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

Componentes genéticos que afetam a via de direcionamento de proteínas organelares em *Arabidopsis thaliana*

Larissa Spoladore

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Programa: Internacional Biologia Celular e Molecular Vegetal

Piracicaba
2016

Larissa Spoladore
Bacharel em Ciências Biológicas

Componentes genéticos que afetam a via de direcionamento de proteínas organelares em *Arabidopsis thaliana*

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Programa: Internacional Biologia Celular e Molecular Vegetal

Piracicaba
2016

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

Spoladore, Larissa
Componentes genéticos que afetam a via de direcionamento de proteínas organelares em *Arabidopsis thaliana* / Larissa Spoladore. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.
100 p. : il.

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

1. Localização Sub-celular 2. Duplo Direcionamento 3. Sequências de Direcionamento 4. Chaperonas 5. Interações proteína-proteína 6. *Arabidopsis* 7. Proteínas 14-3-3 I. Título

CDD 581.873224
S762c

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

Dedico a Edna, Airton, Felipe e Edgard.

Não há agradecimentos à altura do que vocês fizeram por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Marcio de Castro Silva Filho, pela orientação e por compartilhar seu entusiasmo pela pesquisa. Agradeço especialmente pela força e confiança que me passou no momento mais difícil que passei em 2014.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento da bolsa no País e BEPE.

A Daniel Scherer de Moura pela amizade e ajuda com dificuldades do projeto.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, atuais e passados, pelo compartilhamento de experiência, companheirismo e amizade. Especial agradecimento aos amigos: Karina Lopes, Thais Paula, Renata Dias, Flavia Franco, Marcelo Brandão, Wellington Campos, Poliene Costa, Bianca Ribeiro, Tabata Bergonci e Márcia Leite.

Agradecimentos a Rafael Colombi, pelo seu trabalho muito bem feito e dedicação ao laboratório, e pela grande amizade e companheirismo durante tantos anos.

A Jelena Brkljacic, pela orientação no ABRC Lab; e a Erich Grotewold, pela contribuição com idéias para o projeto e preocupação com meu bem estar na OSU.

Agradeço aos pesquisadores e funcionários do Center for Applied Plant Sciences (CAPS) da Ohio State University que me acolheram em seus laboratórios ou compartilharam equipamentos, conhecimento e tornaram minha experiência na OSU tão instrutiva. Agradecimentos especiais a Donnalyn Roxey e Joanna Gardner, que tornaram tudo mais fácil.

Aos alunos e funcionários do ABRC Lab, especialmente Bettina, Luz, Benson, Eva, Leonard, Milica, Hehuan e Gauri, pelos ensinamentos, companheirismo e amizade, desde minha chegada até minha partida de Columbus.

Aos roomates da Blake House, que me proporcionaram uma experiência cultural internacional excelente.

Agradecimentos especiais aos amigos: Marcela S. Joaquim, Aline Borges, Eveline C. Meneguetti, Sheila Carvalho, Gustavo Recchia, Viviane Piccin e Renee Thomas, pela amizade de tantos anos e pela presença contínua em minha vida.

A Silvana Cadorin Araújo, agradeço por sua amizade e convivência de tanto tempo que já te fez alguém da minha família.

A Juliana Longato pela amizade, força, e por não me deixar desistir jamais.

A Seli Tedeschi, por sua presença essencial em nossa casa e por ter uma disposição a ajudar os outros que é admirável. Obrigada por tudo.

À minha avó, Laura Scagnolatto, pela sua presença e companhia amorosa.

A meus pais Edna e Airton, que são os melhores amigos que eu poderia ter, pela companhia diária, de perto ou longe. Com vocês eu percebi que não há lugar como a nossa casa. Obrigada pelo apoio e carinho sempre.

Ao meu irmão Felipe, por ter ido ao meu resgate e me fazer rir em todas as situações.

Agradecimentos especiais a Edgard, por seu amor e sua amizade. Seu apoio me deu determinação para me levantar e para continuar seguindo meus sonhos, e você está presente neles.

