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

**Localização e tráfego intracelular do peptídeo AtRALF1 e a importância da
endocitose como um mecanismo regulador da sua sinalização e atividade
biológica**

Juan Carlos Guerrero Abad

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

**Piracicaba
2016**

Juan Carlos Guerrero Abad
Engenheiro Agrônomo

**Localização e tráfego intracelular do peptídeo AtRALF1 e a importância da endocitose
como um mecanismo regulador da sua sinalização e atividade biológica**

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

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

Piracicaba
2016

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

Guerrero Abad, Juan Carlos

Localização e tráfego intracelular do peptídeo AtRALF1 e a importância da endocitose como um mecanismo regulador da sua sinalização e atividade biológica / Juan Carlos Guerrero Abad. - Piracicaba, 2016.

115 p. : il.

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

1. RALF 2. Tráfego intracelular 3. Endocitose 4. Clatrina I. Título

CDD 581.19256
G934L

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

DEDICATORIA

*De coração e infinito agradecimento
aos meus pais, pela grande motivação
e coragem do dia a dia.*

AGRADECIMENTO

De forma especial ao Prof. Dr. Daniel Scherer de Moura, pela amizade, confiança, orientação, ensinamento e crescimento profissional durante esta longa jornada;

Ao Prof. Dr. Marcio de Castro Silva-Filho, pela disponibilização do seu laboratório de Genética Molecular de Plantas;

À Prof^a. Dr. Helaine Carrer, pela disponibilização do seu laboratório de Genômica Funcional;

Ao Prof. Dr. Jiri Friml, pela amizade, orientação e grande ajuda durante o meu Doutorado *Sandwich* no *Institute of Science and Technology (IST-Austria)*;

À Prof^a. Dr. Eva Benkova, pela amizade e disponibilização do seu laboratório no *Institute of Science and Technology (IST-Austria)*;

Ao Prof. Jianwei Pana, por ceder gentilmente às sementes *clc2-lxclc3-1*;

Ao grande Antônio Amaral pela grande amizade, conselhos e assistência técnica no Laboratório de Bioquímica de Proteínas;

A CAPES pela bolsa concedida temporalmente durante o desenvolvimento do meu doutorado;

Ao Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (FONDECYT) – Perú, pela bolsa concedida temporalmente durante o meu doutorado;

A minha grande companheira Guadalupe Ximena pelo grande carinho, compreensão, apoio, amizade e amor;

Aos meus amigos (as) conquistados no *Institute of Science and Technology (IST-Austria)* Saiko Yoshida, Gergely Molnar, Maciej Adamowski, Matyas Fendrych, Alexandra Mally, Madhumita Narasimham, Tomas Prat, Yuliya Salanenka, Huibin Han, Shutang Tan, Petr Valosek, Daniel Von Wangenheim, Andrej Hurny, Krisztina Ötvös, Juan Carlos Montesinos e Nicola Cavallari, para todos eles muito obrigado pelas discussões sobre ciência;

A comunidade peruana na Áustria Liset Chávez, Katiuska, Bruno Moreno, Alcides Benavente, Betty, Marilu Rios, Diana, Angie Rios, Lily Guevara e Vanessa Sotelo pelos gratos momentos durante minha estância em Viena;

Aos meus amigos (as) conquistados durante meu doutorado na Escolha Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Flavio, Natalie Rondinel, Victor Galvez, Victor Manuel, Thony Arce, Jose Carlos, Juanchi Molina; Evangelina Miqueo, Marco Arizapana, Alejandro Venegas, Carla Sandoval, Pablo Fresia, Carlos Amaral;

Ao grande companheiro e amigo das corridas na ESALQ e competições Guilherme Hossaka;

À família Silva Ferreira pelo acolhimento desinteressado em Brasília-DF, especialmente para a senhora Marília Magdelene, José Maurício Ferreira e Geraldo Silva;

A dois grandes amigos que conheci durante esta travessia Wellington Campos, Enéas Konzen pela sinceridade e lealdade;

De especial agradecimento ao grupo de Bioquímica de Proteínas pelo companheirismo, crítica científica e grande amizade conquistada e prevalecida durante quatro anos Tábata Bergonci, Keini Dressano, Akemi Niitsu, Marina Soriano, Bianca Ribeiro, Fausto Andrés “El Bárbaro”, Paulo Ceciliato, Lucas Claus e a nova equipe Aparecida Leonir, Perla Oliveira, Fernando García, Larissa Helena e Ana Carolina;

Aos grupos de genética molecular de plantas e genômica funcional Fátima de Martin, André Barbosa, Esteban Galeano, Aline Borges, Ana Paula Jacobus, Jeferson Gross, Enio, Tânia Batista, Thais Paula, Larissa Spoladore e Karina Lopes, para todos eles muito obrigado;

Por fim a minha família María Luisa Abad, Cresencio Guerrero, María Nerida, Gladys Anamelba, Roger Arbildo e Alexander,

“Para o espírito científico qualquer conhecimento é uma resposta a uma pergunta. Se não tem pergunta não pode ter conhecimento científico. Nada se dá tudo se constrói”

(G. Bachelard)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Peptídeos hormonais em plantas.....	19
2.2 Peptídeo hormonal RALF.....	23
2.3 Endocitose em plantas	26
2.4 Inibidores de endocitose em plantas	28
2.5 Internalização de proteínas cargo induzidas por ligantes	29
2.6 Internalização de ligantes	30
2.7 Regulação da endocitose por sinalização	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Material vegetal e condições de crescimento	33
3.2 Construção de plasmídeos	34
3.3 Geração de transgênicos	36
3.4 Análise de expressão por RT-PCR semi-quantitativo	37
3.5 Expressão heteróloga do peptídeo recombinante AtRALF1 (HISAtRALF1).....	38
3.6 Tratamento com inibidores de endocitosis	40
3.7 Preparação de células eletrocompetentes de <i>E. coli</i> Top 10.....	40
3.8 Preparação de células eletrocompetentes de <i>Agrobacterium</i> GV3101.....	41
3.9 Eletroporação de células de <i>E. coli</i> e <i>A. tumefaciens</i>	41
3.10 Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	42
3.11 Confirmação de mutantes SALK.....	42
3.12 Hibridação	42
3.13 Imunodeteção por gel de proteína.....	43
3.14 Experimentos de imunolocalização	43
3.15 Formação e medições dos corpos de brefeldina (BFA).....	44
3.16 Ensaios de alcalinização em células em suspensão	44
3.17 Ensaios de alcalinização em células de raízes	45

3.18 Densidade de LRP.....	45
3.19 Experimentos histoquímico da proteína reporter GUS	45
3.20 Ensaio de inibição do crescimento da raiz primária.....	46
3.21 Microscopia confocal	46
3.22 Quantificação da intensidade interna da Cy3 e GUS	46
3.23 Análise estatística.....	47
4 RESULTADOS.....	49
4.1 O gene <i>AtRALF1</i> fusionado a GFP, sob o controle do promotor endógeno é expresso em células diferenciadas da endoderme de raízes	49
4.2 A formação do primórdio de raiz lateral afeta a expressão de <i>AtRALF1</i>	51
4.3 Tráfego intracelular do peptídeo AtRALF1	53
4.4 AtRALF1 é internalizado.....	59
4.5 A internalização do peptídeo AtRALF1 é mediado por clatrina	62
4.6 <i>CLATHRIN LIGHT CHAIN 2</i> (CLC2) e <i>CLATHRIN LIGHT CHAIN 3</i> (CLC3) são essenciais para a inibição do crescimento da raiz e redução da densidade de primórdios de raiz lateral causados pelo peptídeo AtRALF1	65
4.7 Os genes <i>CLC1</i> , <i>CLC2</i> e <i>CLC3</i> são induzidos pelo peptídeo AtRALF1	70
4.8 A indução gênica causada pelo peptídeo AtRALF1 é dependente da maquinaria de endocitose mediada por clatrina.....	70
4.9 A resposta de alcalinização causada pelo peptídeo AtRALF1 é independente da maquinaria de endocitose mediada por clatrina.....	74
5 DISCUSSÃO	79
6 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXOS	105

RESUMO

Localização e tráfego intracelular do peptídeo AtRALF1 e a importância da endocitose como um mecanismo regulador da sua sinalização e atividade biológica

RALF é um peptídeo hormonal de aproximadamente 5kDa presente em diferentes espécies do reino vegetal regulando negativamente a expansão celular. AtRALF1 é uma isoforma específica de raiz das 37 presentes em *Arabidopsis thaliana* que regula negativamente o crescimento de raízes seguido de uma mobilização de Ca^{+2} intracelular e inibição na secreção de prótons (H^+). Neste trabalho foi caracterizado a localização e tráfego intracelular do peptídeo AtRALF1. A análise do promotor AtRALF1 mostra que a sua expressão é restrita a raiz e hipocótilo. Em raízes, particularmente, a localização está entre a região de diferenciação e alongação, mostrando-se específica para as células da endoderme. Uma expressão que é alterada nos locais específicos onde o primórdio da raiz lateral é formado. O peptídeo AtRALF1 apresenta uma secreção padrão ER-Golgi, passando pelos compartimentos do retículo endoplasmático, complexo de Golgi, post-Golgi/endossomos, endossomos de reciclagem, endossomos tardios, vacúolo e parede celular. Também foi mostrado que o peptídeo é internalizado e esta internalização é interrompida quando as proteínas do complexo AP2 e clatrin são perturbadas. A perturbação da maquinaria de endocitose mediada por clatrina afeta consideravelmente a indução dos genes *AtPRP3*, *AtHRGP2* e *AtCML38* alterados por AtRALF1, porém sem efeito na alcalinização extracelular. O duplo mutante deficiente nas proteínas AtCLC2 e AtCLC3 (*clc2-1xclc3-1*) mostrou-se insensível ao peptídeo AtRALF1 quanto a inibição do crescimento da raiz primária e a redução na densidade de primórdios de raiz lateral. Plantas transgênicas super-expressando o gene *AtRALF1* (p35S:AtRALF1) quando cruzadas com o duplo mutante *clc2-1xclc3-1*, produziram progênies F3 com fenótipo normal. A adição exógena do peptídeo AtRALF1 em raízes de plantas selvagens induz os transcritos dos genes *CLC1*, *CLC2* e *CLC3*. Os resultados deste trabalho mostram que o gene *AtRALF1* é expresso nas células da endoderme de raízes e que o peptídeo AtRALF1 é secretado pela via padrão ER-Golgi. A internalização do peptídeo é essencial para sua sinalização gênica e a maquinaria de endocitose mediada por clatrina é essencial na resposta fisiológica do peptídeo AtRALF1.

Palavras-chave: RALF; Tráfego intracelular; Endocitose; Clatrina

ABSTRACT

Localization and intracellular trafficking of AtRALF1 peptide and the importance of the endocytosis as a mechanism regulator for its signaling and biological activity

RALF is a 5kDa peptide hormone ubiquitous in different species of the plant kingdom that regulates cell expansion. AtRALF1 is a root-specific isoform of 37 present in *Arabidopsis thaliana* that negatively regulates root growth by intracellular calcium mobilization and inhibition of proton secretion (H^+). In this work was studied the localization and intracellular trafficking of the AtRALF1 peptide. Analysis of the AtRALF1 promoter shows that its expression is restricted to root and hypocotyl. In roots, AtRALF1 is localized in the elongation and differentiation zone, restricted to endodermal cells. Its specificity is altered when the lateral root primordium is initiated. We show that AtRALF1 peptide have a conventional secretion pathway ER-Golgi, through endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, post-Golgi/endosomes, recycling endosomes, late endosomes, vacuole and cell wall. Also, AtRALF1 peptide is rapid internalized in root cells and its internalization is inhibited when the AP2 complex and clathrin proteins are disturbed. Disturbance of clathrin-mediated endocytosis machinery affects considerably the AtRALF1-inducible genes *AtPRP3*, *AtHRGP2* and *AtCML38* respectively, but the extracellular alkalinization is not affected. The double mutant of two clathrin light chain *clc2-1xclc3-1* is insensitive to root growth inhibition and low density of lateral root primordia. Plants overexpressing the *AtRALF1* gene were crossed with *clc2-1xclc3-1* and a normal phenotype was recovered. Genes encoding the clathrin light chain are positively regulated by exogenous treatment with AtRALF1 peptide. This results show that *AtRALF1* gene is expressed in endodermal cells of roots and the AtRALF1 peptide is secreted via ER-Golgi. Internalization of the AtRALF1 is essential for its signaling and the clathrin-related machinery is essential for the physiological effects of AtRALF1 peptide.

Keywords: RALF; Intracellular traffic; Endocytosis; Clathrin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Análise de microscopia confocal do peptídeo AtRALF1 fusionado a GFP em raízes de plantas transgênicas pAtRALF1:AtRALF1-GFP.....	50
Figura 2-	Análise de microscopia confocal do peptídeo AtRALF1 fusionado a GFP durante o desenvolvimento dos primórdios de raiz lateral (LRP)	52
Figura 3-	AtRALF1 fusionado a GFP é sensível a brefeldina A (BFA) em plantas pAtRALF1:AtRALF1-GFP	53
Figura 4-	Localização subcelular do peptídeo AtRALF1 fusionado a GFP (pAtRALF1:AtRALF1-GFP) com marcadores genéticos de endomembrana em raízes	55
Figura 5-	Localização subcelular do peptídeo AtRALF1 fusionado a mCherry (p35S:AtRALF1-mCherry) com marcadores de membrana vacuolar e complexo de Golgi em raízes	56
Figura 6-	Localização subcelular do peptídeo AtRALF1 fusionado a GFP e mCherry no citosol e apoplasto.....	57
Figura 7-	Imunodeteção em raízes dos peptídeos AtRALF1 fusionados as duas proteínas fluorescentes GFP e mCherry	58
Figura 8-	Atividade do peptídeo recombinante AtRALF1	60
Figura 9-	Imunolocalização do peptídeo AtRALF1 em células de raiz de arabidopsis	61
Figura 10-	Imunolocalização do peptídeo AtRALF1 na presença de TyrA23 e μ 2 em células de raiz de arabidopsis.....	63
Figura 11-	Efeito de TyrA23 e XVE>>Auxilin no peptídeo endógeno AtRALF1 fusionado a GFP.....	64
Figura 12-	Ensaio de inibição do crescimento da raiz primaria nos mutantes <i>clc1</i> , <i>clc2</i> , <i>clc3</i> e <i>clc2-1xclc3-1</i> e plantas Col-0	66
Figura 13-	Efeito do peptídeo AtRALF1 na densidade de primórdios de raiz lateral nos mutantes <i>clc2</i> , <i>clc3</i> e <i>clc2-1xclc3-1</i> e plantas Col-0.....	67
Figura 14-	Análise fenotípica e RT-PCR semi-quantitativo em plantas Col-0, p35:AtRALF1, <i>clc2-1xclc3-1</i> e progênies F3: p35S:AtRALF1/ <i>clc2-1xclc3-1</i>	69
Figura 15-	Análise de expressão dos genes CLC1, CL2 e CLC3 em raízes de arabidopsis....	70
Figura 16-	Análise por RT-PCR semi-quantitativo dos genes induzidos por AtRALF1 na presença dos inibidores de endocitose em raízes de arabidopsis.....	71

Figura 17- Efeito dose resposta da produção proteica CML38-GFP na presença do peptídeo AtRALF1 em raízes de plantas pAtCML38:AtCML38-GFP	72
Figura 18- Efeito dos inibidores de endocitose na produção proteica CML38-GFP induzida pelo peptídeo AtRALF1 em raízes de plantas pAtCML38:AtCML38-GFP	73
Figura 19- Análise por RT-PCR semi-quantitativo dos genes induzidos por AtRALF1 em Col-0 e nos mutantes <i>clc1</i> , <i>clc2</i> , <i>clc3</i> e <i>clc2-1xclc3-1</i> em raiz.....	74
Figura 20- Ensaio de alcalinização em células em suspensão na presença de inibidores de endocitose.....	76
Figura 21- Alcalinização da rizosfera de plantas selvagens (Col-0), mutantes simples <i>clc2</i> , <i>chc2-1</i> e do duplo mutante <i>clc2-1xclc3-1</i> em resposta ao peptídeo AtRALF1	77
Figura 22- Modelo proposto sobre a via secretória e internalização do peptídeo AtRALF1.	85

1 INTRODUÇÃO

Os peptídeos RALF presentes em diversas espécies do reino vegetal e recentemente encontrado em fungos (MOURA; SILVA-FILHO, 2006; MASACHIS et al., 2016), são caracterizados fisiologicamente como reguladores da expansão celular (COVEY et al., 2010; HARUTA et al., 2014; MINGOSSO et al., 2010; PEARCE et al., 2001b). Estes desencadeiam respostas como aumento de ondas de cálcio intracelular, alcalinização extracelular, ativação de MAP quinase (MAPK), indução de genes relacionados a rearranjo da parede celular e proteínas sensoras ao cálcio (CML38), inibição de crescimento de raiz, redução da densidade de raiz lateral e alongamento de pelos radiculares (ATKINSON; LILLEY; URWIN, 2013; BERGONCI et al., 2014; HARUTA et al., 2008; HARUTA et al., 2014; PEARCE et al., 2001b).

O organismo modelo *Arabidopsis thaliana* possui 37 isoformas (*AtRALF1-37*) expressas sobre diferentes tecidos, sendo alguns mais restritos que outros (BIRNBAUM et al., 2003; MORATO DO CANTO et al., 2014; SCHMID et al., 2005). O gene *AtRALF1* (*At1g02900*) que é específico de raiz e hipocótilo codifica uma proteína precursora de 120 aminoácidos responsável pela liberação por processamento enzimático e secreção do peptídeo ativo *AtRALF1* (MATOS et al., 2008). Assim como em animais, peptídeos secretados podem ser internalizados via endocitose regulando eventos de sinalização intracelular (CLAGUE, 1998).

Em plantas, embora controverso inicialmente a questões relativas à pressão de turgor, a endocitose foi reportada desempenhando um papel importante na reciclagem de proteínas de membrana, na internalização de receptores induzida por ligantes e na internalização de ligantes de característica química (BECK et al., 2012; DHONUKSHE et al., 2007; IRANI, NILOUFER G. et al., 2012; RUSSINOVA et al., 2004), não havendo evidências para internalização de peptídeos relacionados ao desenvolvimento em plantas.

Com o propósito de entender sobre a importância da secreção e tráfego dos peptídeos RALF, foi mostrado que um dos membros da família RALF em *Arabidopsis* exclusivo de raízes e hipocótilos, *AtRALF1*, é internalizado e que a internalização seria essencial para inibição do crescimento da raiz e emergência de raízes laterais, diferente do efeito da alcalinização extracelular que não depende de internalização.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Peptídeos hormonais em plantas

Os peptídeos hormonais em plantas são pequenas moléculas proteicas com participação importante na defesa, reprodução, divisão e alongamento celular (COVEY et al., 2010; GERMAIN et al., 2005; MATSUBAYASHI, 2014; MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 1996; MINGOSSO et al., 2010; RYAN; MOURA, 2002). Até o início da década de 90, hormônios vegetais eram conhecidos como pequenas moléculas orgânicas, em sua maior parte derivadas de aminoácidos, sendo considerados clássicos os hormônios auxinas, citocininas, ácido giberélico, ácido abscísico e etileno (KENDE; ZEEVAART, 1997). No entanto, Pearce et al., (1991) pela primeira vez, relataram a descoberta de uma molécula de origem proteica responsável pela ativação da resposta de defesa sistêmica a herbivoria ou ao ferimento. Esta molécula, denominada sistemina, é um peptídeo de 18 aminoácidos isolado de folhas de tomateiro que inicia uma cascata de sinalização, acarretando na síntese de ácido jasmônico e ativação de genes de defesa (RYAN; MOURA, 2002). Pequenas quantidades, fmol/planta, levam ao acúmulo de inibidores de proteinase (RYAN; PEARCE, 1998). Estes inibidores de proteinase uma vez ingeridos pelo inseto dificultam a digestão de proteínas, reduzindo o crescimento e desenvolvimento do mesmo (RYAN, 1990). Desde então uma nova área na ciência vegetal, envolvendo novas descobertas de peptídeos hormonais e suas respectivas vias de sinalização e mecanismos de ação, teve sua origem.

A disponibilidade do genoma de *Arabidopsis thaliana* em 2000, a geração de bases de dados de transcrição, ferramentas de predição gênica e uma melhora nos procedimentos de isolamento bioquímico facilitou a previsão de milhares de peptídeos hormonais em potencial (SIMON; DRESSELHAUS, 2015). Entre estes, uma nova família de oito peptídeos endógenos denominados peptídeos elicitadores de arabidopsis (AtPeps) relacionados a defesa foi descoberta. Os AtPeps são derivados de proteínas precursoras (PROPEP1-8) localizados e ativos em diferentes tecidos, onde atuam induzindo e amplificando o sistema imune em plantas (YAMAGUCHI et al., 2010). Os AtPeps são caracterizados como DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*), desencadeando respostas como o aumento de ondas de cálcio intracelular, alcalinização extracelular, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativação de MAP quinase (MAPK), indução de genes relacionados à defesa, inibição de crescimento de raiz e interação com outros hormônios relacionados à defesa (HUFFAKER; PEARCE; RYAN, 2006; KROL et al., 2010; RANF et al., 2011; ROSS et al., 2014). Todos os

AtPeps são percebidos por duas proteínas de membrana homólogas com domínios extracelulares ricos em leucina (LRR), AtPEPR1 e AtPEPR2. Estudos mostraram que o receptor AtPEPR1 atua como o primeiro receptor do AtPep1, um peptídeo de 23 aminoácidos derivado da porção C-terminal de uma proteína precursora de 92 aminoácidos AtPROPEP1 (HUFFAKER et al., 2006; Yamaguchi et al., 2010; Krol et al., 2010). A resolução da estrutura proteica do complexo formado pelo domínio extracelular LRR do PEPR1 com AtPep1 foi desvendada e mostra que os 10 aminoácidos da porção C-terminal do peptídeo são responsáveis pela interação com o domínio LRR (TANG et al., 2015).

Tanto a sistemina quanto os AtPeps promovem o fluxo iônico de cálcio Ca^{+2} e a interrupção do fluxo de prótons (pH). Esta última atividade de perturbação do fluxo de prótons gerou um ensaio onde a alcalinização do meio extracelular de células em suspensão é utilizada para detectar peptídeos em outras espécies (Felix and Boller, 1995; Pearce et al., 2001a). Na tentativa de descobrir homólogos de sistemina em extratos protéicos de folhas de tabaco, foi descoberto outro peptídeo que promove uma forte e rápida alcalinização do meio extracelular (Pearce et al., 2001b). Estes novos peptídeos estão relacionados com desenvolvimento e foram denominados fatores de alcalinização rápida ou simplesmente RALFs (*Rapid Alkalinization Factors*). O RALF não é o único peptídeo relacionado ao desenvolvimento que é conhecido. O CLAVATA3 (CLV3), Fitosulfoquinas (PSKs), Locus Estéril Rico em Cisteína/proteína11 (SCR/SP11), Inflorescência Deficiente em Abscisão (IDA), *Rotundifolia4-Like/Devil* (ROT 4/DVL1), Polaris (PLS), Nodulina precoce 40 (ENOD40), *Golven* (GLV) e *Stomagen* são alguns exemplos de peptídeos hormonais também envolvidos com diferentes aspectos do desenvolvimento e crescimento vegetal (BUTENKO et al., 2003; CASSON et al., 2002; CHARON et al., 1999; FLETCHER et al., 1999; MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 1996; SCHOPFER; NASRALLAH; NASRALLAH, 1999; SUGANO et al., 2010; TAKAYAMA et al., 2000; WHITFORD et al., 2012).

O peptídeo CLV3 é produzido e secretado nas camadas de células epidérmicas L1 e L2 e difunde-se para a L3, tudo isto na gema apical meristemática (KONDO, 2010; SABLowski, 2007). O precursor de 96 aminoácidos sofre modificações pós-traducionais por glicosilação gerando um peptídeo ativo de 13 aminoácidos (OHYAMA et al., 2009). CLV3 ativa o complexo CLV1/CLV2 desencadeando uma via de sinalização na zona central do meristema apical regulando a especificação e diferenciação das células meristemáticas (FIERS et al., 2007). A perda de função do peptídeo CLV3 (*clv3*) resulta em um mutante

aberrante com acúmulos descontrolados de células meristemáticas na região do meristema apical. Uma vez que CLV3 ativa o complexo de receptores de CLV1/CLV2, WUSCHEL (WUS), um fator transcricional responsável pela atividade das células meristemáticas, é negativamente regulado. As plantas mutantes para WUS não apresentam expressão de CLV3, indicando que WUS regula positivamente a expressão de CLV3 e CLV3 regula negativamente WUS, mantendo uma retroalimentação regulatória necessária para manter o equilíbrio ótimo das células meristemáticas (BRAND et al., 2002; HOBE et al., 2003).

As fitosulfoquinas são pentapeptídeos sulfatados isolados de meios condicionados de cultivos celulares vegetais *in vitro* (MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 1996). Eles são produzidos na etapa exponencial de crescimento celular e promovem a diferenciação e proliferação celular em baixas concentrações (HANAI et al., 2000; MATSUBAYASHI et al., 1999; YANG et al., 2001). Os pentapeptídeos são produzidos pelo processamento enzimático do precursor de 89 aminoácidos (PP-PSK). Esse precursor possui um domínio hidrofóbico de 22 aminoácidos na região N-terminal (YANG et al., 1999). As PSKs são indispensáveis em vários estágios de crescimento das plantas tais como: embriogênese somática (HANAI et al., 2000; IGASAKI et al., 2003; KOBAYASHI et al., 1999), formação de gemas adventícias (YAMAKAWA et al., 1998), formação de raízes adventícias (YAMAKAWA et al., 1998) e germinação de pólen (CHEN; MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2000). Além das etapas de desenvolvimento citadas anteriormente, elevadas concentrações de PSKs em mudas retardam a senescência sob condições de estresse pelo calor (YAMAKAWA et al., 1999). A natureza do receptor das PSKs é do tipo quinase com um domínio rico em repetições de leucina, LRR-RLK. Essa proteína receptora, PSKR1, sofre modificação pós-traducional e, por esse motivo, apresenta peso molecular de 120 e 150 kDa (MATSUBAYASHI et al., 2002). A presença do receptor esta no meristema apical, hipocótilo, raiz e folhas.

