42°C por 30 min, quando foram novamente centrifugadas. Ao “pellet”, adicionaram-se 400 µL de água ultrapura para ressuspensão das células, que foram então plaqueadas em meio SC-trp (SC sem triptofano - base de nitrogênio 0,66%; glicose 2%; mistura de aminoácidos 0,083%; agar bacteriológico 1,6%; pH 5,6) e incubadas a 30°C por 2-4 dias.

3.31.2 Transformação em larga-escala da linhagem AH109 com a biblioteca de *Arabidopsis*

A linhagem contendo a isca de interesse foi inoculada em 25 mL de meio SC-trp e incubada sob agitação a 30°C por 16 h. Após este período, calculou-se o volume de pré-inóculo necessário para a obtenção de um total de $2,5 \times 10^8$ células, as quais foram centrifugadas e inoculadas em 50 mL de meio YAPD. Após incubação a 30 °C por 4 horas, sob agitação, novamente foi verificada a quantidade de células, que deveria corresponder à aproximadamente $2,0 \times 10^7$ células/mL.

A cultura foi então centrifugada a 4.000 rpm por 5 min. Descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 25 mL de água estéril, quando foram novamente sedimentadas e ressuspensas em um único tubo com 3 mL de acetato de lítio (100 mM). A solução foi incubada em banho-maria a 30°C por 15 min, sendo então centrifugada e o sobrenadante descartado. Ao “pellet”, na ordem indicada, foram adicionados: 2,4 ml PEG (50%); 0,36 ml acetato de lítio (1,0 M); 0,5 mL ss-DNA esperma de salmão (2 mg/mL); 90 µL DNA de biblioteca (10 µg total) e 250 µl de água ultrapura. A mistura foi homogeneizada em vórtex e incubada a 30°C por 30 min, agitando-se bem o tubo a cada 5 min. Após este procedimento, a mistura foi submetida ao choque-térmico a 45 °C por 45 min, no decorrer dos quais, o tubo era invertido a cada 5 min. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 4.000 rpm por 5 min e o sobrenadante removido. As células foram ressuspensas em 5 mL de água ultrapura estéril e plaquearam-se 400 µL da solução em 12 placas (150 x 15 mm) contendo meio SC-trip-leu-his. Em outra placa contendo SC-trip-leu, plaquearam-se 50 µL de uma diluição 1:100 da mistura (controle do número de transformantes totais). Incubaram-se as placas a 30 °C durante 14 dias, no decorrer dos quais, efetuou-se a contagem de colônias.

3.31.3 Teste de crescimento em SC-HIS e SC-ADE

Os clones positivos obtidos através do ensaio do duplo-híbrido foram novamente repicados em placas contendo meio SC-trp-leu-his e SC-trp-leu-ade e incubados a 30

°C por 48 h. Somente foram considerados positivos aqueles que apresentaram crescimento em ambas as placas.

3.31.4 Análise dos clones positivos

Para o isolamento do DNA plasmidial de levedura as colônias resultantes após o teste de crescimento em SC-HIS e SC-ADE foram repicadas em alíquotas de 3,0 ml de meio SC-leu e incubadas a 30°C por 24 horas. As células foram centrifugadas e os “pellets” transferidos para um tubo de microcentrífuga. 200 µl de uma solução de lise (2% Triton X-100; 1% SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-Cl pH 8,0; 1,0 mM EDTA) foram adicionados ao “pellet”, que foi ressuspenso em vórtex. Após este procedimento, adicionaram-se 200 µL de fenol/clorofórmio (1:1) e 0,3 g de “glass beads” (425-600 µm, lavadas em ácido nítrico concentrado e enxaguadas em água ultrapura); o conteúdo foi vortexado por 2 min e incubado em gelo por 5 min. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 5 min e o sobrenadante recolhido para novo tubo de microcentrífuga ao qual adicionaram-se 0,1V acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2,5V de etanol. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 20 µL de TE. O DNA resultante foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli*, sendo os clones resultantes submetidos à mini-preparação de DNA plasmidial e posterior sequenciamento.

3.32 Expressão em de proteínas recombinantes em *E. coli*

Para a produção de proteínas recombinantes, uma colônia isolada de células transformadas da linhagem BL21 (DE3) Roseta *E. coli* foi inoculada em meio LB contendo o antibiótico apropriado e crescida a 37 °C sob 200 rpm de agitação durante 18 h. A pré-cultura foi inoculada em meio LB contendo os antibióticos apropriados na razão de 1:100 do volume da cultura total a ser produzida e incubados sob agitação a 37 °C até a densidade óptica atingir 0,6. As células bacterianas foram induzidas com isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) em uma concentração final de 1 mM. A cultura foi incubada a 30°C por 4 h. As células foram centrifugadas e o precipitado congelado a -70°C.

3.33 Purificação de proteínas

3.33.1 Purificação utilizando resina de níquel (Ni-NTA)

Para a purificação das proteínas com cauda de histidina N-terminal, utilizou-se o kit Ni-NTA Spin Columns (QIAGEN). Para tal, ressuspendeu-se o precipitado bacteriano em tampão de lise (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0), adicionando em seguida lisozima a uma concentração final de 1 mg/ml, incubando-se por 30 minutos. Adicionou-se para solubilização das membranas e aumento da quantidade de proteína presente na fase solúvel, 1,5% de sarcosil, incubando-se por adicionais 15 minutos. Centrifugou-se o lisado a 10.000 x g por 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi passado pela coluna previamente equilibrada com tampão de lise e, após, lavado com tampão de lavagem (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8,0), ao total de duas lavagens de 600 ml cada. A proteína heteróloga foi eluída utilizando tampão de eluição (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8,0) em duas frações de 200 ml cada. As frações, lavagens e eluições foram passadas pela coluna através de centrifugações a 0,7 g, a 4 °C, por 2 minutos.

3.33.2 Purificação utilizando “beads” de agarose

Para a purificação das proteínas fusionadas à glutathione S-transferase (GST), utilizou-se a resina Glutathione Superflow (QIAGEN). Para tal, ressuspendeu-se o precipitado bacteriano em tampão de lise (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), adicionando em seguida lisozima a uma concentração final de 1 mg/ml, incubando-se por 30 minutos. Adicionou-se para solubilização das membranas 1,5% de sarkosil, incubando-se por adicionais 15 minutos. O lisado foi sonicado no gelo por 1 minuto e, em seguida, centrifugado a 10.000 x g por 20 minutos, a 4 °C. Ao sobrenadante adicionou-se Triton X-100 a uma concentração final de 2% e, em seguida, uma quantidade adequada de “beads” de agarose foi adicionado, incubando-se no gelo por 30 minutos, sob leve agitação. A seguir, os “beads” foram lavados 6 vezes com tampão PBS (8,4 mM Na_2HPO_4 , 1,9 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, pH 7,4) e armazenados em tampão de estocagem (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 10% glicerol, pH 7,4).

3.34 GST-Pull Down

Para realização do procedimento separou-se 3 tubos, equilibrando-se 50 ml de “beads” de agarose em cada um. Ao primeiro tubo adicionou-se somente tampão de incubação (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, pH 8,0). Ao segundo tubo adicionou-se 25 µg da proteína GST purificada e tampão de incubação. Ao terceiro tubo adicionou-se 25 µg da fusão GST::isca e 25 µg da proteína presa, completando com tampão de incubação. Todos os volumes foram completados para 500 µl, incubando-se por 4 horas, no gelo, sob leve agitação. A seguir os “beads” foram lavados 5 vezes com 1 ml de tampão de incubação e ao final ressuspendidos em 50 µl de tampão de corrida.

3.35 Western blot

Após realizado o SDS-PAGE, as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose (BIORAD 0,45 µm). Para tal, foi montado o cassete de transferência de acordo com as instruções do fabricante (BIORAD) e a transferência foi feita em tampão de transferência (para 1 litro: 14,4 g glicina; 3,0 g Tris-base; 200 ml metanol) a 100 V, por 1 hora. Após a transferência, a membrana foi bloqueada utilizando tampão TBS-T (para 1 litro: 6,61 g Tris-HCl; 0,97 g Tris-Base; 8,75 g NaCl; 0,1% Tween 20) adicionado de 5% de leite em pó desnatado, por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, incubou-se a membrana em tampão TBS-T adicionado de 0,2% de BSA e quantidade adequada de anticorpo primário, por 2 horas. Após, a membrana foi lavada três vezes, por 15 minutos, com tampão TBS-T e utilizada para incubação com quantidade adequada de anticorpo secundário, em tampão TBS-T adicionado de 0,2% de BSA, por 1 hora. A membrana foi então lavada três vezes, por 15 minutos, com tampão TBS-T e utilizada para exposição em filme, após disposição de 1 ml de substrato (BIORAD) para a fosfatase alcalina.

3.36 Microscopia confocal de fluorescência

Os experimentos de microscopia confocal foram realizados em microscópio Olympus FV1000. Para detecção da GFP, a excitação ocorreu a 488 nm e a emissão entre 510 a 550 nm. Para detecção da YFP, a excitação ocorreu a 515 nm e a emissão

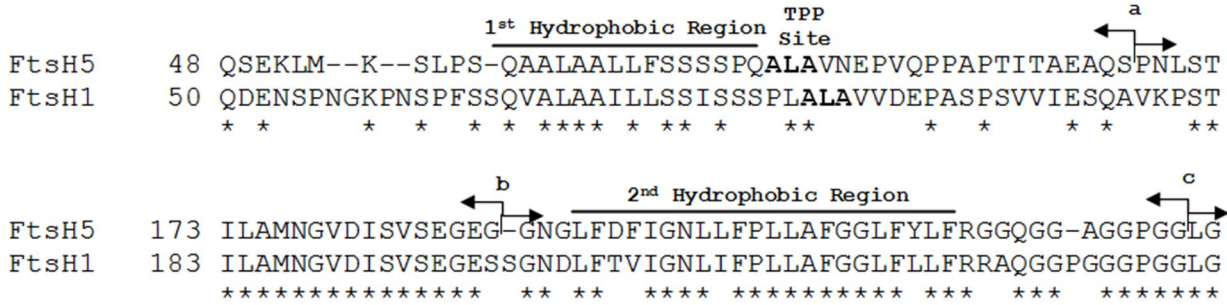
entre 525 a 550 nm. Para detecção da autofluorescência do cloroplasto, a excitação ocorreu a 635 nm e a emissão entre 670 a 700 nm. As imagens foram obtidas utilizando o software Olympus Fluoview FV10-ASW.

4 RESULTADOS

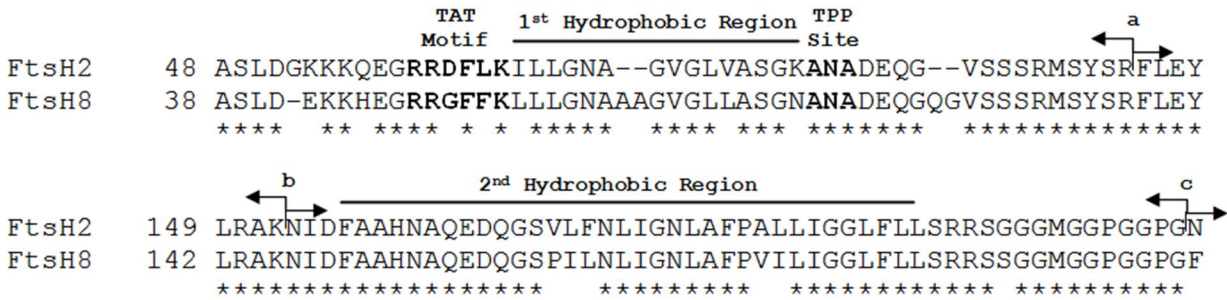
4.1 As FtsHs tipo A e tipo B diferem pela presença/ausência da dupla arginina

Os dois membros FtsH do tipo A (FtsH1 e FtsH5) são praticamente idênticos quando comparadas as sequências de aminoácidos; o mesmo é válido para os membros do tipo B (FtsH2 e FtsH8), o que sugere uma duplicação gênica recente (ANEXO A). Quando comparado o tipo A com o tipo B, verifica-se que tais proteínas apresentam identidade nos domínios de ATPase e protease (que estão expostos ao estroma), porém não há homologia entre os peptídeos de trânsito e sequências que flanqueiam os domínios hidrofóbicos.

(a) *Arabidopsis* FtsH type A



(b) *Arabidopsis* FtsH type B



(c)

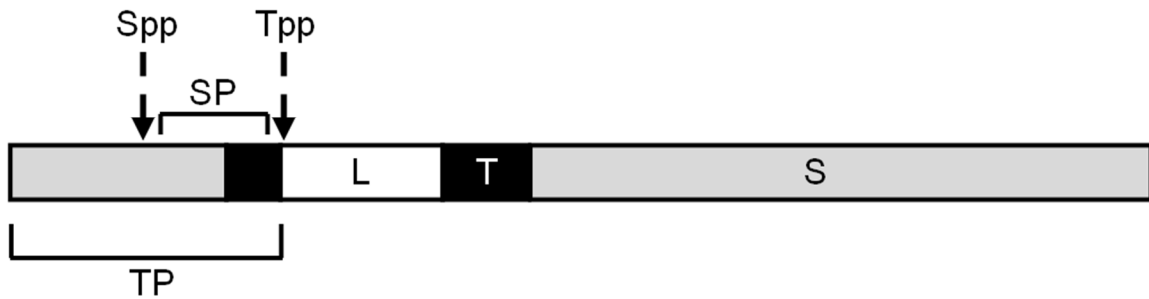


Figura 3 - As FtsH do tipo A e B diferem pela presença/ausência do motivo da dupla arginina. A sequência de aminoácidos da região N-terminal de quatro proteases FtsH de *Arabidopsis* estão alinhadas. (a) Precursores do tipo A, FtsH5 e FtsH1, apresentam um domínio de direcionamento ao cloroplasto seguido de um domínio hidrofóbico e o tripeptídeo A-L-A, o motivo de clivagem para peptidase tilacoidal sinal (Tpp). (b) Precursores do tipo B, FtsH2 e FtsH8, que possuem um domínio de direcionamento ao cloroplasto, o motivo clássico TAT (R-R-X-F-L-K), um domínio hidrofóbico e o sítio de clivagem A-N-A. As últimas três características são típicas de um peptídeo sinal da via TAT. (c) Diagrama de um precursor FtsH genético (i.e. tipo A ou B). Neste trabalho, o domínio de direcionamento ao cloroplasto e o peptídeo sinal estão agrupados e designados “peptídeo de trânsito” (TP). O domínio luminal (L), âncora transmembrânica (T) e domínio estromal (S) estão marcados. Nos itens (a) e (b), a sequência de aminoácidos inicia após o sítio de clivagem Spp previsto. As setas indicam as regiões de troca entre FtsH2 e FtsH5 ou regiões para as versões truncadas

Em particular, as proteínas do tipo B, representadas pela FtsH2, possuem o motivo da dupla arginina (R-R-X-F-L-K, onde X é qualquer aminoácido) antes do primeiro domínio hidrofóbico e do sítio de clivagem A-X-A (sinal consenso para a peptidase tilacoidal). Tal domínio é característico de substratos da via TAT. Para proteínas do tipo A, que não apresentam o motivo TAT, o primeiro domínio hidrofóbico aparenta ser um peptídeo sinal clivável, como evidenciado pela relativa baixa hidrofobicidade e pela sequência A-X-A seguinte (Figura 3a, b). A análise da sequência de aminoácidos sugere que a proteína madura para ambos os tipos A e B consiste de um domínio amino-terminal voltado para o lúmen do tilacóide (L), uma âncora transmembrânica (H) e um grande domínio catalítico voltado para o estroma (S) (Figura 3c). Devido à alta identidade encontrada na sequência de aminoácidos dos membros da família em um mesmo tipo, até mesmo nos peptídeos sinais e de trânsito (Figura S1b e c), selecionamos as FtsH5 e FtsH2 como representantes dos tipos A e B, respectivamente, para ensaios *in-vitro* a fim de determinar as vias de direcionamento para os tilacóides. Estes dois isômeros foram descritos anteriormente como responsáveis pelos fenótipos *var1* e *var2*, respectivamente, em *Arabidopsis* (SAKAMOTO et al., 2003).

4.2 pFtsH2 e pFtsH5 são integradas *in-vitro* através de um mecanismo de duas etapas

Os precursores radioativos traduzidos *in-vitro* para FtsH2 (pFtsH2; 74-kDa) e FtsH5 (pFtsH5; 75-kDa) foram incubados com cloroplastos intactos de ervilha. Os precursores foram importados na organela e processados para uma forma madura de 65-kDa para mFtsH2 e 67-kDa para mFtsH5 (Figura 4a e 4b, coluna 2). O tratamento com protease (termolisina) dos cloroplastos recuperados confirmou que as formas maduras estavam dentro dos cloroplastos e, dessa forma, protegidos da ação de proteases (coluna 3). O fracionamento dos cloroplastos recuperados mostrou que ambas as proteínas maduras estavam presentes na fração do tilacóide (T, coluna 5) ao invés da fração estromal solúvel (S, coluna 4).

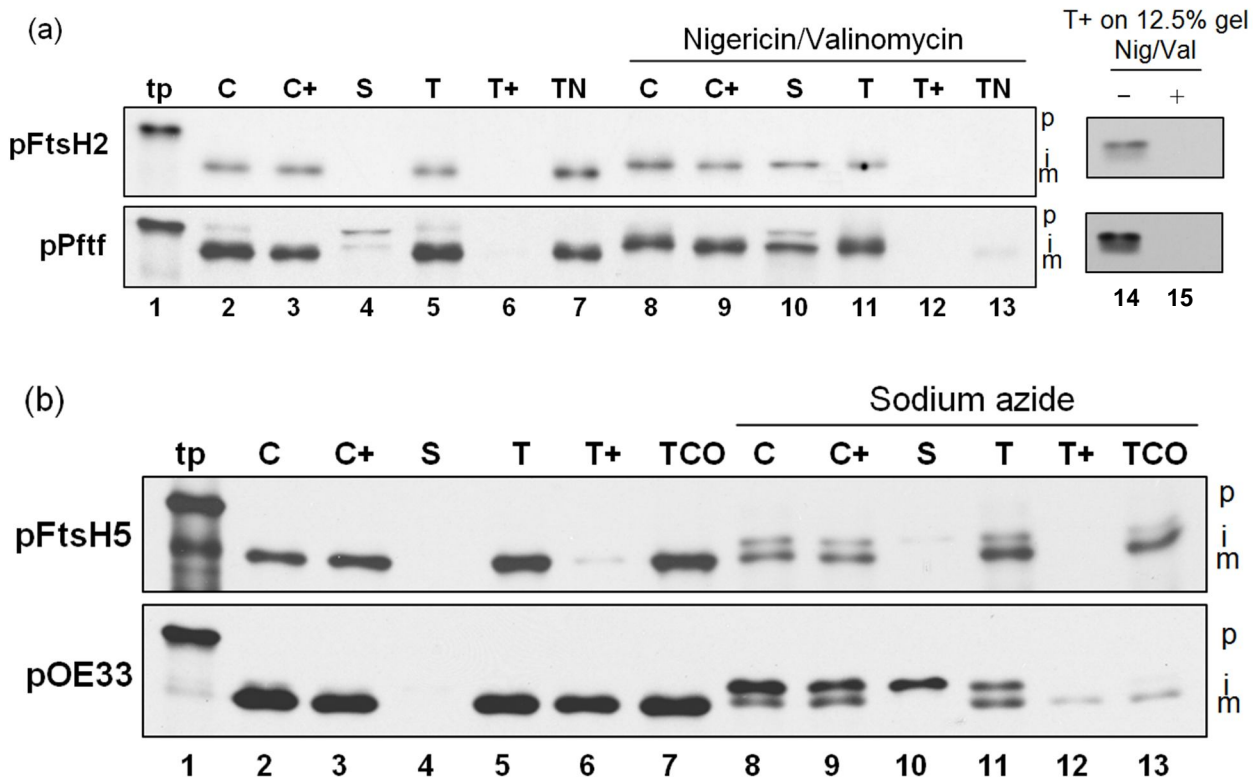


Figura 4 - pFtsH2 e pFtsH5 são importadas em cloroplastos isolados, processadas para uma forma intermediária e integradas nos tilacóides. Os substratos radioativos traduzidos *in-vitro* pFtsH2, pPftf, pFtsH5 ou pOE33 (coluna 1, tp) foram incubados com cloroplastos intactos isolados de ervilha em uma reação contendo 5 mM ATP e $\sim 100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{-s}$ de luz a 25 °C por 20 minutos, na ausência ou presença de nigericina e valinomicina (para pFtsH2 e pPftf) ou azida sódica (para pFtsH5 e pOE33), como mostrado nos painéis. Cloroplastos intactos foram recuperados da reação (C, colunas 2 e 8) e tratados com termolisina (C+, colunas 3 e 9). Cloroplastos intactos não tratados foram fracionados em estroma (S, colunas 4 e 10) e tilacóides. Aliquotas de tilacóides foram lavados em tampão de importação (T, colunas 5 e 11), tratados com termolisina (T+, colunas 6 e 12) ou tratados com 100 mM NaOH ou 200 mM Na_2CO_3 (TN ou TCO, respectivamente, colunas 7 e 13). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE em géis de 7,5% e fluorografia, exceto para os tilacóides tratados com termolisina, os quais foram analisados em géis de 12,5% (a. colunas 14 e 15)

Para verificar a correta integração na membrana, alíquotas da fração dos tilacóides foram tratadas com 100 mM NaOH, 200 mM Na_2CO_3 ou com termolisina. A proteína FtsH2 apresentou resistência à extração com NaOH (TN, coluna 7) e o tratamento com termolisina resultou em um produto de degradação parcial de $\sim 13\text{-kDa}$ (Figura 4a; T+, coluna 14), que corresponde ao tamanho esperado para a cauda luminal adicionado de um domínio transmembrânico. Tal fragmento da FtsH2 é decorrente à proteção após a inserção na membrana, uma vez que o tratamento dos tilacóides com 1% de Triton X-100 resulta na completa degradação (ANEXO B). Para os

experimentos seguintes, a presença do fragmento protegido da ação de proteases será tomada como indicador da integração correta da FtsH2 nos tilacóides.