"In the depth of winter, I finally learned that within me there lay an invincible summer."
— Albert Camus

SUMÁRIO

RESUMO…….....11
ABSTRACT…….....13
1 INTRODUÇÃO…….……..…...15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA…….....17
2.1 A endossimbiose…….....17
2.2 Direcionamento organelar…….…….…….20
2.2.1. Importação de proteínas às mitocôndrias…….……...20
2.2.2 Importação de proteínas aos cloroplastos…….....…..22
2.2.3 Sequências de direcionamento…….....…...23
2.2.4 O duplo direcionamento.....…….…...24
2.2.5 Outros sinais que afetam a localização de proteínas organelares……....25
2.3 Regulação do direcionamento organelar e o tráfego de proteínas no citosol…….....25
2.4 Proteínas 14-3-3 e seu potencial como reguladora do destino celular de proteínas organelares…….....27
2.4.1 THI1 e TH-1, enzimas responsáveis pela biossíntese de tiamina em plantas…….....29
2.4.2 Estrutura e funções das proteínas 14-3-3…….....31
3 MATERIAL E MÉTODOS……..…....37
3.1 Cultivo do material vegetal……....37
3.2 Extração de RNA total…….…….....37
3.3 Síntese de cDNA……..…..38
3.4 Eletroforese em gel de agarose…….....38
3.5 Digestões enzimáticas do DNA…….....38
3.6 Purificação dos fragmentos de DNA a partir de gel de agarose…….....38
3.7 Clonagens…….….....39
3.8 Mini-preparação de DNA plasmidial de *Escherichia coli*…….…….....40
3.9 Transformação de *Escherichia coli*…….....41
3.9.1 Preparo de células eletrocompetentes de *Escherichia coli*…….…….…....41
3.9.2 Eletroporação de *Escherichia coli*…….…….....42
3.10 Transformação de *Agrobacterium tumefasciens*…….…….....42
3.10.1 Preparo de células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefasciens*…….....42
3.10.2 Eletroporação de *Agrobacterium tumefasciens*……..…...42
3.11 Transformação para expressão transiente de *Nicotiana tabacum*…….....43
3.12 Transformação para expressão transiente em *Arabidopsis thaliana*……..….43

3.13 Transformação de *Arabidopsis thaliana*.....44
3.13.1 Transformação de plantas…….....44
3.13.2 Seleção de plantas transformadas.....45
3.14 Extração de DNA genômico de planta……....…….....45
3.15 Ensaios de duplo-híbrido em levedura.….....……..45
3.15.1 Transformação da linhagem AH109 com os genes de interesse.....45
3.15.2 Teste de crescimento em SC-HIS e SC-ADE…….....46
3.16 Complementação de Fluorescência Bimolecular (BiFC)…….....46
3.17 Microscopia confocal de fluorescência……..……...……...47
3.18 Modelagem estrutural e predição de interações proteína-proteína…….....47
3.19 Obtenção de genótipo mutante…….....49
4 RESULTADOS…….....……..51
4.1 Localização sub-celular das proteínas GRF9, THI1 e MST1…….…….....51
4.2 A proteína GRF9 interage com THI1 e MST1 *in vivo* e *in planta*…….…....56
4.3 A região Box-1 é importante para a interação entre GRF9 e proteínas cliente……59
4.4 Predição de aminoácidos importantes na interação de GRF9 e proteínas alvo……60
4.5 Análises de expressão em mutantes silenciados…….…....63
4.6 Obtenção de plantas trangênicas superexpressando GRF9……....64
4.7 Obtenção de genótipo CS3469/TH-1-GFP……...…….....65
5 DISCUSSÃO…….…..71
6 CONCLUSÕES……....75
REFERÊNCIAS…….77
APÊNDICES…….…..91
ANEXOS…….....97

RESUMO

Componentes genéticos que afetam a via de direcionamento de proteínas organelares em *Arabidopsis thaliana*

Nos eucariotos, a evolução dos sistemas de transporte molecular foi essencial pois seu alto grau de compartimentalização requer mecanismos com maior especificidade para a localização de proteínas. Com o estabelecimento das mitocôndrias e plastídeos como organelas da célula eucariota, grande parte dos genes específicos para sua atividade e manutenção foram transferidos ao núcleo. Após a transferência gênica, a maioria das proteínas passaram a ser codificadas pelo núcleo, sintetizadas no citosol e direcionadas às organelas por uma maquinaria complexa que envolve receptores nas membranas das organelas, sequências de direcionamento nas proteínas e proteínas citossólicas que auxiliam o transporte. A importação depende em grande parte de uma sequência na região N-terminal das proteínas que contém sinais reconhecidos pelas membranas organelares. No entanto, muito ainda não é compreendido sobre o transporte de proteínas organelares e fatores ainda desconhecidos podem influenciar o direcionamento sub-celular. O objetivo deste trabalho foi a caracterização da General Regulatory Factor 9 (GRF9), uma proteína da família 14-3-3 de *Arabidopsis thaliana* potencialmente envolvida no direcionamento de proteínas organelares, e a geração de um genótipo para ser utilizado na obtenção de uma população mutante para genes que afetam o direcionamento da proteína Tiamina Monofosfato Sintetase (TH-1). Após experimentos *in vivo* e *in planta*, foi observado que GRF9 interage com as proteínas duplo-direcionadas Mercaptopyruvate Sulfurtransferase1 (MST1) e a Thiazole Biosynthetic Enzyme (THI1), e com a proteína direcionada aos cloroplastos TH-1. Experimentos de deleção e interação *in vivo* mostraram que a região Box1 de GRF9 é essencial para a interação com THI1 e MST1. Com a finalidade de dar continuidade a caracterização da GRF9 e para realização de testes com relação a sua função no direcionamento de proteínas organelares foi gerada uma linhagem homozigota que superexpressa GRF9. Plantas expressando o transgene TH-1 fusionado a Green Fluorescent Protein (GFP) em genótipo deficiente na TH-1 (CS3469/TH-1-GFP) foram obtidas para a geração de população mutante que possibilitará a descoberta de componentes genéticos ainda desconhecidos e responsáveis pelo direcionamento de proteínas aos cloroplastos.