Análises genéticas clássicas revelaram que a autoincompatibilidade é regulada pelo locus multialélico nomeado de locus estéril (S-locus). Quando o pólen e o pistilo possuem o mesmo alelo, uma interação molecular causa a inibição do crescimento do tubo polínico (TAKAYAMA et al., 2001). Estudos bioquímicos e moleculares revelaram a presença de dois genes no S-locus: glicoproteína (SLG) e um receptor de membrana do tipo quinase (*S-Locus Receptor Kinase*, SRK), ambos expressos no estigma. O SRK interage com o peptídeo rico em cisteína (SCR ou SP11) promovendo a incompatibilidade (SUSUKI et al., 1999; TAKAYAMA et al., 2000). Estudos feitos em *Brassica* revelaram que baixas concentrações

do peptídeo SCR/SP11 (50 fmol/estigma) inibe a hidratação do pólen (TAKAYAMA et al., 2000). Na procura de homólogos em arabidopsis, Vanoosthuyse et al. (2001) encontraram 28 homólogos denominados SCRLs, peptídeos básicos e hidrofílicos de 4,4 a 9,5 kDa.

As plantas renovam seus órgãos constantemente e este mecanismo envolve senescência e abscisão. Em plantas, IDA (*Inflorescence Deficient in Abscission*) é um peptídeo de 77 aminoácidos que ocorre na região de abscisão do órgão floral gerando a separação das células que articulam o órgão da planta (JINN et al., 2000). As plantas com a perda da função do gene *IDA* retêm de forma indefinida os órgãos florais (BUTENKO et al., 2003) e plantas que expressam constitutivamente o gene *IDA* promove a abscisão (STENVIK et al., 2006). A proteína precursora é processada liberando um peptídeo de 20 aminoácidos denominado (EPIP), este peptídeo processado pode recuperar mutantes com perda da função do IDA (STENVIK et al., 2008). A percepção deste peptídeo é mediada por dois receptores ricos em leucina LRR-RKs (*Leucine-rich repeat receptor kinase*), HAESA e HLS2 (HAESA-LIKE 2) (CHO et al., 2008; JINN; STONE; WALKER, 2000). Experimentos recentes mostrados por Santiago et al., (2016) utilizando uma resolução cristalográfica, sugerem uma interação do peptídeo IDA com o domínio LRR do receptor HESA e com a proteína quinase SERK1 que teria a função de coreceptora.

O ROT4/DVL1 são peptídeos de 53 e 51 aminoácidos membros de uma família de 24 genes e em arabidopsis são considerados reguladores potenciais da proliferação celular durante vários estágios de desenvolvimento (NARITA et al., 2004; WEN et al., 2004). A análise da expressão gênica em arabidopsis revelou a presença de transcritos de ROT4 e DVL1 em gemas apicais, flores, raízes e folhas jovens (IKEUCHI et al., 2011; DONNELLY et al., 1999).

O PLS é um peptídeo de 36 aminoácidos, não secretado e envolvido na vascularização, crescimento longitudinal e radial de raízes (CASSON, 2002). Os mutantes *pls* mostram uma resposta hipersensitiva a citocininas e uma resposta reduzida para auxinas, sugerindo que o peptídeo PLS tem sua função relacionada a manutenção do equilíbrio entre auxina-citocinina (CHILLEY, 2006).

2.2 Peptídeo hormonal RALF

O peptídeo hormonal RALF, do inglês *Rapid ALKalinization Factor*, foi isolado de extratos protéicos de tabaco através do ensaio de alcalinização em suspensões celulares (PEARCE et al., 2001b). Identificou-se, além da indução de uma rápida alcalinização do meio extracelular, a ativação de uma MAP quinase em células de tabaco (PEARCE et al., 2001b). Em tabaco, o peptídeo RALF possui 49 aminoácidos, é derivado da porção C-terminal de uma preproteína de 115 aminoácidos, apresenta um peptídeo sinal de 23 aminoácidos na porção N-terminal e uma porção entre o peptídeo sinal e o peptídeo maduro de função ainda desconhecida com 43 aminoácidos. Portanto, peptídeos RALF são derivados de proteínas precursoras que são secretadas e que ainda sofrem processamento posterior para liberação do peptídeo maduro. Em um estudo de transporte de proteínas em tabaco, foi demonstrado que a fusão preproRALF-GFP é visualizada primeiramente no retículo endoplasmático (RE) e depois de 24 h no RE e na parede celular (ESCOBAR et al., 2003).

Os peptídeos RALF foram encontrados em todos os representantes do reino vegetal onde foram investigados, caracterizando-se como o primeiro peptídeo hormonal ubíquo em plantas (MOURA; SILVA-FILHO, 2006). Os peptídeos geralmente são encontrados organizados em famílias gênicas que podem apresentar expressão tanto generalizada quanto tecido-específicas (MOURA; SILVA-FILHO, 2006; GERMAIN et al., 2005, HARUTA; CONSTABEL, 2003; OLSEN et al., 2002). Em uma busca *in silico* por peptídeos secretados menores que 200 aminoácidos, Olsen et al., (2002) propuseram a existência de uma família gênica em *arabidopsis* de 34 genes semelhantes ao RALF (*RALFL*, *RALF-LIKE*). Diferentemente de Pearce et al. (2001b), esses autores consideraram como critério para determinar membros dessa família, somente a conservação da região C-terminal onde reside o peptídeo ativo. A presença de outros domínios como peptídeo sinal, sítio dibásico, arranjos de cisteínas e resíduos de ácidos glutâmicos não foi levada em consideração.

Pearce et al. (2010) mostraram que o motivo YISY, presente na extremidade N-terminal do peptídeo RALF maduro, é altamente conservado entre RALFs, sendo que a substituição da isoleucina por uma alanina neste motivo, causa uma severa redução da alcalinização de células em suspensão celular e uma baixa inibição de crescimento de raiz em tomateiro. Matos et al. (2008) demonstraram que o sítio dibásico, formado por uma dupla de argininas na posição 68 e 69 do preproRALF1, posicionada acima do peptídeo ativo é responsável pelo reconhecimento, processamento e liberação do peptídeo ativo em

arabidopsis. As plantas transgênicas super-expressando o precursor mutado (substituição de uma arginina por uma alanina na posição 69) não apresentam o fenótipo semi-anão característico da super-expressão do precursor selvagem e a análise dos extratos protéicos dessas plantas revelam o acúmulo do precursor não processado e a não liberação do peptídeo ativo para o mutante. Similarmente, quando a quimera preproRALF23-myc foi super-expressa em arabidopsis esta gerou um fenótipo semi-anão e raízes com capacidade reduzida para acidificar a rizosfera (SRIVASTAVA et al., 2009).

Quanto à função dos peptídeos da família RALF em plantas, sabe-se que não estão relacionados com defesa, pois não induzem a síntese de inibidores de proteinases (Pearce et al. 2001b) e também não estão envolvidos com a resposta contra patógenos e ferimentos (HARUTA; CONSTABEL, 2003; OLSEN et al., 2002; WU et al., 2007). Quando o peptídeo purificado de tomateiro foi aplicado exogenamente no meio de cultivo de plântulas de tomateiro e de arabidopsis houve inibição do crescimento de raízes, indicando o seu envolvimento no crescimento e desenvolvimento vegetal (PEARCE et al., 2001b). A super-expressão do prepropeptídeo AtRALF23, AtRALF1 e AtRALF8 em arabidopsis resultam em fenótipos semi-anão com raízes e hipocótilos menores, promovendo menor densidade de raízes laterais e alongamento de pelos radiculares (ATKINSON; LILLEY; URWIN, 2013; MATOS et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2009). Recentemente Bergonci et al. (2014) descobriram que o silenciamento gênico do AtRALF1 (*irAtRALF1*) apresentava um maior crescimento da raiz principal e promovia uma maior densidade de raízes laterais, assim como um maior comprimento das células do hipocótilo e de raízes, sugerindo que o peptídeo AtRALF1 estaria regulando a expansão celular.

Na procura por desvendar o papel fundamental do peptídeo AtRALF1 na expansão celular, análises preliminares da expressão gênica em plantas de arabidopsis que super-expressam o gene *AtRALF1*, mostraram que um grupo de genes envolvidos com rearranjo da parede celular teve sua expressão alterada (NCBI, Gene Expression Omnibus, Series GSE641). Dois genes que codificam proteínas ricas em prolina (*AtPRP1*, *AtPRP3*), um gene que codifica uma glicoproteína rica em hidroxiprolina (*AtHRGP2*) e um gene que codifica a proteína xiloglucana endotransglucosilase *TCH4* são alterados de forma positiva quando existe a presença do peptídeo em raízes (BERGONCI et al., 2014), a indução destes genes provavelmente estaria modificando a estrutura da parede celular.

Com o intuito de descobrir componentes da via de sinalização do AtRALF1 que sofrem modificações pós-traducionais (MPT), Haruta et al. (2014) utilizando a fosfoproteômica como uma ferramenta por descobrir proteínas que sofrem alteração ao peptídeo AtRALF1, descobriu entre todas as proteínas candidatas uma proteína de membrana com domínio quinase (FERONIA) como responsável pela interação com AtRALF1, essa ligação desencadeia uma cascata de fosforilação que resulta na inibição de secreção de prótons, aumento do pH apoplástico e redução da expansão celular. As plantas com perda de função do FERONIA (*fer4*) apresentam insensibilidade ao peptídeo AtRALF1 em concentrações inferiores a 1 μM e sensível a doses maiores. Este efeito poderia ser atribuído aos experimentos de ligação que resulta em ~40% para FERONIA e outros ~ 60% que provavelmente estariam relacionados a um segundo receptor ainda desconhecido. Entre as repostas mais rápidas promovidas pelo peptídeo AtRALF1 estão as respostas iônicas como Ca^{+2} e pH (HARUTA et al., 2008; PEARCE et al., 2001b). Os autores mostraram que o incremento de Ca^{+2} citosólico promovido pelo peptídeo AtRALF1 é dependente do FERONIA; já a medição de pH extracelular na presença do peptídeo AtRALF1 em raízes *fer4* não foram mostradas neste trabalho, porém a acidificação extracelular de raízes no mutante resulta ser mais rápida em comparação com plantas selvagens (Col-0).

Pouco se sabe sobre a relação entre os peptídeos RALF e os demais hormônios. Haruta e Constabel (2003), estudando genes que codificam peptídeos RALF em poplar (*Populus trichocarpa* $\times$ *Populus deltoides*) não encontraram efeito significativo dos hormônios benzil adenina e ácido naftaleno acético, porém, quando células em suspensão foram tratadas com metil jasmonato, houve uma inibição transiente da expressão dos genes RALF. Já a isoforma AtRALF23 de arabidopsis é reprimida quando plantas são expostas a brassinolide (BL), porém a super-expressão do AtRALF23 impede a indução do alongamento de hipocótilos típico do tratamento com BL (SRIVASTAVA et al., 2009). Diferentemente do AtRALF23, AtRALF1 não é reprimido pelo tratamento com BL destacando-se uma relação antagônica entre eles. Uma competição pelos componentes da mesma via de sinalização entre AtRALF1 e BL foram sugeridos por Bergonci et al. (2014), dois genes da via da biossíntese dos brassinosteróides (*CPD* e *DWARF4*) são regulados positivamente por AtRALF1 e são regulados negativamente por BL. Também foi evidenciado que a indução gênica da expansina 5 (*EXPA5*) mediada por BL é reprimida por AtRALF1 (BERGONCI; SILVA-FILHO; MOURA, 2014), sugerindo novamente uma relação antagônica entre BL e AtRALF1 na expansão celular.

Estudos de detecção de peptídeos endógenos envolvidos com a regulação do Ca^{+2} intracelular revelaram que o peptídeo AtRALF1 (At1g02900) é capaz de induzir o aumento do Ca^{+2} intracelular de plantas de arábida (HARUTA et al., 2008). Análises de RT-PCR indicaram que o gene se expressa predominantemente em raízes e ensaios com o gene repórter GUS sob controle do promotor do gene revelaram um acúmulo de proteína na zona de desenvolvimento radicular de plantas, com grande intensidade nos feixes vasculares, córtex e endoderme.

2.3 Endocitose em plantas

A endocitose é considerada como a maior rota de entrada de proteínas de membrana, lipídeos e moléculas extracelulares para o interior da célula. Como um mecanismo de regulação, a endocitose é requerida durante a manutenção e atividade das proteínas de membrana em resposta a sinais externos ou internos. Esta regulação pode ser atribuída à entrada de nutrientes, tradução de sinais e interação planta-micróbio (DI RUBBO et al., 2013; FAN et al., 2015). Assim como em animais, os componentes que são necessários para pré-formação, formação e cisão de vesículas são semelhantes entre os dois reinos (plantas e animais), tanto que em arábida, mais de 20 proteínas envolvidas na formação de vesículas cobertas por clatrina já foram descritas e caracterizadas (CHEN; IRANI; FRIML, 2011; DI RUBBO et al., 2013; GADEYNE et al., 2014).

A principal via endocítica em plantas é a dependente de clatrina (DHONUKSHE et al., 2007). As clatrininas são proteínas que polimerizam formando uma rede poliédrica composta de duas cadeias pesadas e três cadeias leves, CLCs e CHCs. Esta rede poliédrica forma uma capa que reveste vesículas que se originam da membrana plasmática. A presença da maquinaria de endocitose mediada por clatrina é essencial na polaridade celular (DHONUKSHE et al., 2008; MRAVEC et al., 2011), citogênese (VAN DAMME et al., 2011), alongamento celular (ZHAO, Y. et al., 2010), embriogênese (KITAKURA et al., 2011) e gametogênese (BACKUES et al., 2010).

A endocitose pode ser mediada por clatrininas (CME) (BASHLINE et al., 2013; DHONUKSHE et al., 2007; DI RUBBO et al., 2013; FAN et al., 2013; FUJIMOTO et al., 2010; GADEYNE et al., 2014; HAO et al., 2014; SONG et al., 2012; VAN DAMME et al., 2011; WANG, C. et al., 2013; YAMAOKA et al., 2013; ZHAO, Y. et al., 2010) ou independente a esta via (CIE) (HAO et al., 2014; LI, R. et al., 2012; LI, X. et al., 2011; WANG, Q. et al., 2013).

2.3.1 Mecanismos de endocitose mediados por clatrina

Assim como em animais, plantas também possuem componentes da maquinaria da endocitose dependente de clatrina. A participação de clatrina, complexo AP2 e dinaminas (DRPs) é o que mais se tem evidenciado até agora. No genoma de *arabidopsis* há pelo menos cinco genes relacionados à codificação de proteínas relacionadas a clatrina, entre elas as clatrininas de cadeia leve *CLC1*(At2g20760), *CLC2*(At2g40060) e *CLC3*(At3G51890) e as de cadeia pesada *CHC1*(At3g11130) e *CHC2*(At3g08530). Estudos mostram que as clatrininas estão presentes entre a membrana plasmática e a rede de trans-Golgi (TGN) facilitando o tráfego vesicular. A perda de função destas proteínas: *chc2-1* e *clc2-1xclc3-1* e a indução negativa de CHC de forma dominante afeta o desenvolvimento e crescimento de plantas (DHONUKSHE et al., 2007; FUJIMOTO et al., 2010; KITAKURA et al., 2011; WANG, C. et al., 2013), assim como o transporte de auxinas (WANG, C. et al., 2013).

O complexo AP-2 não é necessário em levedura para o mecanismo de endocitose dependente de clatrina (YEUNG; PHAN; PAYNE, 1999), porém em animais ocorre o oposto. Em plantas o genoma de *arabidopsis* contem genes de pelo menos quatro complexos AP (AP1, AP2, AP3, AP4) envolvidos sobre diferentes processos de tráfego intracelular (FERARU et al., 2010; ZWIEWKA et al., 2011). Recentemente utilizando experimentos de imunolocalização com antígenos específicos Wang et al. (2016) caracterizaram a localização de três subunidades do complexo AP2 (AP2 σ , AP2 μ , AP1/2 β 1), e observaram que a localização destas proteínas é restrita na membrana plasmática e compartimentos intracelulares unicamente para AP1/2 β 1. A localização destas proteínas na membrana plasmática sugere uma característica conservada entre plantas e animais; tanto que a subunidade AP2 σ de *arabidopsis* apresenta 61% de identidade com o AP2 σ (σ 2) de humanos (FAN et al., 2013). De forma independente, a perda de função das subunidades do complexo AP2: *ap2 μ* , *ap2 σ* , AP2 μ -RNAi apresentam defeitos na reprodução, desenvolvimento e o crescimento de plantas (BASHLINE et al., 2013; DI RUBBO et al., 2013; FAN et al., 2013).

As dinaminas (DRPs), também conhecidas como GTPases desempenham um papel preponderante no tráfego post-Golgi de organelas menores (vesículas). Em plantas, diferentemente de animais pouco se conhece sobre este tráfego intracelular, caracterizando-se apenas para duas sub-famílias estruturalmente distintas em vias de tráfego post-Golgi (DRP1, DRP2). Baseado numa análise filogenética e predição de domínios conservados, Hong et al.

(2003) identificaram em *arabidopsis* um total de 16 DRPs agrupadas em 6 grupos: DRP1A-E, DRP2A-B, DRP3A-B, DRP4A-D, DRP5A-B e DRP6. A utilização de proteínas fluorescentes como proteínas repórteres e imunodeteção de DRPs específicas facilitou a localização subcelular destas GTPases na membrana plasmática, complexo de Golgi, vesículas, mitocôndria, peroxisomos, cloroplastos e durante a iniciação da divisão celular (FUJIMOTO et al., 2010; FUJIMOTO et al., 2007; KONOPKA; BACKUES; BEDNAREK, 2008; MRAVEC et al., 2011). A perda de função das proteínas DRP1C e DRP1E avaliadas em mutantes *drpc* e *drpla* exibem efeitos pleiotrópicos, defeitos na formação da placa central, desenvolvimento do embrião e diminuição na internalização de vesículas FM4-64, um marcador lipofílico fluorescente de membrana. Adicionalmente a perda de função da DRP1C (*drp1c*), apresenta defeitos na expansão celular e formação de grão de pólen (COLLINGS et al., 2008; KANG; BUSSE; BEDNAREK, 2003a; KANG; RANCOUR; BEDNAREK, 2003b; MRAVEC et al., 2011). Isto sugere que o papel da sub-família DRP1 estaria sendo atribuída a regulação do tráfego vesicular durante a formação da placa central, da endocitose ou reciclagem de proteínas de membrana.

2.4 Inibidores de endocitose em plantas

A utilização de ferramentas farmacológicas desenvolveu parte de uma bateria de aliados químicos para à elucidação sobre o destino de proteínas secretadas, recicladas ou internalizadas. Um claro exemplo é o emprego da brefeldina A (BFA), uma toxina de fungo usada comumente em animais, leveduras e plantas que inibe de forma reversível o tráfego vesicular (STAEHELIN; DRIOUICH, 1997). A toxina atua especificamente sobre uma sub-classe de ARF-GEFs (GNOM), reprimindo a secreção e reciclagem de proteínas de membrana estabelecidas na rede *trans-Golgi/EE* com exclusão de MVBs e estruturas de complexo de Golgi (IRANI; RUSSINOVA, 2009). Muito dos receptores quinase em plantas foram sensíveis a BFA e inclusive independente da biossíntese de proteínas (BECK et al., 2012; GIFFORD et al., 2005; RUSSINOVA et al., 2004).

Outro inibidor de endocitose extensamente usado é o *TyrphostinA23* ou TyrA23, um inibidor que interfere o reconhecimento do motivo de internalização YxxØ presente em domínios citoplasmáticos de proteínas receptoras com as sub-unidades do complexo AP-2 (TITAPIWATANAKUN et al., 2009). Em plantas, TyrA23 foi empregado para inibir a

endocitose em protoplastos (ORTIZ-ZAPATER et al., 2006), interferindo o acúmulo de PIN2 em corpos de brefeldina A (BFA) em raízes de *arabidopsis* (DHONUKSHE et al., 2007).

Outros inibidores como *Wortmannin* (Wm), interfere o tráfego intracelular de proteínas que são direcionadas ao vacúolo (DHONUKSHE et al., 2008), assim como a endocitose (IRANI; RUSSINOVA, 2009). Concanamicina (Conc A), apresenta afinidade pelas sub-unidades *c* e *a* da V-ATPase, levando a uma massiva alteração morfológica do complexo de Golgi, agregação de vesículas e o bloqueio do transporte de proteínas entre os compartimentos TGN/EE e vacúolo (STROMPEN et al., 2005; DETTMER et al., 2006).

2.5 Internalização de proteínas cargo induzidas por ligantes

Em animais a endocitose mediada por receptores foi associada à formação de corpos revestidos de clatrina, mecanismo que também está sendo elucidado em plantas. A internalização de receptores induzida por ligantes dependente de clatrina é a mais caracterizada e utilizada como modelo em plantas. Tendo sido mostrada tanto para receptores de membrana quanto para proteínas transportadoras *BRASSINOTEROID INSENSITIVE1*-(BRI1), *FLAGELLIN SENSING 2* (FLS2), *PIN-FORMED* (PINs), *ETHYLENE INDUCING XYLANASE* (LeEIX2), BOR1 e IRT1 (BAR; AVNI, 2009; BARBERON et al., 2011; DHONUKSHE et al., 2007; ROBATZEK; CHINCHILLA; BOLLER, 2006; RUSSINOVA et al., 2004; TAKANO et al., 2010). Porém, não há uma evidência clara de como os receptores são reconhecidos para serem internalizados. Já em animais a descoberta e caracterização de motivos tirosina (YxxØ) presentes em domínios citoplasmáticos de proteínas trans-membrana foram considerados chaves para o reconhecimento de proteínas cargo. O motivo tirosina (YxxØ, onde o Ø é um resíduo hidrofóbico) é responsável pelo reconhecimento das sub-unidades do complexo AP-2. O *Tyrphostin*A23, um inibidor que interfere entre o complexo AP-2 e proteínas cargo utilizado comumente em animais, bloqueia a internalização de proteínas cargo em plantas. Acredita-se que este inibidor estaria afetando células vegetais da mesma forma, onde proteínas cargo não recrutariam o complexo AP de plantas (BANBURY et al., 2003; DI RUBBO et al., 2013; GELDNER; ROBATZEK, 2008; OWEN; EVANS, 1998).

Em animais, endossomos iniciais ou *early endosomes* (EEs) são os primeiros a incorporar complexos receptor-ligante, onde provavelmente exista uma dissociação facilitada por uma acidificação. A separação do complexo possibilita que receptores sejam incorporados

novamente na membrana plasmática via endossomos de reciclagem (*recycling endosomes*, REs) ou que sejam incorporados em endossomos tardios (*late endosomes*, LE)/ *multivesicular bodies* (MVBs) direcionados para degradação via lisossomos (SADOWSKI; PILECKA; MIACZYNSKA, 2009; SORKIN; GOH, 2009). O sistema endocítico em plantas apresenta complexidade, similaridade e diferenças com o sistema de animais. Devido à presença de micro domínios que permite a recepção, acoplamento e estações secretoras, foi sugerido que a rede *trans-golgi* (TGN) seja potencialmente o espaço onde ocorre a dinâmica dos EEs. Foi evidenciado também, que endossomos de plantas poderiam participar como REs via GNOM, uma proteína de arabisopsis responsável pela mudança conformacional GDP/GTP numa classe de proteínas G denominadas ARFs (ARF-GEF) (OTEGUI; SPITZER, 2008; ROBINSON; JIANG; SCHUMACHER, 2008). A reciclagem de proteínas em plantas pode ser estabelecida desde a última fase estacionária dos endossomos, comumente conhecida como MVBs ou LEs proteínas constituídas nestes locais que podem voltar para TGN e subsequentemente para membrana plasmática (JAILLAIS et al., 2006; KLEINE-VEHN et al., 2008). Proteínas estabelecidas nos compartimentos pré-vacuolares (PVCs) podem ser direcionadas à incorporação e degradação via vacúolo, um mecanismo também conhecido em animais (SPITZER et al., 2009).

2.6 Internalização de ligantes

A internalização de pequenos peptídeos hormonais via endocitose é muito conhecida em animais nos quais participa da regulação de eventos de sinalização intracelular (CLAGUE, 1998). Diferentemente de peptídeos hormonais animais, em plantas ainda não foram descritos como são internalizados. Talvez o mais próximo em plantas seja a internalização de uma molécula análoga ao brassinolide complexado ao receptor BRI1. Um receptor de membrana com domínio quinase extensamente investigado na percepção de brassinosteroides (BRs). Irani et al. (2012) desenvolveram uma molécula bioativa análoga ao brassinolide, o interesse dos autores partia do princípio de que se a *castasterone* fusionada ao fluoróforo Alexa (*Alexa Fluor647-castasterone*, AFCS) promoveria a endocitose do BRI1 como um complexo ligante-receptor. Empregando abordagens genéticas e farmacológicas demonstraram que a percepção do AFCS pelo BRI1 levou a sua internalização como um complexo ligante-receptor, havendo uma passagem via TGN/EE, MVBs e subsequentemente ao vacúolo. Durante esta passagem transitória houve uma reciclagem do receptor BRI1 e uma fase estacionária do ligante AFCS no vacúolo.