A tradução *in-vitro* da proteína FtsH5 utilizando tanto germen de trigo preparado no laboratório quanto o kit TNT de transcrição e tradução (Promega) produziu o precursor completo de 75-kDa e uma versão adicional truncada de ~ 25-kDa (ANEXO C). A produção de proteínas truncadas (*early quitters*) a partir de mRNAs grandes não é incomum. Tal precursor truncado parece ser importado nos cloroplastos e processado para uma forma de 17-kDa, que é muito perto do tamanho esperado de migração do fragmento protegido de protease. Dessa forma, a resistência à extração com Na₂CO₃ foi utilizada para verificar a integração da FtsH5 na membrana. Importada e localizada nos tilacóides, a FtsH5 foi totalmente resistente após extração com o álcali 200 mM Na₂CO₃ (TCO, coluna 7), embora não seja resistente após extração com 100 mM NaOH. A resistência após tratamento com 200 mM Na₂CO₃ é geralmente aceita como critério para proteínas ancoradas na membrana, embora algumas proteínas sejam resistentes ao tratamento mais estrigente de 100 mM NaOH. Não está claro a razão pela qual FtsH2, mas não FtsH5, é resistente após tratamento com NaOH, uma vez que ambas apresentam âncoras transmembrânicas com alta hidrofobicidade. De qualquer forma, tais observações para FtsH2 e FtsH5 estão de acordo com o observado para o substrato homólogo das FtsHs previamente caracterizado Pfff (SUMMER et al., 2000) (Figura 4a).

Um mecanismo de processamento de duas etapas, para a localização da FtsH2 e FtsH5, é sugerido pela predição de clivagem sequencial dos peptídeos de trânsito, isto é, um precursor de tamanho intermediário, produzido por uma peptidase do estroma, deve preceder a forma madura integrada na membrana, que resulta do processamento por uma peptidase sinal presente no tilacóide. Para testar tal hipótese, a importação *in-vitro* foi conduzida na presença de inibidores característicos para as vias TAT e SecA/SecYE. Para a pFtsH2, a reação de importação foi conduzida na presença dos ionóforos nigericina e valinomicina, os quais dissipam a força motora de prótons. Tal tratamento inibiu a integração à membrana (Figura 4a, colunas 13 e 15) e resultou na acumulação de uma forma intermediária no estroma (coluna 10). A dissipação da força motora de prótons, que inabilita a via TAT (Figura 4a, pPfff),

apresenta apenas um efeito limitado na via Sec (YUAN; CLINE, 1994). Tais ionóforos não apresentaram praticamente nenhum efeito na integração da pFtsH5 (ANEXO D), confirmando que tal substrato não é integrado pela via TAT. A azida é um inibidor da SecA (Yuan e Cline, 1994). Quando os cloroplastos foram incubados com 10 mM de azida sódica, antes da adição do substrato pFtsH5 radioativo, a integração foi inibida (Figura 4b, coluna 13) e foi possível visualizar uma forma intermediária associada à fração membranosa (coluna 11). O substrato controle para a via SecA/SecYE, pOE33, foi também inibido pela azida sódica (Figura 4b).

Tais resultados suportam o modelo que os substratos pFtsH2 e pFtsH5 são integrados nas membranas dos tilacóides com o domínio maduro exposto ao estroma. Além disso, ambas FtsHs possuem um peptídeo de trânsito que é removido após a importação ao estroma e um peptídeo sinal que removido após a integração no tilacóide. Portanto, ambas FtsH2 e FtsH5 apresentam uma cauda lumenal, uma única âncora transmembrânica e o domínio enzimático ativo carboxil-proximal exposto ao estroma cloroplastidial.

4.3 pFtsH2 requer o gradiente de prótons enquanto pFtsH5 requer o estrato estromal e NTPs para integração nos tilacóides

Para identificar os elementos específicos necessários para a integração nos tilacóides, pFtsH2 e pFtsH5 foram utilizadas em um ensaio para a integração em tilacóides isolados e comparados com o substrato TAT pOE23 e o substrato Sec pOE33 (Figura 5). Na presença do estrato estromal, luz para gerar o gradiente de prótons e ATP, ambas as proteínas foram integradas na membrana (coluna 1), evento verificado pela presença do fragmento protegido após tratamento com termolisina (para pFtsH2) e resistência ao tratamento com 200 mM Na_2CO_3 (para pFtsH5). Para pFtsH2, a integração ocorreu na ausência do extrato estromal (Figura 5, coluna 2 e 7), ausência de NTPs (após tratamento com apirase para remover os traços de NTPs, colunas 3 e 7) e na presença de azida sódica (coluna 8). A integração foi dependente da força motora de prótons, uma vez que foi inibida pelos ionóforos nigericina e valinomicina na presença de luz (coluna 6) e no escuro se mostrou ATP-dependente, através da ação

reversa da ATP sintase (colunas 4 e 5). Requerimentos idênticos foram exibidos pelo substrato TAT pOE23.

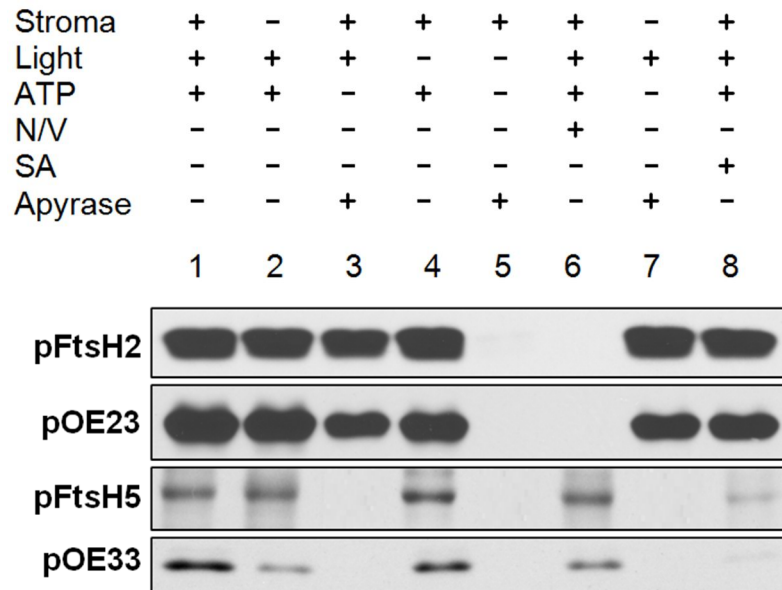


Figura 5 - A integração da pFtsH2 em tilacóides isolados requer a força motora de prótons enquanto a integração da pFtsH5 requer NTPs. Os requerimentos para a integração em tilacóides isolados de ervilha foi examinada pela incubação dos substratos radioativos pFtsH2, pFtsH5, pOE23 ou pOE33 por 30 minutos a 25 °C, sob condições explícitas no painel. Tais condições incluem a ausência ou presença do extrato estromal, luz, 5 mM ATP, nigericina/valinomicina (N/V), azida sódica (SA) e apirase. Os tilacóides recuperados foram tratados com termolisina (para pFtsH2, pOE23 e pOE33) ou extraídos com 200 mM Na₂CO₃ (para FtsH5). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE e fluorografia em géis de 12,5%

pFtsH5, por outro lado, apresentou diferentes requerimentos: a integração se mostrou dependente de NTPs (colunas 3 e 7) e foi reduzida em amostras tratadas com azida sódica (coluna 8). A integração não foi afetada por ionóforos (coluna 6). Os requerimentos para pFtsH5 foram similares aos requerimentos para o transporte do substrato Sec pOE33, com duas notáveis diferenças: A integração da FtsH5 foi praticamente não afetada pela ausência de extrato estromal, a principal fonte de SecA (coluna 2), uma vez que o transporte de pOE33 foi significativamente reduzido; a integração da FtsH5 foi reduzida pelo tratamento com azida sódica, enquanto que a integração de pOE33 foi eliminada (coluna 8). Tal resultado pode indicar uma pequena dependência da FtsH5 para a proteína SecA ou talvez uma NTPase não identificada pode servir como motor para a translocação da FtsH5.

4.4 A integração da pFtsH2 é concorrida com um precursor TAT enquanto pFtsH5 é concorrida com um precursor Sec

Os resultados dos requerimentos para a integração indicam a possível integração da pFtsH2 pela via TAT e pFtsH5 pela via Sec. Para submetê-los a outro critério, foi usado a competição em organela. Tal experimento se baseia na pré-importação de precursores TAT ou Sec, não marcados radiotivamente, nos cloroplastos antes da adição do precursor radioativo a ser testado. A maquinaria presente no envelope do cloroplasto importa os precursores muito mais rápido que os aparatos TAT e Sec, resultando em quantidades presente no estroma que saturam as translocases tilacoidais. Se ambos os substratos utilizarem a mesma via, é possível observar uma acumulação do intermediário e redução na integração.

Utilizando o substrato radioativo pFtsH2, a competição em cloroplastos pré-importados com o precursor TAT pOE23 resultou na acumulação de um intermediário no estroma (Figura 6a, coluna 6) e redução da forma madura (coluna 7). O fragmento protegido, após tratamento com termolisina foi reduzido na amostra pré-importada com o competidor pOE23 (Figura 6b, coluna 2). As amostras para integração “sem competidor” e com pOE33 não apresentaram diferença (Figura 6a, compare colunas 3 e 9; 4 e 10; Figura 6b, compare colunas 1 e 3).

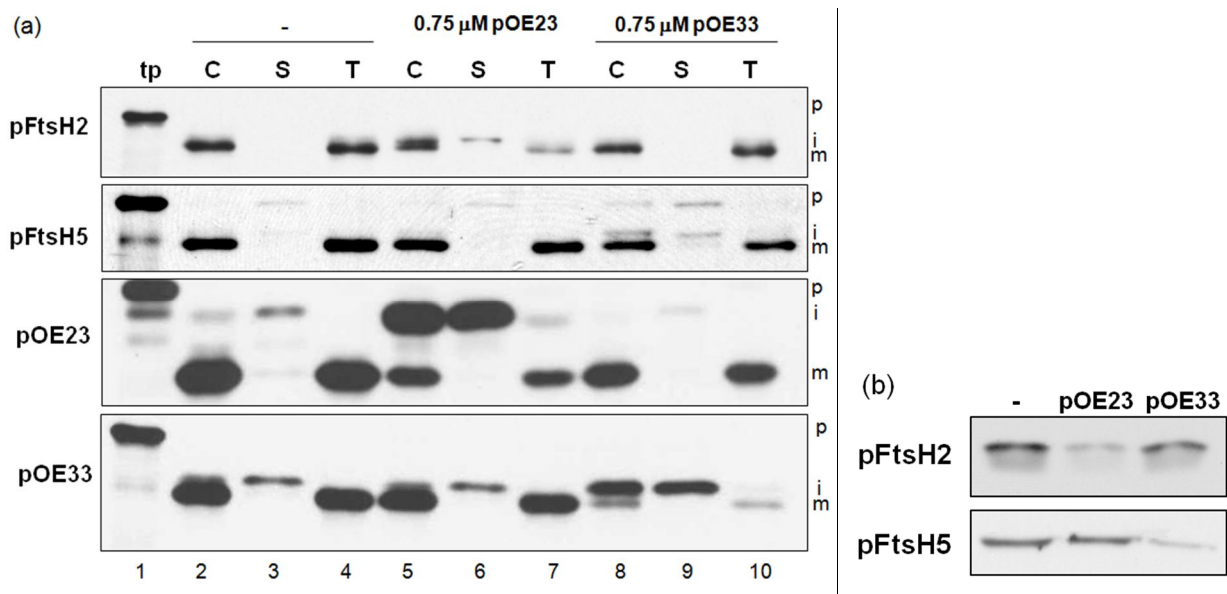


Figura 6 - A integração da pFtsH2 é concorrida com um precursor TAT enquanto pFtsH5 é concorrida com um precursor Sec. Para a competição *in-organello* cloroplastos intactos de ervilha foram pré-incubados sem (-) ou com 0,75 μM dos precursores não radioativos iOE23 ou iOE33, por 7 minutos a 25 $^{\circ}\text{C}$ na luz, e então os precursores radioativos pFtsH2, pFtsH5, pOE23 ou pOE33 foram adicionados e a reação continuou por 10 minutos adicionais. (a), cloroplastos intactos foram recuperados das reações (C, colunas 2, 5 e 8) foram subfracionados em estroma (S, colunas 3, 6 e 9) e tilacóides (T, colunas 4, 7 e 10). (b), alíquotas de tilacóides de amostras importadas com pFtsH2 e pFtsH5 em (a) foram tratadas com termolisina ou 200 mM Na_2CO_3 , respectivamente. Todas as amostras foram analisadas por SDS-PAGE e fluorografia em géis 7,5% (pFtsH2 and pFtsH5, (a)) ou em géis 12,5% (pOE23 e pOE33)

Para pFtsH5, a competição com o precursor Sec pOE33 mostrou um ligeiro aumento de um intermediário presente no estroma (Figura 6a, coluna 9) e uma significativa redução da integração, visualizada pelo decréscimo do sinal após tratamento com 200 mM de Na_2CO_3 (Figura 6b, coluna 3). As amostras “sem competidor” e com pOE23 não apresentaram diferença (Figura 6a, colunas 3 e 9; Figura 6b, coluna 1 e 2). A competição utilizando os substratos pOE23 e pOE33 radioativos foram usados para verificar a eficiência e especificidade dos competidores não radioativos (Figura 6a). Tal resultado indica uma rota comum utilizada pelos pares FtsH2/OE23 e FtsH5/OE33 para inserção na membrana dos tilacóides.

4.5 Anticorpos anti-Hcf106 inibem a integração de pFtsH2 enquanto anticorpos anti-SecY inibem pFtsH5

Como um adicional para a conclusão da via de transporte, e um ensaio para a identificação de parte dos componentes protéicos necessários para o transporte, foi

realizado ensaios de inibição utilizando anticorpos. Como mostrado na Figura 7, o tratamento dos tilacóides com o anticorpo anti-Hcf106, um componente da maquinaria TAT, impediu a integração da pFtsH2 (coluna 2), uma vez que o tratamento dos tilacóides com o anticorpo anti-SecY (coluna 3) inibiu a integração da pFtsH5 (coluna 3). A integração de ambas não foi afetada pelo tratamento com o anticorpo anti-Alb3, um componente da via SRP. A eficiência e especificidade do tratamento com anticorpos foram confirmadas pelos efeitos nas proteínas controles pOE23 (TAT), pOE33 (SecA/SecYE) e pLHCP (SRP). O modelo para transporte e topologia está representado no ANEXO E.

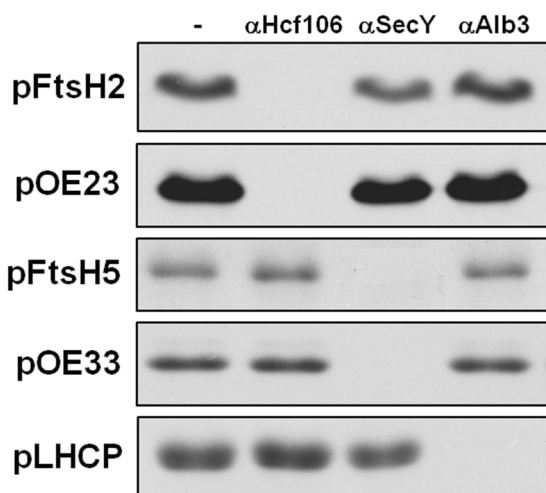


Figura 7 - O pré-tratamento dos tilacóides com o anticorpo anti-Hcf106 preveniu a integração da pFtsH2, uma vez que o pré-tratamento com o anticorpo anti-SecY preveniu a integração da pFtsH5. Tilacóides de ervilha foram incubados sem (-) ou com anti-Hcf106 IgG (1 ml/ml), soro anti-SecY ou anti-Alb3 IgG (1 mg/ml) por 1 hora no gelo. Os tilacóides foram lavados com tampão de importação, suplementados com extrato stromal e incubados com os precursores radioativos pFtsH2, pFtsH5, pOE23, pOE33 ou pLHCP, 5 mM ATP na luz a 25 °C por 30 minutos. As amostras foram então tratadas com termolisina (para pFtsH2, pOE23, pOE33 e pLHCP) ou 200 mM Na₂CO₃ (para pFtsH5). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE e fluorografia em géis 12,5%

4.6 A região N-terminal das pFtsH2 e pFtsH5 é suficiente para a inserção em tilacóides

Os resultados acima demonstram que os precursores para FtsH2 e FtsH5 possuem peptídeos sinais que são clivados e são integradas aos tilacóides pelas vias TAT e SecA/SecYE, respectivamente. Trabalhos anteriores mostram que a especificidade do direcionamento às vias SecA/SecYE ou TAT são governadas pelo

peptídeo sinal. Em particular, o motivo da dupla-arginina é reconhecido pelo componente cpTatC da via TAT (GERARD; CLINE, 2006). Entretanto, uma tentativa anterior, em nosso laboratório, para caracterizar os determinantes necessários para o direcionamento *in-vivo* sugeriu que o domínio maduro da FtsH5 era necessário para o transporte ao tilacóide (Borgonove, 2008). Especificamente, a GFP foi fusionada em frame com as sequências amino-terminais das proteínas FtsH2 e FtsH5. Embora a construção FtsH2-GFP fosse corretamente direcionada aos tilacóides, pFtsH5-GFP acumulou no compartimento estromal. Para verificar se a informação para o direcionamento se encontra na região amino-terminal ou está presente na região madura exposta ao estroma, foram preparadas versões truncadas de pFtsH2 (pFtsH2 Δ) e pFtsH5 (pFtsH5 Δ), as quais contêm a região amino-terminal composta do peptídeo sinal, primeiro domínio hidrofóbico, cauda lumenal e segundo domínio hidrofóbico. Como mostrado na Figura 8, ambos os precursores truncados, pFtsH2 Δ e pFtsH5 Δ , foram localizados na membrana dos tilacóides, após importação *in-vitro*. pFtsH2 Δ foi importada em cloroplastos (Figura 8a, coluna 3) e inserida aos tilacóides, processo confirmado pela proteção contra proteases (coluna 6) e extração com NaOH (coluna 7). pFtsH5 Δ foi importada em cloroplastos (Figura 8b, coluna 3) e inserida aos tilacóides, como confirmado pela proteção contra proteases (coluna 6) e extração com NaCO₃ (coluna 8). Como esperado, a versão truncada da pFtsH5 não é resistente a extração com NaOH (coluna 7). Tais resultados demonstram que todos os requerimentos necessários para a importação das pFtsH2 e pFtsH5 em cloroplastos isolados e subsequente inserção à membrana dos tilacóides se encontram no domínio N-terminal.