Palavras-chave: Localização Sub-celular; Duplo Direcionamento; Sequências de Direcionamento; Chaperonas; Interações proteína-proteína; *Arabidopsis*; Proteínas 14-3-3

ABSTRACT

Genetic components affecting organelar protein targeting in *Arabidopsis thaliana*

In Eukaryotes, the evolution of molecular transport in the cell was essential due to their increase in compartmentalization, which requires more specific mechanisms for the correct localization of proteins. With the establishment of mitochondria and plastids as organelles, a great number of their genes, either specific for their metabolic functions or maintenance of their own transcription/translation processes, were transferred to the nucleus of the cell. These transfers caused most of the organellar proteins to be coded by the nucleus, then synthesized in the cytosol and targeted to the organelles by a complex machinery which involves membrane receptors in the organelles, targeting sequences in the proteins, and cytosolic proteins which assist them with the transport. Protein import depends greatly on an N-terminal sequence in proteins which has recognizable signals for the organellar membrane receptors. However, much is still not understood about the transport of organellar proteins, and unknown factors may still influence subcellular targeting. The goal of this work was the characterization of General Regulatory Factor 9 (GRF9), a protein of the 14-3-3 family in *Arabidopsis thaliana* potentially involved in the targeting of organellar proteins, and generating a genotype to be used in obtaining a mutant population for genes affecting the targeting of the protein Thiamine Requiring 1 (TH-1). After *in vivo* and *in planta* experiments it was observed that GRF9 interacts with the dual-targeted proteins Mercaptopyruvate Sulfurtransferase1 (MST1) and Thiazole Biosynthetic Enzyme (THI1), and with the chloroplast targeted protein TH-1. Deletion experiments followed by *in vivo* interaction assays showed that Box 1 region of GRF9 is essential for the interaction with THI1 and MST1. For the continuing characterization of GRF9 and for following tests of its function in the targeting of organellar proteins, a homozygous line was generated overexpressing GRF9. Plants expressing the transgene TH-1 fused to the Green Fluorescent Protein (GFP) in a TH-1 deficient genotype (CS3469/TH-1-GFP) were obtained for the generation of a mutant population which will allow the discovery of genetic components still unknown responsible for targeting proteins to the chloroplasts.

Keywords: Subcellular localization; Dual-targeting; Targeting sequences; Chaperones; Protein-protein interactions; *Arabidopsis*; 14-3-3 Proteins

1 INTRODUÇÃO

A maquinaria que existe em células vegetais para o correto direcionamento de proteínas aos diferentes compartimentos sub-celulares é essencial para que as funções da célula sejam executadas. Essa maquinaria evoluiu desde o surgimento da célula eucariota, que encontrou o caminho da compartimentalização, com a organização de um sistema intracelular de membranas que permitiu que reações bioquímicas incompatíveis fossem separadas, e com a endossimbiose, que exigiu maior especificidade nos mecanismos de direcionamento (VAN DER LAAN M; HUTU; REHLING, 2010). Após o descobrimento da origem das mitocôndrias e cloroplastos pela endossimbiose (SAGAN, 1967; GRAY, 1982; GRAY, 1999), a evolução das organelas pôde ser melhor compreendida. Desde então, proteínas e fatores moleculares têm sido associados aos mecanismos envolvidos no transporte de proteínas às organelas. Apesar de possuírem material genético próprio, as organelas tiveram a maior parte de seus genes transferidos ao núcleo da célula eucariota, fazendo com que proteínas necessárias a seu funcionamento sejam hoje sintetizadas em ribossomos citosólicos, e então direcionadas a seu destino final. Além de regular as funções específicas de cada organela, a célula eucariota sintetiza proteínas que mantêm funções de reparo e transcrição do DNA organelar (CARRIE; SMALL, 2013). Estudos do proteoma de mitocôndrias purificadas de *Saccharomyces cerevisiae* mostraram que as mitocôndrias contêm aproximadamente 1000 proteínas, sendo que apenas 8 dessas proteínas são codificadas pelo DNA mitocondrial e sintetizada por ribossomos mitocondriais, as demais são importadas do citosol (SICKMANN et al., 2003).