2.7 Regulação da endocitose por sinalização

Além dos componentes que estão envolvidos com a regulação da endocitose, moléculas extracelulares que promovem sinalização podem influenciar na maquinaria de endocitose como um mecanismo de *feedback*. Foi evidenciado que a auxina atua de forma negativa na internalização de vesículas FM4-64 assim como em outras proteínas de membrana PIN1, PIN2, PM-ATPase e PIP2 (PAN et al., 2009). A concentração de auxinas no feixe vascular é elevada, diferentemente de outras camadas celulares. A internalização do PIN1, uma proteína de transporte de auxinas presente no feixe vascular é claramente bloqueada, o que sugere que a presença de auxinas em elevadas concentrações sobre locais específicos estaria modulando a ciclagem endocítica de proteínas PINs (ZHAO, Z. et al., 2010).

Contrariamente a auxina, citocininas promovem a endocitose de proteínas PINs. Recentemente Marhavy et al. (2014) mostraram que a citocinina regula de forma negativa a permanência da proteína PIN1 na membrana plasmática, afetando sua ciclagem pelo fato dela ser degradada. O efeito da citocinina levou a um rearranjo da polaridade para a proteína PIN1, tornando um fluxo anormal de auxinas.

Du et al. (2013) evidenciaram que o ácido salicílico, um hormônio relacionado a resposta de defesa ao ataque de patógenos inibe a distribuição de proteínas de membrana, especificamente em componentes da maquinaria de endocitose. Uma análise de imunofluorescência contra proteínas específicas AtCLC2 e AtCHC2 mostrou que a permanência destas proteínas na membrana plasmática foi afetada. Os autores sugerem que o ácido salicílico atua diretamente sobre a polimerização de vesículas revestidas por clatrina, enfatizando que este mecanismo de interferência não estaria ligado diretamente com a sinalização.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de *Arabidopsis thaliana* (ecótipo Columbia, Col-0) foram utilizadas como selvagem. As linhagens com perda de função por inserção de T-DNA: *clc1* (Salk_133492), *clc2* (Salk_093840) e *clc3* (Salk_024235) foram adquiridas através do *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC) da *Ohio State University* (ALONSO et al., 2003). Adicionalmente foi adquirido o duplo mutante *clc2-1xclc3-2* cedido gentilmente pelo Prof. Jianwei Pana (*College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Zhejiang 321004, China*) (WANG, C. et al., 2013).

Foram utilizados marcadores genéticos de proteínas relacionadas a marcadores de golgi, trans-Golgi endossomos iniciais (EE) ou *network/early endosome* (TGN/EE), endossomos tardios ou *late endosome* (LE) e vacúolo fusionadas a GFP, YFP e mCherry: RabD1-mCherry, RabF2b(ARA7)-mCherry, VAMP711-mCherry, VTI12-mCherry, RabA1g-mCherry (GELDNER et al., 2009); SYP22-YFP (ROBERT et al., 2008) e NST-GFP. Paralelamente foi utilizada a linhagem que super-expressa o gene *AtRALF1* (At1g02900) p35S:AtRALF1 (MATOS et al., 2008). Todas as sementes utilizadas como linhagens com perda de função, super-expressão e marcadores específicos de organelas são oriundas do ecótipo Col-0.

Para utilização, as sementes de Col-0 e os mutantes com perda de função *clc1*(Salk_133492), *clc2* (Salk_093840), *clc3* (Salk_024235) e *clc2-1xclc3-1* foram esterilizadas à superfície em solução de etanol 75% por 15 s, posteriormente em hipoclorito de sódio (50% de água sanitária, 50% de água destilada estéril) por 15 min. Em seguida, foram lavadas três vezes em água destilada esterilizada. As sementes foram colocadas em 0,1% de agarose e colocadas na geladeira (4°), por três dias, com a finalidade de quebrar a dormência.

A mistura de sementes com a solução de agarose 0,1% foram distribuídas em forma de linha sobre placas com meio semi-sólido MS 0,5X (MURASHIGE SKOOG, 1962) sem sacarose e fitagel (Gibco) 6 g/L. As placas foram colocadas verticalmente na sala de crescimento, por um fotoperíodo de 16 h luz (200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) e 8 h de escuridão a 24°C $\pm$ 2 até os 8 dias de crescimento.

Para a transformação de plantas, sementes de *arabidopsis* Col-0 foram inicialmente umedecidas em papel toalha e colocadas na geladeira (4°C) por três dias. Após esse período, quatro sementes, dispostas equidistantes, foram transferidas para vaso de polipropileno próprio para crescimento de *arabidopsis*, contendo uma mistura de 2:1:1 (*Plant Max*:vermiculita fina:vermiculita grossa) e umedecidas com uma solução nutritiva (0,25g de Peters/1L de água). Esses vasos foram cobertos para manutenção de alta umidade relativa, formando-se uma câmara úmida e foram levados para câmaras de crescimento (Convicon) com um fotoperíodo de 16 h luz (200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) e 8 h de escuro, T 24°C $\pm$ 2, HR 46%. Após cinco dias de germinação, foi realizada o processo de aclimatização, em que consistiu na abertura progressiva da câmara úmida, que finalmente foi retirada aos 7 dias. A cada dois dias, as plantas foram irrigadas com a mesma solução nutritiva (0,25g de Peters/1L de água), a fim de que cresçam de forma vigorosa e formem rosetas grandes. Após a aparição da primeira haste floral, esta imediatamente foi retirada, possibilitando assim, a brotação de mais hastes. O recomendado para se efetuar a transformação é quando existia a abertura de mais de três botões florais/haste.

3.2 Construção de plasmídeos

Foram feitas três construções para avaliar o local de expressão e localização subcelular do peptídeo AtRALF1 e das proteínas AtCML38 e AtCLC3, todas sob o controle do promotor endógeno. A partir de DNA genômico de raízes, foram amplificados todos os elementos regulatórios do promotor e o gene *AtRALF1* (*AtRALF1:AtRALF1*, 1598 pb), assim como do promotor e o gene *AtCML38* (*AtCML38:AtCML38*, 1967 pb) e promotor e o gene *AtCLC3* (*AtCLC3:AtCLC3*, 1601 pb) utilizando os iniciadores gene-específicos (Anexo A). A reação foi composta por tampão 1X; MgCl₂ 1,5 mM; dNTP mix (concentração final 0,2 mM de cada dNTP); iniciadores F (0,2 μM) e R (0,2 μM); 1 μL de DNA e 1 U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). A reação foi levada no termociclador programada para 94°C por 2 min, 30 ciclos de 94°C por 30 s, 58°C por 45 s e 72°C por 1 min, e por fim a finalização da extensão de 72°C por 8 min. O produto de PCR obtidos na reação foram submetidos à separação em gel de eletroforese, amplificando as amostras em gel de agarose 1%, tampão TBE (0,5%), a uma voltagem de 70V por 30 min. Imediatamente as bandas de interesse foram identificadas e purificadas com QIAEX II Gel *Extraction Kit* (QIAGEN). Brevemente, foram adicionados três volumes de Buffer QX1 para cada 100 mg de agarose, 10 μL de Buffer QIAEX II e incubado a 50°C por 10 min. A solução foi centrifugada a 12000 rpm por 30 s e

após retirada do sobrenadante, o sedimentado foi lavado uma vez com 500 µL de Buffer QX1, duas vezes com 500 µL de Buffer PE e secado a temperatura ambiente por 15 min. Eluiu-se o DNA com água ultra-pura. Com os fragmentos purificados e quantificados e seguindo as especificações da Invitrogen, 20 ng de cada fragmento foram levados a uma reação enzimática de recombinação por 15 min a uma temperatura de 22°C com o vetor de entrada pENTER/D-TOPO (Invitrogen). Todas as reações foram eletroporadas em *E. coli* (Top 10), recuperadas por uma hora a 200 rpm (37°C) em meio SOC e plaqueadas em meio LB contendo 50mg/L de canamicina. Após o sequenciamento, os vetores de entrada contendo os fragmentos de interesse foram recombinados com o vetor de destino pK7FWG2 (*AtRALF1:AtRALF1-GFP*; *AtCML38:AtCML38-GFP*) e pKGWFS7 (*AtCLC3:AtCLC3-GFP-GUS*), respectivamente. O fragmento *AtRALF1:AtRALF1-GFP-T35S* (2756 pb) e *AtCML38:AtCML38-GFP-T35S* (3112, pb) foram amplificados do vetor de destino pK7FWG2 utilizando os iniciadores gene-específicos (Anexo A). Esse fragmento foi purificado e inserido no vetor de entrada pENTER/D-TOPO (Invitrogen), posteriormente após a verificação por sequenciamento, os vetores de entrada com o inserto de interesse foram recombinados no vetor de destino pKGWFS7 (KARIMI; INZE; DEPICKER, 2002). Sequências da região terminadora *T35S*, *mCherry* e o gene *AtRALF1* foram isolados separadamente dos vetores pK7FWG2(KARIMI; INZE; DEPICKER, 2002), pAN583 (SHANER et al., 2004) e DNA genômico. Todos estes fragmentos foram reconstituídos para uma sequência *AtRALF1-mCherry-T35S*, usando os iniciadores gene-específicos (Anexo A). O fragmento *AtRALF1-mCherry-T35S* (1300 pb) foi inserido via enzima de restrição *ApaI* and *Spe I* dentro do maior fragmento do vetor pK7FWG2 digerido e purificado, respectivamente. Uma vez confirmados por sequenciamento, os vetores de destino contendo os insertos de interesse foram transferidos para *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101).

O sistema PET (Novagen) foi utilizado para clonar a região madura do peptídeo ativo AtRALF1. A partir de DNA genômico e os iniciadores gene-específicos (Anexo A) foi amplificado em um fragmento de 150 pb e clonado no vetor pET28b, via enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII*, a fim de fusionar um *tag* contendo 6 resíduos de histidinas (6xHis), na região N-terminal do peptídeo maduro. O vetor pET38b contendo o inserto de interesse foi eletroporado em células de *E. coli* (cepa BL21).

3.3 Geração de transgênicos

3.3.1 Crescimento de *Agrobacterium*

Foram crescidas de forma individual as células de *Agrobacterium* com os insertos de interesse em 10 mL de meio LB líquido, contendo 50 mg/L de Gentamicina e 50 mg/L de Spectomicina. O crescimento das células foi feito a 28°C por 18 h, sob agitação de 180 rpm. Em seguida, foi adicionado o pré-inóculo (10 mL) em 500 mL de meio LB líquido com os antibióticos adequados (50 mg/L de Gentamicina e 50 mg/L de spectomicina), e colocou-se para crescer a 28°C sob agitação de 180 rpm durante 48 h. Após esse período, 125 g de sacarose foram adicionadas a 400 mL de cultura em agitação e imediatamente foi transferida para um balão de 500 mL, onde foi adicionado 80 µL de Silwet L-77, completando a 500 mL com solução bacteriana restante. Posteriormente, foi feita a homogeneização da solução bacteriana por meia rotação e finalmente disposta em um becker de 600 mL para ser usada na transformação.

3.3.2 Infecção de botões florais pelo método *pasteur pipet-bud flower*

O método da infecção aqui proposto é diferente ao descrito por Clough e Bent (1998), resulta ser mais prático, eficiente e menos agressivo para as plantas. O método consistiu na remoção das flores abertas mantendo apenas os botões fechados de acordo com o método já estabelecido por (CLOUGH; BENT, 1998). Após essa separação de flores abertas, as hastes são aproximadas até a solução bacteriana que é utilizada na infecção (ver item 3.3.1) e com ajuda de luvas e uma pipeta *pasteur*, pequenas quantidades da solução bacteriana são expostas sobre os botões florais até completar uma imersão total da cultura sobre os espaços estreitos dos botões, não deixando escorrer solução bacteriana nas folhas. Após a transformação, foi feita uma câmara úmida contendo os vasos com as plantas transformadas, e posteriormente foram transferidas para um ambiente escuro por 24 h. Após esse período, as plantas foram levadas para a câmara de crescimento, sendo feito algumas aberturas na câmara úmida, a fim de gerar oxigenação interna. No dia seguinte, a câmara úmida foi retirada por completo. Nos dias posteriores, foram realizados os cuidados respectivos, principalmente na irrigação com água e fertilizante. Após completar o ciclo reprodutivo e maturação de sementes, essas foram coletadas e dispostas a ser selecionadas.

3.3.3 Seleção de transgênicos

As sementes T1 foram esterilizadas à superfície por agitação em solução de 50% de hipoclorito de sódio comercial (2,5% de cloro ativo), 50% de água destilada estéril), por 15 min. Em seguida, foram lavadas três vezes em água esterilizada e colocadas na geladeira com 0,1% de agarose por 3 dias. Após esse período, as sementes foram germinadas em placas contendo meio de cultura semissólido MS 0,5X fitagel (Gibco) 4 g/L, e 100 mg/L de canamicina. As sementes T1 foram dispostas uniformemente nas placas e levadas para sala de crescimento, por 15 dias, com fotoperíodo de 16 h luz (200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) e 8 h de escuro a $24^\circ\text{C}\pm 2$. Foram selecionadas plantas resistentes a canamicina que apresentavam o segundo par de folhas verdadeiras. Essas plantas foram transferidas para vaso de polipropileno contendo substrato (descritas no item 3.1), crescidas até completar o ciclo reprodutivo e posteriormente, coletadas as sementes T2. As sementes T2 foram selecionadas novamente em meio semissólido contendo 50 mg/L de canamicina e posteriormente transferidas as plantas resistentes para substrato e crescidas até obter sementes T3. As sementes T3 foram utilizadas posteriormente para todos os ensaios realizados.

3.4 Análise de expressão por RT-PCR semi-quantitativo

3.4.1 Tratamento exógeno (peptídeo recombinante AtRALF1)

Para avaliar a resposta dos genes induzidos por AtRALF1 (BERGONCI et al., 2014), placas de 24 poços e plantas com oito dias de idade, entre plantas selvagens (Col-0) e mutantes com perda de função das clatrininas de cadeia leve (item 3.1) foram utilizadas no experimento. As raízes de 20 plantas/genótipo foram submergidas em 2 mL de meio líquido MS 0,5X sem sacarose, por 20 min. Em seguida, foi adicionado o peptídeo recombinante AtRALF1 por 30 min e após este período, as raízes rapidamente foram colocadas sobre papel absorvente, cortadas e colocadas em tubos estéreis eppendorf de 1,5 mL.

3.4.2 Extração do RNA mensageiro

Os tubos de 1,5 mL contendo os tecidos de raiz, foram macerados em nitrogênio líquido. A extração de RNA total foi realizada com Trizol (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, foi adicionado 1 mL de Trizol (Invitrogen) e agitado por 1 minuto. Seguido da adição de 200 μL de clorofórmio e incubado a temperatura ambiente por 5 min e centrifugado a 12000 rpm por 15 min a 4°C . A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde foi adicionado 500 μL de isopropanol e incubado a temperatura ambiente por 10 min. A solução foi centrifugada a 12000 rpm por 10 min a 4°C .

O sobrenadante foi removido e o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 75%, e centrifugado a 7500 rpm por 5 min a 4°C. O sedimentado foi seco a temperatura ambiente, ressuspensão em água DEPC. Todas as amostras foram tratadas com DNase I para eliminar contaminação por DNA genômico.

3.4.3 Quantificação do RNA mensageiro

Para cada amostra de RNA total obtida, foi retirado 2 µL de RNA e quantificado no NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Os valores de absorbância foram utilizados para calcular a concentração e avaliar a qualidade do RNA (260/280).

3.4.4 Síntese de cDNA e RT-PCR

Por transcriptase reversa (Promega), 1 µg de RNA foi utilizado para a síntese de cDNA. Brevemente, 1µg de RNA total foi misturado com 50 µM de oligodT e incubado a 70°C por 5 min. Imediatamente após este período a amostra foi colocada no gelo por 5 min. Em seguida, foi adicionada 10 µL de uma solução contendo Buffer Improm-II 1X(concentração final); MgCl₂ 1,5 mM; dNTPmix (concentração final 0,5 mM de cada dNTP) e 1 U Improm-II Reverse Transcriptase. A mistura foi incubada a 25°C por 5 min, 42°C por 60 min, 70°C por 15 min e 4°C por tempo indefinido. Foi utilizado os iniciadores gene-específicos para cada gene (Anexo A) e avaliada a expressão gênica por RT-PCR semi-quantitativo para cada tratamento. Cerca de 1µL de cDNA foi empregado na preparação de 50 µL da reação: 5 µL de 10X de Taq Buffer; 0,2 mM dNTP mix, 1µM de iniciador F, 1µM de iniciador R, 2 mM MgCl₂, 1µL de cDNA, 0,5 U de Taq DNA Polymerase e por fim água Milli-Q estéril até completar os 50 µL. A reação foi levada a 95°C por 3 min, 28 ciclos de (95°C por 30 s, 58°C por 45 s e 72° por 30 s), uma extensão final de 72°C por 7 min e finalmente a 4°C por tempo indeterminado. O gene *GAPDH* (*GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE*) foi utilizado como um controle interno da síntese do cDNA na avaliação do RT-PCR.

3.5 Expressão heteróloga do peptídeo recombinante AtRALF1 (_{HIS}AtRALF1)

3.5.1 Preparação do pre-inóculo

Foi crescido um pre-inóculo de 200 mL da cepa BL21(_{HIS}AtRALF1) em meio LB: 10g/L de triptona, 5g/L de extrato de levedura e 10 g/L de Cloreto de Sódio, pH 7.5 a 37°C por 24h sobre 200 rpm.

3.5.2 Crescimento de células e indução à produção de proteínas

Cerca de 10 mL de pre-inóculo foram adicionados e crescidos em frascos de 1 L, contendo 500 mL de meio LB e os antibióticos adequados. O crescimento da cultura bacteriana foi levada por um período de 2-3 h a 37°C por 200 rpm até atingir uma OD₆₀₀ (0,5-0,8), respectivamente. Atingindo a OD desejada, foram adicionados 0,5g de lactose sobre 500 mL de cultura bacteriana por 6 h contínuas. Após este período, as células foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 min, a temperatura ambiente, e posteriormente ressuspensas e armazenadas a (-20°C) em água destilada estéril.

3.5.3 Extração e purificação de proteínas por cromatografia de afinidade (Ni-NTA)

As células armazenadas foram resuspensas sob agitação por 30 min no tampão de lise: 8 M de uréia, 100 mM de NaH₂PO₄, 20 mM de Tris-Base, pH 8,0. Em seguida e utilizando uma bomba Parr, foi realizada a ruptura das células por descompressão de nitrogênio (N₂), por 10 min. A solução de lise foi retirada e colocada para agitação por 10 min, posteriormente foi feita uma centrifugação a 10500 rpm por 40 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado, levando-o a uma correção de pH 8,0. No intervalo da centrifugação foi feita uma coluna de resina de Ni-NTA, empregando-se 1 mL de resina por cada 5 L de cultura bacteriana induzida. Com ajuda de uma seringa descartável de 10 mL, foi feita uma coluna de resina de Ni-NTA, brevemente foi colocado por pressão 5 mm de fibra de vidro e sobre esta foi equilibrado 1mL da resina de Ni-NTA com a adição de 9 mL de tampão de lise pH 8,0. Após a sedimentação da resina de Ni-NTA foi facilitada a saída do tampão de lise a fim de obter um fluxo lento (1 gota/2 seg). Antes de promover uma desidratação da resina em equilíbrio, foi colocado lentamente o sobrenadante da solução bacteriana centrifugada, para permitir assim, a passagem das proteínas através da resina, promovendo uma interação entre as *beads* de Ni-NTA com o *tag* 6xHIS. Uma vez culminada a passagem do sobrenadante, foi realizada uma lavagem da resina de Ni-NTA com 10 mL de tampão de lavagem: 8 M de uréia, 100 mM de NaH₂PO₄, 20 mM de Tris-Base, pH 6,3. Ao termino da lavagem, as proteínas presentes na resina foram eluídas com 8 mL de tampão de eluição: 8 M de uréia, 100 mM de NaH₂PO₄, 20 mM de Tris-Base, pH 3,3.

3.5.4 Diálise e liofilização

Para eliminação de sais, uréia e outros componentes, foi realizada a diálise das proteínas eluídas. Foram utilizadas membranas de diálise apropriadas para cada proteína. Inicialmente as membranas foram hidratadas e fechada uma extremidade com presilhas,

posteriormente foi feito o carregamento da fração eluída, e por fim o fechamento da segunda extremidade da membrana. Em seguida, todas as membranas contendo a fração eluída foram colocadas em contato com uma solução de 4L de 1% de ácido fórmico (v/v) a uma temperatura de 4°C sobre uma agitação leve. Foram feitas pelo menos três trocas de diálise. Após a diálise, a fração de proteínas foi centrifugada por 10000 rpm a 4°C, e o sobrenadante foi congelado em nitrogênio líquido e liofilizado.

3.5.5 Quantificação e verificação da pureza por cromatografia líquida (HPLC)

Cerca de 0,5 mg de proteína liofilizada foi eluída em 1 mL de água Milli-Q autoclavada, posteriormente após a sua eluição completa a solução foi centrifugada a 12000 rpm por 5 min. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foi colocado em 900 µL de ácido fórmico 0,1% e injetados no HPLC. Foi verificado o tempo de retenção do peptídeo no cromatograma e ao mesmo tempo foi visualizado o espectro em 220 nm. Foi quantificada a área do pico integrado e interpolado para o cálculo da proteína em µg/µL.

3.6 Tratamento com inibidores de endocitosis

As plantas crescidas verticalmente, quatro dias para experimentos de imunolocalização e oito dias para experimentos de avaliação da expressão gênica, foram transferidas para placas de 24 poços contendo 2 mL de MS 0,5X líquido sem sacarose. Foram feitos pre-tratamentos separados com os inibidores de secreção e endocitose: Brefeldina A (BFA, 25 µM), *Tyrphostin* A23 (TyrA23, 30 µM) e *Wortmannin* (WM, 30 µM) sob agitação a (20 rpm) por um período de 30 min. Após o pre-tratamento, diferentes concentrações do peptídeo recombinante AtRALF1 foram incubados por um período de 30 min para expressão gênica e diferentes tempos para os experimentos de imunolocalização.

3.7 Preparação de células eletrocompetentes de *E. coli* Top 10

As células de *E. coli* desarmadas da cepa TOP10 (Invitrogen) foram estriadas em placas contendo meio LB sólido (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, cloreto de sódio 10 g/L, ágar 12 g/L pH 7,5) e crescida a 37°C/16 h. Após 16 h, foi feito um pré-inóculo a partir de uma colônia colocada em 10 mL de LB líquido, e levados a 37°C/16 h sob agitação de 180 rpm. No inóculo de 500 mL de meio LB líquido foi adicionado 5 mL de pré-inóculo, e colocado a 37°C sob agitação de 180 rpm até a densidade ótica (OD₆₀₀) atingir 0,5-0,8. As células foram centrifugadas 5000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em água ultra-pura estéril e gelada. As lavagens foram repetidas mais

duas vezes e as células foram ressuspensas em 3 mL de glicerol 10% filtro-esterilizado. Foram feitas alíquotas de 70 µL de células e armazenadas a -80°C.

3.8 Preparação de células eletrocompetentes de *Agrobacterium* GV3101

Estriou-se *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 sob uma placa contendo meio MAS sólido (1 L: 200 mL de meio 5XA; 10 mL de sacarose 20% filtro-esterilizada; 2 mL de MgSO₄ 20%; 0,5 mL de tiamina 10 mg/ml; 12 g de ágar; pH 7,0 - Meio 5XA: K₂HPO₄ 69 g/L; K₂H₂PO₄ 22,5 g/L; (NH₄)₂SO₄ 5 g/L e citrato de sódio 2,5 g/L contendo rifampicina (50 µg/mL) e gentamicina (50 µg/mL). A placa foi colocada a 28°C/48 h. Inoculou-se uma colônia em 10 mL de LB líquido contendo os antibióticos anteriores e crescido a 28°C sob agitação de 180 rpm durante 18 h. O pré-inóculo foi colocado em 500 mL de meio LB com antibióticos e colocado para crescer a 28°C sob uma agitação de 180 rpm até atingir OD₆₀₀ 0,5-0,8. A cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas três vezes com água ultra-pura estéril e gelada. Por fim, as células foram ressuspensas em 2 mL de glicerol 10% filtro-esterilizado. Alíquotas de 70 µL de células foram armazenadas a -80°C.

3.9 Eletroporação de células de *E. coli* e *A. tumefaciens*

Aproximadamente 2 µL da reação de recombinação foi adicionado a 70 µL de células de *E. coli* eletrocompetentes. Misturou-se suavemente e as células foram transferidas para a cubeta de eletroporação. Submeteu-se uma descarga de 2,5 kV/2,5 µF (Eletroporador gene pulse, BioRad) e, após a eletroporação, adicionou-se 500 µL de meio SOC (100 ml: 2 g de triptona; 0,5 g de extrato de levedura; 0,05 g de NaCl; 1 ml de KCl 250 mM; 180 µL de glicose 20% filtro-esterilizada; 180 µL de MgCl₂ 1 M; pH 7,0) e colocado sob agitação de 180 rpm a 37°C/1 hora. Centrifugou-se a 5000 rpm por 30 s e plaqueou-se todas células em placas contendo meio LB semi-sólido e os antibióticos apropriados. As colônias cresceram a 37°C 16 a 18 h. Em 70 µL de células de *A. tumefaciens* eletrocompetentes foi adicionado 0,5-1 µg de plasmídeos e eletroporado como anteriormente para as células de *E. coli*. As células de *Agrobacterium* eletroporadas foram crescidas a 28°C sob agitação de 180 rpm por 2 h. Centrifugou-se e plaqueou-se em meio LB sólido, contendo os antibióticos apropriados e deixou crescer colônias durante dois dias a 28°C.