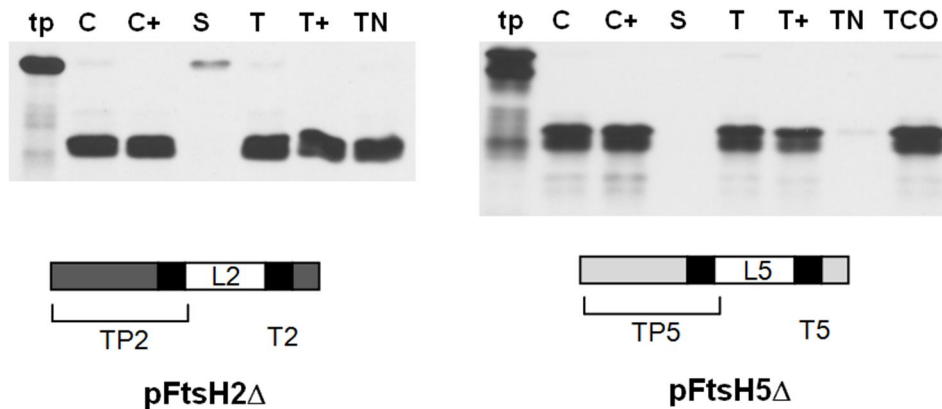


Figura 8 - As regiões N-terminais das pFtsH2 e pFtsH5 são suficientes para a inserção nas membranas dos tilacóides. Os precursores radioativos pFtsH2 Δ e pFtsH5 Δ foram incubados com cloroplastos de ervilha intactos em uma reação contendo 5 mM ATP e luz, a 25 °C por 20 minutos. Os cloroplastos intactos foram recuperados (C) e tratados com termolisina (C+). Cloroplastos intactos não tratados foram fracionados em estroma (S) e tilacóides. Alíquotas de tilacóides foram lavadas com tampão de importação (T), tratados com termolisina (T+) ou extraídos com 100 mM NaOH (TN). Para pFtsH5 Δ , uma alíquota de tilacóides foi extraída com 200 mM Na₂CO₃ (TCO). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE e fluorografia em géis de 12,5%

4.7 A região madura da pFtsH2 apresenta incompatibilidade com a via Sec

Como um teste inicial para identificar as bases moleculares do observado para os substratos FtsH2 e FtsH5, ou seja, duas vias distintas direcionando duas proteínas homólogas pertencentes ao mesmo complexo heterólogo multimérico, precursores quiméricos de tais proteínas foram preparados. O peptídeo de transito e o peptídeo sinal da pFtsH2 foram fusionados ao domínio maduro da pFtsH5 (Tp2Mat5) e o peptídeo de transito e peptídeo sinal da pFtsH5 foi fusionado ao domínio maduro da pFtsH2 (Tp5Mat2) (Figura 3a e 3b, região de troca dos peptídeos de direcionamento). Como mostrado na Figura 9a, o precursor quimérico Tp2Mat5 (76-kDa) foi importado em cloroplastos e processado para uma forma madura (67-kDa, coluna 2). A forma madura esteve presente na fração tilacoidal e produziu um fragmento protegido de ~17-kDa, após tratamento com protease, confirmando a integração à membrana. Um padrão similar foi obtido em um ensaio paralelo conduzido com cloroplastos pré-tratados com azida sódica (colunas 8, 9, 10 e 13). A pré-incubação dos cloroplastos com nigericina e valinomicina preveniu completamente a integração, evidenciado pela acumulação de um fragmento intermediário (72-kDa) na fração estromal (coluna 6) e ausência do

fragmento protegido, após tratamento com protease (coluna 12). Tais resultados indicam que o peptídeo de trânsito e o peptídeo sinal da pFtsH2 são capazes de direcionar a integração do domínio maduro da FtsH5 através da via TAT.

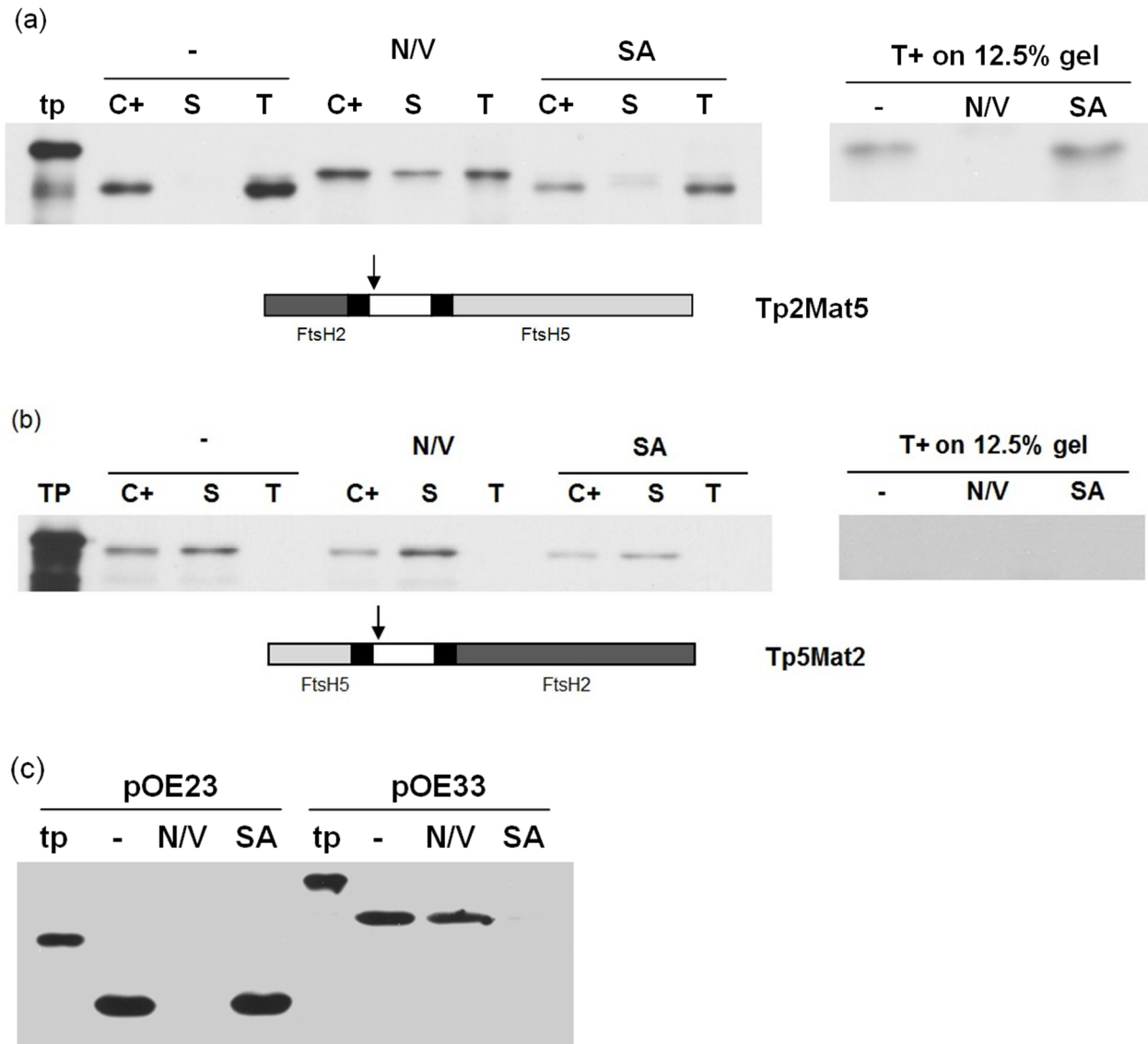


Figura 9 - O domínio maduro da FtsH2 é incompatível para o transporte com a via Sec. Os precursores radioativos TP2Mat5 (a) ou TP5Mat2 (b) foram incubados com cloroplastos intactos de ervilha em uma reação contendo 5 mM ATP e luz, a 25 °C por 20 minutos, na presença ou ausência de nigericina/valinomicina (N/V) ou azida sódica (SA). Cloroplastos intactos foram recuperados da reação e tratados com termolisina (C+). Cloroplastos intactos não tratados foram fracionados em estroma (S) e tilacóides. Aliquotas de tilacóides foram lavadas com tampão de importação (T) ou tratadas com termolisina (T+). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE e fluoregrafia em géis de 7,5%, exceto para as amostras tratadas com termolisina, que foram analisadas em géis de 12,5%. As setas indicam os pontos de troca de peptídeo de trânsito

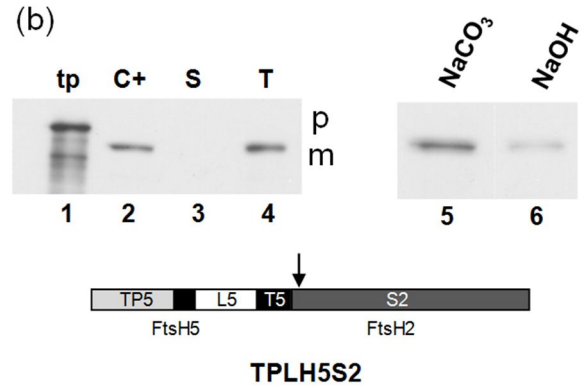
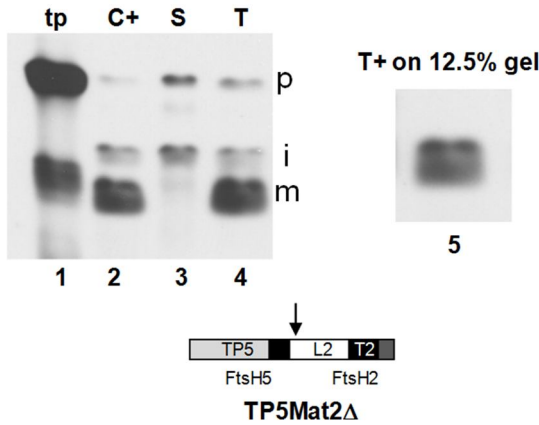
O precursor quimérico Tp5Mat2 (73-kDa) foi importado em cloroplastos e processado a uma forma de 70-kDa (Figura 9b, coluna 2) o qual é ligeiramente maior que os 65-kDa esperados após o processamento no tilacóide. Interessantemente, tal forma processada encontrou-se exclusivamente associada com a fração estromal (coluna 3) no controle sem tratamento, na amostra tratada com nigericina/valinomicina (colunas 5, 6 e 7) e tratada com azida sódica (colunas 8, 9 e 10). Tal resultado indica que o peptídeo de trânsito da pFtsH5 não é capaz de integrar a região madura da pFtsH2 aos tilacóides, sugerindo uma possível incompatibilidade apresentada pela conformação da região madura da pFtsH2 com a via Sec.

4.8 A cauda lumenal, âncora transmembrânica e região exposta ao estroma da FtsH2 são necessárias para a incompatibilidade

Existem três domínios diferentes da região madura da FtsH2 que poderiam potencialmente causar a incompatibilidade observada: a cauda lumenal, âncora transmembrânica e a região catalítica exposta ao estroma. Três fusões diferentes envolvendo a proteína precursora foram construídas para testar tais domínios em potencial incompatíveis. TP5Mat2 Δ , que apresenta o mesmo ponto de troca da construção TP5Mat2, porém falta o domínio exposto ao estroma, visando testar os domínios lumenal (L) e transmembrânico (T) da FtsH2 (Figura 9a); TPLT5S2, cuja sequência da FtsH5 até a região transmembrânica é fusionada à região exposta ao estroma da FtsH2 (Figura 10b); TPL5TS2, em que o peptídeo de trânsito e cauda lumenal da FtsH5 são fusionadas aos domínios transmembrânico e estromal da FtsH2 (Figura 10c). Como mostrado na Figura 9, todas as três fusões foram importadas em cloroplastos (colunas 2), processados proteoliticamente e localizados nos tilacóides (colunas 4). Cada proteína foi devidamente integrada aos tilacóides, como determinado pela proteção parcial após tratamento com protease (Figura 10a, coluna 5) ou pela resistência ao tratamento com 100 mM NaOH (Figura 10c, coluna 6) ou 200 mM Na₂CO₃ (Figura 10b, coluna 5), dependendo da fonte da âncora transmembrânica na fusão protéica e produção de um fragmento de degradação parcial de ~12-kDa após tratamento com termolisina (coluna 5). Tal resultado indica que nenhum domínio isolado da FtsH2 ou combinação de dois domínios da FtsH2 previnem a integração pela

maquinaria Sec. Talvez há uma estrutura montada que consiste de todos os domínios que previne o acesso da maquina Sec de transporte.

(a)



(c)

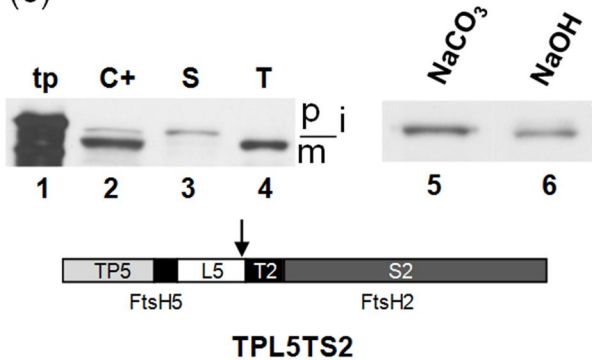


Figura 10 - Ambas os domínios expostos ao lúmen e ao estroma são necessário para a incompatibilidade com a maquinaria Sec. Os precursores radioativos TP5Mat2 Δ , TPL5S2 e TPL5TS2 foram incubados com cloroplastos intactos de ervilha em uma reação contendo 5 mM ATP na luz, a 25 °C por 20 minutos. Os cloroplastos intactos foram recuperados e tratados com termolisina (C+). Cloroplastos intactos não tratados foram fracionados em estroma (S) e tilacóides. Alíquotas de tilacóides foram lavadas com tampão de importação (T), tratadas com termolisina (T+) ou extraídas com 200 mM Na₂CO₃ (Na₂CO₃) ou com 100 mM NaOH (NaOH). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE e fluorografia. O peptídeo de trânsito (TP), domínio luminal (L) e domínio transmembrânico (T) estão designados junto com 2 ou 5 para identificar a origem da FtsH2 ou FtsH5, respectivamente

4.9 FtsH7 e FtsH9 não apresentam a dupla arginina nem o sítio de clivagem A-X-A

O alinhamento dos membros FtsH7 e FtsH9 sugere uma duplicação gênica, visto que são praticamente idênticos (Figura 11). O domínio característico de proteínas transportadas pela via TAT, motivo da dupla arginina (R-R-X-F-L-K), não está presente

em ambas as proteínas. Além disso, o sítio de clivagem A-X-A, que é o sinal consenso para a peptidase tilacoidal, também não é encontrado, estando presentes somente dois domínios hidrofóbicos. Dessa forma, tais proteínas foram selecionadas para importação *in-vitro* e fusão com a proteína GFP, visando à caracterização do transporte, localização e topologia.

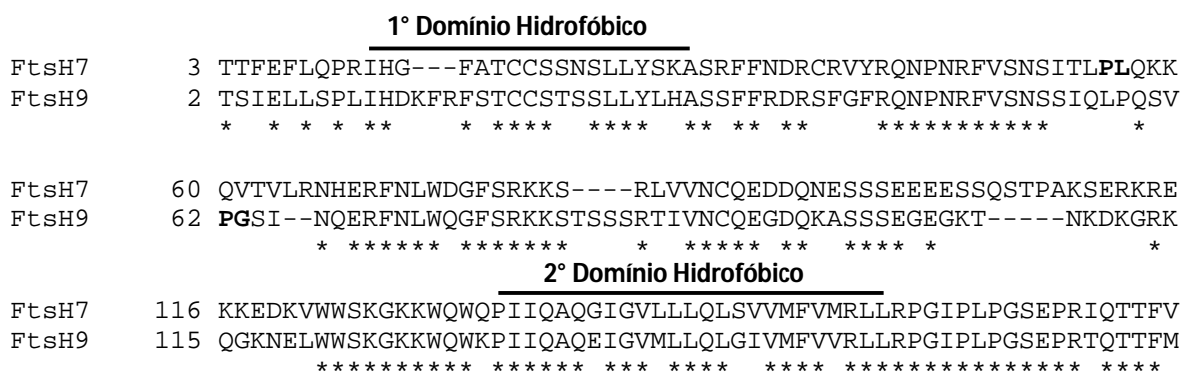


Figura 11 - As FtsHs 7 e 9 não apresentam o motivo da dupla arginina nem o sítio de clivagem A-X-A. A sequência de aminoácidos da região N-terminal da FtsH7 e FtsH9 de *Arabidopsis* estão alinhadas. Em negrito estão indicados os sítios preditos para clivagem da peptidase estromal. As duas regiões hidrofóbicas estão indicadas

4.10 As FtsH7 e FtsH9 são direcionadas *in-vivo* e *in-vitro* para o cloroplasto

Para localização *in-vivo* das proteases FtsH7 e FtsH9 foram obtidas plantas transgênicas estáveis expressando a fusão FtsH7/9::GFP, sob controle do promotor constitutivo CamV35S, clonadas em vetor de expressão em plantas pBin. Foi possível observar a fluorescência da GFP das plantas FtsH7::GFP e FtsH9::GFP presente nos cloroplastos, indicando um processo de síntese no citoplasma celular e direcionamento aos cloroplastos (Figura 12).