A importação de proteínas às organelas ocorre pela ação de uma maquinaria específica que inclui receptores nas membranas das organelas, sinais de direcionamento nas proteínas e proteínas citossólicas que auxiliam o transporte (CARRIE; SMALL, 2013). A maioria das proteínas mitocondriais e cloroplastidiais é codificada pelo núcleo com um sinal de direcionamento em sua sequência N-terminal que é importante na translocação da proteína pelas membranas externa e interna das organelas ao interagir com proteínas receptoras específicas que realizam a importação (KUNZE; BERGER, 2015). Existem relatos de mais de 50 proteínas duplo-direcionadas para mitocôndrias e cloroplastos em plantas. Estas proteínas, codificadas pelo mesmo gene, possuem funções comuns a ambas às organelas e podem gerar dois produtos finais distintos, ou gerar o mesmo produto contendo uma pré-sequência de direcionamento ambígua, que é reconhecida por mais de uma organela (CARRIE; GIRAUD; WHELAN, 2009). Além das sequências de direcionamento, proteínas citosólicas, como as chaperonas, possuem um papel importante no transporte das proteínas

organelares (FLORES-PÉREZ; JARVIS, 2013). O direcionamento de proteínas às organelas é regulado conforme as necessidades fisiológicas da célula, e existem relatos de que a própria organela pode enviar sinais ao núcleo para indicar a necessidade de determinadas proteínas sintetizadas no citosol (KRAUSE; OETKE; KRUPINSKA, 2012). Assim, as proteínas direcionadas às organelas podem variar em células de tecidos diferentes, organismos, e em condições fisiológicas alteradas, para que as necessidades enzimáticas da organela (e da célula) sejam atendidas (ANDERSEN; MANN, 2006; FORNER et al., 2006). Como existem exceções quanto ao modo de transporte, aos tipos de sinais de direcionamento nas pré-proteínas, e nos complexos citossólicos que podem influenciar o transporte de proteínas às mitocondrias e cloroplastos (LEE; JUNG; HWANG, 2012), o estudo de novos fatores pode revelar mecanismos desconhecidos de regulação do transporte de proteínas organelares em plantas.

O objetivo deste trabalho foi investigar fatores citosólicos potencialmente envolvidos no direcionamento sub-celular de proteínas organelares em *Arabidopsis thaliana*. Caracterizou-se a proteína GRF9, uma proteína pertencente à família 14-3-3, potencialmente envolvida no destino celular de proteínas organelares, e gerou-se o genótipo CS3469/TH-1-GFP que será usado para a obtenção de uma população mutagenizada para a descoberta de genes que afetam a localização de TH1, uma proteína cloroplastidial envolvida na biossíntese da tiamina em plantas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O transporte correto de substâncias nas células procariotas e eucariotas, é essencial para o funcionamento de vias bioquímicas essenciais. Em procariotos, os mecanismos de transporte de proteínas se limitam a poucos compartimentos, como membrana citoplasmática, parede celular, periplasma e membrana externa, além da secreção ao meio extracelular. Já em eucariotos, os sistemas de transporte molecular se tornaram mais específicos, para que componentes essenciais a processos bioquímicos fossem localizados nas diversas organelas corretamente. Dessa forma, a célula eucariota pôde tornar suas funções cada vez mais especializadas e eficazes.

O direcionamento sub-celular tornou-se ainda mais específico com o estabelecimento das mitocôndrias e cloroplastos como organelas da célula eucariota, que tornaram-se responsáveis pelo metabolismo energético da célula, agindo na respiração e fotossíntese.

2.1 A endossimbiose

A teoria da simbiogênsese foi primeiro proposta por Konstantin Mereschkowski em 1905, que afirmou que os cloroplastos haviam se originado a partir de organismos procariotos em associação simbiótica com outra célula. A idéia foi inspirada no estudo de Mereschkowski da simbiose em liquens, e a teoria não teve grandes repercursões na época. Anos depois a endossimbiose seria proposta por Lynn Margulis (SAGAN, 1967) e oficialmente provada com o livro “Symbiosis in Cell Evolution” de 1981. Após grandes volumes de dados que suportaram a hipótese nos últimos 30 anos, pôde-se desvendar a origem das mitocôndrias e cloroplastos, as organelas responsáveis pelo metabolismo energético em células eucariotas. Acredita-se que essas inovações metabólicas provenientes da endossimbiose direcionaram a evolução na Terra (O’MALLEY, 2015), pois levaram a maior complexidade dos organismos e diversidade de ambientes nos quais se podia prosperar. A proposta de Lynn foi que o cloroplasto se originou de uma cianobactéria de vida livre que foi assimilada por um protozoário e reduzida com o tempo a uma máquina metabólica desta célula. Similarmente criou a hipótese que a mitocôndria descende de uma bactéria endossimbiótica capaz de respiração aeróbica (SAGAN, 1967).