3.10 Extração de DNA plasmidial de *E. coli*

As colônias isoladas foram crescidas em 5 mL de meio LB com os antibióticos adequados a 37°C, sob agitação de 180 rpm durante 16-18 h. Centrifugou-se 1 mL de cultura bacteriana a 12000 rpm e as células ressuspensas em 75 µL de Buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 1 mM EDTA). Adicionou-se 300 µL de Buffer TENS (10 mM Tris-HCl; pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,1 N NaOH; 0,5% SDS), incubou-se a temperatura ambiente por 5 min. Após esse período, foi adicionado 150 µL de acetato de potássio 3M (pH 5,2) e incubado no gelo por 15 min. Centrifugou-se a 12000 rpm a 4°C por 15 min, coletou-se o sobrenadante onde foi adicionado 1 µL de RNase (10 U/µL) e incubado a 37°C por 30 min. Precipitou-se o plasmídeo com 500 µL de etanol 100% por 5 min e, centrifugou-se a 12000 rpm a 4°C durante 15 min. Foi feita a lavagem do sedimentado com etanol 70% gelado e centrifugou-se a 12000 rpm a 4°C durante 15 min. Logo, o sedimentado foi colocado para secar a temperatura ambiente e ressuspensão em 30 µL de água ultra-pura estéril livre de DNase. Feita a quantificação o plasmídeo foi armazenado a -20°C

3.11 Confirmação de mutantes SALK

Foi realizada a extração de DNA a partir de folhas de *Arabidopsis* utilizando o Plant DNAzol (Thermo Scientific), seguindo as instruções do fabricante. A presença do T-DNA e ausência de segregação (homozigoto) foram confirmadas por PCR, utilizando iniciadores gene-específicos (Anexo A). Iniciadores que flanqueiam o TDNA foram utilizados em DNA genômico de plantas selvagens e mutantes, a ausência do fragmento possibilitou a identificação de plantas homozigotas. As plantas que apresentavam ausência do fragmento foram submetidas a uma nova PCR, utilizando a combinação de um iniciador LBb1.3 e o reverso do iniciador que flanqueia o T-DNA, sendo que a presença do fragmento em plantas mutantes e ausência em plantas selvagens confirmou a homozigose e a mutação do gene específico. Mutantes homozigotos foram submetidos a uma nova avaliação de expressão gênica por RT-PCR semi-quantitativo (item 3.4) utilizando iniciadores gene-específicos (Anexo A). Todos os mutantes confirmados foram utilizados nos experimentos.

3.12 Hibridação

Foram feitas hibridações entre plantas doadoras de pólen: p35S:AtRALF1, p35S:AtRALF1-mCherry, pAtRALF1:AtRALF1-GFP e plantas receptoras de pólen: *clc3-1*, RabD1-mCherry, RabA1g-mCherry, VTI12-mCherry, RabF2b(ARA7)-mCherry, VAMP711-mCherry; SYP22-YFP, NST-GFP, XVE:Auxilin. Para o cruzamento foram

utilizadas pinças (5-SA Style 5 Tweezers) e uma lupa Donegan DA-10 *OptiVisor*. As plantas receptoras de pólen foram emasculadas 24 h antes do cruzamento, após este período anteras completas foram colocadas sobre os estilos receptivos. Três dias mais tarde, os cruzamentos foram verificados e 15 dias mais tarde as siliquas maduras foram coletadas. Sementes F1 foram semeadas e crescidas até completar o período de reprodução. Posteriormente estas sementes F2 utilizando os iniciadores gene-específicos (Anexo A) foram selecionadas por PCR e detecção de sinal de fluorescência no *Stereo Microscope* 165FC-Leica. Sementes F3 provenientes de plantas F2 foram re-avaliadas por RT-PCR semi-quantitativo para o gene *AtRALF1*.

3.13 Imunodeteção por gel de proteína

As raízes de *arabidopsis* foram coletadas e maceradas com nitrogênio líquido. Em seguida, o produto macerado foi solubilizado no tampão de extração: 20 mM de Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM de NaCl; 1 mM de EDTA; 1% de Tritom-X-100; 0,1% de SDS; 5 mM DTT; 1 mM de PMSF; 10µM de leupentina; 1 µM de pesptatina; 0,3 µM de aprotinina. A fase orgânica foi separada por centrifugação a 13500 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e uma alíquota representativa foi utilizada para quantificação por Bradford (BRADFORD, 1976). Cerca de 10 µg de proteína total para cada amostra foram diluídas em tampão de carregamento (10% SDS; 10 mM DDT; 20% Glicerol; 0,2 M de Tris-HCl pH 6.8 e 0,05% de azul de bromofenol) e levadas à desnaturação a 95°C por 8 min. Proteínas desnaturadas foram usadas para separação em géis de policrilamida SDS-PAGE 15%, paralelamente foi adicionado o tampão de corrida: 1g/L de SDS; 3,0 g/L de Tris-Base e 14,4 g/L de glicina. Todas as proteínas separadas foram transferidas a uma membrana de nitrocelulose, utilizando tampão de transferência: 3,3 g/L de Tris-Base; 14,4 g/L de glicina e 200 mL/L de metanol. Membranas com as proteínas transferidas foram bloqueadas por 5% de leite desnatado por 1 hora. Após este período, anticorpos primários foram colocados em 2% de leite desnatado e incubados overnight por 4°C. As proteínas de interesse foram detectadas utilizando anti-AtRALF1 (1:5000) e anti-GFP (1:5000) como anticorpos primários e *anti-rabbit* IgG-peroxidase (1:20000) como anticorpo secundário. Diferentes tempos de exposição foram usados para a detecção de proteínas.

3.14 Experimentos de imunolocalização

As plantas de *arabidopsis* com quatro dias de idade foram transferidas para placas de 24 poços contendo 1 mL de meio MS 0,5X. De forma exógena, diferentes concentrações do

peptídeo recombinante AtRALF1 (0, 10, 50, 100, 200 nM) foram adicionados a 30 plantas/tratamento que foram monitoradas por diferentes períodos de tempo (10 s, 60 s, 5 min, 20 min). Ao término do tratamento, foram feitas pelo menos duas lavagens das plantas com meio MS 0.5X, e de forma imediata foi adicionado 1 mL de paraformaldeído 4% (PFA). A placa contendo as plantas com PFA foi colocada dentro de uma câmpnula de vidro acoplada a uma bomba de vacuum, que posteriormente foi ativada por um intervalo de 60 min. As plantas permeabilizadas com PFA foram transferidas para uma placa de 72 poços que em seguida foi acoplada ao immuno-robot. Durante os 60 min de vacuum, foi feita a preparação das soluções de digestão (20% *driselasse* em PBS 1X), permeabilização (9% DMSO, 2,6% NP40 em PBS 1X), Bloqueio (5% de BSA), solução de anticorpo primário (anti-RALF1, 1:1000 em 5% de BSA-PBS 1X) e solução de anticorpo secundário (*anti-rabbit-IgG-Cy3*, 1:600). Paralelamente foram preparadas três soluções alimentadoras, solução A (100 mL de água Milli-Q), Solução B: (0.1% de Triton-X-100 em 100 mL de água Milli-Q), Solução C (0.1% de Triton-X-100 em 100 mL de PBS 1X). Após a preparação de todas as soluções o immuno-robot foi ativado por 16 h (*overnight*). No dia seguinte e de forma muito cuidadosa, foram preparadas lâminas contendo as plantas do experimento para avaliação no microscópio confocal.

3.15 Formação e medições dos corpos de brefeldina (BFA)

As plantas AtRALF1-AtRALF1-GFP crescidas por 4 dias, foram submetidas ao tratamento de BFA (50 μ M) por 30 min. Corpos de BFA sobre células endodérmicas foram quantificados manualmente, gerando uma média de corpos de BFA/célula. Todas as imagens foram processadas no software imageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>)

3.16 Ensaios de alcalinização em células em suspensão

As células de arábido *MM1* foram mantidas e crescidas como descrito por (MENGES; MURRAY, 2002). Suspensões celulares com cinco dias de idade foram transferidas para placas de 24-poços (1 mL/poço) e agitadas por 60 min a temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) por 130 rpm. Para os ensaios com inibidores de endocitose como Brefeldina A (BFA, 25 μ M), *Tyrphostin A23* (TyrA23, 25 μ M) e *Wortmannin* (WM, 30 μ M) estes foram adicionados no começo por um tempo de 30 min. Posteriormente, foi realizada a primeira medição do pH e em seguida, a adição do peptídeo recombinante AtRALF1 sobre diferentes concentrações (100, 300 e 500 nM). Foram feitas as medições de

pH por cada 10 min por cada tratamento. Todos os valores foram trabalhados no Microsoft Excel, gerando gráficos de barras com valores Δ pH.

3.17 Ensaios de alcalinização em células de raízes

Aproximadamente 20 plantas de arabis foram estendidas sobre um gel indicador de pH não tamponado (0,006% de *bromocresol purple*, 1 mM CaSO_4 , pH 6,3) como descrito por (WU et al., 2007). As placas foram colocadas de forma vertical por 15 min a fim de estabilizar o pH original de cada genótipo. Em seguida, as placas foram deitadas novamente para receber na superfície das raízes pelo menos 500 μL do peptídeo recombinante AtRALF1 (2 μM) por 5 min. Após este período, as placas foram colocadas verticalmente e deixadas por um período de 20 min. Com uma câmara digital NIKON D7100 foram registradas as imagens em contraluz para favorecer uma maior resolução do sinal.

3.18 Densidade de LRP

Para quantificar os primórdios de raiz lateral, sementes Col-0, *clc2*(Salk_093840), *clc3* (Salk_024235), *clc2-1xclc3-1*, p35SAtRALF1, p35S:AtRALF1-mCherry e F3: p35S:AtRALF1/*clc2-1xclc3-1* foram crescidas em placas verticais contendo meio MS semissólido por um período de sete dias (para os experimentos com peptídeo AtRALF1) e cinco dias para caracterizar híbridos e linhagens transgênicas (Figura 14, Anexo E). Completando o período de crescimento, as placas foram digitalizadas (escâner) e utilizadas como referência para efetuar as medições do comprimento da raiz. Plantas dos diferentes genótipos foram clareadas como descrito por (MALAMY; BENFEY, 1997). A quantificação dos primórdios foi feita nos oito estágios de desenvolvimento (I-VIII) usando o microscópio binocular E-100 LED Nikon. A densidade foi calculada de acordo ao número total primórdios/comprimento de raiz, gerando um valor de LRP/cm (LRP “lateral root primordia”).

3.19 Experimento histoquímico da proteína reporter GUS

Uma linhagem representativa pAtCLC3:AtCLC3-GFP-GUS, foi crescida por 4 dias em placas verticais contendo meio MS semissólido, após este período as plantas foram transferidas para placas de 24 poços onde foi feito o tratamento exógeno com o peptídeo AtRALF1 por 4 horas. A análise histoquímica da proteína repórter GUS foi feita de acordo ao método descrito por Jeferson (1987). As amostras foram submergidas no tampão de reação enzimática contendo: 2 mM de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) e 50

mM de buffer fosfato sódico (pH 7,0), as mesmas que foram levadas para incubação no escuro por um período de 18h por 37°C. Após a reação enzimática as amostras foram clareadas de acordo ao descrito por (MALAMY; BENFEY, 1997). Todas as amostras, especialmente raízes foram preparadas sobre lamina para microscópio com 10% de Glycerol. Para o registro das imagens foi utilizada a opção de contraste de interferencia diferencial (DIC) no estereo microscopio 165FC-Leica. As imagens foram processadas no software imageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

3.20 Ensaios de inibição do crescimento da raiz primaria

Sementes Col-0, *clc1*(Salk_133492), *clc2*(Salk_093840), *clc3* (Salk_024235) e *clc2-1xclc3-1* foram germinadas verticalmente sobre meio MS semissólido sem sacarose por 48h, após este período as sementes em germinação foram transferidas para placas de 24 poços contendo 1 mL de meio MS liquido sem sacarose, onde receberam diferentes doses do peptídeo AtRALF1. A incubação com o peptídeo foi de 48 h adicionais sob uma constante agitação 130 rpm. Após a finalização do experimento, as plantas foram esticadas sobre placas contendo 1,2% de ágar e digitalizadas por escâner. Usando o software imageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) foram feitas todas as medições do comprimento da raiz primaria.

3.21 Microscopia confocal

Foram utilizados microscópios do tipo confocal invertido (*Confocal Laser Scanning Microscopy Fluo View*) e Zeiss LSM700. As proteínas GFP, YFP e mCherry foram excitadas com laser de íons de argon, a 488 nm, 514 nm e 580nm, e a emissão de cada proteína fluorescente foi coletada entre o intervalo de 500-530 para GFP, 530-600 para YFP e 600-630 para mCherry. As moléculas fluorescentes Cy3 e iodeto de propídio (Pi) foram excitadas a 550 e 555 nm e o sinal foi emitido entre o intervalo de 560-580 nm e 640-655 nm, respectivamente.

3.22 Quantificação da intensidade interna da Cy3 e GUS

As imagens obtidas por microscopia confocal e estereo microscopio foram trabalhadas no software imageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Foi subtraído o *background* de cada imagem e realizado a medição da intensidade por cada célula sobre uma área específica.

3.23 Análise estatística

Para as análises estatísticas, foi utilizado o pacote de software *Infostat Statistics Base* (versão 2012e). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,01$) a partir de uma análise de variância (STEEL et al., 1996). Alternativamente foi utilizado o teste t (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) para a comparação de duas médias diferentes.

4 RESULTADOS

4.1 O gene *AtRALF1* fusionado a GFP, sob o controle do promotor endógeno é expresso em células diferenciadas da endoderme de raízes

Para investigar a localização subcelular do *AtRALF1* em raízes de arábida, a sequência do gene *AtRALF1* foi fusionada a sequência da proteína verde fluorescente (GFP) e esta construção foi colocada sob o controle do promotor endógeno do *AtRALF1* (*pAtRALF1:AtRALF1-GFP*). Uma linhagem representativa foi selecionada por microscopia confocal a partir da avaliação de 25 eventos transgênicos de integração estável. Plantas *pAtRALF1:AtRALF1-GFP* com 4 dias de idade mostram um sinal da GFP restrito à raiz, preponderante no estágio de desenvolvimento III (diferenciação) e parcialmente no estágio de desenvolvimento II (elongação) (Figura 1A). A marcação com iodeto de propídio (Pi), utilizado em plantas como marcador de parede celular (MARHAVY et al., 2013), registra uma separação do sinal da GFP com outras camadas celulares da raiz (Figura 1A, Sobreposição).

Para investigar esta especificidade do sinal, foi feita uma magnificação da imagem diferenciando células da epiderme, córtex, endoderme e periciclo. Foi constatado que o sinal da GFP é abundante e restrito nas células da endoderme (Figura 1B). O sinal da GFP também foi visualizado em hipocótilos crescidos no escuro (Anexo B).

De forma complementar, foram explorados os dados de expressão gênica gerados por Schmid et al. (2005), depositados na base de dados da Universidade de Toronto (<http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Nessa base de dados, o valor total de expressão gênica para o gene *AtRALF1* é de $3457,53 \pm 6,66$ normalizados pelo método GCOS (TGT=100, Bkg=20), sendo que 67,88% desta expressão correspondem à raiz, 26,21% ao hipocótilo e 5,91% distribuído em outros tecidos (Anexo C). Em outra base de dados de expressão gênica em raízes (BIRNBAUM et al., 2003), a representação gráfica do perfil de expressão do gene *AtRALF1* é majoritária no estágio de desenvolvimento III (diferenciação) (Anexo C). A separação e quantificação por cada camada celular mostram um perfil de expressão mais abundante nas camadas celulares correspondentes a endoderme, córtex, periciclo e tecido vascular (Anexo C).

Figura 1- Anlise de microscopia confocal do peptdeo AtRALF1 fusionado a GFP em razes de plantas transgnicas pAtRALF1:AtRALF1-GFP. (A) Expresso do *AtRALF1-GFP* na regio meristemtica (I), regio de alongao (II) e regio de diferenciao (III). Escala, 100 m. (B) Expresso do *AtRALF1-GFP* nas clulas da endoderme (seta). Escala, 25 m. Pi, iodeto de propdio. * = epiderme, * = cortx, * = endoderme, * = periciclo

4.2 A formação do primórdio de raiz lateral afeta a expressão de *AtRALF1*

De acordo as descrições propostas por (MALAMY; BENFEY, 1997) foi estudado o comportamento do *pAtRALF1:AtRALF1-GFP* nas células da endoderme ao longo dos estágios de desenvolvimento do primórdio de raiz lateral (LRP do inglês “lateral root primordia”) em plantas *pAtRALF1:AtRALF1-GFP*. Para o dado de microscopia confocal utilizando os canais da GFP e o contraste de interferência foi observado que entre os estágios de desenvolvimento I e II (Figura 2A), o sinal da GFP não se alterou em relação ao padrão normal (comparar com Figura 1B). Já no estágio de desenvolvimento III, onde o LRP atravessa a camada da endoderme, o sinal da GFP foi alterado de forma parcial (Figura 2B). Esta alteração se torna mais evidente quando o LRP invade a célula do córtex (Figura 2C, estágio IV), levando ao decréscimo progressivo até a emergência da raiz lateral (Figura 2D). Os dados aqui mostrados sugerem que, o LRP a partir do estágio III altera o sinal da GFP na camada celular da endoderme. Sobre estas observações foi construído um modelo que representa o comportamento do peptídeo *AtRALF1* ao longo de oito (8) estágios de desenvolvimento propostos por (MALAMY; BENFEY, 1997) (Figura 2E).

Figura 2 - Análise de microscopia confocal do peptídeo *AtRALF1* fusionado a GFP durante o desenvolvimento dos primórdios de raiz lateral (LRP). (A) Expressão do *AtRALF1-GFP* durante o estágio II, (B) III e (C) IV, respectivamente. (D) Expressão do *AtRALF1-GFP* durante a emergência da raiz lateral. (E) Representação gráfica do comportamento do *AtRALF1-GFP* ao longo de oito (8) estágios de desenvolvimento (I-VIII). Escala, 200 μ m. ep = epiderme, co=córtex, en=endoderme, pe=periciclo

4.3 Tráfego intracelular do peptídeo AtRALF1

Um exame inicial da estrutura primária dos peptídeos RALF sugere que os peptídeos são secretados (PEARCE et al., 2001b). Para confirmar essa previsão plantas pAtRALF1:AtRALF1-GFP foram tratadas com brefeldina A (BFA), um inibidor de transporte de proteínas que atua especificamente sobre uma família de ARFs-GEFs, denominada GNON (proteína localizada entre ER-Golgi.) em arabidopsis (RICHTER et al., 2007). O efeito de BFA gera a formação de agregados denominados agregados ou corpos de BFA. O tratamento com BFA nas raízes de plantas pAtRALF1:RALF1-GFP levou a formação de agregados característico aos corpos de BFA, diferente de raízes que receberam uma alíquota do solvente DMSO (tratamento controle, Figura 3A-B, setas). Foi realizada a quantificação de corpos de BFA/célula em plantas tratadas e não tratadas, detectando diferenças significativas pelo teste *t* ($p < 0,001$) (Figura C).

Figura 3 - AtRALF1 fusionado a GFP é sensível a brefeldina A (BFA) em plantas pAtRALF1:AtRALF1-GFP . (A) Células da endoderme de plantas pAtRALF1:AtRALF1-GFP tratadas com DMSO e (B) BFA, 50 μ M por 30 min. (C) Quantificação dos corpos de BFA por célula. Barras indicam as médias $\pm$ SD. Asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; teste *t*). ns = não significativo. n = 15 raízes. Experimento repetido duas vezes. Escala, 15 μ m.

Os resultados indicam que o peptídeo AtRALF1 é sensível a BFA, afetando seu transporte intracelular. Com o propósito para desvendar a caracterização do tráfego intracelular do peptídeo AtRALF1 em arabidopsis, foram feitos diferentes cruzamentos entre as linhagens transgênicas pAtRALF1:AtRALF1-GFP e p35S:AtRALF1-mCherry com marcadores de Golgi (ST-mRFP, NST-GFP), post-Golgi/endossomos (RabD1-mCherry) endossomos iniciais ou TGN/*early endosomes* (EEs) (VTI12-mCherry), *recycling endosome* (RE) (RabA1g-mCherry), endossomos tardios ou *late endosomes* (LEs) (RabF2b-mCherry) e vacúolo (SYP22-YFP). Plantas obtidas destes cruzamentos foram avaliadas ainda na primeira geração (F1). Da avaliação do sinal da GFP em células da endoderme de plantas pAtRALF1:AtRALF1-GFP cruzadas com o marcador de Golgi ST-mFRP (ST, domínio transmembrana da sialil transferase de rato) comumente utilizado em plantas (AKKERMAN et al., 2011; LATIJNHOUWERS et al., 2005), conclui-se que AtRALF1 não co-localiza com estruturas de complexo de Golgi (Figura 4A), porém é evidente que há estruturas intracelulares semelhantes ao retículo endoplasmático, estruturas já evidenciadas anteriormente (ESCOBAR et al., 2003).

Pequenas estruturas presentes entre o retículo endoplasmático não foram co-localizadas com a proteína VTI12-mCherry, uma proteína presente no compartimento do(EE) (Figura 4B). Entretanto, as mesmas estruturas apresentaram uma co-localização, ainda que parcial, com a proteína RabD1-mCherry (Figura 4C, setas), uma proteína da família Rab presente no compartimento post-Golgi/endossomos (GELDNER et al., 2009). Da mesma forma foi evidenciado uma co-localização parcial com a proteína RabA1g-mCherry (Figura 4D), presente no compartimento do(RE) e por fim a uma evidente co-localização com a proteína RabF2b-mCherry ou ARA7-mCherry (Fig 4E), uma proteína presente no compartimento do(LE). Não foi observada a presença do peptídeo AtRALF1-GFP no vacúolo (Anexo D).

A super-expressão do gene *AtRALF1-mCherry* em raízes de plantas híbridas p35S:AtRALF1-mCherry/SYP22-YFP (um marcador de membrana vacuolar), mostra que o sinal da mCherry está presente no interior do vacúolo, delimitada pelo marcador de membrana vacuolar (Figura 5A, seta). Provavelmente a detecção do peptídeo AtRALF1-GFP não foi possível pela sua baixa produção quando sob o controle do seu promotor endógeno.

Figura 4 - Localização subcelular do peptídeo AtRALF1 fusionado a GFP (pAtRALF1:AtRALF1-GFP) com marcadores genéticos de endomembrana em raízes. (A) F1: pAtRALF1:AtRALF1-GFP/ST-mRFP, ST-RFP = sialil transferase (ST) trans-cisternae Golgi. (B) F1: pAtRALF1:AtRALF1-GFP/Rab D1-mCherry, GTPase localizado em endossomos do compartimento post-Golgi, setas indicam co-localização. (C) F1: pAtRALF1:AtRALF1-GFP/Rab A1g-mCherry, GTPase localizado no compartimento de endossomos de reciclagem (RE), setas indicam co-localização. (D) F1: pAtRALF1:AtRALF1-GFP/VTI12-mCherry, *VESICAL TRANSPORT V-SNARE 12* presente no compartimento do EE (TGN/EE). (E) F1: pAtRALF1:AtRALF1-GFP/Rab F2b-mCherry, Rab F2b presente no compartimento do (LE), setas indicam co-localização. Escala, 5 μ m.

Diferentemente do cruzamento pAtRALF1:AtRALF1-GFP/ST-mRFP a super-expressão do gene *RALF1-mCherry* co-localiza parcialmente com a região N-terminal da mesma sialil transferase fusionada a GFP (Figura 5B, setas). Isso indica que provavelmente sob o controle do seu próprio promotor, a passagem do peptídeo AtRALF1 para o complexo de Golgi seja mais lenta ou que dependa que algum estímulo seja ativado para ser direcionado.

Figura 5 - Localização subcelular do peptídeo AtRALF1 fusionado a mCherry (p35S:AtRALF1-mCherry) com marcadores de membrana vacuolar e complexo de Golgi em raízes. (A) F1: p35S:AtRALF1-mCherry/SYP22-YFP, SYP22 proteína de transporte vesicular do tipo Qa-SNAREs localizada na membrana de compartimentos pre-vacuolares (PVC) e vacúolo, seta indica o acúmulo da proteína mCherry. (B) F1: p35S:AtRALF1-mCherry/NST-GFP, domínio N-terminal da sialil transferase (ST) presente no complexo de Golgi, setas indicam co-localização. Escala, 8 μ m

Em seguida, foi verificado se o peptídeo AtRALF1 fusionado às proteínas GFP e mCherry são secretados para o apoplasto. As células de raiz das plantas pAtRALF1-AtRALF1-GFP incubadas com iodeto de propídio (Pi) apresentaram uma co-localização parcial com o sinal da GFP (Figura 6A, seta). Sabe-se que o ambiente da parede celular é um ambiente desfavorável para GFP e que o emprego de ambientes tamponados poderia favorecer o sinal (ZHENG et al., 2004). Para intensificar esse sinal, raízes de plantas

pAtRALF1:AtRALF1-GFP foram crescidas por 6 h em meio MS 0,5X, pH 7,0 contendo HEPES 10 mM. Após este período de tamponamento, raízes de plantas pAtRALF1:AtRALF1-GFP foram sometidas à plasmólise com uma solução de sacarose 1M por 30 min. Foi verificado que a membrana plasmática sofreu uma retração, mostrando uma separação de sinal da GFP entre o citosol e o apoplasto (Figura 6B, setas). Um resultado similar foi obtido em plantas super-expressando o gene *AtRALF1-mCherry*, onde sinal da mCherry foi detectado no citosol e no apoplasto (Figura 6C, setas).