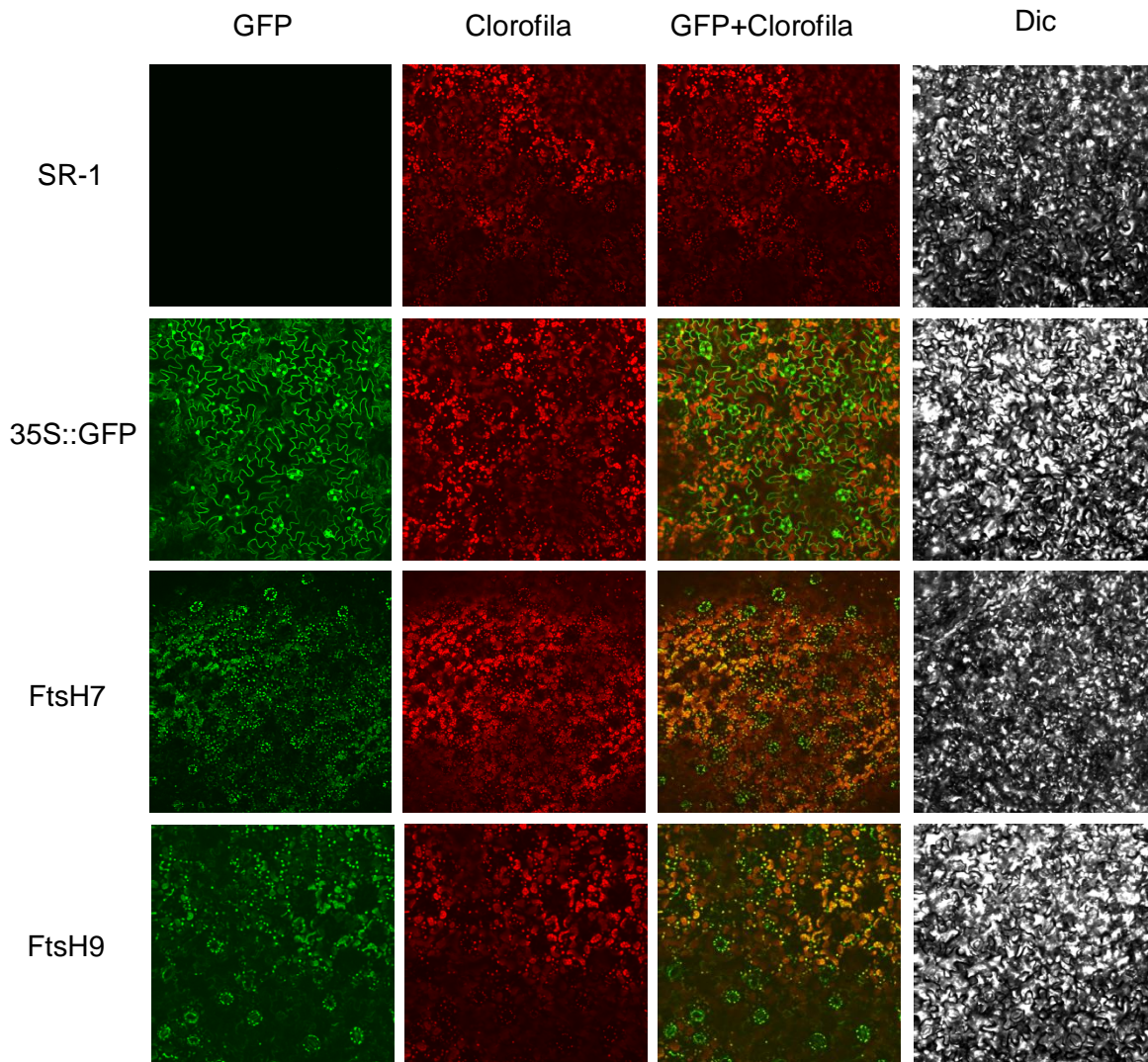


Figura 12 - As proteínas FtsH7 e FtsH9, fusionadas a GFP, são direcionadas aos cloroplastos em plantas transgênicas estáveis de *Nicotiana tabacum*. SR-1: Planta selvagem não transformada; 35S::GFP: GFP sob controle do promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor. As imagens foram obtidas por microscopia confocal em microscópio Olympus FV1000. As plantas foram transformadas utilizando o vetor de expressão em plantas pBin

Para os experimentos *in-vitro*, os precursores radioativos traduzidos para FtsH7 (pFtsH7; 88-kDa) e FtsH9 (pFtsH9; 88-kDa) foram incubados com cloroplastos intactos de ervilha. Os precursores foram importados na organela e processados para uma forma madura de 81-kDa para mFtsH7 e mFtsH9 (Figura 13a, coluna 2). O tratamento com protease (termolisina) dos cloroplastos recuperados confirmou que as formas maduras estavam dentro dos cloroplastos e, dessa forma, protegidos da ação de proteases (coluna 3). O fracionamento dos cloroplastos recuperados mostrou que

ambas as proteínas maduras estavam presentes na fração membranosa (T, coluna 5) ao invés da fração estromal solúvel (S, coluna 4). O tratamento dos tilacóides com 100 mM de NaOH mostrou que mFtsH7 e mFtsH9 (TN, coluna 7) são resistentes, indicando uma possível inserção na membrana. Entretanto, o tratamento com termolisina (T+, coluna 6) não resultou em um fragmento protegido de membrana, característica de proteínas inseridas. O tratamento com outras proteases como proteinase k e tripsina (Figura 13b, Tk e Tt, respectivamente, colunas 7 e 8) também não resultou na formação de fragmento protegido. Dessa forma, a presença do fragmento protegido não pode ser usada como critério de inserção na membrana.

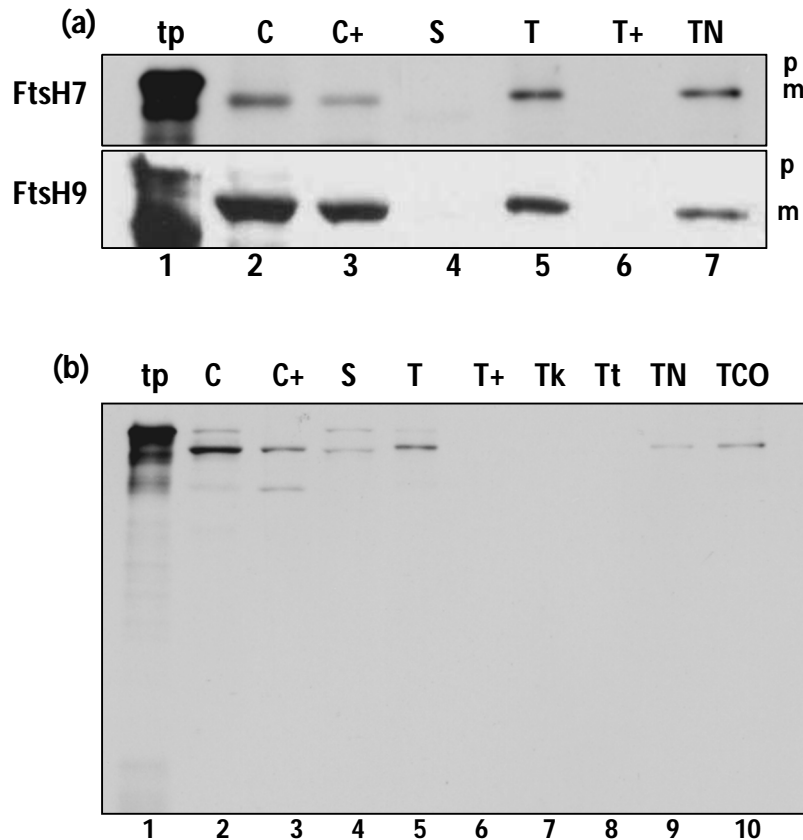


Figura 13 - pFtsH7 e pFtsH9 são importadas em cloroplastos isolados, processadas para uma forma madura e associada aos tilacóides. (a) Os substratos radioativos traduzidos *in-vitro* pFtsH7 e pFtsH9 (coluna 1, tp) foram incubados com cloroplastos intactos isolados de ervilha em uma reação contendo 5 mM ATP e $\sim 100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{-s}$ de luz a 25 °C por 20 minutos. Cloroplastos intactos foram recuperados da reação (C, coluna 2) e tratados com termolisina (C+, coluna 3). Cloroplastos intactos não tratados foram fracionados em estroma (S, coluna 4) e tilacóides. Alíquotas de tilacóides foram lavados em tampão de importação (T, coluna 5), tratados com termolisina (T+, coluna 6) ou tratados com 100 mM NaOH (TN, coluna 7). (b) O substrato radioativo traduzido *in-vitro* pFtsH7 (coluna 1, tp) foi incubado com cloroplastos intactos isolados de ervilha em uma reação contendo 5 mM ATP e $\sim 100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{-s}$ de luz a 25 °C por 20 minutos). Cloroplastos intactos foram recuperados da reação (C, coluna 2) e tratados com termolisina (C+, coluna 3). Cloroplastos intactos não tratados foram fracionados em estroma (S, coluna 4) e tilacóides. Alíquotas de tilacóides foram lavados em tampão de importação (T, coluna 5), tratados com termolisina (T+, coluna 6), proteinase k (Tk, coluna 7), tripsina (Tt, coluna 8), 100 mM NaOH (TN, coluna 9) ou 200 mM Na_2CO_3 (TCO, coluna 10). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE em géis de 12,5% e fluorografia

4.11 FtsH7 e FtsH9 são encontradas nas frações do envelope plastidial e tilacóides

Em um estudo de proteômica do envelope plastidial (FERRO et al., 2003), relatou-se que a protease FtsH7 foi encontrada presente em tal estrutura. Dessa forma,

visando a localização intra-plastidial das proteases FtsH7 e FtsH9, realizou-se a separação do envelope e tilacóides. Para tal, os substratos radioativos pFtsH7, pFtsH9, pOE23 (marcador para o tilacóide) e p36 (marcador para o envelope) foram incubados com cloroplastos intactos de ervilha. As reações foram misturadas em dois tubos, contendo quantidades adequadas de pFtsH7, pOE23 e p36 (Figura 14, coluna 1) e pFtsH9, pOE23 e pP36 (coluna 5). Os cloroplastos foram lizados e separados em envelope (E, colunas 2 e 6), estroma (S, colunas 3 e 7) e tilacóides (T, colunas 4 e 8). As bandas referentes as proteínas FtsH7 e FtsH9 puderam ser observadas nas frações do envelope (junto com o marcador P36) e dos tilacóides (OE23).

A possível formação de um complexo para os substratos pFtsH7 e pFtsH9 foi verificada através da importação em cloroplastos isolados e eletroforese em géis nativos, após a solubilização da fração membranosa usando diferentes detergentes. Entretanto, não foi possível observar bandas definidas para nenhuma das proteases testadas (ANEXO F).

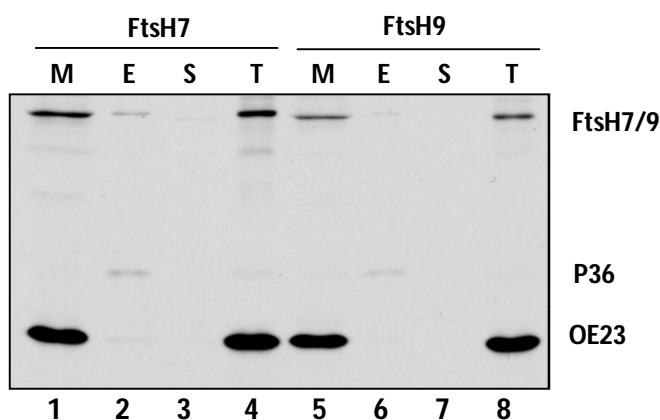


Figura 14 - pFtsH7 e pFtsH9 são encontradas em ambas as frações ricas em envelope plastidial e tilacóides. Os substratos radioativos traduzidos *in-vitro* pFtsH7, pFtsH9, pOE23 e pP36 foram incubados com cloroplastos intactos isolados de ervilha em uma reação contendo 5 mM ATP e $\sim 100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{-s}$ de luz a 25 °C por 20 minutos. As reações foram misturadas em dois tubos, contendo quantidades iguais de pFtsH7, pOE23 e p36 (M, coluna 1) e pFtsH9, pOE23 e pP36 (M, coluna 5). Os cloroplastos foram lizados e fracionados em envelope (E, colunas 2 e 6), estroma (S, colunas 3 e 7) e tilacóides (T, colunas 4 e 8). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE em géis de 12,5% e fluorografia

4.12 Uma proteína hipotética plastidial potencialmente interage com a protease FtsH5

Em *Arabidopsis*, a estrutura do complexo FtsH nos tilacóides é até certo ponto conhecida (para revisão veja (SAKAMOTO, 2006)). Entretanto, o mecanismo de regulação do mesmo ainda é desconhecido e acredita-se que haja outros fatores envolvidos. Para verificar possíveis interações protéicas com a protease FtsH5, utilizou-se a técnica de duplo híbrido de levedura. O sistema duplo híbrido de levedura é uma das técnicas indicadas para identificação de proteínas que interajam em um contexto *in-vivo* (CHIEN et al., 1991). Dessa forma, a sequência completa do gene FtsH5 de *Arabidopsis* foi clonada no vetor pGBKT7, sendo este utilizado como isca para transformar a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* AH109, a qual foi plaqueada em meio seletivo (-Tryptofano). A linhagem recombinante, com a isca, foi utilizada para a transformação com uma biblioteca de ESTs de *Arabidopsis thaliana* (presas) e o resultado foi plaqueado em meio seletivo (-Tryptofano, -Leucina, -Histidina), onde cresceram 269 colônias. A transformação resultou em $2,5 \times 10^5$ células transformadas, ou seja, aproximadamente 12 vezes o número total de genes presentes em *Arabidopsis*. As colônias resultantes foram estriadas em outro meio seletivo (-Tryptofano, -Leucina, -Adenina), sendo que cresceram 48 colônias. Tais amostras foram consideradas positivas, sequenciadas e analisadas (Tabela 1).

As proteínas encontradas se enquadraram em diferentes funções e localização subcelular. Para a seleção de candidatos em potencial, procuramos primeiramente excluir as proteínas cuja localização subcelular tenha sido comprovada experimentalmente e seja diferente do cloroplasto, local em que a proteína FtsH5 desempenha seu papel. Um dos clones obtidos é uma proteína hipotética, cuja localização subcelular está predita aos cloroplastos. A análise da sequência de aminoácidos abriu uma série de perguntas e possibilidades de estudo. Tal proteína foi denominada FIP (FtsH5 Interacting Protein) e a análise é mostrada a seguir.

Tabela 1 - Resultado do sequenciamento das colônias obtidas da transformação de uma biblioteca de ESTs de *A. thaliana* (presas) na linhagem de *S. cerevisiae* expressando a protease FtsH5 (isca), clonada no vetor pGBKT7

Nome	Função	Local
ATSERPIN1	Inibidor de protease	AP
Alfa-amilase 3	Amilase	CL
Beta-fructofuranosidase/invertase	Hidrolisa fructofuranosídeos	CL
Metalotioneína	Liga-se a metais pesados	CL
Ornitina carbamoiltransferase	Síntese de citrulina	CL
Proteína desconhecida	-	CL
Ribulose-bifosfato carboxilase	Fotossíntese	CL
Subunidade K do fotossistema I	Fotossíntese	CL
TOC64	Transporte de proteínas	CL
Cafeoil-CoA 3-O-metiltransferase	Formação de lignina	CT
Tiorredoxina H tipo 3	Reduz pontes dissulfeto	CT
Proteína da família LPT	Inibidor de protease	EX
Proteína da família gênica SNARE	Transporte vesicular	GC
Proteína de membrana plasmática Atpip1	Aquaporina	MB
3-Cetoacil-coa tiolase	Glicólise	MT
Proteína desconhecida	-	MT
Disease resistance protein	Defesa	NC
2-Oxoglutarato dioxigenase	Produção de hidroxialquil	ND
RGLG1 (Ring Domain Ligase1);	Ligante de zinco	ND
DIS3	Organização do citoesqueleto	NL
Proteína desconhecida	-	NL
RTV1 (Related To Vernalization1)	Fator de Transcrição	NL
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Participa da via glicolítica	PX

Nota - A coluna local informa a predição subcelular obtida pelo programa WolfPSORT. AP: Apoplasto; CL: Cloroplasto; CT: Citosol; EX: Extracelular; GC: Complexo de Golgi; MB: Membrana plasmática; MT: Mitocôndria; ND: Não determinada; NL: Núcleo; PX: Peroxissomo.

4.13 A proteína FIP apresenta um domínio rico em cisteína conservado na região C-terminal

A proteína FIP, que possivelmente interage com FtsH5, é composta por 129 aminoácidos, sendo codificada por apenas um gene em *Arabidopsis*, presente no cromossomo 5. A análise da sequência de aminoácidos revelou que FIP é composta em potencial por um peptídeo de trânsito N-terminal, seguido de um domínio hidrofóbico (para ancoragem em membrana) e um domínio rico em cisteína na região C-terminal (Figura 15).

MTIAPALQTTFVSSSTNFLKHSSSWGSPSPNNVILPKNKRSSSSVVAAVGDVSSDGTIYLIGGAI AVALVG
TAFPILFKRKDTCP ECDGAGFVRKGGVTLRANAARKDLPQIVCANCNGLGKLNQIDKS

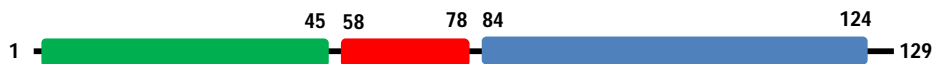


Figura 15 - Esquema mostrando regiões e domínios da proteína FIP. Verde, aminoácidos 1 a 45: peptídeo de trânsito N-terminal; Vermelho, aminoácidos 58 a 78: domínio hidrofóbico; Azul, aminoácidos 84 a 124: domínio rico em cisteína

O alinhamento múltiplo utilizando a sequência de aminoácidos das proteínas homólogas presentes em *Vitis vinifera*, *Zea mays*, *Glycine max*, *Oryza sativa*, *Picea sitchensis* e *Populus trichocarpa* mostrou que não há identidade na região N-terminal das proteínas alinhadas, uma vez que tal região se trata de um peptídeo de trânsito. Toda a identidade apresentada no alinhamento está presente na região do domínio hidrofóbico e domínio rico em cisteína (Figura 16).

```

Vitis      MVSLAPLHTLFP-----GNSLKQSSLPG---FYARPT-----PVGS-AV 35
Populus    MATLTPIQTSLS-----RFSPQRWPVSGP---GFSAA-----PAGSKFL 37
Glycine    MASMTMLQTMIP-----KNAPNLPFRVGAASNNTTKIS-----FGGSGRV 40
Arabidopsis MTIAPALQTFV-----SSTN-----FLKHSS-----SWGSPSP 29
Zea        --MAAVVNAR-----AATARCSAAGG---PPRGAASSFP-----PSTIRTR 36
Oryza      -MAASPASTA-----AAVVNAPAATGGLLLPRGRSS-----WSWSCC 36
Picea      MAMAI PVAAS T TALQALPSTTSSAQHSAASGSCSSLMRSSTMQVPAVCNLQRSIGSIWKS 60
          :

Vitis      SW---KKN---RSLTVVAAVGEVSTDGTIYLIAGAVAVTVLGTAFPIFFSRKDVCP 89
Populus    SWNISQKKNKRSRSLTVVAAVGDVSDGTTYLIAGAAVALLGTAFFILFSRKDLCPE 97
Glycine    LWTGIQRNRNRSSSIVVAAVGDVSSDGTAYLVAGAI AVALVGTAFPIFFSRKDTCP 100
Arabidopsis NNVILPKNKRSSSSVVAAVGDVSSDGTIYLIGGAI AVALVGTAFPIILFKRKDTCPE 88
Zea        K--RTTAAAGGRRLVAVSAVDVAEGNTYLIAGAVAVALVGTAFPIILFSRKDTCPE 94
Oryza      N--NNSSMGRWR---AAAVGEVAEGNTYLIAGAVAVALVGTAFPIILFSRKDTCPE 91
Picea      RSYSNSRNTTNGRSVVVCAF GDVSSDGTTYLVAGAVAVALLGTAFFILFSRKDLCPE 120
          .*. *:::*. *::.* *:::*****:*.* **
          :

Vitis      GAGFVRQSGVALRANAARKDQAQIVCARCNGLGKLNQVDK- 129
Populus    GAGFIRKSGATLRANAARKDQAQIVCPRCNGLGKLNQIDK- 137
Glycine    GAGFVRKANVTLRANAARKDQTQIVCARCNGLGKLNQIDK- 140
Arabidopsis GAGFVRKGGVTLRANAARKDLPQIVCANCNGLGKLNQIDKS 129
Zea        GAGFIRKAGATLRANAARKDEA QIVCPNCNGLGKLGQIDK- 134
Oryza      GAGFVRKGGATLRANAARKDLPQIVCPNCNGLGKLGQIDK- 131
Picea      GAGFTRKTDRTL RANAARKDEA QIVCPRCNGLGKLGQVDK- 160
          **** *: . . :***** .****.*****.*:**

```

Figura 16 – Alinhamento múltiplo utilizando a sequência de aminoácidos de FIP e seus homólogos em *Vitis vinifera*, *Zea mays*, *Glycine max*, *Oryza sativa*, *Picea sitchensis* e *Populus trichocarpa*

4.14 FIP interage com o domínio C-terminal de proteases FtsH do tipo A

Para uma maior confiabilidade dos dados, o vetor contendo a proteína FIP foi re-introduzido em levedura e a interação com a protease FtsH5 (tipo A) foi repetida, através da observação do crescimento em meio seletivo (-W, -L, -H, -A) e ativação do gene repórter β -Galactosidase. Para tal experimento foi utilizada a protease FtsH5 completa, ou seja, composta dos peptídeos sinal e de trânsito, região exposta ao lúmen, região hidrofóbica e região ativa exposta ao estroma (Figura 3c). Visando identificar se a interação é dependente da região N-terminal (peptídeos sinal e de trânsito, região exposta ao lúmen e âncora transmembrânica) ou da região C-terminal (região exposta ao estroma) a construção Δ FtsH5 foi testada. Tal construção é composta pela região N-terminal da protease FtsH5, sendo que o domínio exposto ao estroma foi deletado (mesma sequência da construção usada na Figura 8, pFtsH5 Δ). Verificou-se que não houve crescimento em meio seletivo (-W, -L, -H, -A) e não houve ativação do gene repórter β -Galactosidase sendo que, dessa forma, tal construção não interage com FIP. Uma vez que a sequência completa interagiu, pode-se dizer que,

para que a interação ocorra, é necessário um domínio que está presente na região C-terminal exposta ao estroma, região que desempenha atividade de protease e ATPase na FtsH5 (Figura 17).