Nos anos 1980, provou-se que as mitocôndrias e cloroplastos possuem seu próprio DNA que até então acreditava-se existir apenas no núcleo. Também foi descoberto que as organelas possuem um sistema independente de replicação do seu DNA. Com a análise da sequência do DNA mitocondrial e cloroplastidial, provou-se que são mais próximas de

cianobactérias e proteobactérias do que da sequência nuclear eucariota (GRAY; DOOLITLE, 1982).

Além da similaridade observada entre procariotos e organelas, evidências no registro fóssil confirmaram a hipótese da endossimbiose. A data do surgimento das bactérias anaeróbicas foi aproximadamente a 3.8 bilhões de anos atrás, período em que a atmosfera da Terra não possuía oxigênio. Com o surgimento das cianobactérias (~3.2 bilhões de anos atrás) ocorreu o acúmulo de oxigênio na atmosfera e o consequente desaparecimento de muitas bactérias anaeróbicas, pela toxicidade da atmosfera. O surgimento de organismos que puderam prosperar na atmosfera rica em oxigênio ocorreu pouco tempo depois (~2.5 bilhões de anos atrás), com células aeróbicas que foram capazes de utilizar o oxigênio e convertê-lo em energia (ATP) e água (O'MALLEY, 2015).

A origem e o estabelecimento de uma organela fotossintética presente em algas e plantas, o plastídeo, há mais de um bilhão (1,558 milhões de anos atrás) de anos atrás (YOON et al., 2004), é tida como uma das inovações biológicas mais importantes do planeta (FALKOWSKI et al., 2004; ROCKWELL et al., 2014). O estabelecimento do cloroplasto como organela ocorreu com um evento endossimbiótico primário no qual um protista fagotrófico, previamente não fotossintético, englobou uma cianobactéria. A endossimbiose que gerou plastídeos pode ser de três tipos: primária, secundária e terciária (Figura 1). A primária resultou da assimilação de um procarioto fotossintético (cianobactéria) e deu origem a um plastídeo contendo duas membranas, e posteriormente, a membrana externa se perdeu. Acredita-se que endossimbiose primária ocorreu apenas uma vez durante a evolução, com um ancestral comum do supergrupo eucariótico Archaeplastida que inclui algas vermelhas, glaucófitas, algas verdes e plantas terrestres (Viridiplantae) (RODRÍGUEZ-EZPELETA et al., 2005; CHAN et al., 2011; PRICE et al., 2012). Uma vez estabelecidos, os plastídeos foram transferidos verticalmente para outras linhagens como diatomáceas, haptófitas, euglênidas e a maioria dos dinoflagelados (BHATTACHARYA; HACKETT; YOON, 2003).

Muitas linhagens de algas surgiram a partir de um evento endossimbiótico secundário, como os cromistas (diatomáceas e algas pardas). Neste grupo, um protista englobou uma alga eucariótica (no caso, uma alga vermelha). No caso dos dinoflagelados, ocorreram eventos terciários (ou até quaternários) de endossimbiose, em que ocorreu o englobamento de uma alga contendo um endosimbionte secundário (BHATTACHARYA; HACKETT; YOON, 2003; MCFADDEN, 2014).