Figura 6 - Localização subcelular do peptídeo AtRALF1 fusionado a GFP e mCherry no citosol e apoplasto (A). Co-localização da GFP com iodeto de propídio em raízes de plantas pAtRALF1:AtRALF1-GFP, inset maximização da co-localização, seta indica a sobreposição GFP/Pi. (B) Células de raiz tratadas com HEPES pH 7,0 por 6 h e plasmolizadas; setas mostram a retração da membrana e permanência da GFP no apoplasto. (C) Plasmólise em células de raiz p35S:AtRALF1-mCherry, setas mostram a retração da membrana e permanência da mCherry no apoplasto. Plasmólise feita por 1M de sacarose por 30 min. Escala, 8 μ m.

Por fim, foi verificado se os peptídeos AtRALF1 fusionado às duas proteínas repórteres estavam sendo produzidos de forma íntegra. Para isto, foi feita a imunodeteção das proteínas GFP e AtRALF1 em extratos protéicos de raiz de plantas pAtRALF1:AtRALF1-GFP e p35S:AtRALF1-mCherry. A detecção de uma proteína de 37 kDa em plantas pAtRALF1:AtRALF1-GFP foi atribuída ao precursor pro-AtRALF1-GFP e não ao peptídeo RALF1-GFP, resultado esperado pela baixa disponibilidade da proteína processada sob condições endógenas (Figura 7A). Já o oposto é mostrado em plantas que expressam constitutivamente o gene *AtRALF1-mCherry*, onde há uma proteína de aproximadamente 38

kDa atribuída ao precursor pro-AtRALF1-mCherry e outra proteína de 32 kDa atribuída ao peptídeo processado AtRALF1-mCherry (Figura 7B).

Figura 7 - Imunodetecção em raízes dos peptídeos AtRALF1 fusionados as duas proteínas fluorescentes GFP e mCherry. (A) Imunodetecção da GFP em extratos protéicos de raiz procedente de plantas pAtRALF1:AtRALF1-GFP e Col-0, anti-GFP 1/5000. (B) Imunodetecção do peptídeo AtRALF1 em extratos protéicos de raiz procedente de plantas p35S:AtRALF1-mCherry e Col-0, anti-AtRALF1 (1/5000)

Para confirmar a funcionalidade das proteínas fusionadas as proteínas repórteres, foram avaliados e comparados todos os fenótipos das plantas que super-expressam o gene *AtRALF1-mCherry* (p35S:AtRALF1-mCherry) com plantas que super-expressam o gene *AtRALF1* (p35S:AtRALF1) e Col-0. Inicialmente foram obtidos sete eventos transgênicos independentes de plantas que super-expressam o gene *AtRALF1-mCherry* (p35S:AtRALF1-mCherry). Os fenótipos encontrados nesses eventos são semelhantes aos fenótipos descritos para a super-expressão do gene *AtRALF1* (BERGONCI et al., 2014; MATOS et al., 2008). Os autores descrevem que a super-expressão do gene *AtRALF1* pelo promotor viral 35S, promove um fenótipo semi-anão em plantas, assim como uma redução no crescimento de raízes e hipocótilos e uma menor densidade de raízes laterais. Adicionalmente aos fenótipos aqui caracterizados, plantas que super-expressam o gene *AtRALF1* e *AtRALF1-mCherry* apresentam uma redução da zona conjunta (meristemática e elongação) em raízes. Assim como um maior comprimento dos pelos radiculares em raízes de plantas p35S:AtRALF1, p35S:AtRALF1-mCherry comparadas ao Col-0 (Anexo E). Além dos fenótipos caracterizados,

foram detectados por extratos protéicos, utilizando o anticorpo anti-AtRALF1, as proteínas produzidas em cada genótipo (Anexo E, Fig 7B).

4.4 AtRALF1 é internalizado

Anteriormente foi demonstrado que o peptídeo AtRALF1 é secretado, e peptídeos hormonais que são secretados, a exemplo do que ocorre em animais, podem ser internalizados (CLAGUE, 1998). Para investigar se o AtRALF1 é internalizado foram realizados experimentos de imunolocalização do peptídeo recombinante AtRALF1 em células de raízes de arabidopsis. Primeiramente foi produzido e purificado de forma heteróloga o peptídeo recombinante AtRALF1, testando sua atividade no ensaio de crescimento de raiz e alcalinização. Experimentos de inibição de raiz mostram que o peptídeo mantém uma atividade dose-dependente (Figura 8A), sendo possível observar um decréscimo gradual no tamanho de raízes comparadas ao controle (Figura 8B). A adição de uma alíquota do peptídeo em células MM1 de arabidopsis levou a uma forte e rápida alcalinização por um intervalo de 0-15 min (Figura 8C), resposta iônica própria do peptídeo (MORATO DO CANTO et al., 2014). A identidade da proteína foi confirmada pela imunodeteção contra um anticorpo específico anti-AtRALF1 (Figura 8D). Os resultados confirmam que o peptídeo recombinante é ativo para alcalinização e para a inibição do crescimento de raiz.

A imunodeteção do peptídeo AtRALF1 pelo anticorpo anti-AtRALF1 demonstrou que o anticorpo é capaz de detectar o peptídeo de forma específica. Em seguida, foi estudado se a adição do peptídeo AtRALF1 em raízes promovia sua internalização. Para isso, foi realizada a imunolocalização do peptídeo AtRALF1 no interior das células de raízes tratadas por 5 min sob diferentes concentrações. A análise da intensidade interna do fluoróforo -Cy3 em células de raiz mostra que existe uma resposta dose-dependente conforme o peptídeo é adicionado em comparação com as plantas que não foram tratadas com o peptídeo (Figura 9A). Todos os valores de intensidade interna mensurada em pixels (px) foram plotados em um gráfico de barras (Figura 9B), determinando diferenças significativas entre cada tratamento pelo teste *t* ($p < 0,001$). A detecção do peptídeo intracelularmente em pouco tempo (5 min) mostra que o peptídeo é internalizado de forma rápida. Para confirmar esta dinâmica de internalização foram feitas incubações rápidas em 10 s, 60 s e 5 min. Surpreendentemente, o sinal da Cy3 foi detectado aos 10 s incrementando-se até os 60 s e 5 min (Figura 9C).

Diferenças significativas crescentes foram detectadas pelo teste *t* ($p < 0,001$) à medida que a incubação é mais longa (Figura 9D).

Figura 8 - Atividade do peptídeo recombinante AtRALF1. (A) Comprimento de raiz sob diferentes concentrações do peptídeo AtRALF1 (μM) avaliados em 48 h. (B) Representação gráfica de plantas tratadas com diferentes concentrações do peptídeo AtRALF1 após o experimento. (C) Atividade de alcalinização do peptídeo AtRALF1 (1 μM) por um intervalo de 15 min. (D) Imunodeteção do peptídeo AtRALF1 sob diferentes concentrações (ng). Barras indicam as médias ± SD. Asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,01$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$; teste *t*). Escala, 0,3 cm

Alternativamente foi feita a imunolocalização do peptídeo AtRALF1 em raízes de plantas que super-expressam o gene *AtRALF1* (p35S:AtRALF1). Intensidade de fluorescência interna por célula mostra que o peptídeo AtRALF1 é mais abundante em plantas que super-expressam o gene *AtRALF1* quando comparadas com plantas selvagens Col-0 (Anexo F). Como um controle e para determinar se o sinal da –Cy3 é referente ao peptídeo AtRALF1 foi

feita a imunolocalização de raízes de todos os genótipos usados na ausência do anticorpo primário (anti-AtRALF1). O resultado de fluorescência em raízes mostra uma intensidade de sinal mais fraco daquele observado em plantas que receberam o anticorpo primário (comparar Anexo G, Figura 9A, Figura 9C).

Figura 9 - Imunolocalização do peptídeo AtRALF1 em células de raiz de arábidoopsis. (A) Imunolocalização do peptídeo AtRALF1 em células de raiz tratadas por 5 min sob diferentes concentrações (0, 10, 50 e 100 nM), 15 min de incubação após lavagem em meio MS 0,5X, pH 5,75 sem peptídeo. (B) Quantificação do sinal interno da -Cy3 em células individuais. (C) Imunolocalização de 100 nM do peptídeo AtRALF1 em raízes por intervalos de 0, 10, 60 e 500 s respectivamente. (D) Quantificação do sinal interno da -Cy3 em células individuais. Todos os experimentos foram repetidos 5 vezes de forma independentes, n=15 raízes(5 células/raiz). . Barras indicam as médias $\pm$ SD. Asteriscos indicam diferenças significativas (* p<0,01; ** p<0,005; *** p<0,001; teste t)

Os dados mostrados indicam que o peptídeo AtRALF1 é internalizado de forma rápida em células de raiz de arábidoopsis.

4.5 A internalização do peptídeo AtRALF1 é mediado por clatrina

Sabe-se que a internalização de ligantes pode ser mediada por receptores e ser dependente de clatrina, uma proteína essencial para a formação de vesículas endocíticas em células eucariotas. O complexo AP-2 ou AP presente tanto em animais como em plantas foi sugerido como uma componente chave no reconhecimento de proteínas cargo dependentes de clatrina. *Tyrphostin* A23 (TyrA23), um inibidor que interfere no reconhecimento do complexo AP-2 sobre domínios YxxØ presente nos domínios citoplasmáticos de proteínas cargo, usado extensamente em plantas para interferir a internalização de proteínas de membrana (BECK et al., 2012; DI RUBBO et al., 2013; IRANI, NILOUFER G. et al., 2012), foi utilizado nos experimentos de imunolocalização, desta vez a concentração do peptídeo foi mais alta por um período de incubação de 20 min. A análise da imunolocalização representada pela intensidade da -Cy3 revelou que em 20 min de incubação, raízes sem o inibidor TyrA23 apresentou um diferencial entre raízes tratadas e não tratadas (Figura 10A-B), a quantificação da intensidade em unidades pixel da -Cy3 mensurada para cada célula apresentou diferenças significativas pelo teste *t* ($p < 0,001$) (Figura 10C). Resultados opostos foram obtidos na presença do inibidor TyrA23 (Figura 10 D-E), não apresentando diferenças significativas entre plantas tratadas e não tratadas (Figura 10F). A não internalização do peptídeo AtRALF1 pela interferência do inibidor TyrA23 sugere que a entrada do peptídeo seja dependente do complexo AP em plantas. Para confirmar esta observação, foram usadas plantas mutantes com inserção de T-DNA (SALK_083693, $\mu 2$) do gene (At5g46630) que codifica a proteína AP2M, uma subunidade do complexo AP2 em arabidopsis. A análise da imunodeteção do peptídeo AtRALF1 tratado e não tratado no mutante $\mu 2$ não apresentaram diferenças no sinal da -Cy3 (Figura 10 G-H), portanto não houve a detecção de diferenças significativas nos valores de intensidade em pixels (Figura 10I).

Figura 10 - Imunolocalização do peptídeo AtRALF1 na presença de TyrA23 e $\mu 2$ em células de raiz de arábido. (A-B) Imunolocalização do peptídeo AtRALF1 em células de raiz de plantas Col-0. (C) Quantificação do sinal interno da -Cy3 por cada célula (D-E) Imunolocalização do peptídeo AtRALF1 na presença do inibidor de endocitose TyrA23 (F) Quantificação do sinal interno da -Cy3 por cada célula. (G-H) imunolocalização do peptídeo AtRALF1 em plantas com perda de função $\mu 2$, uma subunidade medial AP2M do complexo AP2. (I) Quantificação do sinal interno por célula. Todos os experimentos foram repetidos três vezes de forma independente, n=15 raízes (5 células/raiz). Barras indicam as médias $\pm$ SD. Asteriscos indicam diferenças significativas (* p<0,01; ** p<0,005; *** p<0,001; teste t), ns = não significativo. Tratamento de 200 nM do peptídeo AtRALF1 por 20 min. Escala = 8 μ m

Paralelamente a este experimento foi avaliado o efeito do inibidor TyrA23 em plantas pAtRALF1:AtRALF1-GFP. Raízes tratadas com TyrA23 (50 μ M) por 30 min apresentaram um acúmulo progressivo da GFP na membrana plasmática diferente de raízes não tratadas (Figura 11 A).

Figura 11 - Efeito de TyrA23 e XVE>>Auxilin no peptídeo endógeno AtRALF1 fusionado a GFP. (A) Tratamento exógeno do solvente DMSO e TyrA23 (50 μ M) em raízes de plantas pAtRALF1:AtRALF1-GFP, células da endoderme mostram o acúmulo da proteína GFP, setas. (B). Quantificação do sinal de fluorescência GFP na membrana plasmática de cada célula tratada. (C) Indução da XVE>>Auxilin na presença e ausência de 5 μ M de β -estradiol por 24 h em plantas F1: XVE>>Auxilin/pAtRALF1:AtRALF1-GFP, células da endoderme mostram o acúmulo da GFP na membrana plasmática, setas. (D) Quantificação do sinal de fluorescência da proteína GFP na membrana plasmática de cada célula tratada. Barras indicam as médias $\pm$ SD. Asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,01$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$; teste t). $n = 20$ raízes. Escala = 10 μ m

Diferenças na intensidade de sinal para a proteína GFP na membrana plasmática foram quantificadas e plotadas em um gráfico de barras onde foram detectadas diferenças significativas pelo teste *t* ($p < 0,001$) (Figura 11C). Em animais, AUXILINs são proteínas citosólicas responsáveis pelo desacoplamento das clatrininas que revestem as vesículas internalizadas, a super-expressão da *AUXILIN* em plantas (*AUXILIN-LIKE 1*) bloqueia a maquinaria da endocitose mediada por clatrina (ADAMOWSKI, M., FRIML, J. *UNPUBLISHED*), regulando negativamente a polimerização de novas estruturas pré-formadas na membrana plasmática. Utilizando uma linhagem XVE>>Auxilin induzida por β -stradiol, um esteroide hormonal que reconhece o ativador de transcrição quimérico (XVE) (ZUO; NIU; CHUA, 2000) foi utilizada para geração de híbridos F1. Híbridos F1: XVE>>Auxilin/pAtRALF1:AtRALF1-GFP induzidos por 5 μ M de β -stradiol por 24 h, promoveram o acúmulo da GFP na membrana plasmática (Figura 11D), diferente de híbridos que não foram induzidos por β -stradiol (Figura 11E). A quantificação de intensidade de sinal foi mensurada e plotada em um gráfico de barras (Figura 11F), detectando diferenças significativas pelo teste de *t* ($p < 0,01$).

4.6 CLATHRIN LIGHT CHAIN 2 (CLC2) e CLATHRIN LIGHT CHAIN 3 (CLC3) são essenciais para a inibição do crescimento da raiz e redução da densidade de primórdios de raiz lateral causados pelo peptídeo AtRALF1

Clatrina é uma proteína multimérica composta por cadeias leves (CLATHRIN LIGHT CHAIN, CLC) e cadeias pesadas (CLATHRIN HEAVY CHAIN, CHC) que é essencial na formação de vesículas membranosas no interior das células eucariotas (HOLSTEIN, 2002). Para investigar se as proteínas relacionadas à clatrina são essenciais na inibição do crescimento da raiz primária e redução da densidade da raiz lateral, os mutantes por inserção do T-DNA *clc1* (Salk_133492), *clc2* (Salk_093840), *clc3* (Salk_024235) e *clc2-1xclc3-1* foram obtidos. Transcritos do *CLC1*, *CLC2* não foram detectados em análises de RT-PCR semi-quantitativo utilizando RNA exclusivamente de raízes dos mutantes *clc1* e *clc2*. Os transcritos *CLC3* foram detectados em nível baixo para o mutante *clc3*. Por fim, os transcritos *CLC2* e *CLC3* não foram detectados no duplo mutante *clc2-1xclc3-1* (Anexo H).

Os mutantes confirmados *clc1*, *clc2*, *clc3* e *clc2-1xclc3-1* foram submetidos primeiramente ao ensaio de inibição do crescimento da raiz primária. Plantas com dois dias após a germinação em meio semisólido foram tratadas com diferentes concentrações do peptídeo AtRALF1 em meio líquido, e o crescimento de raízes foi avaliado após 2 dias. Os

resultados indicam uma resposta dose-dependente na inibição do crescimento da raiz primária em plantas selvagens (Col-0) e em mutantes *clc1* e *clc3*. O mutante *clc2* foi diferente, mostrando insensibilidade a 1 μM e sensibilidade a 5 μM . O duplo mutante *clc2-1xclc3-1*, embora tenha mostrado uma redução do comprimento da raiz primária proporcional ao aumento da concentração, a redução não se mostrou estatisticamente significativa quando comparada a observada em plantas selvagens (Figura 12).

Figura 12 - Ensaio de inibição do crescimento da raiz primária nos mutantes *clc1*, *clc2*, *clc3* e *clc2-1xclc3-1* e plantas Col-0. Plantas foram tratadas exógenamente com 0, 1 e 5 μM de AtRALF1 em meio líquido por 48 h. Barras indicam as médias $\pm$ SD. Diferenças significativas detectadas pelo teste de tukey ($p < 0,01$). Letras diferentes indicam diferenças significativas. $n = 80$ plantas. Repetições = 3.

Para a avaliação da densidade dos primórdios de raízes laterais foram feitos experimentos em meio semisólido onde as placas contendo as plantas são deixadas na posição vertical. A contagem de primórdios de raiz lateral (LRP) foi realizada entre os estágios I – VIII e estes valores foram divididos pelo comprimento total da raiz em cm, obtendo uma densidade de primórdios de raiz lateral (LRP/cm). A exposição ao peptídeo AtRALF1 por sete dias reduziu a densidade de LRP em plantas Col-0. A exposição da mesma concentração em plantas mutantes *clc2*, *clc3* e *clc2-1xclc3-1* não promoveu a redução da densidade de LRP como em plantas Col-0, causando um efeito oposto à redução da densidade de LRP (Figura 13). A análise estatística pelo teste t ($p < 0,001$) indica diferenças significativas para cada genótipo avaliado. Foi constatado também que nos mutantes *clc2*, *clc3* e *clc2-1xclc3-1*, existe um menor crescimento de raízes primárias e uma menor densidade de LRP que em plantas Col-0.

Figura 13 - Efeito do peptídeo AtRALF1 na densidade de primórdios de raiz lateral nos mutantes *clc2*, *clc3* e *clc2-1xclc3-1* e plantas Col-0. Densidade de primórdio de raiz lateral (LRP) em plantas Col-0, *clc2* (Salk_093840) e *clc3* (Salk_024235) e *clc2-1xclc3-1* crescidas verticalmente em meio MS semisólido contendo 2 µM do peptídeo AtRALF1 por 7 dias. Barras indicam as médias ± SD. Asteriscos indicam diferenças significativas * $p < 0,01$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$; teste *t*), ns = não significativo. $n = 10$ raízes. Repetições = 2

Para estudar se as proteínas CLC2 e CLC3 são essenciais para a manifestação do fenótipo semi-anão de plantas que super-expressam o gene *AtRALF1*, plantas transgênicas p35S:AtRALF1 foram cruzadas com o duplo mutante *clc2-1xclc3-1*, resultando no híbrido p35S:AtRALF1/*clc2-1xclc3-1*. A partir de DNA genômico, a inserção do T-DNA em homozigose e a presença do p35S:AtRALF1 em progênies F3: p35S:AtRALF1/*clc2-1xclc3-1* foram confirmadas PCR usando iniciadores gene-específicos (Anexo A).

As plantas p35S:AtRALF1 mostram uma redução do crescimento da raiz principal, enquanto as raízes principais de plantas F3 do cruzamento p35S:AtRALF1/*clc2-1xclc3-1* cresceram e se desenvolveram normalmente, sendo semelhantes às raízes principais do duplo mutante *clc2-1xclc3* (Figura 14A). A medição do comprimento de raiz entre os genótipos Col-0 e p35S:AtRALF1 mostrou diferenças significativas pelo teste *t* ($p < 0,001$) e a comparação entre os genótipos *clc2-1xclc3-1* e p35S:AtRALF1/*clc2-1xclc3-1* não apresentou diferenças significativas (Figura 14 B). De forma similar, foram realizadas as avaliações no comprimento de hipocótilos crescidos no escuro. Da mesma forma que em raízes, plantas que

super-expressam o gene *AtRALF1* leva a geração de hipocótilos curtos comparados a plantas Col-0. Plantas F3 do cruzamento p35S:*AtRALF1/clc2-1xcl3-1* apresentaram hipocótilos normais (Figura 14 C-D).

Além dos fenótipos relacionados à raiz e do hipocótilo, foi avaliada a densidade de LRP em plantas Col-0, p35S:*AtRALF1*, *clc2-1xcl3-1* e p35S:*AtRALF1/clc2-1xcl3-1*, respectivamente. Os dados demonstram que a super-expressão do gene *AtRALF1* no duplo mutante *clc2-1xcl3-1*(F3:p35S:*AtRALF1/clc2-1xcl3-1*) não afeta a redução da densidade de LRP promovida pela super-expressão do gene *AtRALF1*(p35S:*AtRALF1*), atuando de uma forma oposta (Figura 14E). Este resultado é semelhante quando existe a adição do peptídeo recombinante no duplo mutante *clc2-1xcl3-1*. De igual forma plantas p35S:*AtRALF1* apresentam raízes com pelos radiculares maiores que em plantas Col-0 (Anexo E), este fenótipo não é evidente nas progênies F3: p35S:*AtRALF1/clc2-1xcl3-1* (Figura 14F).

Para confirmar o acúmulo de transcritos em progênies F3: p35S:*AtRALF1/clc2-1xcl3-1* uma análise por RT-PCR semi-quantitativo foi realizado em raízes das progênies F3 comparados com plantas Col-0, p35S:*AtRALF1* e *clc2-1xcl3-1*. A análise confirmou a presença de transcritos do gene *AtRALF1* de forma abundante nas plantas p35S:*AtRALF1* e progênies F3: p35S:*AtRALF1/clc2-1xcl3-1* (Figura 14 G).

Os resultados aqui mostrados indicam que a perda de função de duas clatrininas de cadeia leve (CLC2 e CLC3) em arabidopsis afeta o efeito da super-expressão do gene *AtRALF1*.

Figura 14 - Análise fenotípica e RT-PCR semi-quantitativo em plantas Col-0, p35:AtRALF1, *clc2-1xcl3-1* e progênies F3: p35S:AtRALF1/*clc2-1xcl3-1*. (A,B,C,D) Representação gráfica e comparação de médias do comprimento da raiz e do hipocótilo. (E) Comparação de médias da densidade de LRP. (F) Representação gráfica do comprimento de pelos radiculares. (G) Análise de transcritos do gene *AtRALF1* por RT-PCR semi-quantitativo. *GAPDH* (*GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE*) foi usado como controle da síntese do cDNA. Barras indicam as médias $\pm$ SD. Asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,01$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$; teste *t*), ns = não significativo. $n = 20$ raízes, $n = 60$ hipocótilos. Repetições = 3. Escala = 0,5 cm

4.7 Os genes *CLC1*, *CLC2* e *CLC3* são induzidos pelo peptídeo AtRALF1

Foi investigado se a adição exógena do peptídeo AtRALF1 em plantas selvagens altera a expressão dos genes *CLC1*, *CLC2* e *CLC3*. Os genes *CLC1*, *CLC2* e *CLC3* foram rapidamente (30 min) induzidos quando comparados a plantas sem tratamento (Figura 15A). Também foram criadas plantas transgênicas, cinco eventos independentes, contendo o promotor e o gene *CLC3* fusionados ao gene *GFP-GUS* (pCLC3:CLC3-GFP-GUS). As plantas de um evento transgênico representativo foram tratadas por 4 h com 1 μ M do peptídeo AtRALF1 (Figura 15B). Foram detectadas diferenças significativas na intensidade de sinal do GUS pelo teste *t* ($p < 0,001$) (Figura 16C).

Figura 15 - Análise de expressão dos genes *CLC1*, *CLC2* e *CLC3* em raízes de arábida. (A) RT-PCR semi-quantitativo nos genes *CLC1*, *CLC2* e *CLC3* em raízes de plantas selvagens (Col-0) tratadas e não tratadas com 1 μ M do peptídeo AtRALF1 por 30 min, 28 ciclos. $n=3$. *GAPDH* (*GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE*) foi usado como controle da síntese do cDNA. (B) Presença da β -glucuronidase (GUS) em raízes de plantas pCLC3:CLC3-GFP-GUS tratadas e não tratadas com 1 μ M do peptídeo AtRALF1 durante 4 h. (C) Quantificação do sinal do GUS. Barras indicam as médias $\pm$ SD. Asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,01$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$; teste *t*), ns = não significativo $n = 15$ raízes. Escala = 0,5 cm

4.8 A indução gênica causada pelo peptídeo AtRALF1 é dependente da maquinaria de endocitose mediada por clatrina

O tratamento do peptídeo de forma exógena em raízes de arábida, promove a indução de genes *AtPRP1* (*PROLINE-RICH PROTEIN 1*), *AtPRP3* (*PROLINE-RICH PROTEIN 3*), *AtHRGP2* (*HYDROXYPROLINE-RICH GLYCOPROTEIN 2*), *TCH4*

(*XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 22*), que estão relacionados ao rearranjo da parede celular (BERGONCI et al., 2014). Com a finalidade de encontrar uma relação entre a endocitose do peptídeo AtRALF1 sobre estas respostas gênicas, foram utilizados dois inibidores de endocitose TyrA23 e Wm, e o inibidor de secreção BFA. A análise por RT-PCR semi-quantitativo dos genes *AtPRP3* e *AtHRGP2* em raízes de arabidopsis não mostrou mudanças significativas na expressão quando somente existe a presença de TyrA23, Wm e BFA (Figura 16A). Posteriormente, a adição de 1 μ M de AtRALF1 em raízes tratadas com DMSO e BFA promoveu uma indução normal dos genes *AtPRP3* e *AtHRGP2* (Figura 16B) e uma resposta parcial quando o peptídeo AtRALF1 foi adicionado na presença de TyrA23 e Wm (Figura 16B).