A protease FtsH2 (tipo B), de *Arabidopsis*, também faz parte do complexo FtsH nos tilacóides. Tal proteína apresenta certa identidade com as FtsHs do tipo A, porém recentemente verificou-se que a atividade proteásica de proteínas do tipo B é completamente dispensável no complexo tilacoidal (ZHANG et al., 2010). Assim sendo, a sequência da protease FtsH2 completa foi introduzida em levedura, sendo que não houve crescimento em meio seletivo nem ativação do gene da β -Galactosidase. Dessa forma, a interação com FIP parece ser específica com proteases do tipo A (Figura 17).

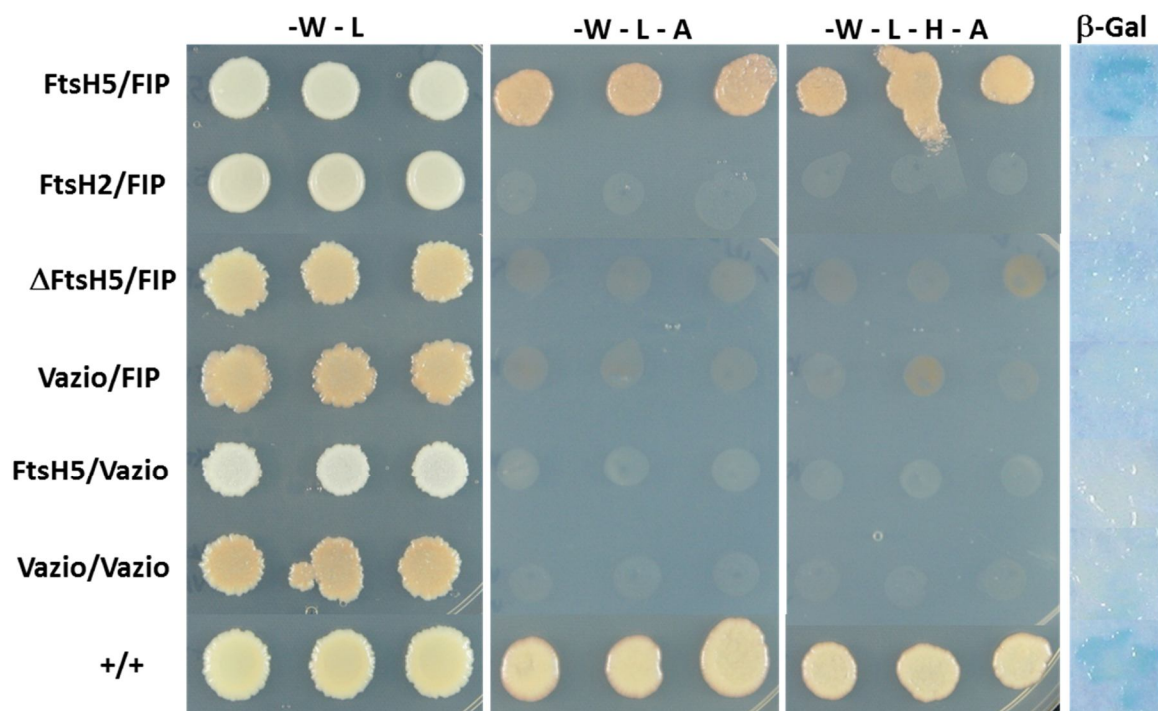


Figura 17 – FIP interage com a região C-terminal de proteases FtsH do tipo A. Teste de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem AH109, em diferentes meios de cultivo e ensaio utilizando a atividade da β -Galactosidase após 2 horas, com diferentes construções, como designado na figura. Os controles negativos mostram que a FtsH5 e FIP sozinhos não promovem crescimento, assim como ambos os vetores vazios. Para o controle positivo utilizou-se os vetores (SNF1/SNF4). W: Triptofano; L: Leucina; H: Histidina; A: Adenina; β -Gal: β -Galactosidase

4.15 FIP é direcionada *in-vivo* e *in-vitro* aos cloroplastos e está inserida nos tilacóides

A predição da sequência de aminoácidos de FIP, utilizando o programa WolfPSORT, indica uma provável localização cloroplastidial, o que contribuiria para confirmar a hipótese da co-localização entre FIP e FtsH5. Para verificação do direcionamento aos cloroplastos, FIP foi fusionada à GFP no vetor de expressão em plantas pK7FWG2 e utilizado para transformação transiente de *Nicotiana tabacum*. Como esperado, a fusão proteína FIP::GFP é direcionada aos cloroplastos (Figura 18).

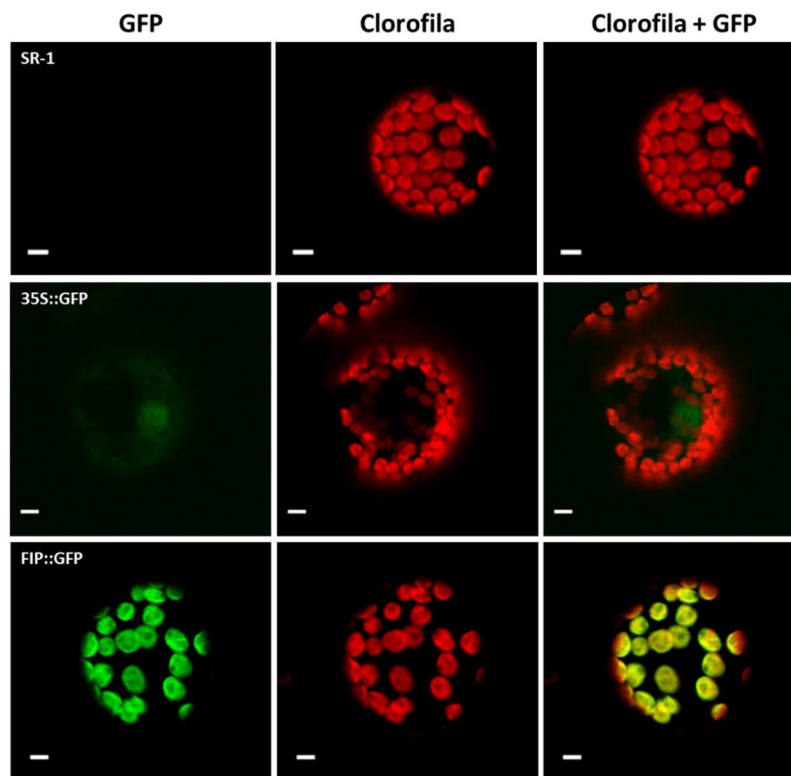


Figura 18 – A fusão proteína FIP::GFP é direcionada aos cloroplastos. As construções foram introduzidas em *Nicotiana tabacum* por infiltração foliar de uma suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* e, após 3 dias da infiltração, foram preparados os protoplastos. As imagens foram obtidas utilizando microscópio confocal de fluorescência Olympus FV1000. GFP corresponde à fluorescência detectada no canal verde; Clorofila, detectada no canal vermelho distante, corresponde à autofluorescência do cloroplasto; Clorofila + GFP corresponde à sobreposição do canal verde e vermelho distante. As barras de escala correspondem a 5 μm

A proteína FIP, *in-vivo*, é direcionada aos cloroplastos. Entretanto, não foi possível identificar sua localização intra-plastidial. Dessa forma, foi realizado a transcrição e tradução *in-vitro* e posterior importação em cloroplastos isolados. Para tal, o precursor radioativo traduzido para FIP (pFIP; 13-kDa) foi incubados com cloroplastos intactos de ervilha. O precursor foi importado na organela e processados para uma forma madura de ~9-kDa (Figura 19a, coluna 2). O tratamento com protease (termolisina) dos cloroplastos recuperados confirmou que a forma madura estava dentro dos cloroplastos e, dessa forma, protegidos da ação de proteases (coluna 3). O fracionamento dos cloroplastos recuperados mostrou que a proteína madura estavam presentes na fração do tilacóide (T, coluna 5) ao invés da fração estromal solúvel (S, coluna 4).

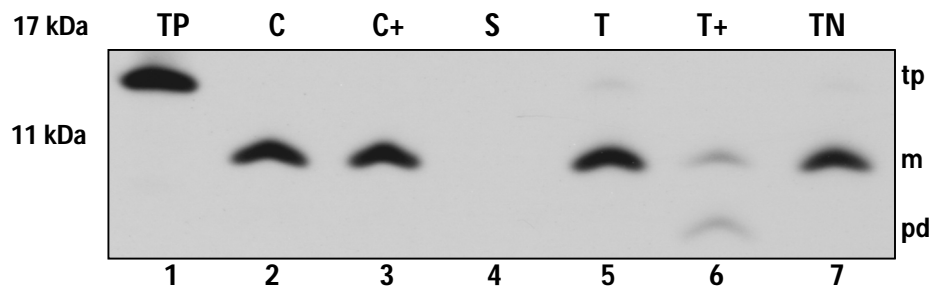


Figura 19 - pFIP é importada em cloroplastos isolados, processada para uma forma madura e integradas nos tilacóides. O substrato radioativo traduzido *in-vitro* pFIP (coluna 1, tp) foi incubado com cloroplastos intactos isolados de ervilha em uma reação contendo 5 mM ATP e ~ 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{-s}$ de luz a 25 °C por 20 minutos. Cloroplastos intactos foram recuperados da reação (C, coluna 2) e tratados com termolisina (C+, coluna 3). Cloroplastos intactos não tratados foram fracionados em estroma (S, coluna 4) e tilacóides. Alíquotas de tilacóides foram lavados em tampão de importação (T, coluna 5), tratados com termolisina (T+, coluna 6) ou tratados com 100 mM NaOH (TN coluna 7). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE em géis de 15% e fluorografia

Para verificar a correta integração na membrana, alíquotas da fração dos tilacóides foram tratadas com 100 mM NaOH ou com termolisina. A proteína FIP apresentou resistência à extração com NaOH (TN, coluna 7) e o tratamento com

termolisina resultou em um produto de degradação parcial de ~ 5-kDa (Figura 19, T+, coluna 6), indicando a correta inserção na membrana dos tilacóides. A formação de um produto de degradação parcial de menor tamanho indica também a topologia. Após o ancoramento à membrana, o domínio rico em cisteína se encontra exposto ao estroma.

4.16 A proteína FIP está associada a um complexo de aproximadamente 440 kDa

A possível associação da proteína FIP a um complexo protéico nos tilacóides foi verificada através da realização de eletroforese em gel nativo. Para tal, o precursor radioativo traduzido para FIP foi incubados com cloroplastos intactos de ervilha. Os cloroplastos intactos foram lisados e a fração de tilacóides solubilizada com 1% digitonina. Como mostrado na Figura 20, a proteína FIP apresentou em gel nativo uma banda de aproximadamente 440 kDa. Tal peso molecular é o mesmo valor esperado para o complexo FtsH nos tilacóides (SAKAMOTO et al., 2003).

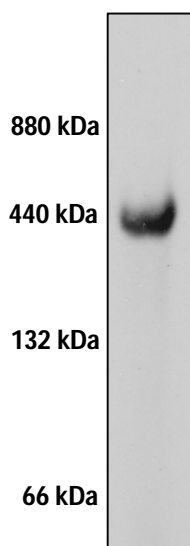


Figura 20 – A proteína FIP está associada a um complexo de aproximadamente 440 kDa. Eletroforese em gel nativo de amostras de tilacóides. O substrato radioativo traduzido *in-vitro* pFIP foi incubado com cloroplastos intactos isolados de ervilha em uma reação contendo 5 mM ATP e ~ 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{-s}$ de luz a 25 °C por 20 minutos. Cloroplastos intactos foram recuperados da reação e lisados, sendo a fração dos tilacóides lavada e solubilizada com 1% digitonina por 1 hora. As amostras foram analisadas por fluorografia. Os marcadores moleculares utilizados foram ferritina (880 e 440 kDa) e BSA (132 e 66 kDa)

4.17 Expressão heteróloga em *E. coli* das construções GST::FIP e His::FtsH5

Como um segundo teste de interação entre FIP e FtsH5, decidiu-se utilizar a técnica *in-vitro* GST Pull-Down. Dessa forma, é necessário primeiramente expressar e purificar as proteínas em questão. Sendo assim, decidimos inicialmente testar a expressão em *E. coli*. A sequência codificadora da proteína FIP foi clonada no vetor de expressão pDEST15 (Invitrogen), fusionando tal sequência à sequência da GST (Glutathione S-Transferase). Para purificação da proteína FtsH5, a sequência codificadora foi clonada no vetor de expressão pET28b (Novagen), o qual possui a cauda de histidina na região N-terminal. Como esperado, a expressão das proteínas recombinantes foi dependente da adição de indutor (IPTG) (Figura 21a e 21b).

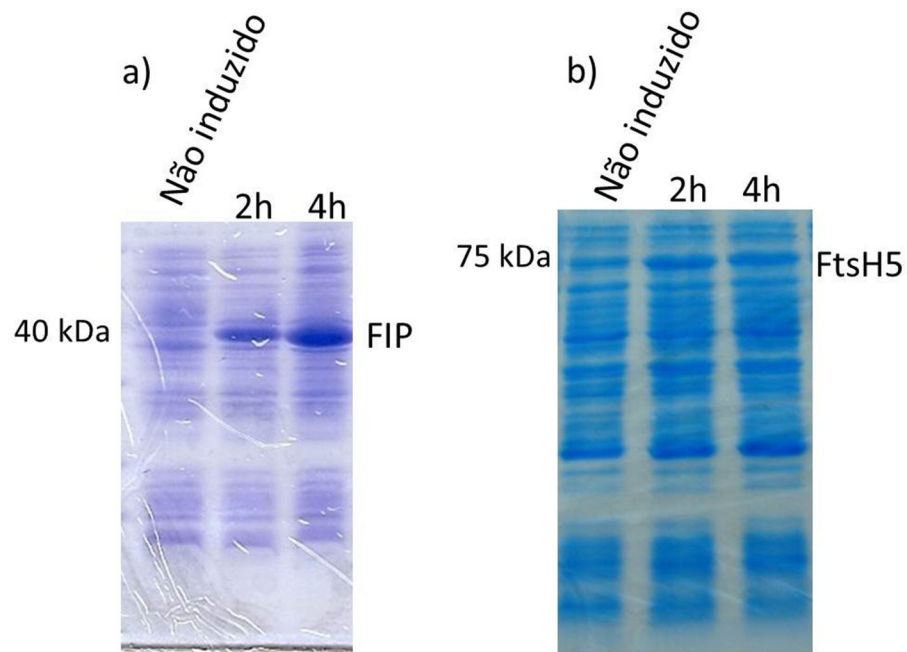


Figura 21 – Expressão em linhagem de *E. coli* BL21 Codon PlusRP das proteínas recombinantes FIP (40 kDa) e FtsH5 (75 kDa). A indução foi realizada utilizando IPTG a concentração final de 1mM, a 30°C. A cultura foi coletada na condição não induzida, 2 horas após a indução e 4 horas após a indução. As amostras foram submetidas à SDS-PAGE em géis de 12,5% e, após a corrida, corados com Coomassie Blue

4.18 GST Pull-Down mostra que há a interação *in-vitro* entre FIP e FtsH5

Para realização do experimento *GST Pull-Down*, a proteína FtsH5 foi produzida em *E. coli* e purificada utilizando resina de níquel. Para a purificação, o lisado foi solubilizado com 1,5% de Sarcosil, visando aumentar a quantidade da proteína recombinante FtsH5 presente na fração solúvel. Após solubilização, uma grande quantidade da proteína recombinante ainda continuou presente na fração insolúvel (Figura 22, compare a coluna *Pellet* com Solúvel). Apesar disso, a quantidade de proteína purificada foi suficiente para o ensaio de GST Pull-Down (Figura 22, Eluído).

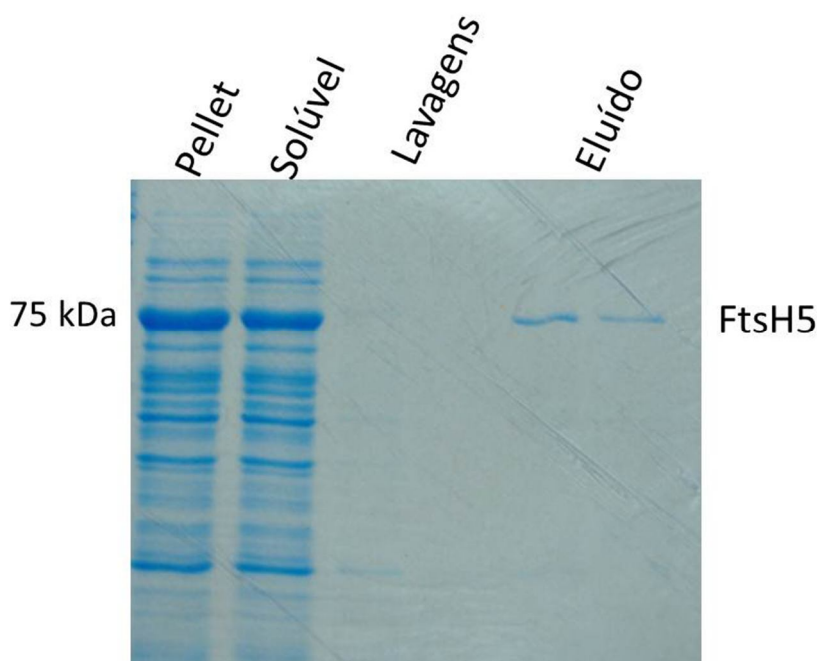


Figura 22 – Expressão e purificação da proteína FtsH5 fusionada à cauda de histidina. A purificação foi realizada em resina de níquel e as amostras foram submetidas à SDS-PAGE em géis de 12,5% e, após a corrida, corados com Coomassie Blue. Na figura, *Pellet* corresponde à fração insolúvel e a fração solúvel foi utilizada para passagem pela resina. O eluído foi coletado em duas etapas

O experimento de *GST Pull-Down* foi realizado comparando amostras em três tubos distintos. Ao primeiro tubo foi adicionada somente a resina usada para purificação (Glutathione Superflow – QIAGEN); Ao segundo tubo, a resina e somente a proteína GST; Ao terceiro, a resina e a fusão GST::FIP. A todos os tubos foi adicionado 1 μ g de FtsH5 recombinante previamente purificada. O procedimento a seguir foi realizado conforme descrito em Material e Métodos. As amostras resultantes foram aplicadas em

gel desnaturante e coradas com prata (Figura 23a) ou utilizadas para *western blot* utilizando o anticorpo anti-FtsH5 (Figura 23b). Como mostrado na Figura 23a, as proteínas GST e GST::FIP foram adequadamente purificadas. O experimento de *western blot*, utilizando as mesmas amostras da Figura 23a, permitiu a visualização de uma banda de tamanho esperado para a proteína recombinante FtsH5 somente na fração GST::FIP. Tal fato indica uma interação entre FIP e FtsH5, uma vez que FtsH5 não se liga à resina (Figura 23b, Resina) nem à GST (Figura 23b, Resina + GST).