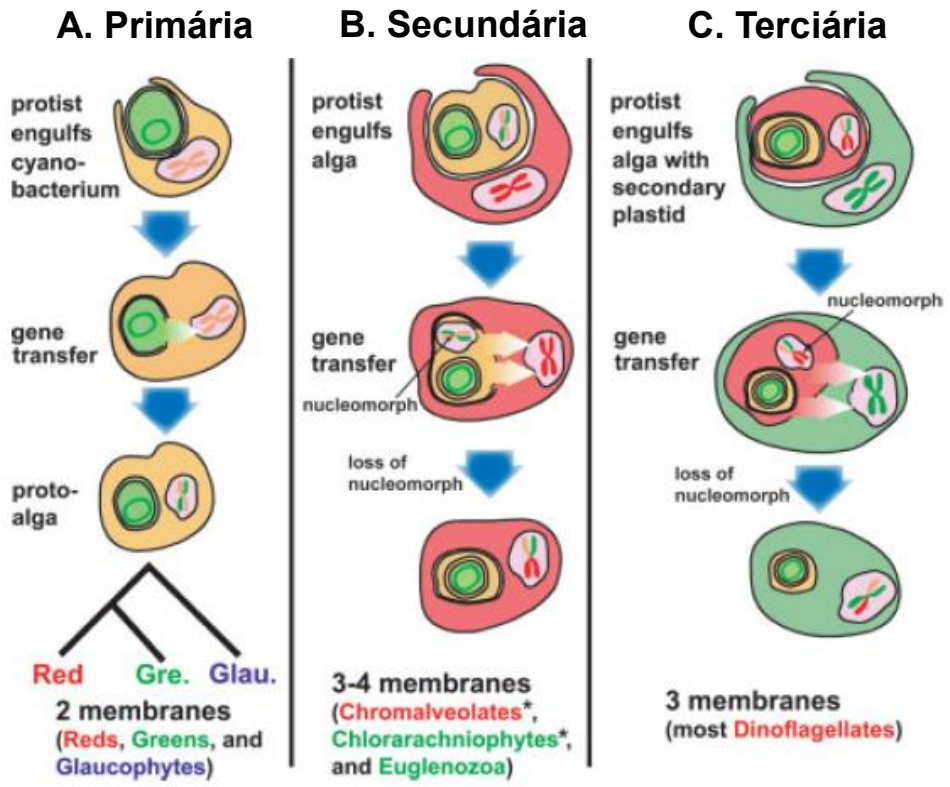


Figura 1 - Origem dos plastídeos via endossimbiose primária (A), secundária (B), e terciária (C). Transferência gênica do endossimbionte para o núcleo hospedeiro é mostrado com setas e cromossomos coloridos. A mitocôndria foi omitida nessas figuras. Adaptado de BHATTACHARYA; HACKETT; YOON (2003)

A ocorrência de endosimbiose primária de um plastídeo é apenas conhecida em mais uma linhagem de amebas fotossintéticas, que inclui *Paulinella chromatophora*. Sua organela fotossintética é chamada cromatóforo (BHATTACHARYA; ARCHIBALD, 2006; LAUTERBORN, 1895; MARIN; NOWACK; MELKONIAN, 2005; NOWACK et al., 2011; NOWACK; MELKONIAN; GLÖCKNER, 2008; YOON et al., 2009). Essa endosimbiose primária independente provavelmente ocorreu a 60 milhões de anos atrás e o doador do plastídeo pertencia a um membro do clado das α-cianobacterias (YOON et al., 2006; MARIN et al., 2007).

A mitocôndria descende de uma α-Proteobactéria endossimbiótica que foi assimilada por uma célula hospedeira similar às protistas amitocondriadas existentes hoje. Esta assimilação ocorreu apenas uma vez no processo evolutivo.

Com o estabelecimento das mitocôndrias e plastídeos, muitos genes específicos para sua atividade e manutenção foram transferidos ao núcleo da célula hospedeira. Assim, surgiram mecanismos que pudessem re-introduzir todas as proteínas a partir do citosol para as organelas para que pudessem exercer suas funções. Análises filogenéticas mostram que transferências gênicas para o núcleo ocorreram independentemente, o que tornou a

composição do DNA mitocondrial muito diversa nas várias linhagens eucarióticas (PITTIS; GABALDON, 2015).

A teoria da endossimbiose forneceu uma explicação bem fundamentada sobre a evolução da célula eucariota e é vista por muitos biólogos como um dos maiores avanços do século 20, pois explicou não apenas a conquista energética do ambiente terrestre, mas também a evolução do DNA nuclear eucarioto (O'MALLEY, 2015).

Além de proteínas responsáveis por funções específicas das organelas, o núcleo eucarioto passou a codificar proteínas que mantêm funções de reparo, replicação e transcrição do DNA organelar. Com a inserção desses genes no núcleo da célula, as sequências de muitos genes se encontraram duplicadas, o que abriu espaço para a seleção natural editar as cópias (nucleares ou provenientes dos endossimbiontes) por mutações, deleções, inserções, levando ao surgimento de novas funções (BRANDÃO; SILVA-FILHO, 2010; FUNES et al., 2002; KEELING; PALMER, 2001; MARTIN et al., 2002; STIBITZ; KEELING; BHATTACHARYA, 2000).

Com isso, a transfêrencia gênica dos endossimbiontes para as células eucariotas aumentou a complexidade nuclear, que em alguns casos manteve cópias de genes provenientes das organelas, aboliu a autonomia das organelas e influenciou de modo considerável a evolução das algas e subsequentemente plantas terrestres (MARTIN et al., 2002). Sabe-se que esta transferência de genes é frequente e que esse processo ainda está ocorrendo (STEGEMANN et al., 2003).