Figura 16 - Análise por RT-PCR semi-quantitativo dos genes induzidos por AtRALF1 na presença dos inibidores de endocitose em raízes de arabidopsis. (A) Efeito dos inibidores TyrA23 (30 μ M), Wm (30 μ M), BFA (25 μ M) e o solvente DMSO na expressão dos genes *AtPRP3* e *AtHRGP2*, sem a adição do peptídeo . (B) Efeito dos inibidores TyrA23 (30 μ M), Wm (30 μ M), BFA (25 μ M) na expressão dos genes *AtPRP3* e *AtHRGP2*, na presença de 1 μ M do peptídeo AtRALF1, avaliado por 30 min. 28 ciclos. O gene *TUBULIN* foi usado como controle da síntese do cDNA. Os experimentos foram repetidos três vezes de forma independente.

O gene semelhante a calmodulina (*CALMODULIN-LIKE 38*, *CML38*) também induzido pelo peptídeo AtRALF1 (HARUTA et al., 2014) foi usado nos experimentos de expressão gênica. Desta vez, foram gerados quatro eventos transgênicos independentes que expressam o gene *AtCML38* fusionado ao gene da proteína verde fluorescente (GFP), sob o controle do promotor endógeno (*pAtCML38:AtCML38-GFP*). A adição do peptídeo AtRALF1 em raízes de plantas *pAtCML38:AtCML38-GFP* apresentou uma indução do CML38-GFP dose-dependente (Figura 17A). A medida da intensidade de fluorescência em

três regiões de desenvolvimento da raiz (I= região meristemática, II= região de alongação e III= região de diferenciação) para cada tratamento mostrou diferenças significativas pelo teste t ($p < 0,001$) (Figura 17 B).

Figura 17 - Efeito dose resposta da produção proteica CML38-GFP na presença do peptídeo AtRALF1 em raízes de plantas pAtCML38:AtCML38-GFP. (A) Raízes de plantas pAtCML38:AtCML38-GFP crescidas por 4 dias em placas verticais foram transferidas para diferentes concentrações de 0, 0,5 e 1,0 µM do peptídeo AtRALF1 por 4 h sob agitação. (B) Quantificação da intensidade de fluorescência da GFP das três regiões de desenvolvimento da raiz (III, II e I). Barras indicam as médias $\pm$ SD. Asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,01$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$; teste t). $n = 15$ raízes. Escala = 100 µm

As plantas pAtCML38:AtCML38-GFP, incubadas por 4 h com DMSO, TyrA23, Wm e BFA não mostraram indução do gene *AtCML38* (Figura 18A). Essa resposta indica que as concentrações dos inibidores utilizados não alteram uma possível indução gênica do gene *AtCML38*. A adição de 1 µM do peptídeo recombinante AtRALF1 em plantas co-incubadas com DMSO e BFA promoveram a indução do gene *AtCML38*. Já a adição do peptídeo AtRALF1 com TyrA23 (30 µM) e Wm (20 µM) promoveu uma menor fluorescência, sugerindo uma inibição parcial da resposta ao peptídeo (Figura 18B-C). A BFA, uma toxina que afeta a secreção de proteínas, não afetou a indução do gene *pAtCML38:AtCML38-GFP* (Figura 18B-C).

Figura 18- Efeito dos inibidores de endocitose na produção proteica CML38-GFP induzida pelo peptídeo AtRALF1 em raízes de plantas pAtCML38:AtCML38-GFP. (A) Raízes de plantas pAtCML38:AtCML38-GFP crescidas por 4 dias e transferidas na presença de TyrA23 (30 μ M), Wm (20 μ M), BFA (25 μ M) e DMSO por 4 h sob agitação e (B) adição de 1 μ M do peptídeo recombinante AtRALF1. (C) Quantificação da intensidade de fluorescência da GFP das três regiões de desenvolvimento da raiz (III, II e I) dos experimentos da Figura 19 A-B. Barras indicam as médias $\pm$ SD. Asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,01$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$; teste t). $n = 15$ raízes. Escala = 100 μ m

A interferência dos inibidores TyrA23 e Wm na indução dos genes *AtPRP3* e *AtHRGP2*, e produção da proteína CML38-GFP, sugerem que a maquinaria de endocitose mediada por clatrina seria essencial para a sinalização do peptídeo AtRALF1. Para confirmar esta previsão foi feita uma análise por RT-PCR semi-quantitativo dos genes *AtPRP3*, *AtHRGP2* e *CML38* em plantas com perda de função das clatrininas de cadeia leve CLC1 (*clc1*), CLC2 (*clc2*), CLC3 (*clc3*) e o duplo mutante *clc2-1xclc3-1*.

Figura 19 - Análise por RT-PCR semi-quantitativo dos genes induzidos por AtRALF1 em Col-0 e nos mutantes *clc1*, *clc2*, *clc3* e *clc2-1xclc3-1* em raiz. Efeito do peptídeo AtRALF1 (1 μ M) na indução dos genes *AtPRP3*, *AtHRGP2* e *AtCML38* em raízes de plantas selvagens Col-0 e mutantes *clc1*, *clc2*, *clc3* e *clc2-1xclc3-1*, indução avaliada por 20 min e analisada em 28 ciclos. n=3. *GAPDH* (GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE) foi usado como controle da síntese do cDNA. Foram realizados três experimentos de forma independente. n= 20 plantas por cada tratamento

O tratamento exógeno do peptídeo AtRALF1 em raízes de Arabidopsis Col-0 leva a uma indução dos genes *AtPRP3*, *AtHRGP2* e *AtCML38* durante 20 min, uma resposta que é reprimida nos mutantes *clc1*, *clc2*, *clc3* e *clc2-1xclc3-1* (Figura 19) A resposta parcial dos genes induzidos (*AtPRP3*, *AtHRGP2* e *CML38*) nos mutantes *clc1*, *clc2*, *clc3* e *clc2-1xclc3-1* indica que as proteínas CLC1, CLC2 e CLC3 são necessárias para sinalização do peptídeo AtRALF1.

4.9 A resposta de alcalinização causada pelo peptídeo AtRALF1 é independente da maquinaria de endocitose mediada por clatrina

Além da sinalização mediada pela indução gênica sabe-se que o peptídeo promove uma alcalinização rápida do meio extracelular de células em suspensão. Baseado nesta atividade foram empregadas estratégias farmacológicas e genéticas com o intuito de descobrir se estas respostas são também dependentes da maquinaria da endocitose.

Ensaio de alcalinização em células de arabidopsis MM1 indicaram que a alcalinização causada por 100 nM de AtRALF1 é inibida por TyrA23 e Wm mas não por

BFA (Figura 20A). Porém, este efeito inibitório não é observado nas concentrações maiores de AtRALF1, 300 e 500 nM (Figura 20 B-C). .

Para descartar efeitos de alcalinização que poderiam ser provocados pelos inibidores de endocitose, foi verificado o valor do pH inicial antes da adição dos inibidores e um pH final depois da adição dos inibidores durante um período de 30 min. Os valores expressos em Δ pH indicam que a interferência dos inibidores em células em suspensão não foi significativa (Anexo I).

Figura 20 - Ensaio de alcalinização em células em suspensão na presença de inibidores de endocitose. (A) Células MM1 tratadas com 100nM, (B) 300 nM e (C) 500 nM do peptídeo AtRALF1 na presença de TyrA23 (30 μ M), Wm (20 μ M), BFA (25 μ M), DMSO e H2O. H2O e DMSO sem peptídeo foi utilizado como controle. Valores expressados em Δ pH foram registrados em 10 min (barras brancas), 20 min (barras cinzas) e 30 min (barras pretas). Barras indicam as médias $\pm$ SD. Os experimentos foram repetidos três vezes de forma independente

De forma alternativa, foram transferidas 20 plantas dos genótipos Col-0, *clc2*, *clc2-1xclc3-1* e *chc2* para placas contendo um gel indicador de pH (WU et al., 2007). Uma alíquota de AtRALF1 (2 μ M) foi colocada sobre a rizosfera de cada planta por 5 min. Após esse tempo, placas com plantas tratadas e não tratadas foram colocadas de forma vertical. Após 20 min, raízes de plantas Col-0 tratadas com o peptídeo AtRALF1 exibiram uma alcalinização na rizosfera verificada pela mudança gradual da cor amarela para púrpura (Figura 21A). Plantas tratadas com H₂O não mostraram alteração. Uma resposta semelhante foi verificada em todas as rizosferas dos mutantes por inserção de T-DNA *clc2*, *clc2-1xclc3-1*, *chc2-1* (Figura 21 B-E). Diferentemente da resposta gênica, a resposta de alcalinização promovida pelo peptídeo AtRALF1 não é dependente da maquinaria de endocitose mediada por clatrina.

Figura 21- Alcalinização da rizosfera de plantas selvagens (Col-0), mutantes simples *clc2*, *chc2-1* e do duplo mutante *clc2-1xclc3-1* em resposta ao peptídeo AtRALF1. Plantas foram crescidas por seis dias e logo transferidas para placas contendo gel indicador de pH (0,006% bromocresol purple, 1 mM CaSO₄, pH 6,2) (WU et al., 2007). Genótipos (A) Col-0. (B) *clc2*. (C) *clc2-1xclc3-1* e (D) *chc2-1* foram tratados transientemente por 5 minutos a uma concentração final de 2 μ M do peptídeo AtRALF1 (lado direito) e plantas tratadas apenas com água (lado esquerdo). O registro das imagens foi a feito em 20 minutos após tratamento

5 DISCUSSÃO

Os peptídeos RALF em arábida formam uma família multigênica cujos membros podem apresentar expressão generalizada ou tecido-específica (CAO; SHI, 2012; MORATO DO CANTO et al., 2014). A visualização da proteína verde fluorescente (GFP) fusionada ao gene *AtRALF1* sob o controle do promotor endógeno, exibiu uma localização restrita a raiz e hipocótilo (Figura 1A, Anexo B). A localização em raízes pelo sinal da GFP mostra que o gene se expressa exclusivamente na região de diferenciação, parcialmente na região de alongação e raramente na região meristemática (Figura 1A). Uma análise mais detalhada sobre as camadas celulares da região de diferenciação mostra que a GFP é produzida preponderantemente nas células da endoderme (Figura 1B). Estas observações são um pouco diferentes do descrito por (HARUTA et al., 2008), onde o acúmulo da proteína GUS fusionada ao promotor endógeno *AtRALF1* é encontrada nos feixes vasculares, córtex e endoderme. Esta falta de especificidade relatada por Haruta et al. (2008) pode ser atribuída a difusão do sinal produzido pela enzima GUS para outras camadas celulares próximas a endoderme. Por outro lado, a localização do peptídeo AtRALF1 em raízes e hipocótilos também é predito e mostrado experimentalmente por (SCHMID et al., 2005), com uma maior expressão na zona de diferenciação restrita a células da endoderme e córtex (BIRNBAUM et al., 2003) (Anexo C).

A produção do peptídeo AtRALF1-GFP nas células da endoderme é alterada em locais específicos onde os primórdios de raiz lateral são formados. O sinal da GFP durante os primeiros estágios de desenvolvimento dos primórdios de raiz lateral (I e II) não é alterado (Figura 2A), já a partir do estágio de desenvolvimento III começa uma mudança de sinal quando o primórdio atravessa a célula da endoderme (Figura 2B), posteriormente o sinal da GFP diminui quando o primórdio atravessa as células do córtex (Figura 2C, estágio IV), esta diminuição se torna mais evidente conforme o primórdio continue o desenvolvimento até sua emergência (Figura 2D, raiz lateral). A redução do número de raízes laterais já observada em plantas que super-expressam o gene *AtRALF1* (BERGONCI et al., 2014), fornecem outra evidência para uma ligação do AtRALF1 com o mecanismo de regulação da densidade de raiz lateral.

Os peptídeos RALF foram preditos como peptídeos secretados por apresentarem uma sequência de aminoácidos na região N-terminal com características de endereçamento para via secretória (PEARCE et al., 2001b). Buscando um melhor entendimento sobre esta secreção e tráfego do peptídeo AtRALF1, foram utilizados inibidores de secreção e marcadores genéticos de organelas fusionadas a proteínas fluorescentes. Primeiramente, a exposição de plantas pAtRALF1:AtRALF1-GFP ao tratamento com brefeldina A (BFA) levou a formação de agregados de BFA em 30 min (Figura 3 A-C). Estes resultados indicam que o efeito de BFA altera o tráfego do peptídeo AtRALF1-GFP entre retículo endoplasmático e o complexo de Golgi (ER-Golgi). É bem conhecido que a via de secreção ER-Golgi envolve uma dinâmica de tráfego sobre um sistema de endomembranas (DENECKE et al., 2012; FORESTI; DENECKE, 2008). A utilização dos marcadores genéticos fluorescentes são ferramentas propícias para identificar locais específicos de residência ou passagem. A sialil transferase de rato fusionada a proteína monomérica fluorescente vermelha mRFP (ST-mRFP) sugere que o peptídeo AtRALF1 não passa pelo complexo de Golgi (Figura 4A). Uma estrutura que também foi evidenciada no precursor (NtRALF) procedente de *Nicotiana benthamiana* (ESCOBAR et al., 2003).

Endossomos são compartimentos essenciais de integração proteica, reciclagem e degradação de proteínas de membrana ou moléculas externas, assim como de vital importância para processos que possibilitam a sinalização e transporte de auxinas (DHONUKSHE et al., 2006; SAUER, KLEINE-VEHN, 2011), sinalização dos brasinosteroides (GELDNER et al., 2007; ROBERT et al., 2008) e resposta a luz azul (CHRISTIE, 2007). A co-localização parcial das estruturas estabelecidas entre a rede do retículo endoplasmático com proteínas Rab D1-mCherry, uma proteína de compartimento post-Golgi (Figura 4B) e RabA1g-mCherry, uma proteína do endossomo de reciclagem (RE) (Figura 4C) sugere que o peptídeo AtRALF1 está estabelecido em compartimentos de endossomos derivados do complexo de Golgi e direcionados para secreção pelo RE. A proteína RabA1g residente no compartimento do RE é altamente sensível a BFA (GELDNER et al., 2009). A ausência da co-localização com a proteína VIT12-mCherry, uma proteína presente no endossomo inicial (EE) ou (TGN/EE), indica que o peptídeo AtRALF1 não é incorporado no EE (Figura 4D). É bem conhecido que proteínas derivadas dos EE são incorporadas nos endossomos tardios (LE) onde podem ser recicladas ou direcionadas ao vacúolo via PVC/MVB (DETTMER et al., 2006; VIOTTI et al., 2010). A co-localização com a proteína Rab F2b-mCherry, uma proteína do LE indica que o peptídeo AtRALF1 é

direcionado diretamente para o LE, sem a necessidade de passar pelo EE (Figura 4E). Endossomos tardios ou também caracterizados como corpos multivesiculares (MVB, do inglês “Multivesicular Bodies”) são incorporados ou fusionados ao vacúolo (CONTENTO; BASSHAM, 2012). Embora o peptídeo não seja visualizado no vacúolo sobre uma condição endógena (Anexo D), a super-expressão do gene *RALF1-mCherry* facilita a visualização da mCherry no vacúolo delimitado por um marcador de membrana vacuolar SYP22-YFP (Figura 5A). A abundância do peptídeo, produto da super-expressão gênica, diferente da condição endógena facilita também a visualização da mCherry, co-localizando com o marcador de Golgi NST-GFP (Figura 5B). A passagem pelo complexo de Golgi do peptídeo AtRALF1 sobre condições endógenas pode ser mais lenta ou condicionada por um sinal externo.

Os compartimentos ER-Golgi estão associados com modificações pós-traducionais de proteínas precursoras, tais como atividade enzimática e glicosilação (ABAS; LUSCHNIG, 2010). O processamento do peptídeo AtRALF1 é realizado na fração microsomal (ER-Golgi), processamento que permite a liberação do peptídeo ativo e secreção para o apoplasto (ESCOBAR et al., 2003; MATOS et al., 2008). A utilização de iodeto propiônico e a plasmolização de células de raiz previamente tamponadas por um pH 7,0 possibilitaram a visualização do peptídeo AtRALF1-GFP no apoplasto sobre uma baixa quantidade, um cenário diferente quando o gene *AtRALF1-mCherry* é super-expresso (Figura 6A-C). A imunodeteção endógena do peptídeo RALF1-GFP processado é difícil em raízes, enquanto que a super-expressão do gene, facilita sua detecção como peptídeo processado. Adicionalmente a integridade das fusões RALF1-GFP e RALF1-mCherry confirmam uma especificidade pelo sinal nas organelas estudadas anteriormente (Figura 7A-B). Foi confirmada também, que a fusão AtRALF1-mCherry resulta ser funcional nas plantas de arábidsopsis por apresentar os fenótipos característicos a plantas que super-expressam o gene *AtRALF1* (BERGONCI et al., 2014; MATOS et al., 2008) (Anexo E).

Assim como em animais, peptídeos secretados podem ser internalizados via endocitose regulando eventos de sinalização intracelular (Clague, 1998). Através de ensaios de imunolocalização o peptídeo AtRALF1 (Figura 8 A-D) é internalizado de maneira dose-dependente (Figura 9 A-B, Figura 10 A-C), mostrando uma dinâmica de internalização muito rápida, 10 s (Figura 9 C-D). Diferente de animais, em plantas não há evidências da internalização de peptídeos secretados, conhecendo-se somente a internalização de proteínas receptoras de membranas mediadas por seus respectivos ligantes (CHEN; IRANI; FRIML,

2011; IRANI, N. G.; RUSSINOVA, 2009; ROBATZEK; CHINCHILLA; BOLLER, 2006). A internalização do peptídeo AtRALF1 é dependente do complexo AP2 e clatrina pelo fato de ser bloqueada por TyrA23 (Figura 10 D-F, Figura 11 A-B), $\mu 2$ (Figura 10 G-I) e XVE>>Auxilin (Figura 11 C-D). Em plantas as sub-unidades do complexo AP2 e proteínas relacionadas a clatrina foram caracterizados por estarem presentes predominantemente na membrana plasmática regulando a endocitose de proteínas cargo (FAN et al., 2013; WANG et al., 2016; WANG et al., 2013).

A insensibilidade parcial na inibição do crescimento da raiz primária pelo peptídeo recombinante AtRALF1 no mutante *clc2* e no duplo mutante *clc2-1xclc3-1* indica que a presença de clatrininas de cadeia leve CLC2 e CLC3 são essenciais na inibição do crescimento da raiz (Figura 12). Sabe-se que a perda de função de CLC2 e CLC3 no duplo mutante *clc2-1xclc3-1* afeta o transporte de auxinas, reduzindo a capacidade de efetuar sinalização em locais específicos onde as auxinas não são produzidas (WANG et al., 2013). Assim como a insensibilidade parcial em raízes, os mutantes *clc2*, *clc3* e *clc2-1xclc3-1* são insensíveis à redução da densidade de primórdios de raiz lateral, promovendo um efeito oposto ao acréscimo da densidade de primórdios de raiz lateral, inclusive de forma aditiva no duplo mutante *clc2-1xclc3-1* (Figura 13). A super-expressão do gene *AtRALF1* leva ao fenótipo semi-anão com raízes e hipocótilos curtos e menor número de raízes laterais (BERGONCI et al., 2014; MATOS et al., 2008). A ausência de duas clatrininas de cadeia leve CLC2 e CLC3 reprime os fenótipos de raízes e hipocótilos curtos, redução da densidade de raízes laterais e alongamento de pelos radiculares promovidos pela super-expressão ectópica do gene *AtRALF1* (Figura 14 A-H). A insensibilidade aos efeitos promovidos pelo peptídeo AtRALF1 nos mutantes *clc1*, *clc2* e *clc3* colocam as clatrininas de cadeia leve como essenciais para função do peptídeo, tanto que os genes que codificam estas clatrininas *CLC1*, *CLC2* e *CLC3* são induzidos pelo peptídeo em raízes de plantas selvagens Col-0 (Figura 15A-C).

Neste trabalho foi investigado se a inibição da endocitose afeta a sinalização do peptídeo AtRALF1. A perturbação da internalização pelos inibidores químicos TyrA23 e Wm afetaram a indução dos genes induzidos por AtRALF1 *AtPRP3*, *AtHRGP2* (Figura 16 A-B) e *AtCML38* (Figura 17 A-B, Figura 18 A-C). O efeito inibitório de TyrA23 e Wm sugere que provavelmente a indução gênica seja dependente da estabilidade da maquinaria de endocitose mediada por clatrina. Estas duas substâncias, TyrA23 e Wm, foram utilizadas em plantas para bloquear a endocitose de proteínas de membrana como FLS2, PIN2, BRI1 (BECK et al.,

2012; DHONUKSHE et al., 2007; IRANI, NILOUFER G. et al., 2012). A inibição da endocitose relacionada ao decréscimo da sinalização também foi evidenciada em duas proteínas de membrana BRI1 e FLS2, sugerindo que a internalização das proteínas favorece a sinalização, provavelmente nos compartimentos dos endossomos (GELDNER et al., 2007; ROBATZEK et al., 2006.). Diferente de TyrA23 e Wm, a toxina BFA, uma substância que bloqueia a reciclagem de proteínas via GNOM em plantas (ROBINSON; JIANG; SCHUMACHER, 2008), não afeta a indução dos genes *AtPRP3*, *AtHRGP2* e *AtCML38* em raízes de *arabidopsis*, apresentando um padrão semelhante àquele observado em plantas não tratadas com o inibidor (Figura 16 A-B, Figura 18 A-C). A interferência da internalização do peptídeo recombinante AtRALF1, sugere que internalização é um mecanismo necessário para sinalização gênica que poderia ser traduzido no efeito fisiológico do peptídeo. Tanto assim que a ausência das clatrininas de cadeia leve disponibilizadas nos mutantes (*clc1*, *clc2*, *clc3* e *clc2-1xclc3-1*) afeta significativamente a indução dos genes *AtPRP3*, *AtHRGP2* e *AtCML38*, criando um efeito aditivo no duplo mutante *clc2-1xclc3-1* (Figura 19). Os experimentos sugerem que a participação das clatrininas de cadeia leve é essencial durante a sinalização do peptídeo. As clatrininas estão presentes nos compartimentos da membrana plasmática e TGN/EE, participando da internalização de proteínas de membrana envolvidas com sinalização hormonal (CHEN et al., 2011; IRANI, NILOUFER G. et al., 2012; WANG et al., 2013).

Diferente da indução gênica promovida pelo peptídeo AtRALF1, o efeito da alcalinização em células MM1 de *arabidopsis* não é sensível aos inibidores TyrA23, Wm e BFA (Figura 20), demonstrando que o efeito da alcalinização é independente da endocitose do peptídeo AtRALF1. Assim como inibidores químicos, os mutantes *clc2*, *clc2-1xclc3-1*, *chc2-1* respondem normalmente ao peptídeo alcalinizando a rizosfera de modo semelhante ao observado em plantas controle (Figura 21). Os resultados indicam que provavelmente existam dois mecanismos distintos de percepção e sinalização do peptídeo, algo já sugerido anteriormente (Morato do Canto et al., 2014; Haruta et al., 2014).

Em resumo é proposto o modelo da via secretória e internalização do peptídeo AtRALF1 em raízes de *arabidopsis* (Figura 22). De acordo com as evidências experimentais, o peptídeo é secretado pela via padrão ER-Golgi. A passagem por este compartimento ER-Golgi, considerado como parte da fração microssomal, possibilita o processamento do precursor proAtRALF1 (MATOS et al., 2008), liberando o peptídeo maduro AtRALF1 (49

aa). O peptídeo maduro trafega então pelos endossomos oriundos do complexo de Golgi (RabD1). A sensibilidade a BFA e a localização do peptídeo em proteínas RabA1g confirmam a secreção ao apoplasto. O peptídeo secretado é internalizado via complexo AP2 e clatrina, bloqueado pelo inibidor de endocitose TyrA23. A dependência pelo complexo AP2 e clatrina, sugere que o peptídeo provavelmente precise do seu receptor para internalização. Após a internalização, o peptídeo AtRALF1 é incorporado no compartimento de endossomos (RabF2b), uma passagem direta sem a incorporação no compartimento dos endossomos iniciais (VTI12). O peptídeo AtRALF1 tem como último destino o vacúolo, provavelmente para ser degradado. A internalização do peptídeo AtRALF1 é necessária para sua sinalização traduzida na indução de genes *AtPRP3*, *AtHRGP2* e *AtCML38*, genes que participam da regulação da expansão celular e formação de raiz lateral (BERGONCI et al., 2014).