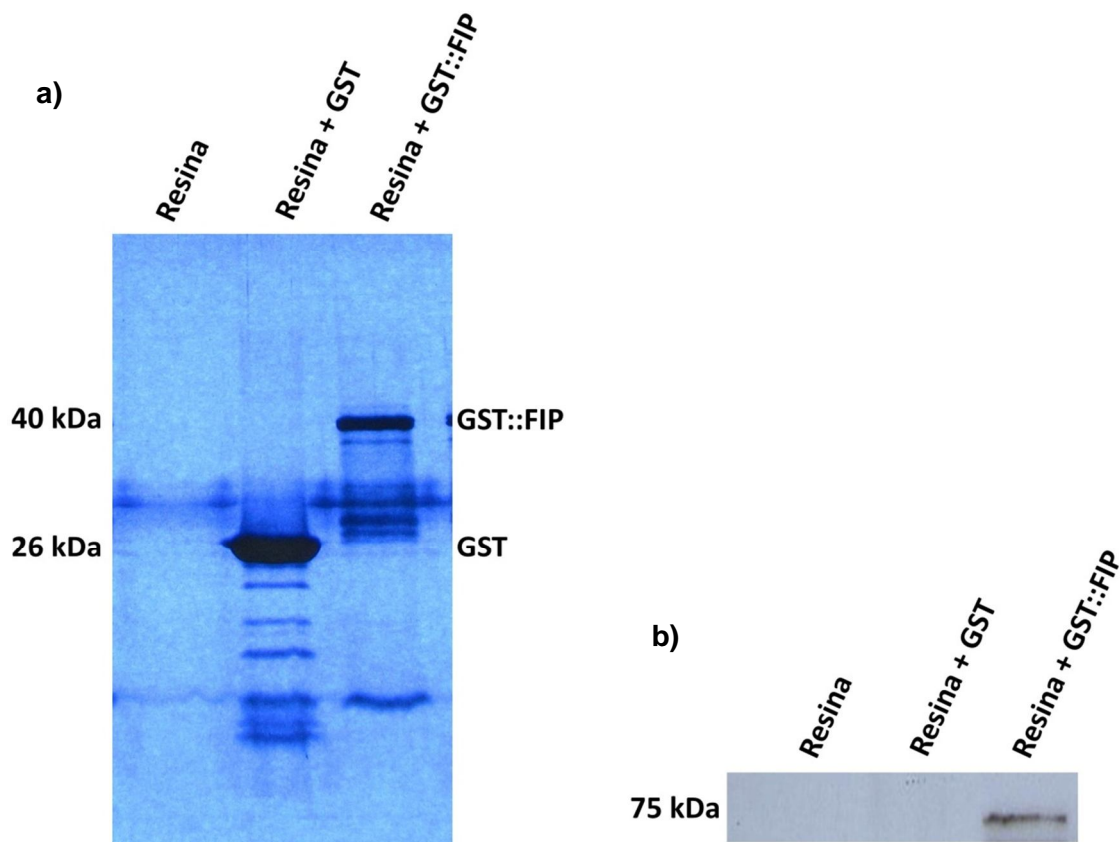


Figura 23 – FtsH5 e FIP interagem *in-vitro*. Experimentos de *GST-Pull-Down* utilizando três amostras. Amostra 1: Somente resina (Resina); Amostra 2: Resina e a proteína GST (Resina + GST); Amostra 3: Resina e a fusão GST:FIP (Resina +GST::FIP). À todas as amostras foi adicionado 1 μ g da proteína FtsH5 purificada. As amostras foram incubadas a 4 °C por 2 horas e lavadas 5X em tampão de lavagem, conforme descrito em Material e Métodos. a) As amostras foram visualizadas após SDS-PAGE e coloração do gel com prata. b) As mesmas amostras em a) foram transferidas para membrana de nitrocelulose e então realizado um *western blot* utilizando o anticorpo anti-FtsH5 (SAKAMOTO et al., 2003)

5 DISCUSSÃO

5.1 Direcionamento das proteínas FtsH2 e FtsH5 ao tilacóide

Três classes de proteases dependentes de ATP são encontradas nos cloroplastos: Clp, Lon e FtsH (para revisão veja (ADAM; RUDELLA; VAN WIJK, 2006), (SAKAMOTO, 2006)). Clp e Lon são encontradas no estroma enquanto FtsH está inserida na membrana. Todas possuem um motivo de ligação ao ATP, porém diferem no domínio catalítico para proteólise. A protease FtsH foi originalmente descrita em *E. coli* e atua na degradação de proteínas de vida curta (para revisão veja (ITO; AKIYAMA, 2005)). A FtsH, assim como seus ortólogos FtsH em diferentes organismos, apresentam dois domínios transmembrânicos seguidos de um domínio ATPásico, um motivo de ligação ao zinco, que serve como um sítio catalítico para a protease. Tais sítios estão voltados para o poro central de hexâmeros FtsH, acesso o qual é controlado pelo domínio ATPásico. Acredita-se que o domínio ATPásico atua também na translocação do polipeptídeo através do sítio de protease, além de deslocar substratos protéicos para fora da bicamada lipídica (ITO; AKIYAMA, 2005). *Arabidopsis* possui doze genes FtsH (FtsH1-12). Oito das 12 FtsHs (FtsH1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, e 12) são direcionadas para o cloroplasto, 3 para a mitocôndria (FtsH3, 4 e 10) (SAKAMOTO et al., 2003) e FtsH11 é direcionada para cloroplastos e mitocôndrias (URANTOWKA et al., 2005). As proteases direcionadas ao cloroplasto FtsH1/FtsH5 (tipo A), FtsH2/FtsH8 (tipo B) e FtsH7/FtsH9 são pares relacionados baseado na identidade de sequência e análise genética. Não está claro, mas acredita-se que as FtsH tipo A e tipo B combinam-se para formar um complexo multimérico na razão de 1 subunidade tipo A para 2 tipo B (YU; PARK; RODERMEL, 2004; 2005). Os tipos A e B são as FtsH plastidiais mais abundantes.

Nosso estudo de direcionamento e integração para as subunidades dos tipos A e B indica que ambas as proteínas são direcionadas por um mecanismo de duas etapas no qual o precursor é importado no estroma plastidial, onde o peptídeo de trânsito é removido, expondo um peptídeo sinal de direcionamento aos tilacóides. Após a integração aos tilacóides, o peptídeo sinal é removido, produzindo uma proteína madura com uma cauda lumenal amino-proximal de 118 (FtsH5) e 84 (FtsH2) resíduos, uma única âncora transmembrânica e um grande domínio catalítico estromal. A

topologia desses domínios foram verificados por tratamento com protease e extração alcalina (Figura 4). A partir do estroma, FtsH5 e FtsH2 são direcionadas a maquinarias de integração distintas. A maquinaria Sec integra FtsH5, uma vez que a maquinaria TAT integra FtsH2. A integração da FtsH5 pela maquinaria Sec foi demonstrada pela necessidade de ATP, inibição da SecA com azida sódica, competição com o substrato iOE33 e inibição após pré-tratamento com anticorpos anti-SecY. Por analogia da operação do sistema Sec em *E. coli* (OSBORNE; RAPOPORT; VAN DEN BERG, 2005; DRIESSEN; NOUWEN, 2008) acredita-se que SecA interaja com o peptídeo sinal hidrofóbico, que serve como uma sequência de início de transferência e, por uma inserção dos segmentos do peptídeo não montado através do canal SecYE, SecA, direciona o domínio luminal através da membrana do tilacóide. A âncora transmembrânica, que deve servir como uma sequência de parada de transferência, encerra o transporte e o peptídeo é liberado lateralmente na membrana lipídica.

Evidências que a via TAT integra a FtsH2 incluem a necessidade do gradiente iônico, competição com o substrato TAT iOE23, inibição após pré-tratamento com anticorpos para o componente TAT Hcf106. Um trabalho anterior mostra que a protease FtsH de *Capsicum*, Pfff, envolvida na fusão de vesículas é também integrada pela via TAT (SUMMER et al., 2000). A característica marcante para as proteínas direcionadas pela via TAT está na presença do motivo TAT, R-R-X-F-L-K, que interessadamente é mais característico de substratos TAT de bactéria do que tilacóides. As proteínas do tipo B são os únicos substratos TAT conhecidos que possuem o motivo TAT completo. Uma vez que a dupla arginina é essencial para o transporte TAT, o aminoácido conservado F na posição +2 do motivo é importante para a eficiência em *E. coli* (STANLEY; PALMER; BERKS, 2000) e pode aumentar a afinidade de ligação dos precursores que normalmente não possuem a fenilalanina nessa posição (GERARD; CLINE, 2007). Uma breve análise das sequências de plantas nos banco de dados indicam que, em geral, plantas e algas verdes possuem uma proteína FtsH direcionada pela via TAT. Esta foi a primeira proteína de membrana conhecida integrada pela TAT (SUMMER et al., 2000). Estudos subsequentes demonstram que a proteína Rieske FeS utiliza a TAT (MOLIK et al., 2001) e algumas proteínas periplasmáticas de *E. coli* utilizam a TAT bacteriana (HATZIXANTHIS; PALMER; SARGENT, 2003). A maneira

pela qual TAT integra proteínas de membrana não está clara, uma vez que tal sistema transporta domínios protéicos totalmente montados com regiões carregadas e hidrofílicas. Experimentos utilizando substratos artificiais mostraram que mesmo um pequeno domínio hidrofóbico exposto pode terminar o transporte pela TAT (RICHTER et al., 2007), aparentemente causando a desmontagem do complexo transiente de translocação e liberação do segmento hidrofóbico para a bicamada lipídica.

A troca de peptídeos de trânsito com outros substratos mostram que a via TAT consegue transportar substratos Sec com eficácia moderada, porém a via Sec é praticamente incapaz de transportar substratos TAT (HENRY et al., 1997). Uma situação parecida acontece para as proteases FtsH. O precursor quimérico TP2Mat5 foi importado em cloroplastos e integrado aos tilacóides pela via TAT. Por outro lado, TP5Mat2 foi importado nos cloroplastos porém foi incapaz de integrar-se aos tilacóides. Uma estrutura montada e/ou presença de resíduos básicos perto da região de clivagem da peptidase apresentam-se como as duas principais razões para a incompatibilidade dos substratos TAT com a via Sec (BOGSCH; BRINK; ROBINSON, 1997; HYNDS; ROBINSON; ROBINSON, 1998). Neste trabalho procurou-se identificar a região de incompatibilidade da FtsH2 através da criação de construções quiméricas entre FtsH5 e FtsH2. Contudo, nenhum domínio individual da FtsH2 foi suficiente para abortar a integração mediada pela Sec, sugerindo que o domínio maduro completo da FtsH2 apresenta uma estrutura que interfere tanto com o reconhecimento ou quanto o acesso da maquinaria Sec.

Sakamoto (SAKAMOTO, 2006) nota que a multiplicação das isoformas de FtsH está associada com organismos fotossintetizantes, ao invés de organismos não-fotossintetizantes. Quatro isômeros FtsH foram descritos na cianobactéria *Synechocystis* sp. Um isômero (sll1463) apresenta uma dupla arginina imediatamente antes da primeira região hidrofóbica, a qual é seguida do sítio de clivagem putativo A-P-A. Dessa forma, a presença no cloroplasto de FtsHs integradas pela via TAT pode ser resultado de uma duplicação gênica e segregação de vias, que ocorreram no procarioto fotossintetizante progenitor dos cloroplastos. Não é incomum que um complexo fotossintetizante apresente subunidades direcionadas por vias de direcionamento distintas. Por exemplo, o fotossistema 2 contém subunidades direcionadas por todas as

quatro vias de translocação do tilacóide. Contudo, este é o primeiro exemplo conhecido onde subunidades homólogas de um mesmo complexo utilizam diferentes mecanismos de integração para formarem as respectivas formas funcionais. Os fatores específicos que governam o direcionamento de tais proteínas ainda ajudam a esclarecer a operação das vias TAT e Sec para a integração pós-traducional de proteínas de membrana.

5.2 Localização das FtsH7 e FtsH9

O par de genes FtsH7 e FtsH9 em *Arabidopsis* apresenta alta similaridade na sequência de aminoácidos (ANEXO G), podendo ser considerados genes duplicados. Um dos objetivos deste trabalho era incluir esse par de genes no estudo, uma vez que não há trabalhos descrevendo função, localização ou estrutura de tais proteínas disponíveis na literatura. Um estudo interessante sobre proteômica do envelope plastidial (FERRO et al., 2003) mostrou que a protease FtsH7 foi encontrada no envelope. Tal fato levantou a possibilidade da existência de um complexo FtsH presente no envelope plastidial, ancorado na membrana interna ou externa, podendo o complexo estar voltado para espaço de intermembranas ou para o estroma. Tal hipótese seria bastante viável, uma vez que em mitocôndrias há complexos FtsH voltados para o espaço de intermembranas e para a matriz mitocondrial (TATSUTA; LANGER, 2009).

As tentativas para identificação da via de transporte das proteínas FtsH7 e FtsH9 à membrana dos tilacóides não foram bem sucedidas. A ausência de formação de um fragmento protegido, após digestão da fração membranosa com termolisina, colocou em dúvida a inserção adequada de tais proteínas à membrana, embora tenham sido plenamente resistentes ao tratamento com álcali (Figura 13). Por outro lado, tais substratos não foram afetados pelo tratamento com os ionóforos nigericina/valinomicina e com azida sódica (dados não mostrados), indicando que provavelmente não são transportados pelas vias TAT e Sec, respectivamente.

O experimento de separação da fração membranosa dos cloroplastos em tilacóides e envelope (Figura 14), utilizando os substratos radioativos FtsH7 e FtsH9, mostrou uma dupla localização de tais proteínas, podendo observar um sinal presente

tanto no envelope quanto nos tilacóides. A dupla localização levanta a possibilidade de tais proteínas serem inseridas na membrana espontaneamente, uma vez que é bastante comum encontrar também no envelope proteínas que utilizem a “via” espontânea de transporte ao tilacóide (SCHLEIFF; KLOSGEN, 2001). Outra possibilidade seria a inserção das proteases FtsH7/9 por um mecanismo alternativo de inserção no envelope (pelo menos duas proteínas da membrana interna do envelope utilizam tal mecanismo (BRINK et al., 1995; KNIGHT; GRAY, 1995)) e então o direcionamento ao tilacóide por um fluxo de membrana. Embora pouco provável, não se pode descartar a existência de uma via alternativa de direcionamento aos tilacóides.

A tentativa de identificação de um complexo formado por tais proteínas foi testada através da importação em cloroplastos isolados, solubilização dos tilacóides e aplicação em gel nativo. Entretanto, não foi possível observar a formação de uma banda nos géis, apesar da tentativa com inúmeros tipos e concentrações de detergentes (ANEXO F). Talvez o uso do sistema heterólogo de importação (cloroplastos de ervilha, utilizando sequências protéicas de *Arabidopsis*) contribua para a observação da não interação em géis nativos. Um procedimento mais complexo, como o isolamento e importação em cloroplastos de *Arabidopsis* poderia responder tais dúvidas.

O mutantes *FtsH7* e *FtsH9* não apresentaram um fenótipo detectável (dados não mostrados). Possivelmente por apresentarem alta identidade, a falta de um elemento do par é compensada pelo outro. O cruzamento dos dois mutantes, visando obter o duplo mutante *FtsH7/FtsH9*, pode auxiliar na identificação da função de tais genes em *Arabidopsis*.

Com os dados obtidos nessa tese, pode-se observar que o par de proteínas FtsH7 e FtsH9 são direcionadas ao cloroplasto *in-vivo* (Figura 12) e *in-vitro* (Figura 13), sendo proteínas de membrana. Outros experimentos são necessários para a identificação da função e estrutura de tais componentes da família gênica das FtsH.

5.3 A proteína FIP e a interação com FtsH5

Em *E. coli*, o complexo FtsH é formado por um homo-hexâmero de proteínas FtsH, uma vez que há apenas um gene no genoma. O hexâmetro está localizado na membrana plasmática e se apresenta associado a um outro complexo protéico grande, de aproximadamente 1000 kDa, chamado HflKC. O complexo HflKC não é absolutamente necessário para a ação das FtsH, uma vez que diversos estudos *in-vitro* mostram a atividade protease de FtsH isolada. De fato, o complexo HflKC atua como um inibidor da atividade FtsH sobre SecY (KIHARA; AKIYAMA; ITO, 1996). A deleção de *hflK* ou *hflC* contribui para aumentar a proteólise de proteínas SecY mutadas (KIHARA; AKIYAMA; ITO, 1997).

Em cloroplastos, embora a estrutura do complexo hetero-hexâmero FtsH seja bem conhecida, o mecanismo de regulação do mesmo ainda é desconhecido. Dessa forma, a introdução da protease FtsH5 no sistema duplo-híbrido de leveduras apresentou-se como uma estratégia em potencial para a descoberta de possíveis fatores protéicos envolvidos e, conseqüentemente, um passo inicial para o entendimento do mecanismo regulatório de atividade proteásica FtsH em cloroplastos.

O rastreamento empregando o duplo-híbrido de levedura, utilizando como isca a protease FtsH5, resultou em $2,5 \times 10^5$ células transformadas, ou seja, uma quantidade de transformantes aproximadamente 12 vezes maior que o total de genes presentes em *Arabidopsis*, valor considerado suficiente para uma completa cobertura da biblioteca utilizada. O sequenciamento dos clones resultou na identificação de diversos cDNAs com funções diversas na biologia de *Arabidopsis*. Para a seleção dos candidatos em potencial procurou-se, inicialmente, descartar os genes cuja localização tenha sido confirmada experimentalmente e fosse diferente de uma localização plastidial. A co-localização intracelular de parceiros protéicos que interajam é uma premissa para a ocorrência de interação. Dentre as diversas proteínas plastidiais encontradas (Tabela 1), uma apresentou um grande potencial para a continuação dos estudos e foi denominada FIP (FtsH Interacting Protein).

A análise *in-silico* da proteína FIP mostrou que tal proteína pode ser dividida em três regiões distintas: um peptídeo de trânsito clivável N-terminal, uma região hidrofóbica para ancoramento na membrana e um domínio rico em cisteína C-terminal

(Figura 15). O domínio rico em cisteína é composto pela presença de dois motivos CXXCXGXG (onde X é qualquer aminoácido), sendo que tal motivo é característico de ligação ao zinco e está presente em proteínas DnaJ (SHI et al., 2005). Em proteínas DnaJ, o motivo CXXCXGXG está repetido quatro vezes, conferindo uma estrutura de “dedo de zinco”, formada por dois centros de ligação ao zinco. O primeiro centro de ligação é responsável pela atividade chaperona das DnaJ, enquanto o segundo centro atua principalmente na interação com o parceiro DnaK (TANG; WANG, 2001). As proteínas DnaK são chaperonas de 70 kDa que se ligam a regiões hidrofílicas de peptídeos não montados, proporcionando alteração de conformação, sendo a energia proveniente da hidrólise de ATP. O parceiro DnaJ de 40 kDa é também uma chaperona que atua na interação com a DnaK e propicia regulação da atividade, principalmente pela ligação do domínio J com a região ATPásica da DnaK (WALSH et al., 2004).

As proteínas FtsH5 e FIP mostraram interação no sistema duplo-híbrido de levedura. A interação se mostrou dependente de sequência presente na região exposta ao estroma da FtsH5, uma vez que não houve interação com a construção composta dos peptídeos sinal e de trânsito, cauda lumenal e âncora transmembrânica (Figura 17, Δ FtsH5), indicando que FIP pode desempenhar um papel na sequência da região ativa da FtsH5, ou seja, região que possui os domínios de protease e ATPásico. Também foi testada a interação com proteases do tipo B. Para tal, utilizou-se a sequência completa da FtsH2, não resultando em interação em levedura (Figura 17, FtsH2). Recentemente foi mostrado que a atividade proteásica em proteínas do tipo B é totalmente dispensável, embora sejam necessárias para montagem do complexo (ZHANG et al., 2010). A especificidade de FIP para interação com proteases do tipo A pode estar relacionada diretamente com a função que, no caso das proteases FtsH1 e FtsH5 (tipo A), atuam na proteólise dos substratos.

A interação de FIP e FtsH5 foi testada utilizando outros dois métodos. O experimento *GST-Pull Down* (Figura 23) permitiu a corroboração *in-vitro* da interação verificada em levedura, o que contribui para afastar a hipótese de um falso-negativo. Para o segundo método, baseado na interação *in-vivo*, foi utilizado a técnica BiFC (**B**imolecular **F**luorescence **C**omplementation), a qual se baseia na fusão de metades da proteína YFP com as respectivas presa e isca. Uma vez que tais substratos

interajam, a fluorescência da YFP é recomposta e pode-se observar, *in-vivo*, a localização subcelular da interação (WALTER et al., 2004). Os ensaios de BiFC utilizando as proteínas FtsH5 e FIP não foram conclusivos (dados não mostrados). A utilização de dois substratos de membrana, aliado à adição de sequências heterólogas às moléculas pode ter contribuído para a redução da interação. Novos ensaios deverão ser realizados.

FIP, assim como FtsH5, apresenta uma localização plastidial, inserida na membrana dos tilacóides. Os experimentos *in-vivo* utilizando a fusão com a proteína fluorescente GFP (Figura 18) permitiram observar claramente a localização plastidial, embora sem dados relacionados à localização intra-plastidial. Para tal, a importação *in-vitro* e posterior separação da fração membranosa permitiu a localização de FIP inserida na membrana dos tilacóides (Figura 19), fato corroborado pelo estudo de proteômica em tilacóides (PELTIER et al., 2004). Outro indício da associação FIP-FtsH5 veio de experimentos de importação *in-vitro* utilizando FIP radioativa, seguidos de eletroforese em géis nativos, mostrando que FIP está associada a um complexo de aproximadamente 440 kDa (Figura 20), que é o tamanho esperado para o complexo FtsH nos tilacóides (SAKAMOTO et al., 2003).