2.2 Direcionamento organelar

Após a transferência gênica de grande parte do genoma organelar, a maioria das proteínas passaram a ser codificadas pelo núcleo, sintetizadas no citosol e direcionadas de modo específico por uma maquinaria complexa que envolve receptores nas membranas das organelas que reconhecem sinais específicos, sequências de direcionamento nas proteínas e proteínas citossólicas que auxiliam o transporte.

2.2.1 Importação de proteínas às mitocôndrias

O sistema de importação de proteínas através das membranas das mitocôndrias é composto por complexos proteicos com múltiplas sub-unidades que reconhecem, translocam e montam as proteínas em complexos funcionais. As sub-unidades principais envolvidas na importação de proteínas mitocondriais são bem conservadas em grupos filogenéticos distantes

(BAUER et al., 1999), no entanto, as sub-unidades acessórias destes complexos diferem em identidade e função na comparação entre *Saccharomyces cerevisiae* e plantas (MURCHA et al., 2014).

As mitocôndrias possuem dois complexos proteicos responsáveis pela importação, chamados TOM (*translocon of the outer mitochondrial membrane*) e TIM (*translocon of the inner mitochondrial membrane*), respectivamente localizados na membrana externa e interna.

A maioria das proteínas solúveis presentes na matriz mitocondrial contém um sinal de direcionamento em sua sequência amino-terminal que media a interação com proteínas receptoras de membrana que fazem parte do complexo proteico TOM, que envolve Tom20, 22, 40, 70, 5, 6 e 7 (NEUPERT; HERRMANN, 2007).

Apesar das proteínas destinadas à matriz mitocondrial serem transportadas de modo pós-traducional, seu dobramento é impedido por chaperonas citosólicas da família Hsp70. Estas chaperonas e outros fatores proteicos da família 14-3-3 (MSF, *mitochondrial import stimulatory factor*) auxiliam a translocação de pré-proteínas à membrana mitocondrial (ALAM et al., 1994; KOMIYA et al., 1997).

Na membrana externa, elementos presentes na pré-sequência interagem sequencialmente com as proteínas receptoras Tom20 e Tom22. Estes receptores mediam a transferência da pré-sequência a proteína formadora de poro Tom40. A afinidade da pré-sequência a um domínio de Tom22 no espaço intermembrana leva a continuidade da passagem da proteína (KOMIYA et al., 1998).

No espaço inter-membranas, a pré-sequência interage com o complexo TIM, composto por Tim23, 50, 17, 21. Primeiramente, a pré-sequência se liga a Tim50 (YAMAMOTO et al., 2002) e é então transferida à proteína formadora de canal, Tim23. A translocação da pré-sequência através da membrana interna é movida pela força eletroquímica da membrana, que age nas cargas positivas da pré-sequência (SCHLEYER et al., 1982).

Do lado interno do poro Tim23, a pré-proteína se liga a mtHsp70, de modo dependente de ATP, e impede que a pré-proteína retorne pelo canal (NEUPERT; BRUNNER, 2002). Para isso, Tim23 interage com o complexo PAM (Presequence Translocase Associated Motor), presente do lado interno da membrana, que inclui mtHsp70 e também Tim44, 14, 16 e Mge1 (NEUPERT; HERRMANN, 2007).

Na matriz mitocondrial, a pré-proteína é processada pela peptidase de processamento mitocondrial (MPP) que libera a sequência N-terminal. A proteína processada então atinge sua conformação tridimensional final pelo auxílio de chaperonas específicas da família Hsp60 (KUNZE; BERGER, 2015).

2.2.2 Importação de proteínas aos cloroplastos

Os cloroplastos também possuem um complexo proteico nas membranas externa e interna, chamados TOC (*translocon on the outer chloroplast membrane*) e TIC (*translocon on the inner chloroplast membrane*) respectivamente.

As proteínas cloroplastidiais são codificadas pelo núcleo com um sinal de direcionamento em sua sequência N-terminal, denominado peptídeo de trânsito (BRUCE, 2000) que é importante na translocação da proteína. As proteínas sintetizadas no citosol se mantêm em um estado desdobrado até que interajam com proteínas receptoras de membrana na superfície dos cloroplastos. Para isso, são auxiliadas por chaperonas citosólicas da família Hsp70 (FLORES-PÉREZ; JARVIS, 2013) em cooperação com proteínas da família Hsp90 na ligação a peptídeos de trânsito não-fosforilados que se ligam a uma proteína específica da membrana externa (Toc64) (FELLERER et al., 2011), ou com proteínas da família 14-3-3 que se ligam especificamente a sequências fosforiladas nos peptídeos de trânsito (WAEGEMANN; SOLL, 1996; MAY; SOLL, 2000).