Figura 22 - Modelo proposto sobre a via secretória e internalização do peptídeo AtRALF1. O peptídeo AtRALF1 passa pelo retículo endoplasmático como uma proteína precursora (pro-AtRALF1) estabelecendo uma conexão com o complexo de Golgi, esta conexão ER-Golgi através de uma atividade catalítica promove seu processamento como peptídeo maduro e incorporado sobre compartimentos post-Golgi enriquecidos de endossomos iniciais (TGN/EE), endossomos tardios (LE), vacúolo e endossomos de reciclagem, estes últimos sensíveis a BFA. A internalização do peptídeo AtRALF1 (provavelmente complexado com seu receptor) é dependente do complexo AP2 e clatrina, que promovem a indução dos genes *AtPRP3*, *AtHRGP2* e *AtCML38* relacionados com expansão celular. A inibição de secreção de prótons não está relacionada à internalização do peptídeo. SYP22, VTI12, RABF2b, NST, RabD1, RabA1g, são proteínas residentes de diferentes organelas intracelulares. AHA2 = bomba de prótons, FER = Receptor-like kinase (LRK, Feronia). MVB = corpos multivesiculares, PVC = Compartimentos pre-vacuolares

6 CONCLUSÕES

O peptídeo AtRALF1 é expresso e produzido na raiz e hipocótilo, preponderantemente nas células da endoderme situadas entre a região de diferenciação e alongação;

O tráfego do AtRALF1 envolve desde sua secreção pela via padrão ER-Golgi, passando pelo retículo endoplasmático, complexo de Golgi, post-Golgi/endossomos, endossomos de reciclagem até sua internalização passando pelo endossomo tardio (LE) e vacúolo;

O peptídeo AtRALF1 é internalizado via complexo AP2 e clatrina, um mecanismo requerido para sua sinalização gênica relacionada a expansão celular;

Plantas com acúmulo de transcritos do gene *AtRALF1*, mais defectivas na produção de proteínas AtCLC2 e AtCLC3 não apresentam o fenótipo semi-anão, redução do crescimento de raízes e hipocótilo, redução da densidade de raiz lateral e alongamento de pelos radiculares;

Em raízes de plantas selvagens os genes *CLC1*, *CLC2* e *CLC3* são induzidos pelo peptídeo AtRALF1 sobre um tempo relativamente curto;

O efeito de alcalinização promovida pelo peptídeo AtRALF1 não é dependente da sua internalização ou de proteínas relacionadas com a maquinaria de endocitose;

Um modelo de tráfego intracelular foi realizado para o peptídeo AtRALF1 de *arabidopsis*;

REFERÊNCIAS

- ABAS, L.; LUSCHNIG, C. Maximum yields of microsomal-type membranes from small amounts of plant material without requiring ultracentrifugation. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 401, p. 217-227, 2010.
- AKKERMAN, M.; OVERDIJK, E.J.; SCHEL, J.H.; EMONS, A.M.; KETELAAR, T. Golgi body motility in the plant cell cortex correlates with actin cytoskeleton organization. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 52, p. 1844-1855, 2011.
- ALONSO, J.M.; STEPANOVA, A.N.; LEISSE, T.J.; KIM, C.J.; CHEN, H.; SHINN, P.; STEVENSON, D.K.; ZIMMERMAN, J.; BARAJAS, P.; CHEUK, R.; GADRINAB, C.; HELLER, C.; JESKE, A.; KOESEMA, E.; MEYERS, C.C.; PARKER, H.; PREDNIS, L.; ANSARI, Y.; CHOY, N.; DEEN, H.; GERALT, M.; HAZARI, N.; HOM, E.; KARNES, M.; MULHOLLAND, C.; NDUBAKU, R.; SCHMIDT, I.; GUZMAN, P.; AGUILAR-HENONIN, L.; SCHMID, M.; WEIGEL, D.; CARTER, D.E.; MARCHAND, T.; RISSEEUW, E.; BROGDEN, D.; ZEKO, A.; CROSBY, W.L.; BERRY, C.C.; BERRY, C.C. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. **Science**, Washington, v. 301, p. 653-657, 2003.
- ATKINSON, N.J.; LILLEY, C.J.; URWIN, P.E. Identification of genes involved in the response of *Arabidopsis* to simultaneous biotic and abiotic stresses. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 162, p. 2028-2041, 2013.
- BACKUES, S.K.; KORASICK, D.A.; HEESE, A.; BEDNAREK, S.Y. The *Arabidopsis* dynamin-related protein2 family is essential for gametophyte development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 3218-3231, 2010.
- BANBURY, D.N.; OAKLEY, J.D.; SESSIONS, R.B.; BANTING, G. Tyrphostin A23 inhibits internalization of the transferrin receptor by perturbing the interaction between tyrosine motifs and the medium chain subunit of the AP-2 adaptor complex. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, p. 12022-12028, 2003.
- BAR, M.; AVNI, A. EHD2 inhibits ligand-induced endocytosis and signaling of the leucine-rich repeat receptor-like protein LeEix2. **The Plant Journal**, Oxford, v. 59, p. 600-611, 2009.
- BARBERON, M.; ZELAZNY, E.; ROBERT, S.; CONÉJÉRO, G.; CURIE, C.; FRIML, J.; VERT, G. Monoubiquitin-dependent endocytosis of the iron-regulated transporter 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, p. E450-E458, 2011.
- BASHLINE, L.; LI, S.; ANDERSON, C.T.; LEI, L.; GU, Y. The endocytosis of cellulose synthase in *Arabidopsis* is dependent on μ 2, a clathrin-mediated endocytosis adaptin. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 163, p. 150-160, 2013.
- BECK, M.; ZHOU, J.; FAULKNER, C.; MacLEAN, D.; ROBATZEK, S. Spatio-temporal cellular dynamics of the *Arabidopsis* flagellin receptor reveal activation status-dependent endosomal sorting. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, p. 4205-4219, 2012.

BERGONCI, T.; RIBEIRO, B.; CECILIATO, P.H.; GUERRERO-ABAD, J.C.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. *Arabidopsis thaliana* RALF1 opposes brassinosteroid effects on root cell elongation and lateral root formation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, p. 2219-2230, 2014.

BERGONCI, T.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. Antagonistic relationship between AtRALF1 and brassinosteroid regulates cell expansion-related genes. **Plant Signaling & Behavior**, Philadelphia, v. 9, p. e976146, 2014.

BIRNBAUM, K.; SHASHA, D.E.; WANG, J.Y.; JUNQ, J.W.; LAMBERT, G.M.; GALBRAITH, D.W.; BENFEY, P.N. A gene expression map of the Arabidopsis root. **Science**, Washington, v. 302, p. 1956-1960, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.72, p. 248-254, 1976.

BRAND, U.; GRÜNEWALD, M.; HOBE, M.; SIMON, R. Regulation of CLV3 expression by two homeobox genes in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 129, p. 565–575, 2002.

BUTENKO, M.A.; PATTERSON, S.E.; GRINI, P.E.; STENVIK, G.E.; AMUNDSEN, S.S.; MANDAL, A.; AALEN, R.B. Inflorescence deficient in abscission controls floral organ abscission in Arabidopsis and identifies a novel family of putative ligands in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v.15, p. 2296-2307, 2003.

CASSON, S.A.; CHILLEY, P.M.; TOPPING, J.F.; EVANS, I.M.; SOUTER, M.A.; LINDSEY, K. The POLARIS gene of Arabidopsis encodes a predicted peptide required for correct root growth and leaf vascular patterning. **The Plant Cell**, Rockville, v.14, p. 1705–1721, 2002.

CAO, J.; SHI, F. Evolution of the RALF Gene Family in Plants: Gene Duplication and Selection Patterns. **Evolucionary Bioinformatics**, Auckland, v. 8, p. 271-192, 2012.

CHARON, C.; SOUSA, C.; CRESPI, M.; KONDOROSI, A. Alteration of enod40 expression modifies *Medicago truncatula* root nodule development induced by sinorhizobium meliloti. **The Plant Cell**, Rockville, v.11, p. 1953-1966, 1999.

CHEN, X.; IRANI, N.G.; FRIML, J. Clathrin-mediated endocytosis: the gateway into plant cells. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.14, p. 674-682, 2011.

CHEN, Y.F.; MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y. Peptide growth factor phytosulfokine- α contributes to the pollen population effect. **Planta**, Berlin, v. 211, p. 752–755, 2000.

CHILLEY, P.M.; CASSON, S.A.; TARKOWSKI, P.; HAWKINS, N.; WANG, K.L.; HUSSEY P.J.; BEALE, M.; ECKER, J.R.; SANDBERG, G.K.; LINDSEY, K. The POLARIS peptide of Arabidopsis regulates auxin transport and root growth via effects on ethylene signaling. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 3058-3072, 2006.

CHRISTIE, J.M. Phototropin blue-light receptors. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 21-45, 2007.

CHO, S.K.; LARUE, C.T.; CHEVALIER, D.; WANG, H.; JINN, T.L.; ZHANG, S.; WALKER, J.C. Regulation of floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.105, p. 15629-15634, 2008.

CLAGUE, M.J. Molecular aspects of the endocytic pathway. **The Biochemical Journal**, London, v. 336, p. 271-282, 1998.

CLOUGH, S.J.; BENT, A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v.16, p. 735-743, 1998.

COLLINGS, D.A.; GEBBIE, L.K.; HOWLES, P.A.; HURLEY, U.A.; BIRCH, R.J.; CORK, A.H.; HOCART, C.H.; ARIOLI, T.; WILLIAMSON, R.E. *Arabidopsis* dynamin-like protein DRP1A: a null mutant with widespread defects in endocytosis, cellulose synthesis, cytokinesis, and cell expansion. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.59, p. 361-376, 2008.

CONTENTO, A.L.; BASSHAM, D.C. Structure and function of endosomes in plant cells. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 125, p. 3511-3518, 2012.

COVEY, P.A.; SUBBAIAH, C.C.; PARSONS, R.L.; PEARCE, G.; LAY, F.T.; ANDERSON, M.A.; RYAN, C.A.; BEDINGER, P.A. A pollen-specific RALF from tomato that regulates pollen tube elongation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 153, p. 703-715, 2010.

DENECKE, J.; ANIENTO, F.; FRIGERIO, L.; HAWES, C.; HWANG, I.; MATHUR, J.; NEUHAUS, J.M.; ROBINSON, D.G. Secretory pathway research: the more experimental systems the better. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, p. 1316-1326, 2012.

DETTMER, J.; HONG-HERMESDORF, A.; STIERHOF, Y.D.; SCHUMACHER, K. Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 715-730, 2006.

DHONUKSHE, P.; ANIENTO, F.; HWANG, I.; ROBINSON, D.G.; MRAVEC, J.; STIERHOF, Y.D.; FRIML, J. Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. **Current Biology**, Cambridge, v. 17, p. 520-527, 2007.

DHONUKSHE, P.; BALUSKA, F.; SCHLICHT, M.; HLAVACKA, A.; SAMAJ, J.; FRIML, J.; GADELLA, T.W.JR. Endocytosis of cell surface material mediates cell plate formation during plant cytokinesis. **Developmental cell**, Cambridge, v. 10, p. 137-150, 2006.

DHONUKSHE, P.; TANAKA, H.; GOH, T.; EBINE, K.; MÄHÖNEN, A.P.; PRASAD, K.; BLILOU, I.; GELDNER, N.; XU, J.; UEMURA, T.; CHORY, J.; UEDA, T.; NAKANO, A.; SCHERES, B.; FRIML, J. Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. **Nature**, London, v. 456, p. 962-966, 2008.

DI RUBBO, S.; IRANI, N.G.; KIM, S.Y.; XU, Z.Y.; GADEYNE, A.; DEJONGHE, W.; VANHOUTTE, I.; PERSIAU, G.; EECKHOUT, D.; SIMON, S.; SONG, K.; KLEINE-VEHN, J.; FRIML, J.; De JAEGER, G.; VAN DAMME, D.; HWANG, I.; RUSSINOVA, E. The clathrin adaptor complex AP-2 mediates endocytosis of brassinosteroid insensitive1 in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 25, p. 2986-2997, 2013.

DONNELLY, P.M.; BONETTA, D.; TSUKAYA, H.; DENGLER, R.E.; DENGLER, N.G. Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of Arabidopsis. **Development Biology**, San Diego, v. 215, p. 407-419, 1999.

DU, Y.; TEJOS, R.; BECK, M.; HIMSCHOOT, E.; LI, H.; ROBATZEK, S.; VANNESTE, S.; FRIML, J. Salicylic acid interferes with clathrin-mediated endocytic protein trafficking. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, p. 7946-7951, 2013.

ESCOBAR, N.M.; HAUPT, S.; THOW, G.; BOEVINK, P.; CHAPMAN, S.; OPARKA, K. High-throughput viral expression of cDNA-green fluorescent protein fusions reveals novel subcellular addresses and identifies unique proteins that interact with plasmodesmata. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 1507-1523, 2003.

FAN, L.; HAO, H.; XUE, Y.; ZHANG, L.; SONG, K.; DING, Z.; BOTELLA, M.A.; WANG, H.; LIN, J. Dynamic analysis of Arabidopsis AP2 sigma subunit reveals a key role in clathrin-mediated endocytosis and plant development. **Development**, Cambridge, v. 140, p. 3826-3837, 2013.

FAN, L.; LI, R.; PAN, J.; DING, Z.; LIN, J. Endocytosis and its regulation in plants. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 20, p. 388-397, 2015.

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

FERARU, E.; PACIOREK, T.; FERARU, M.I.; ZWIEWKA, M.; De GROODT, R.; De RYCKE, R.; KLEINE-VEHN, J.; FRIML, J. The AP-3 beta adaptin mediates the biogenesis and function of lytic vacuoles in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 2812-2824, 2010.

FORESTI, O.; DENECKE, J. Intermediate organelles of the plant secretory pathway: identity and function. **Traffic**, Oxford, v. 9, p. 1599-1612, 2008.

FLETCHER, J.C.; BRAND, U.; RUNNING, M.P.; SIMON, R.; MEYEROWITZ, E.M. Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems. **Science**, Washington, v. 283, p. 1911-1914, 1999.

FUJIMOTO, M.; ARIMURA, S.; NAKAZONO, M.; TSUTSUMI, N. Imaging of plant dynamin-related proteins and clathrin around the plasma membrane by variable incidence angle fluorescence microscopy. **Plant Biotechnology**, Oxford, v. 24, p. 449-455, 2007.

- FUJIMOTO, M.; ARIMURA, S.; UEDA, T.; TAKANASHI, H.; HAYASHI, Y.; NAKANO, A.; TSUTSUMI, N. Arabidopsis dynamin-related proteins DRP2B and DRP1A participate together in clathrin-coated vesicle formation during endocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, p. 6094-6099, 2010.
- GADEYNE, A.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, C.; VANNESTE, S.; Di RUBBO, S.; ZAUBER, H.; VANNESTE, K.; Van LEENE, J.; De WINNE, N.; EECKHOUT, D.; PERSIAU, G.; Van De SLIJKE, E.; CANNOOT, B.; VERCRUYSSSE, L.; MAYERS, J.R.; ADAMOWSKI, M.; KANIA, U.; EHRLICH, M.; SCHWEIGHOFER, A.; KETELAAR, T.; MAERE, S.; BEDNAREK, S.Y.; FRIML, J.; GEVAERT, K.; WITTERS, E.; RUSSINOVA, E.; PERSSON, S.; De JAEGER, G.; Van DAMME, D. The TPLATE adaptor complex drives clathrin-mediated endocytosis in plants. **Cell**, Cambridge, v. 156, p. 691-704, 2014.
- GELDNER, N.; DÉNERVAUD-TENDON, V.; HYMAN, D.L.; MAYER, U.; STIERHOF, Y.D.; CHORY, J. Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set. **The Plant Journal**, Oxford, v. 59, p. 169-178, 2009.
- GELDNER, N.; HYMAN, D.L.; WANG, X.; SCHUMACHER, K.; CHORY, J. Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1. **Genes & Development**, New York, v. 21, p. 1598-1602, 2007.
- GELDNER, N.; ROBATZEK, S. Plant receptors go endosomal: a moving view on signal transduction. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 147, p. 1565-1574, 2008.
- GERMAIN, H.; CHEVALIER, E.; CARON, S.; MATTON, D.P. Characterization of five RALF-like genes from *Solanum chacoense* provides support for a developmental role in plants. **Planta**, Berlin, v. 220, p. 447-454, 2005.
- GIFFORD, M.L.; ROBERTSON, F.C.; SOARES, D.C.; INGRAM, G.C. ARABIDOPSIS CRINKLY4 function, internalization, and turnover are dependent on the extracellular crinkly repeat domain. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 1154-1166, 2005.
- HANAI, H.; MATSUNO, T.; YAMAMOTO, M.; MATSUBAYASHI, Y.; KOBAYASHI, T. A secreted peptide growth factor, phytosulfokine, acting as a stimulatory factor of carrot somatic embryo formation. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 41, p. 27-32, 2000.
- HAO, H.; FAN, L.; CHEN, T.; LI, R.; LI, X.; HE, Q.; BOTELLA, M.A.; LIN, J. Clathrin and Membrane Microdomains Cooperatively Regulate RbohD Dynamics and Activity in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 26, p. 1729-1745, 2014.
- HARUTA, M.; CONSTABEL, C.P. Rapid alkalization factors in poplar cell cultures. Peptide isolation, cDNA cloning, and differential expression in leaves and methyl jasmonate-treated cells. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 131, p. 814-823, 2003.
- HARUTA, M.; MONSHAUSEN, G.; GILROY, S.; SUSSMAN, M.R. A cytoplasmic Ca²⁺ functional assay for identifying and purifying endogenous cell signaling peptides in Arabidopsis seedlings: identification of AtRALF1 peptide. **Biochemistry**, Washington, v. 47, p. 6311-6321, 2008.

- HARUTA, M.; SABAT, G.; STECKER, K.; MINKOFF, B.B.; SUSSMAN, M.R. A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion. **Science**, Washington, v. 343, p. 408-411, 2014.
- HOBE, M.; MULLER, R.; GRUNEWALD, M.; BRAND, U.; SIMON, R.. Loss of CLE40, a protein functionally equivalent to the stem cell restricting signal CLV3, enhances root waving in *Arabidopsis*. **Development Genes and Evolution**, Berlin, v. 213, p. 371–381, 2003.
- HOLSTEIN, S.E.H. Clathrin and plant endocytosis. **Traffic**, Oxford, v.3,p.614–620, 2002.
- HONG, Z.; BEDNAREK, S.Y.; BLUMWALD, E.; HWANG, I.; JURGENS, G.; MENZEL, D.; OSTERYOUNG, K.W.; RAIKHEL, N.V.; SHINOZAKI, K.; TSUTSUMI, N.; VERMA, D.P. A unified nomenclature for *Arabidopsis* dynamin-related large GTPases based on homology and possible functions. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 53, p. 261-265, 2003.
- HUFFAKER, A.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 10098-10103, 2006.
- IGASAKI, T.; AKASHI, N.; UJINO-IHARA, T.; MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y.; SHINOHARA, K. Phytosulfokine stimulates somatic embryogenesis in *Cryptomeria japonica*. **The Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 44, p. 1412–1416, 2003.
- IKEUCHI, M.; YAMAGUCHI, T.; KAZAMA, T.; ITO, T.; HORIGUCHI, G.; TSUKAYA, H. ROTUNDIFOLIA4 regulates cell proliferation along the body axis in *Arabidopsis* shoot. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 1, p. 59-69, 2011.
- IRANI, N.G.; DI RUBBO, S.; MYLLE, E.; VAN DEN BEGIN, J.; SCHNEIDER-PIZÓN, J.; HNÍLÍKOVÁ, J.; ŠÍŠA, M.; BUYST, D.; VILARRASA-BLASI, J.; SZATMÁRI, A.M.; VAN DAMME, D.; MISHEV, K.; CODREANU, M.C.; KOHOUT, L.; STRNAD, M.; CAÑO-DELGADO, A.I.; FRIML, J.; MADDER, A.; RUSSINOVA, E. Fluorescent castasterone reveals BRI1 signaling from the plasma membrane. **Nature Chemical Biology**, London, v. 8, p. 583-589, 2012.
- IRANI, N.G.; RUSSINOVA, E. Receptor endocytosis and signaling in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, p. 653-659, 2009.
- JAILLAIS, Y.; FOBIS-LOISY, I.; MIÈGE, C.; ROLLIN, C.; GAUDE, T. AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in *Arabidopsis*. **Nature**, London, v. 443, p. 106-109, 2006.
- JEFFERSON, R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 5, p.387–405, 1987.
- JINN, T.L.; STONE, J.M.; WALKER, J.C. HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. **Genes & Development**, New York, v. 14, p. 108-117, 2000.

KANG, B.H.; BUSSE, J.S.; BEDNAREK, S.Y. Members of the Arabidopsis dynamin-like gene family, ADL1, are essential for plant cytokinesis and polarized cell growth. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 899-913, 2003a.

KANG, B.H.; RANCOUR, D.M.; BEDNAREK, S.Y. The dynamin-like protein ADL1C is essential for plasma membrane maintenance during pollen maturation. **The Plant Journal**, Oxford, v. 35, p. 1-15, 2003b.

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

KENDE, H.; ZEEVAART, J. The Five "Classical" Plant Hormones. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1197-1210, 1997.

KITAKURA, S.; VANNESTE, S.; ROBERT, S.; LÖFKE, C.; TEICHMANN, T.; TANAKA, H.; FRIML, J. Clathrin mediates endocytosis and polar distribution of PIN auxin transporters in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, p. 1920-1931, 2011.

KLEINE-VEHN, J.; LEITNER, J.; ZWIEWKA, M.; SAUER, M.; ABAS, L.; LUSCHNIG, C.; FRIML, J. Differential degradation of PIN2 auxin efflux carrier by retromer-dependent vacuolar targeting. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, p. 17812-17817, 2008.

KOBAYASHI, T.; EUN, C.; HANAI, H.; MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y.; KAMADA, H. Phytosulphokine-a, a peptidyl plant growth factor, stimulates somatic embryogenesis in carrot. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, p. 1123-1128, 1999.

KONDO, T.; YOKOMINE, K.; NAKAGAWA, A.; SAKAGAMI, Y. Analogs of the CLV3 peptide: synthesis and structure-activity relationships focused on proline residues. **Plant & Cell Physiology**, Tokyo, v. 1, p. 30-36, 2011.

KONOPKA, C.A.; BACKUES, S.K.; BEDNAREK, S.Y. Dynamics of Arabidopsis dynamin-related protein 1C and a clathrin light chain at the plasma membrane. **The Plant Cell**, Rockville, v. 20, p. 1363-80, 2008.

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

LATIJNHOUWERS, M.; HAWES, C.; CARVALHO, C.; OPARKA, K.; GILLINGHAM, A.K.; BOEVINK, P. An Arabidopsis GRIP domain protein locates to the trans-Golgi and binds the small GTPase ARL1. **The Plant Journal**, Oxford, v. 44, p. 459-470, 2005.

LI, R.; LIU, P.; WAN, Y.; CHEN, T.; WANG, Q.; METTBACH, U.; BALUSKA, F.; SAMAJ, J.; FANG, X.; LUCAS, W.J.; LIN, J. A membrane microdomain-associated protein, Arabidopsis Flot1, is involved in a clathrin-independent endocytic pathway and is required for seedling development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, p. 2105-2122, 2012.

LI, X.; WANG, X.; YANG, Y.; LI, R.; HE, Q.; FANG, X.; LUU, D.T.; MAUREL, C.; LIN, J. Single-molecule analysis of PIP2;1 dynamics and partitioning reveals multiple modes of Arabidopsis plasma membrane aquaporin regulation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, p. 3780-3797, 2011.

MALAMY, J.E.; BENFEY, P.N. Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. **Development**, Cambridge, v. 124, p. 33-44, 1997.

MARHAVY, P.; VANSTRAELEN, M.; De RYBEL, B.; ZHAOJUN, D.; BENNETT, M.J.; BEECKMAN, T.; BENKOVÁ, E. Auxin reflux between the endodermis and pericycle promotes lateral root initiation. **The EMBO Journal**, London, v. 32, p. 149-158, 2013.

MARHAVY, P.; DUCLERCQ, J.; WELLER, B.; FERARU, E.; BIELACH, A.; OFFRINGA, R.; FRIML, J.; SCHWECHHEIMER, C.; MURPHY, A.; BENKOVA, E. Cytokinin controls polarity of PIN1-dependent auxin transport during lateral root organogenesis. **Current Biology**, Cambridge, v. 24, p. 1031-1037, 2014.

MASACHIS, S.; SEGORBE, D.; TURRÀ, D.; LEON-RUIZ, M.; FÜRST, U.; EL GHALID, M.; LEONARD, G.; LÓPEZ-BERGES, M.; RICHARDS, T.; FELIX, G.; DI PIETRO, A. A fungal pathogen secretes plant alkalinizing peptides to increase infection. **Nature Microbiology**, London, v. 1, p. 1-8, 2016.

MATOS, J.L.; FIORI, C.S.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. A conserved dibasic site is essential for correct processing of the peptide hormone AtRALF1 in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 582, p. 3343-3347, 2008.

MATSUBAYASHI, Y. Posttranslationally modified small-peptide signals in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 65, p. 385-413, 2014.

MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y. Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 7623-7627, 1996.

MATSUBAYASHI, Y.; OGAWA, M.; MORITA, A.; SAKAGAMI, Y. An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine. **Science**, Washington, v. 296, p. 1470-1472, 2002.

MATSUBAYASHI, Y.; TAKAGI, L.; OMURA, N.; MORITA, A.; SAKAGAMI, Y. The endogenous sulfated pentapeptide phytosulfokine- α stimulates tracheary element differentiation of isolated mesophyll cells of zinnia. **The Plant Physiology**, Lancaster, v. 120, p. 1043-1048, 1999.

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

MINGOSSI, F.B.; MATOS, J.L.; RIZZATO, A.P.; MEDEIROS, A.H.; FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. SacRALF1, a peptide signal from the grass sugarcane (*Saccharum* spp.), is potentially involved in the regulation of tissue expansion. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 73, p. 271-281, 2010.