O papel de FIP ainda é incerto. Os dados sugerem que FIP possa regular de alguma forma a atividade FtsH em cloroplastos, através da regulação da atividade ATPásica ou proteásica que ocorre no complexo. Em *Xenopus*, está presente uma protease denominada ADAM, envolvida com modificação do comportamento celular através da alteração da superfície celular e matriz extracelular. ADAM pertence também à família das metaloproteases e, assim como FtsH5, é uma proteína de membrana. Diferentemente de FtsH5, proteases ADAM apresentam um domínio rico em cisteína, o qual atua de maneira intramolecular na regulação *in-vivo* do domínio de protease (SMITH et al., 2002). Outros experimentos são necessários e estão em andamento para tentar compreender o papel de FIP. Plantas mutantes *FIP* estão sendo analisadas, assim como plantas transgênicas que superexpressam o gene FIP estão sendo produzidas. Dessa forma espera-se com isso obter dados sobre o função do gene FIP e tentar entender a associação com as proteases FtsH.

6 CONCLUSÕES

- As proteases FtsH2 e FtsH5 são integradas às membranas dos tilacóides através de um mecanismo de duas etapas. Inicialmente há o processamento do peptídeo de trânsito por uma peptidase presente no estroma; Após a integração na membrana dos tilacóides, há um segundo processamento do peptídeo sinal por uma peptidase presente no lúmen dos tilacóides.
- As proteases FtsH2 e FtsH5 estão ancoradas na membrana por apenas um domínio hidrofóbico.
- A integração de FtsH2 é dependente do gradiente de prótons enquanto a integração da FtsH5 é dependente de NTPs e do transportador SecA.
- A integração de FtsH2 é concorrida com o precursor TAT OE23, enquanto a integração de FtsH5 é concorrida com o precursor Sec OE33.
- Anticorpo anti-Hcf106 inibe a integração de FtsH2 enquanto o anticorpo anti-SecY inibe a integração de FtsH5.
- As regiões N-terminal de FtsH2 e FtsH5 são suficientes para o direcionamento e integração à membrana dos tilacóides.
- A região madura da protease FtsH2 é incompatível com a via Sec.
- A cauda luminal, âncora transmembrânica e região exposta ao estroma da FtsH2 são necessárias para a incompatibilidade com a via Sec.
- As proteases FtsH7 e FtsH9 são proteínas direcionadas ao cloroplasto *in-vivo* e *in-vitro* e apresentam localização tanto no envelope quanto nas membranas dos tilacóides;

- A proteína FtsH5 interage em levedura e *in-vitro* com uma proteína hipotética denominada FIP (**F**tsH5 **I**nteracting **P**rotein).
- FIP apresenta um peptídeo de trânsito N-terminal clivável, seguido de uma região hidrofóbica e um domínio rico em cisteína na região C-terminal.
- FIP é direcionada *in-vivo* e *in-vitro* aos cloroplastos e está inserida na membrana dos tilacóides.
- Eletroforese em géis nativos mostram que FIP está associada a um complexo de aproximadamente 440 kDa, o tamanho esperado para o complexo FtsH nos tilacóides.
- O agrupamento e análises dos dados sugerem que FIP pode estar associada ao complexo FtsH nos tilacóides e, de alguma forma, regular a atividade de ATPásica e/ou proteásica do complexo.

REFERÊNCIAS

ADAM, Z.; RUDELLA, A.; VAN WIJK, K. J. Recent advances in the study of Clp, FtsH and other proteases located in chloroplasts. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, p. 234-240, 2006.

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

ALAMI, M.; LUKE, I.; DEITERMANN, S.; EISNER, G.; KOCH, H. G.; BRUNNER, J.; MULLER, M. Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in Escherichia coli. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 12, p. 937-946, 2003.

BERKS, B. C. A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 22, p. 393-404, 1996.

BERKS, B. C.; SARGENT, F.; PALMER, T. The Tat protein export pathway. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 35, p. 260-274, 2000.

BIENIOSSEK, C.; NIEDERHAUSER, B.; BAUMANN, U. M. The crystal structure of apo-FtsH reveals domain movements necessary for substrate unfolding and translocation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 51, p. 21579-21584, 2009.

BOGSCH, E.; BRINK, S.; ROBINSON, C. Pathway specificity for a delta pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a 'Sec-avoidance' motif in the transfer peptide and a 'Sec-incompatible' mature protein. **The EMBO Journal**, London, v. 16, p. 3851-3859, 1997.

BOLHUIS, A.; MATZEN, A.; HYYRYLAINEN, H. L.; KONTINEN, V. P.; MEIMA, R.; CHAPUIS, J.; VENEMA, G.; BRON, S.; FREUDL, R.; VAN DIJL, J. M. Signal peptide peptidase- and ClpP-like proteins of *Bacillus subtilis* required for efficient translocation and processing of secretory proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, p. 24585-24592, 1999.

BRINK, S.; FISCHER, K.; KLOSGEN, R. B.; FLUGGE, U. I. Sorting of nuclear-encoded chloroplast membrane proteins to the envelope and the thylakoid membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, p. 20808-20815, 1995.

CARLOS, J. L.; PAETZEL, M.; BRUBAKER, G.; KARLA, A.; ASHWELL, C. M.; LIVELY, M. O.; CAO, G.; BULLINGER, P.; DALBEY, R. E. The role of the membrane-spanning domain of type I signal peptidases in substrate cleavage site selection. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, p. 38813-38822, 2000.

CHADDOCK, A. M.; MANT, A.; KARNAUCHOV, I.; BRINK, S.; HERRMANN, R. G.; KLOSGEN, R. B.; ROBINSON, C. A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase. **The EMBO Journal**, London, v. 14, p. 2715-2722, 1995.

CHIEN, C. T.; BARTEL, P. L.; STERNGLANZ, R.; FIELDS, S. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, p. 9578-9582, 1991.

CLINE, K.; DABNEY-SMITH, C. Plastid protein import and sorting: different paths to the same compartments. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 11, p. 585-592, 2008.

CLINE, K.; ETTINGER, W. F.; THEG, S. M. Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes. Two luminal proteins are transported in the absence of ATP. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, p. 2688-2696, 1992.

CLINE, K.; MORI, H. Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 154, p. 719-729, 2001.

DALBEY, R. E.; CHEN, M. Sec-translocase mediated membrane protein biogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1694, p. 37-53, 2004.

DALBEY, R. E.; CHEN, M.; JIANG, F.; SAMUELSON, J. C. Understanding the insertion of transporters and other membrane proteins. **Current Opinion in Cell Biology**, Philadelphia, v. 12, p. 435-442, 2000.

DELISA, M. P.; TULLMAN, D.; GEORGIU, G. Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 6115-6120, 2003.

DING, Z.; CHRISTIE, P. J. *Agrobacterium tumefaciens* twin-arginine-dependent translocation is important for virulence, flagellation, and chemotaxis but not type IV secretion. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, p. 760-771, 2003.

DRIESSEN, A. J.; NOUWEN, N. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 77, p. 643-667, 2008.

DUBNAU, D. Binding and transport of transforming DNA by *Bacillus subtilis*: the role of type-IV pilin-like proteins--a review. **Gene**, Amsterdam, v. 192, p. 191-198, 1997.

FATH, M. J.; KOLTER, R. ABC transporters: bacterial exporters. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 57, p. 995-1017, 1993.

FERRO, M.; SALVI, D.; BRUGIERE, S.; MIRAS, S.; KOWALSKI, S.; LOUWAGIE, M.; GARIN, J.; JOYARD, J.; ROLLAND, N. Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. **Molecular and Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 2, p. 325-345, 2003.

GERARD, F.; CLINE, K. Efficient twin arginine translocation (Tat) pathway transport of a precursor protein covalently anchored to its initial cpTatC binding site. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 281, p. 6130-6135, 2006.

GERARD, F.; CLINE, K. The thylakoid proton gradient promotes an advanced stage of signal peptide binding deep within the Tat pathway receptor complex. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, p. 5263-5272, 2007.

GUTENSOHN, M.; FAN, E.; FRIELINGS DORF, S.; HANNER, P.; HOU, B.; HUST, B.; KLOSGEN, R. B. Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 163, p. 333-347, 2006.

HATZIXANTHIS, K.; PALMER, T.; SARGENT, F. A subset of bacterial inner membrane proteins integrated by the twin-arginine translocase. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 49, p. 1377-1390, 2003.

HENRY, R.; CARRIGAN, M.; MCCAFFREY, M.; MA, X.; CLINE, K. Targeting determinants and proposed evolutionary basis for the Sec and the Delta pH protein transport systems in chloroplast thylakoid membranes. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 136, p. 823-832, 1997.

HOMUTH, G.; MASUDA, S.; MOGK, A.; KOBAYASHI, Y.; SCHUMANN, W. The dnaK operon of *Bacillus subtilis* is heptacistronic. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 179, p. 1153-1164, 1997.

HULFORD, A.; HAZELL, L.; MOULD, R. M.; ROBINSON, C. Two distinct mechanisms for the translocation of proteins across the thylakoid membrane, one requiring the presence of a stromal protein factor and nucleotide triphosphates. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, p. 3251-3256, 1994.

HYNDS, P. J.; ROBINSON, D.; ROBINSON, C. The sec-independent twin-arginine translocation system can transport both tightly folded and malformed proteins across the thylakoid membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, p. 34868-34874, 1998.

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

IZE, B.; STANLEY, N. R.; BUCHANAN, G.; PALMER, T. Role of the *Escherichia coli* Tat pathway in outer membrane integrity. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 48, p. 1183-1193, 2003.

JONGBLOED, J. D.; ANTELMANN, H.; HECKER, M.; NIJLAND, R.; BRON, S.; AIRAKSINEN, U.; PRIES, F.; QUAX, W. J.; VAN DIJL, J. M.; BRAUN, P. G. Selective contribution of the twin-arginine translocation pathway to protein secretion in *Bacillus subtilis*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, p. 44068-44078, 2002.

JONGBLOED, J. D.; GRIEGER, U.; ANTELMANN, H.; HECKER, M.; NIJLAND, R.; BRON, S.; VAN DIJL, J. M. Two minimal Tat translocases in *Bacillus*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 54, p. 1319-1325, 2004.

JONGBLOED, J. D.; MARTIN, U.; ANTELMANN, H.; HECKER, M.; TJALSMA, H.; VENEMA, G.; BRON, S.; VAN DIJL, J. M.; MULLER, J. TatC is a specificity determinant for protein secretion via the twin-arginine translocation pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, p. 41350-41357, 2000.

KARIMI, M.; INZE, D.; DEPICKER, A. GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, p. 193-195, 2002.

KARNAUCHOV, I.; HERRMANN, R. G.; KLOSGEN, R. B. Transmembrane topology of the Rieske Fe/S protein of the cytochrome b6/f complex from spinach chloroplasts. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 408, p. 206-210, 1997.

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

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

KLEIN, C.; KALETTA, C.; SCHNELL, N.; ENTIAN, K. D. Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 132-142, 1992.

KNIGHT, J. S.; GRAY, J. C. The N-terminal hydrophobic region of the mature phosphate translocator is sufficient for targeting to the chloroplast inner envelope membrane. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 1421-1432, 1995.

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

LAILER, V.; CHADDOCK, A. M.; KNOTT, T. G.; WALKER, D.; ROBINSON, C. A SecY homolog in *Arabidopsis thaliana*. Sequence of a full-length cDNA clone and import of the precursor protein into chloroplasts. **The Journal of Biological Chemistry**, Washington, v. 270, p. 17664-17667, 1995.

LANGER, T. AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. **Trends in Biochemical Sciences.**, Cambridge, v. 25, p. 247-251, 2000.

LI, W.; ZHOU, X.; LU, P. Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. **Research in Microbiology**, Paris, v. 155, p. 605-610, 2004.

LINDAHL, M.; SPETEA, C.; HUNDAL, T.; OPPENHEIM, A. B.; ADAM, Z.; ANDERSSON, B. The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 419-431, 2000.

MA, X.; CLINE, K. Multiple precursor proteins bind individual Tat receptor complexes and are collectively transported. **The EMBO Journal**, London, v. 29, p. 1477-1488, 2010.

MALDONADO, B.; KNEUPER, H.; BUCHANAN, G.; HATZIXANTHIS, K.; SARGENT, F.; BERKS, B. C.; PALMER, T. Characterisation of the membrane-extrinsic domain of the TatB component of the twin arginine protein translocase. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 585, p. 478-484, 2011.

MANN, N. H.; NOVAC, N.; MULLINEAUX, C. W.; NEWMAN, J.; BAILEY, S.; ROBINSON, C. Involvement of an FtsH homologue in the assembly of functional photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 479, p. 72-77, 2000.

MANT, A.; SCHMIDT, I.; HERRMANN, R. G.; ROBINSON, C.; KLOSGEN, R. B. Sec-dependent thylakoid protein translocation. Delta pH requirement is dictated by passenger protein and ATP concentration. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, p. 23275-23281, 1995.

MARQUES, J. P.; SCHATTAT, M. H.; HAUSE, G.; DUDECK, I.; KLOSGEN, R. B. In vivo transport of folded EGFP by the DeltapH/TAT-dependent pathway in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. **The Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 1697-1706, 2004.

MCAULIFFE, O.; ROSS, R. P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS microbiology reviews**, Oxford, v. 25, p. 285-308, 2001.

MENAND, B.; MARECHAL-DROUARD, L.; SAKAMOTO, W.; DIETRICH, A.; WINTZ, H. A single gene of chloroplast origin codes for mitochondrial and chloroplastic methionyl-tRNA synthetase in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 11014-11019, 1998.

MIRAS, S.; SALVI, D.; FERRO, M.; GRUNWALD, D.; GARIN, J.; JOYARD, J.; ROLLAND, N. Non-canonical transit peptide for import into the chloroplast. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, p. 47770-47778, 2002.

MOLIK, S.; KARNAUCHOV, I.; WEIDLICH, C.; HERRMANN, R. G.; KLOSGEN, R. B. The Rieske Fe/S protein of the cytochrome b6/f complex in chloroplasts: missing link in the evolution of protein transport pathways in chloroplasts? **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, p. 42761-42766, 2001.

MOORE, M.; GOFORTH, R. L.; MORI, H.; HENRY, R. Functional interaction of chloroplast SRP/FtsY with the ALB3 translocase in thylakoids: substrate not required. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 162, p. 1245-1254, 2003.

MORI, H.; CLINE, K. A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid [Delta]pH/Tat translocase. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 157, p. 205-210, 2002.

MORI, H.; ITO, K. The Sec protein-translocation pathway. **Trends in Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 494-500, 2001.

NADA, A.; SOLL, J. Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. **The Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 117, p. 3975-3982, 2004.

NAKAI, M.; GOTO, A.; NOHARA, T.; SUGITA, D.; ENDO, T. Identification of the SecA protein homolog in pea chloroplasts and its possible involvement in thylakoidal protein transport. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, p. 31338-31341, 1994.

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

OCHSNER, U. A.; SNYDER, A.; VASIL, A. I.; VASIL, M. L. Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, p. 8312-8317, 2002.

OSBORNE, A. R.; RAPOPORT, T. A.; VAN DEN BERG, B. Protein translocation by the Sec61/SecY channel. **Annual Review of Cell Biology** Palo Alto, v. 21, p. 529-550, 2005.

PASCH, J. C.; NICKELSEN, J.; SCHUNEMANN, D. The yeast split-ubiquitin system to study chloroplast membrane protein interactions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 69, p. 440-447, 2005.

PELTIER, J. B.; YTTERBERG, A. J.; SUN, Q.; VAN WIJK, K. J. New functions of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, p. 49367-49383, 2004.

PORCELLI, I.; DE LEEUW, E.; WALLIS, R.; VAN DEN BRINK-VAN DER LAAN, E.; DE KRUIJFF, B.; WALLACE, B. A.; PALMER, T.; BERKS, B. C. Characterization and membrane assembly of the TatA component of the *Escherichia coli* twin-arginine protein transport system. **Biochemistry**, Washington, v. 41, p. 13690-13697, 2002.

QUENTIN, Y.; FICHANT, G.; DENIZOT, F. Inventory, assembly and analysis of *Bacillus subtilis* ABC transport systems. **Journal of Molecular Biology**, Cambridge, v. 287, p. 467-484, 1999.

RICHTER, C. V.; BALS, T.; SCHUNEMANN, D. Component interactions, regulation and mechanisms of chloroplast signal recognition particle-dependent protein transport. **European Journal of Cell Biology**, Berlin, v. 89, p. 965-973, 2010.

RICHTER, S.; LINDENSTRAUSS, U.; LUCKE, C.; BAYLISS, R.; BRUSER, T. Functional Tat transport of unstructured, small, hydrophilic proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, p. 33257-33264, 2007.

ROBINSON, C.; CAI, D.; HULFORD, A.; BROCK, I. W.; MICHL, D.; HAZELL, L.; SCHMIDT, I.; HERRMANN, R. G.; KLOSGEN, R. B. The presequence of a chimeric construct dictates which of two mechanisms are utilized for translocation across the thylakoid membrane: evidence for the existence of two distinct translocation systems. **The EMBO Journal**, London, v. 13, p. 279-285, 1994.

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

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

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

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

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

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

SARGENT, F.; GOHLKE, U.; DE LEEUW, E.; STANLEY, N. R.; PALMER, T.; SAIBIL, H. R.; BERKS, B. C. Purified components of the Escherichia coli Tat protein transport system form a double-layered ring structure. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 268, p. 3361-3367, 2001.

SCHLEIFF, E.; KLOSGEN, R. B. Without a little help from 'my' friends: direct insertion of proteins into chloroplast membranes? **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1541, p. 22-33, 2001.

SCHUENEMANN, D.; AMIN, P.; HARTMANN, E.; HOFFMAN, N. E. Chloroplast SecY is complexed to SecE and involved in the translocation of the 33-kDa but not the 23-kDa subunit of the oxygen-evolving complex. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, p. 12177-12182, 1999.

SCHUNEMANN, D. Structure and function of the chloroplast signal recognition particle. **Current genetics**, New York, v. 44, p. 295-304, 2004.

SETTLES, A. M.; YONETANI, A.; BARON, A.; BUSH, D. R.; CLINE, K.; MARTIENSSEN, R. Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. **Science**, Washington, v. 278, p. 1467-1470, 1997.

SHACKLETON, J. B.; ROBINSON, C. Transport of proteins into chloroplasts. The thylakoidal processing peptidase is a signal-type peptidase with stringent substrate requirements at the -3 and -1 positions. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, p. 12152-12156, 1991.

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

SILVA, P.; THOMPSON, E.; BAILEY, S.; KRUSE, O.; MULLINEAUX, C. W.; ROBINSON, C.; MANN, N. H.; NIXON, P. J. FtsH is involved in the early stages of repair of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 2152-2164, 2003.

SIMONEN, M.; PALVA, I. Protein secretion in *Bacillus* species. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 57, p. 109-137, 1993.

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

SKALITZKY, C. A.; MARTIN, J. R.; HARWOOD, J. H.; BEIRNE, J. J.; ADAMCZYK, B. J.; HECK, G. R.; CLINE, K.; FERNANDEZ, D. E. Plastids contain a second sec translocase system with essential functions. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 155, p. 354-369, 2011.

SMITH, K. M.; GAULTIER, A.; COUSIN, H.; ALFANDARI, D.; WHITE, J. M.; DESIMONE, D. W. The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function in vivo. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 159, p. 893-902, 2002.

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

STANLEY, N. R.; PALMER, T.; BERKS, B. C. The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, p. 11591-11596, 2000.

SUMMER, E. J.; MORI, H.; SETTLES, A. M.; CLINE, K. The thylakoid delta pH-dependent pathway machinery facilitates RR-independent N-tail protein integration. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, p. 23483-23490, 2000.

TANG, W.; WANG, C. C. Zinc fingers and thiol-disulfide oxidoreductase activities of chaperone DnaJ. **Biochemistry**, Washington, v. 40, p. 14985-14994, 2001.