- MORATO DO CANTO, A.; CECILIATO, P.H.; RIBEIRO, B.; ORTIZ MOREA, F.A.; FRANCO GARCIA, A.A.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. Biological activity of nine recombinant AtRALF peptides: implications for their perception and function in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 75, p. 45-54, 2014.
- MOURA, D.S.; SILVA-FILHO, M.C. Plant peptide hormones, from defense to pollen self-incompatibility, cell fate and development: small peptides as signaling molecules in plants. In: SILVA, J.A.T. **Floriculture, ornamental and plant biotechnology**: advances and topical issues. London: Global Science Books, 2006. p. 203-209.
- MRAVEC, J.; PETRÁŠEK, J.; LI, N.; BOEREN, S.; KARLOVA, R.; KITAKURA, S.; PAŘEZOVÁ, M.; NARAMOTO, S.; NODZYŃSKI, T.; DHONUKSHE, P.; BEDNAREK, S.Y.; ZAŽÍMALOVÁ, E.; De VRIES, S.; FRIML, J. Cell plate restricted association of DRP1A and PIN proteins is required for cell polarity establishment in *Arabidopsis*. **Current Biology**, Cambridge, v. 21, p. 1055-1060, 2011.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NARITA, N.N.; MOORE, S.; HORIGUCHI, G.; KUBO, M.; DEMURA, T.; FUKUDA, H.; GOODRICH, J.; TSUKAYA, H. Overexpression of a novel small peptide ROTUNDIFOLIA4 decreases cell proliferation and alters leaf shape in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 38, p. 699–713, 2004.
- OHYAMA, K.; SHINOHARA, H.; OGAWA-OHNISHI, M.; MATSUBAYASHI, Y. A glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Chemical Biology**, London, v. 5, p. 578–580, 2009.
- OLSEN, A.N.; MUNDY, J.; SKRIVER, K. Peptomics, identification of novel cationic *Arabidopsis* peptides with conserved sequence motifs. **In Silico Biology**, Göttingen, v. 2, p. 441-451, 2002.
- ORTIZ-ZAPATER, E.; SORIANO-ORTEGA, E.; MARCOTE, M.J.; ORTIZ-MASIA, D.; ANIENTO, F. Trafficking of the human transferrin receptor in plant cells: effects of tyrphostin A23 and brefeldin A. **The Plant Journal**, Oxford, v. 48, p. 757-770, 2006.
- OTEGUI, M.S.; SPITZER, C. Endosomal functions in plants. **Traffic**, Oxford, v. 9, p. 1589-1598, 2008.
- OWEN, D.J.; EVANS, P.R. A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals. **Science**, Washington, v. 282, p. 1327-1332, 1998.
- PAN, J.; FUJIOKA, S.; PENG, J.; CHEN, J.; LI, G.; CHEN, R. The E3 ubiquitin ligase SCFTIR1/AFB and membrane sterols play key roles in auxin regulation of endocytosis, recycling, and plasma membrane accumulation of the auxin efflux transporter PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, p. 568-580, 2009.
- PEARCE, G.; MOURA, D.S.; STRATMANN, J.; RYAN, C.A. Production of multiple plant hormones from a single polypeptide precursor. **Nature**, London, v. 411, p. 817-820, 2001a.

_____. RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 12843-12847, 2001b.

RANF, S.; ESCHEN-LIPPOLD, L.; PECHER, P.; LEE, J.; SCHEEL, D. Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. **The Plant Journal**, Oxford, v. 68, p. 100-113, 2011.

RICHTER, S.; GELDNER, N.; SCHRADER, J.; WOLTERS, H.; STIERHOF, Y.D.; RIOS, G.; KONCZ, C.; ROBINSON, D.G.; JÜRGENS, G. Functional diversification of closely related ARF-GEFs in protein secretion and recycling. **Nature**, London, v. 448, p. 488-492, 2007.

ROBATZEK, S.; CHINCHILLA, D.; BOLLER, T. Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. **Genes & Development**, New York, v. 20, p. 537-542, 2006.

ROBERT, S.; CHARY, S.N.; DRAKAKAKI, G.; LI, S.; YANG, Z.; RAIKHEL, N.V.; HICKS, G.R. Endosidin1 defines a compartment involved in endocytosis of the brassinosteroid receptor BRI1 and the auxin transporters PIN2 and AUX1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, p. 8464-8469, 2008.

ROBINSON, D.G.; JIANG, L.; SCHUMACHER, K. The endosomal system of plants: charting new and familiar territories. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 147, p. 1482-1492, 2008.

ROSS, A.; YAMADA, K.; HIRUMA, K.; YAMASHITA-YAMADA, M.; LU, X.; TAKANO, Y.; TSUDA, K.; SAIJO, Y. The Arabidopsis PEPR pathway couples local and systemic plant immunity. **The EMBO Journal**, London, v. 33, p. 62-75, 2014.

RUSSINOVA, E.; BORST, J.W.; KWAAITAAL, M.; CAÑO-DELGADO, A.; YIN, Y.; CHORY, J.; De VRIES, S.C. Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 3216-3229, 2004.

RYAN, C.A. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 425-449, 1990.

RYAN, C.A.; MOURA, D.S. Systemic wound signaling in plants: a new perception. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, p. 6519-6520, 2002.

RYAN, C.A.; PEARCE, G. SYSTEMIN: a polypeptide signal for plant defensive genes. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 14, p. 1-17, 1998.

SABLOWSKI, R. Flowering and determinacy in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 899-907, 2007.

SADOWSKI, L.; PILECKA, I.; MIACZYNSKA, M. Signaling from endosomes: location makes a difference. **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 315, p. 1601-1609, 2009.

SANTIAGO, J.; BRANDT, B.; WILDHAGEN, M.; HOHMANN, U.; HOTHORN, L. A.; BUTENKO, M. A.; HOTHORN, M. Mechanistic insight into a peptide hormone signaling complex mediating floral organ abscission. **Elife**, Cambridge, v. 5, p. e15075, 2016.

SAUER, M.; KLEINE-VEHN, J. AUXIN BINDING PROTEIN1: the outsider. **The Plant Cell**, Rockville v. 23, n. 6, p. 2033-2043, Jun 2011.

SCHMID, M.; DAVISON, T.S.; HENZ, S.R.; PAPE, U.J.; DEMAR, M.; VINGRON, M.; SCHÖLKOPF, B.; WEIGEL, D.; LOHMANN, J.U. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. **Nature Genetics**, London, v. 37, p. 501-506, 2005.

SCHOPFER, C.R.; NASRALLAH, M.E.; NASRALLAH, J.B. The male determinant of self-incompatibility in Brassica. **Science**, Washington, v. 286, p. 1697-1700, 1999.

SHANER, N.C.; CAMPBELL, R.E.; STEINBACH, P.A.; GIEPMANS, B.N.; PALMER, A.E.; TSIEN, R.Y. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. **Nature Biotechnology**, London, v. 22, p. 1567-1572, 2004.

SIMON, R.; DRESSELHAUS, T. Peptides take centre stage in plant signalling. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, p. 5135-5138, 2015.

SONG, K.; JANG, M.; KIM, S.Y.; LEE, G.; LEE, G.J.; KIM, D.H.; LEE, Y.; CHO, W.; HWANG, I. An A/ENTH domain-containing protein functions as an adaptor for clathrin-coated vesicles on the growing cell plate in *Arabidopsis* root cells. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 159, p. 1013-1025, 2012.

SORKIN, A.; GOH, L.K. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 315, p. 683-696, 2009.

SPITZER, C.; REYES, F.C.; BUONO, R.; SLIWINSKI, M.K.; HAAS, T.J.; OTEGUI, M.S. The ESCRT-related CHMP1A and B proteins mediate multivesicular body sorting of auxin carriers in *Arabidopsis* and are required for plant development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, p. 749-766, 2009.

SRIVASTAVA, R.; LIU, J.X.; GUO, H.; YIN, Y.; HOWELL, S.H. Regulation and processing of a plant peptide hormone, AtRALF23, in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 59, p. 930-939, 2009.

STAEHELIN, L.A.; DRIOUICH, A. Brefeldin A Effects in Plants (Are Different Golgi Responses Caused by Different Sites of Action?). **Plant Physiology**, Lancaster, v. 114, p. 401-403, 1997.

STEEL, R.G.; TORRIE, J.H.; DICKEY, D.A. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**, 3rd ed. New York: McGraw-Hill Companies, 1996. 672p.

STENVIK, G.E.; BUTENKO, M.A.; URBANOWICZ, B.R.; ROSE, J.K.; AALEN, R.B. Overexpression of INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION activates cell separation in vestigial abscission zones in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 1467-1476, 2006.

STENVIK, G.E.; TANDSTAD, N.M.; GUO, Y.; SHI, C.L.; KRISTIANSEN, W.; HOLMGREN, A.; CLARK, S.E.; AALEN, R.B.; BUTENKO, M.A. The EPIP peptide of INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION is sufficient to induce abscission in arabidopsis through the receptor-like kinases HAESA and HAESA-LIKE2. **The Plant Cell**, Rockville, v. 20, p. 1805-1817, 2008.

STROMPEN, G.; DETTMER, J.; STIERHOF, Y.D.; SCHUMACHER, K.; JURGENS, G.; MAYER, U. Arabidopsis vacuolar H-ATPase subunit E isoform 1 is required for Golgi organization and vacuole function in embryogenesis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 41, p. 125-132, 2005.

SUGANO, S.S.; SHIMADA, T.; IMAI, Y.; OKAWA, K.; TAMAI, A.; MORI, M.; HARA-NISHIMURA, I. Stomagen positively regulates stomatal density in Arabidopsis. **Nature**, London, v. 463, p. 241-244, 2010.

SUZUKI, G.; KAI N HIROSE, T.; FUKUI, K.; NISHIO, T. Genomic organization of the S locus: identification and characterization of genes in SLG/SRK region of S(9) haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). **Genetics**, Austin, v. 153, p. 391-400, 1999.

TAKANO, J.; TANAKA, M.; TOYODA, A.; MIWA, K.; KASAI, K.; FUJI, K.; ONOUCHI, H.; NAITO, S.; FUJIWARA, T. Polar localization and degradation of Arabidopsis boron transporters through distinct trafficking pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, p. 5220-5225, 2010.

TAKAYAMA, S.; SHIBA, H.; IWANO, M.; ASANO, K.; HARA, M.; CHE, F.S.; WATANABE, M.; HINATA, K.; ISOGAI, A. Isolation and characterization of pollen coat proteins of *Brassica campestris* that interact with S locus-related glycoprotein 1 involved in pollen-stigma adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 3765-3770, 2000.

TAKAYAMA, S.; SHIBA, H.; IWANO, M.; SHIMOSATO, H.; CHE, F.S. The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 1920-1925, 2000.

TANG, J.; HAN, Z.; SUN, Y.; ZHANG, H.; GONG, X.; CHAI, J. Structural basis for recognition of an endogenous peptide by the plant receptor kinase PEPR1. **Cell Research**, Basingstoke, v. 25, p. 110-120, 2015.

TITAPIWATANAKUN, B.; BLAKESLEE, J.J.; BANDYOPADHYAY, A.; YANG, H.; MRAVEC, J.; SAUER, M.; CHENG, Y.; ADAMEC, J.; NAGASHIMA, A.; GEISLER, M.; SAKAI, T.; FRIML, J.; PEER, W.A.; MURPHY, A.S. ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 57, p. 27-44, 2009.

VAN DAMME, D.; GADEYNE, A.; VANSTRAELEN, M.; INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M.C.; De JAEGER, G.; RUSSINOVA, E.; GEELLEN, D. Adaptin-like protein TPLATE and clathrin recruitment during plant somatic cytokinesis occurs via two distinct pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, p. 615-620, 2011.

VANOOSTHUYSE, V.; MIEGE, C.; DUMAS, C.; COCK, J.M. Two large *Arabidopsis thaliana* gene families are homologous to the Brassica gene superfamily that encodes pollen coat proteins and the male component of the self-incompatibility response. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 46, p. 17-34, 2001.

VIOTTI, C.; BUBECK, J.; STIERHOF, Y.D.; KREBS, M.; LANGHANS, M.; VAN DEN BERG, W.; VAN DONGEN, W.; RICHTER, S.; GELDNER, N.; TAKANO, J.; JÜRGENS, G.; De VRIES, S.C.; ROBINSON, D.G.; SCHUMACHER, K. Endocytic and secretory traffic in *Arabidopsis* merge in the trans-Golgi network/early endosome, an independent and highly dynamic organelle. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 1344-1357, 2010.

WANG, C.; HU, T.; YAN, X.; MENG, T.; WANG, Y.; WANG, Q.; ZHANG, X.; GU, Y.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, C.; GADEYNE, A.; LIN, J.; PERSSON, S.; VAN DAMME, D.; LI, C.; BEDNAREK, S.Y.; PAN, J. Differential Regulation of Clathrin and Its Adaptor Proteins, AP-2 and the TPLATE Complex, during Their Membrane Recruitment in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 171, p.215-229, 2016.

WANG, C.; YAN, X.; CHEN, Q.; JIANG, N.; FU, W.; MA, B.; LIU, J.; LI, C.; BEDNAREK, S.Y.; PAN, J. Clathrin light chains regulate clathrin-mediated trafficking, auxin signaling, and development in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 25, p. 499-516, 2013.

WANG, Q.; ZHAO, Y.; LUO, W.; LI, R.; HE, Q.; FANG, X.; MICHELE, R.D.; AST, C.; VON WIRÉN, N.; LIN, J. Single-particle analysis reveals shutoff control of the *Arabidopsis* ammonium transporter AMT1;3 by clustering and internalization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, p. 13204-13209, 2013.

WEN, J.; LEASE, K.A.; WALKER, J.C. DVL: a novel class of small polypeptides: overexpression alters *Arabidopsis* development. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, p. 668-677, 2004.

WHITFORD, R.; FERNANDEZ, A.; TEJOS, R.; PÉREZ, A.C.; KLEINE-VEHN, J.; VANNESTE, S.; DROZDZECKI, A.; LEITNER, J.; ABAS, L.; AERTS, M.; HOOGEWIJS, K.; BASTER, P.; De GROODT, R.; LIN, Y.C.; STORME, V.; VAN DE PEER, Y.; BEECKMAN, T.; MADDER, A.; DEVREESE, B.; LUSCHNIG, C.; FRIML, J.; HILSON, P. GOLVEN secretory peptides regulate auxin carrier turnover during plant gravitropic responses. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 22, p. 678-685, 2012.

WU, J.; KURTEN, E.L.; MONSHAUSEN, G.; HUMMEL, G.M.; GILROY, S.; BALDWIN, I.T. NaRALF, a peptide signal essential for the regulation of root hair tip apoplastic pH in *Nicotiana attenuata*, is required for root hair development and plant growth in native soils. **The Plant Journal**, Oxford, v. 52, p. 877-890, 2007.

YAMAGUCHI, Y.; HUFFAKER, A.; BRYAN, A.C.; TAX, F.E.; RYAN, C.A. PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 508-522, 2010.

YAMAKAWA, S.; MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y.; KAMADA, H.; SATOH, S. Promotive effects of the peptidyl plant growth factor, phytosulfokine- α , on the growth and chlorophyll content of *Arabidopsis* seedlings under high night-time temperature conditions. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 63, p. 2240–2243, 1999.

YAMAKAWA, S.; SAKURAI, C.; MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y.; KAMADA, H.; SATOH, S. The promotive effects of a peptidyl plant growth factor, phytosulfokine, on the formation of adventitious roots and expression of a gene for a root-specific cystatin in cucumber hypocotyls. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 111, p. 453–458, 1998.

YAMAOKA, S.; SHIMONO, Y.; SHIRAKAWA, M.; FUKAO, Y.; KAWASE, T.; HATSUGAI, N.; TAMURA, K.; SHIMADA, T.; HARA-NISHIMURA, I. Identification and dynamics of *Arabidopsis* adaptor protein-2 complex and its involvement in floral organ development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 25, p. 2958-2969, 2013.

YANG, H.; MATSUBAYASHI, Y.; NAKAMURA, K.; SAKAGAMI, Y. *Oryza sativa* PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine- α , a sulfated peptide growth factor found in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, p. 13560–13565, 1999.

_____. Diversity of *Arabidopsis* genes encoding precursors for phytosulfokine, a peptide growth factor. **The Plant Physiology**, Lancaster, v. 127, p. 842–851, 2001.

YEUNG, B.G.; PHAN, H.L.; PAYNE, G.S. Adaptor complex-independent clathrin function in yeast. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 10, p. 3643-3659, 1999.

ZHAO, Y.; YAN, A.; FEIJÓ, J.A.; FURUTANI, M.; TAKENAWA, T.; HWANG, I.; FU, Y.; YANG, Z. Phosphoinositides regulate clathrin-dependent endocytosis at the tip of pollen tubes in *Arabidopsis* and tobacco. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 4031-4044, 2010.

ZHAO, Z.; ANDERSEN, S.U.; LJUNG, K.; DOLEZAL, K.; MIOTK, A.; SCHULTHEISS, S.J.; LOHMANN, J.U. Hormonal control of the shoot stem-cell niche. **Nature**, London, v. 465, p. 1089-1092, 2010.

ZHENG, H.; KUNST, L.; HAWES, C.; MOORE, I. A GFP-based assay reveals a role for RHD3 in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, p. 398-414, 2004.

ZWIEWKA, M.; FERARU, E.; MÖLLER, B.; HWANG, I.; FERARU, M.I.; KLEINE-VEHN, J.; WEIJERS, D.; FRIML, J. The AP-3 adaptor complex is required for vacuolar function in Arabidopsis. **Cell Research**, Basingstoke, v. 21, p. 1711-1722, 2011.

ANEXOS

Anexo A - Sequência dos iniciadores utilizados para clonagem, análise de expressão por RT-PCR e genotipagem

	Anelamento Temp. (°C)	Fragmento (bp)	Nome dos iniciadores (F/R)	Sequência de nucleotídeos (5'→3')
Confirmação dos mutantes por inserção de T-DNA	58	980	Salk_133492_F	CCTGCCAAAGACGCAAGTGTTG
			Salk_133492_R	CACATGCCATGACACTCCTCAACTAC
	58	1100	Salk_093840_F	CCGTCGGAGATGGAATCAGATGAG
			Salk_093840_R	CTCTCTGTTAGCTGCTTTGTTGTTTTCAC
	58	1007	Salk_024235_F	AATCACATGGACGACAAAACC
			Salk_024235_R	AAGCAAATTTGGTTTCCTTCG
	58	1129	Salk_016049_F	GCTCAATGATTGTGCCAATTC
			Salk_016049_R	GCCATAGCACGAAATCAGATC
	58	1105	CS100219_F	GACGGAGGAAACTTCACGGCTTAC
			CS100219_R	CACTCACACTCACATTCGGGTCAG
	58	1125	Salk_083693_F	GCACAAAGAAAAGTCAGTGGC
			Salk_083693_R	GCAATGCTAATGTTGCTTGTTG
	58		T-DNA LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
			sgtDs3'-1	GGTCCCCGTCCGATTTTCGACT
	58	389	At5g67070_F	ATGGCAGCTTCGTCTCTCAATCTC
			At5g67070_R	CTATCTCCGGCATCGAGTGATC
Análise por RT-PCR Semi-quantitativo	60	160	HRGP2_F	TGTAGCATGGGCTACGACTG
			HRGP2_R	AAGGCACACTGTTCCGTTTC
	60	155	AtPRP3_F	GTTCCGACCCAGCATCATA
			AtPRP3_R	GCAAGTCTCGACCGGAGATA
	60	528	AtCML38_F	ATGAAGAATAATACTCAACCTCAATCATC
			AtCML38_R	TTAGCGCATCATAAGAGCAAATC
	60	360	AtRALF1-F	ATGGACAAGTCCTTTACTCTGT
			AtRALF1-R	ACTCCTGCAAGCAGCAATTT
	60	195	CLC1_F	CAATTGCAGAGCTAATCCCTCGTG
			CLC1_R	AGGAGGAGGCGGCATCATG
	60	143	CLC2_F	CCGTCGGAGATGGAATCAGATGAG
			CLC2_R	CTCTCTGTTAGCTGCTTTGTTGTTTTCAC
	60	636	CLC3_F	GACGGAGGAAACTTCACGGCTTAC
			CLC3_R	CACTCACACTCACATTCGGGTCAG
	60	62	GAPDH_F	TTGGTGACAACAGGTCAAGCA
			GAPDH_R	AAACTTGTCGCTCAATGCAATC

Anexo A - Sequência dos iniciadores utilizados para clonagem, análise de expressão por RT-PCR e genotipagem

Continuação...

	Anelamento Temp. (°C)	Fragmento (bp)	Nome dos iniciadores (F/R)	Sequência de nucleotídeos (5' → 3')
Construção de plasmídeos	58	226	T35S_F	GCGGGGCCCAGGTCACTGGATTTTGGTT
			T35S_R	GACGAGCTGTACAGATCTTAACGGCCATGCTAGAGTCCGCA
	58	714	mCherry_F	GCGGACTCTAGCATGGCCGTTAAGATCTGTACAGCTCGT
			mCherry_R	CAAAATTGCTCGTTGCAGGAGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
	58	360	RALF1_F	CTCCTCGCCCTTGCTCACCATACTCCTGCAACGAGCAATTT
			RALF1_R	GCG <u>ACTAGT</u> ATGGACAAGTCCTTTACTCTGT
	58		pAtRALF1:RALF1_F	CACCCTATTAATTTTATGTGTCTTAC
		2756	pAtRALF1:RALF1_R	ACTCCTGCAACGAGCAATTTTG
			T35S	TGCCTGCAGGTCACTGGATTTTGGTTTTAGGAA
	58	3112	pAtCLC3:AtCLC3_F	AAAAATTGTCAATCTAATTTCTG
			pAtCLC3:AtCLC3_R	CAACTTCTCTGTAAGTGTGACCTG
			T35S	TGCCTGCAGGTCACTGGATTTTGGTTTTAGGAA
	58	1601	pAtCML38:AtCML38_F	CACCTCTTTAGTCTCTTTTAAATGCA
			pAtCML38:AtCML38_R	GCGCATCATAAGAGCAAACCTCA
	58	150	AtRALF1- <i>NedI</i> -F	GGG <u>CATATG</u> GCGACCACAAAATACAT
			AtRALF1- <i>HindIII</i> -F	TTG <u>AAGCTT</u> CTAACTCCTGCAACGAGCAAT
	60	180	AtTUB_F	TTTGTGCTCATCTTGCCACGGAAC
			AtTUB_R	CTCAAGAGGTTCTCAGCAGTACC

Anexo B - Localização da proteína GFP em hipocótilos de plantas pAtRALF1:AtRALF1-GFP, crescidas no escuro

RALF1-RALF1-GFP

Anexo C - Análise *in silico* da expressão gênica do peptídeo AtRALF1. (A) Valores de expressão relativa do gene *AtRALF1* em estágios do desenvolvimento de *Arabidopsis* Schmid et al. (2005). (B) Representação percentual dos valores da expressão do gene *AtRALF1* em raiz e hipocótilo (C) Representação gráfica da expressão do gene *AtRALF1* nas regiões de desenvolvimento radicular (I=meristemática, II = alongação e III = diferenciação), asteriscos mostram as camadas celulares * = epiderme, * = córtex, * = endoderme e * = periciclo. (D) Quantificação dos valores *in silico* na região de crescimento radicular III obtidos por Birnbaum et al. (2003), apresentados de forma gráfica na figura (Anexo C-D)

A

B

C

D

Anexo D - Localização subcelular do peptídeo AtRALF1 fusionado a GFP com o marcador VAMP711-mCherry, um marcador de vacúolo. Escala = 10 μ m

Anexo E - Análise fenotípica de plantas Col-0, p35S:AtRALF1 e p35S:AtRALF1-mCherry. Representação de plantas (A) inteiras, (B) raiz e (C) hipocótilo. Comparação de médias do (D) comprimento de raiz, (E) densidade de primórdios de raiz lateral e (F) comprimento do hipocótilo. (G) Comparação fenotípica dos pelos radiculares e (H) imunodeteção do peptídeo AtRALF1 (5 kDa) em plantas Col-0 e p35S:AtRALF1. Barras mostram as médias $\pm$ SD. Asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; teste t). Escala = 0,3 cm.

Anexo F - Imunolocalização do peptídeo AtRALF1 em plantas Col-0 e p35S:AtRALF1. (A) Imunolocalização do peptídeo AtRALF1 em células de raiz Col-0 e p35S:AtRALF1, anti-RALF1 (1/1000), anti-*rabbit* IG-Cy3 (1/600). (B) Quantificação da intensidade do sinal interno da -Cy3 em células Col-0 e p35S:AtRALF1. Barras indicam as médias $\pm$ SD. Asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, teste *t*)

A **B**

Anexo G - Imunolocalização do peptídeo AtRALF1 em plantas Col-0, p35S:AtRALF1 e $\mu 2$ na ausência do anticorpo primário anti-RALF1 e presença do anticorpo secundário anti-*rabbit* IG-Cy3

Anexo H - Confirmação dos mutantes *clc1*, *clc2*, *clc3* e *clc2-1xclc3-1*. (A) Representação esquemática da inserção dos T-DNAs dos mutantes *clc1*, *clc2*, *clc3*, *clc2-1* e *clc3-1*, barras sólidas são exons, linhas contínuas são introns e barras cinzas são regiões 5 e 3 UTR. (B) Genotipagem dos mutantes *clc1*, *clc2* e *clc3*, usando os iniciadores que flanqueiam o T-DNA (F e R, Anexo A) e detectam o T-DNA (LBb1.3, Anexo A), os iniciadores do gene *AtRALF34* (At567070) foi utilizado como um controle positivo do DNA. (C e D) RT-PCR usando RNA total de raízes de plantas selvagens (Col-0) e dos mutantes *clc1*, *clc2*, *clc3*, *clc2-1xclc3-1*. O gene *GAPDH* foi usado como um controle interno da síntese do cDNA

Anexo I - Efeito da alcalinização dos inibidores de endocitose e solventes em células em suspensão MM1. Diferentes concentrações de DMSO (puro, 5 μ L), TyrA23 (30 μ M), Wm (20 μ M), BFA (25 μ M), H₂O foram adicionados e monitorados por um período de 30 min. Os valores em Δ pH foram plotados no gráfico de barras. Barras indicam as médias $\pm$ SD.