TATSUTA, T.; LANGER, T. AAA proteases in mitochondria: diverse functions of membrane-bound proteolytic machines. **Research in Microbiology**, Paris, v. 160, p. 711-717, 2009.

TJALSMA, H.; ANTELMANN, H.; JONGBLOED, J. D.; BRAUN, P. G.; DARMON, E.; DORENBOS, R.; DUBOIS, J. Y.; WESTERS, H.; ZANEN, G.; QUAX, W. J.; KUIPERS, O. P.; BRON, S.; HECKER, M.; VAN DIJL, J. M. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 68, p. 207-233, 2004.

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

TOMOYASU, T.; YUKI, T.; MORIMURA, S.; MORI, H.; YAMANAKA, K.; NIKI, H.; HIRAGA, S.; OGURA, T. The *Escherichia coli* FtsH protein is a prokaryotic member of a protein family of putative ATPases involved in membrane functions, cell cycle control, and gene expression. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 175, p. 1344-1351, 1993.

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

VAN ENGELEN, F. A.; MOLTHOFF, J. W.; CONNER, A. J.; NAP, J. P.; PEREIRA, A.; STIEKEMA, W. J. pBINPLUS: an improved plant transformation vector based on pBIN19. **Transgenic Research**, London, v. 4, p. 288-290, 1995.

VAN ROOSMALEN, M. L.; GEUKENS, N.; JONGBLOED, J. D.; TJALSMA, H.; DUBOIS, J. Y.; BRON, S.; VAN DIJL, J. M.; ANNE, J. Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1694, p. 279-297, 2004.

VAN WELY, K. H.; SWAVING, J.; FREUDL, R.; DRIESSEN, A. J. Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 25, p. 437-454, 2001.

VON HEIJNE, G.; STEPPUHN, J.; HERRMANN, R. G. Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 180, p. 535-545, 1989.

WALKER, M. B.; ROY, L. M.; COLEMAN, E.; VOELKER, R.; BARKAN, A. The maize *tha4* gene functions in sec-independent protein transport in chloroplasts and is related to *hcf106*, *tatA*, and *tatB*. **The Journal of Cell Biology**, Washington, v. 147, p. 267-276, 1999.

WALSH, P.; BURSAC, D.; LAW, Y. C.; CYR, D.; LITHGOW, T. The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. **EMBO Reports**, London, v. 5, p. 567-571, 2004.

WALTER, M.; CHABAN, C.; SCHUTZE, K.; BATISTIC, O.; WECKERMANN, K.; NAKE, C.; BLAZEVIC, D.; GREFEN, C.; SCHUMACHER, K.; OECKING, C.; HARTER, K.; KUDLA, J. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. **Plant Journal**, Oxford, v. 40, p. 428-438, 2004.

WOOLHEAD, C. A.; THOMPSON, S. J.; MOORE, M.; TISSIER, C.; MANT, A.; RODGER, A.; HENRY, R.; ROBINSON, C. Distinct Albino3-dependent and -independent pathways for thylakoid membrane protein insertion. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, p. 40841-40846, 2001.

YAMANE, K.; BUNAI, K.; KAKESHITA, H. Protein traffic for secretion and related machinery of *Bacillus subtilis*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 68, p. 2007-2023, 2004.

YANG, M. J.; PANG, X. Q.; ZHANG, X.; HAN, K. L. Molecular dynamics simulation reveals preorganization of the chloroplast FtsY towards complex formation induced by GTP binding. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 173, p. 57-66, 2011.

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

YU, F.; PARK, S.; RODERMEL, S. R. Functional redundancy of AtFtsH metalloproteases in thylakoid membrane complexes. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 138, p. 1957-1966, 2005.

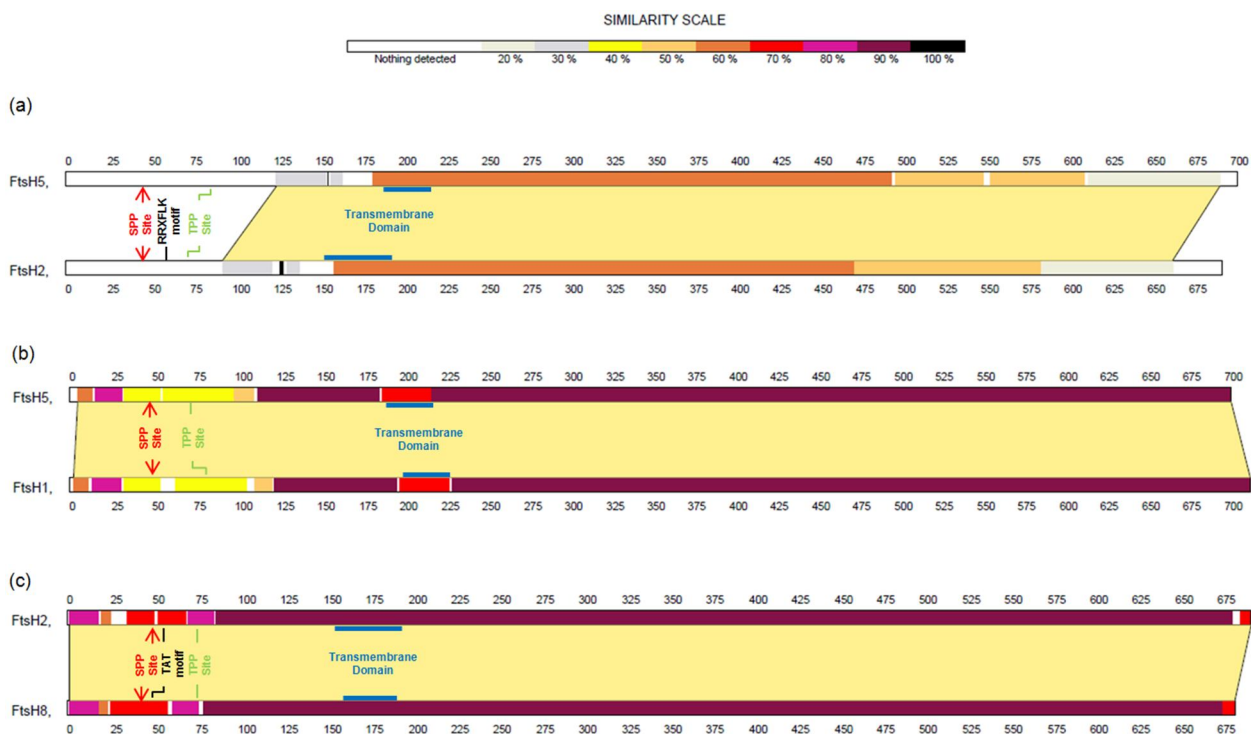
YUAN, J.; CLINE, K. Plastocyanin and the 33-kDa subunit of the oxygen-evolving complex are transported into thylakoids with similar requirements as predicted from pathway specificity. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, p. 18463-18467, 1994.

ZALTSMAN, A.; ORI, N.; ADAM, Z. Two types of FtsH protease subunits are required for chloroplast biogenesis and Photosystem II repair in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 2782-2790, 2005.

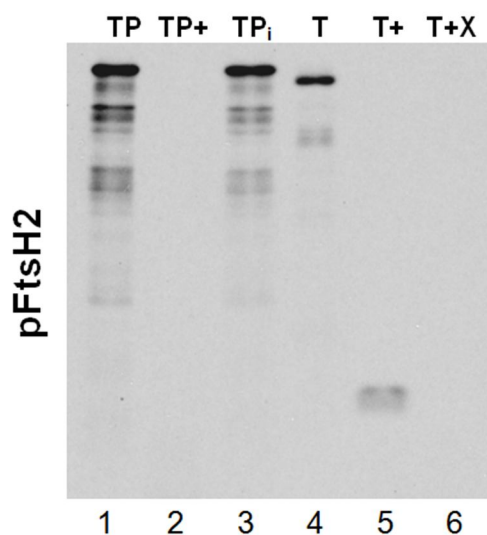
ZHANG, D.; KATO, Y.; ZHANG, L.; FUJIMOTO, M.; TSUTSUMI, N.; SODMERGEN; SAKAMOTO, W. The FtsH protease heterocomplex in arabidopsis: dispensability of type-B protease activity for proper chloroplast development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 3710-3725, 2010.

ANEXOS

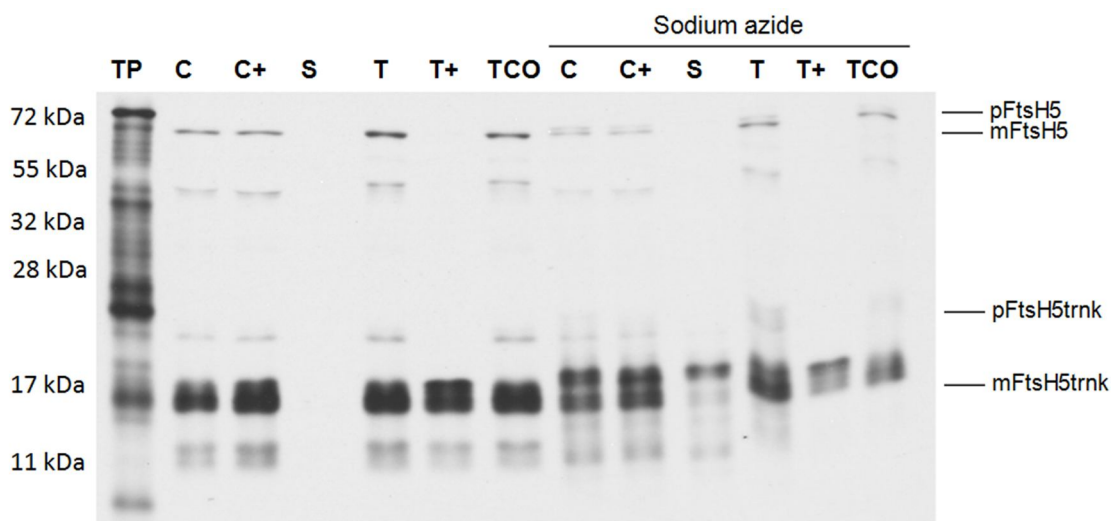
ANEXO A - Alinhamento de seqüência de proteínas FtsH. (a) Alinhamento entre FtsH2 e FtsH5; (b) Alinhamento entre FtsH5 e FtsH1 (tipo A); (c) Alinhamento entre FtsH2 e FtsH8 (tipo B). Os alinhamentos binários foram obtidos usando SIM e LALN VIEW (<http://www.expasy.ch/tools/sim-prot.html>)



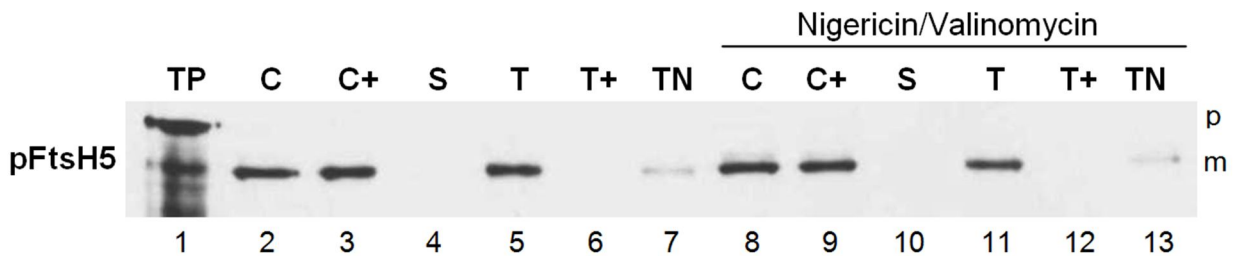
ANEXO B - pFtsH2 é completamente degradada por termolisina sem a proteção do tilacóide. O precursor traduzido *in-vitro* foi diluído com um volume de 60 mM leucina em 2X IB. Uma alíquota do precursor foi usada para um ensaio de transporte em tilacóides utilizando lisado de cloroplastos. O precursor restante foi diluído 3 vezes com IB e 25 μ l foram incubados a 4 °C sem (TP, coluna 1) ou com 20 μ g de termolisina por 60 minutos (TP+, coluna 2). A proteólise foi terminada com 5 μ l de 500 mM EDTA e as amostras foram desnaturadas com um volume igual de tampão 2X SDS a 100 °C por 4 minutos. Como controle para a proteólise durante desnaturação, uma alíquota não tratada recebeu 20 μ g de termolisina inibida com EDTA imediatamente antes da desnaturação com SDS (TPi, coluna 3). Os tilacóides do ensaio de transporte foram ressuspensos em três alíquotas de 25 μ l em IB e não foram tratadas (T, coluna 4), tratadas com 20 μ g de termolisina (T+, coluna 5) ou tratadas com termolisina em presença de 1% de Triton X-100 por 60 minutos a 4 °C (T+X, coluna 6). A proteólise foi terminada, as amostras desnaturadas e analisadas por SDS-PAGE em géis de 12,5% e fluorografia



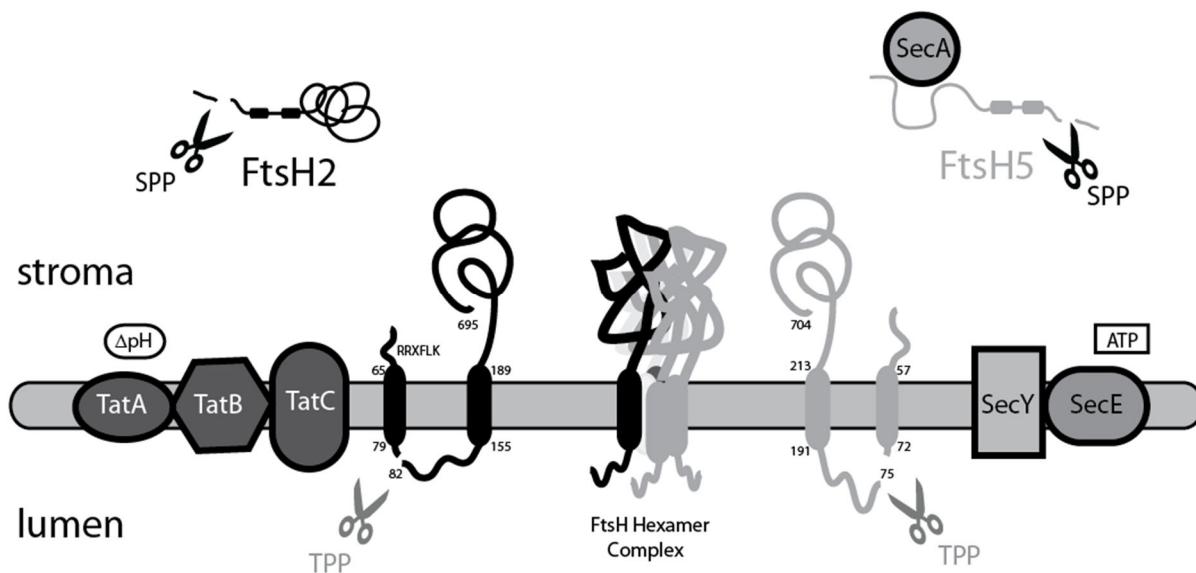
ANEXO C - A tradução *in-vitro* do RNA pFtsH5 produz um precursor truncado além da pFtsH5 completa. pFtsH5 traduzida *in-vitro* (tp) resultou na pFtsH5 de cadeia completa (75-kDa) e uma banda de aproximadamente 25-kDa. Após incubação com cloroplastos intactos de ervilha, em uma reação contendo 5 mM ATP e luz a 25 °C por 20 minutos, é possível detectar produtos processados correspondendo a proteína FtsH5 a 67-kDa e uma banda menor de 17-kDa. O produto de 17-kDa se comportou similarmente a FtsH5 com relação a sua localização nos tilacóides e acumulação como uma banda maior em amostras tratadas com azida sódica. Na figura, os produtos de tradução foram importados em cloroplastos na ausência e presença de 10 mM de azida sódica. Cloroplastos intactos foram recuperados (C, colunas 2 e 8) e tratados com termolisina (C+, colunas 3 e 9). Cloroplastos intactos não tratados foram fracionados em estroma (S, colunas 4 e 10) e tilacóides. Alíquotas de tilacóides foram lavadas com tampão de importação (T, colunas 5 e 11), submetidos a tratamento com termolisina (T+, colunas 6 e 12) ou tratados com 200 mM Na₂CO₃ (TCO, colunas 7 e 13). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE e fluorografia em gel de 12,5%



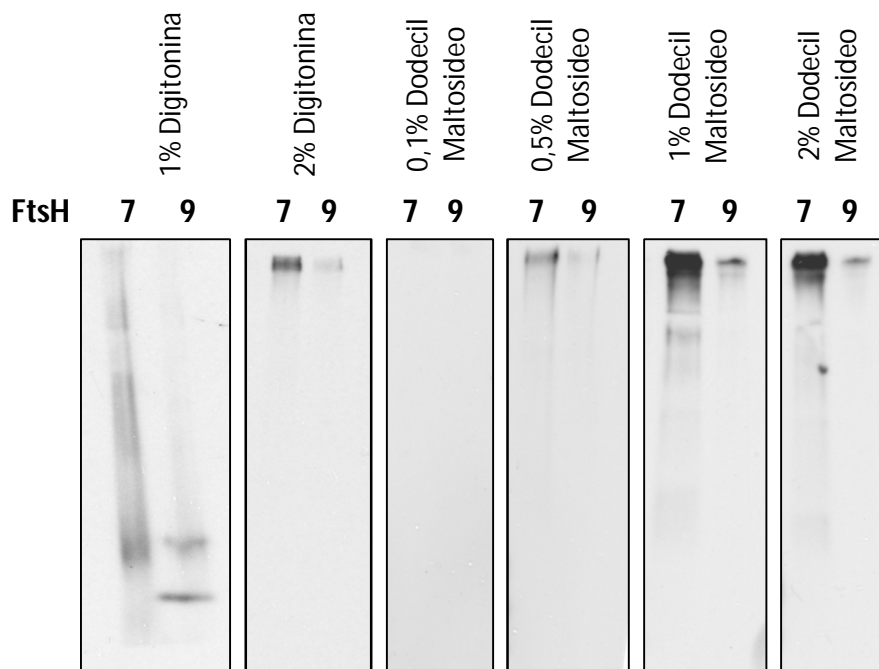
ANEXO D - A integração aos tilacóides de pFtsH5 não é afetada pelos ionóforos nigericina/valinomicina. O substrato radioativo pFtsH5 (coluna 1, TP) foi incubado com cloroplastos intactos isolados de ervilha em uma reação contendo 5 mM ATP e $\sim 100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{-s}$ de luz a 25°C por 20 minutos, na ausência ou presença de nigericina e valinomicina. Cloroplastos intactos foram recuperados da reação (C, colunas 2 e 8) e tratados com termolisina (C+, colunas 3 e 9). Cloroplastos intactos não tratados foram fracionados em estroma (S, colunas 4 e 10) e tilacóides. Alíquotas de tilacóides foram lavados em tampão de importação (T, colunas 5 e 11), tratados com termolisina (T+, colunas 6 e 12) ou tratados com 100 mM NaOH (TN colunas 7 e 13). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE em gel de 7,5% e fluorografia



ANEXO E - Modelo e topologia para a integração das subunidades FtsH2 e FtsH5. FtsH2 e FtsH5 são sintetizadas e apresentam dois domínios hidrofóbicos, representados pelas regiões espessas. FtsH2, após o primeiro processamento, é translocada para a membrana dos tilacóides pela via TAT; FtsH5 é transportada pela via Sec. Após o segundo processamento, em ambas proteínas encontra-se apenas um domínio hidrofóbico (âncora transmembrânica). Os números indicam os respectivos aminoácidos da seqüência. SPP: Peptidase estromal; TPP: Peptidase tilacoidal



ANEXO F - Eletroforese em géis nativos. Os substratos radioativos pFtsH7 e pFtsH9 foram incubados com cloroplastos intactos isolados de ervilha em uma reação contendo 5 mM ATP e $\sim 100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{-s}$ de luz a 25 °C por 20 minutos. Os cloroplastos foram lisados e a fração membranosa foi solubilizada com diferentes detergentes e concentrações, como mostrado na figura. As amostras foram analisadas por fluorografia



ANEXO G - Alinhamento de sequência das proteínas FtsH7 e FtsH9. Os alinhamentos binários foram obtidos usando SIM e LALN VIEW (<http://www.expasy.ch/tools/sim-prot.html>).