Na superfície do cloroplasto, os peptídeos de trânsito interagem sequencialmente com as proteínas receptoras Toc34 e Toc159, que fazem parte do complexo proteico TOC, que inclui TOC34, 159, 75, 64, 12. O peptídeo de trânsito estimula a atividade de GTPase de Toc43 e é tranferido para Toc159 (PAILA; RICHARDSON; SCHNELL, 2015) e, após desfosforilação, é transferido para o poro da membrana, que é formado por Toc75. O peptídeo de trânsito interage com Toc75 e em seguida com uma chaperona no espaço inter-membranas que auxilia a passagem pela membrana externa. Em seguida, o peptídeo de trânsito interage com Tic22 (KOURANOV et al., 1998) e com proteínas do complexo TIC, que inclui Tic100, Tic214, Tic56, Tic20/Tic21, e Tic40 e media a translocação da pré-proteína através da membrana interna dos cloroplastos (PAILA; RICHARDSON; SCHNELL, 2015).

É sugerido que as proteínas Tic20 e Tic110 são componentes do canal formado por TIC. O lado interno de TIC110 interage com os peptídeos de trânsito ao emergirem do poro e ambos se associam com a co-chaperona ligada a membrana Tic40, que em conjunto com Hsp90, Hsp93 e CpHsp70, do estroma, auxiliam a importação (LATIJNHOUWERS et al., 2010; KUNZE; BERGER, 2015). A importação de proteínas ao cloroplasto requer a hidrólise de GTP durante os estágios iniciais de inserção do peptídeo de trânsito (YOUNG et al., 2003), mas a translocação é movida pela hidrólise de ATP feita por chaperonas do estroma e em parte por uma chaperona presente no espaço inter-membranas (KUNZE; BERGER, 2015).

Quando as proteínas solúveis chegam ao estroma, elas são processadas pela peptidase de processamento do estroma (SPP) e o dobramento final da proteína é auxiliado por membros da família Hsp60 (Cnp60, chaperonina 60) (KUNZE; BERGER, 2015).

A membrana interna e as membranas dos tilacóides contêm seus próprios sistemas de separação que agem após a passagem das proteínas pelas membranas da organela, e consistem de vias conservadas adaptadas a partir dos ancestrais procariotos dos cloroplastos (PAILA; RICHARDSON; SCHNELL, 2015).

2.2.3 Sequências de direcionamento

O estabelecimento do sistema de importação de proteínas após a endossimbiose primária incluiu uma sequência extra (de 24 a 100 aminoácidos) na região N-terminal das proteínas contendo sinais reconhecidos pelas membranas organelares. Esta sequência provavelmente surgiu por mutações que extenderam a ORF original na extremidade 5’ e as proteínas com essa sequência foram direcionadas eficientemente e se mantiveram por seleção (BHATTACHARYA; YOON; HACKETT, 2003).

A pré-sequência N-terminal de mitocôndrias não pode ser descrita como uma sequência consenso, mas contém características frequentemente observadas (PEETERS; SMALL, 2001). Em plantas, sequências de direcionamento mitocondriais possuem em média 40 resíduos de aminoácidos, possui carga positiva, é rica em leucinas, alaninas e argininas, e poucos resíduos acídicos. A pré-sequência se organiza numa estrutura α-hélice anfifílica (VON HEIJNE; STEPPUHN; HERRMANN, 1989).

Já as sequências de direcionamento cloroplastidiais (ou peptídeos de trânsito) possuem cerca de 50 resíduos, são ricas em serinas e contêm poucos resíduos carregados positivamente, ao contrário das sequências mitocondriais. No entanto, são igualmente pobres em aminoácidos acídicos (VON HEIJNE; NISHIKAWA, 1991).

Assim que as sequências codificando esses peptídeos de trânsito se estabeleceram, eles se espalharam por meio de trocas de exons com outros genes. Muitos genes subsequentemente transferidos ao núcleo eucarioto e provenientes da mesma organela foram inseridos em sequência e supõe-se que o mesmo peptídeo sinal foi aproveitado (MARTIN; HERRMANN, 1998; BLANCHARD; LYNCH, 2000).

As mitocôndrias se originaram antes dos plastídeos, e assim, os primeiros plastídeos surgiram em células eucariotas que já continham um mecanismo que direcionava proteínas sintetizadas no citosol para as mitocôndrias, além de outros compartimentos sub-celulares (PEETERS; SMALL, 2001). Ao invés do esperado, que a mesma maquinaria fosse

reaproveitada para a localização de proteínas aos plastídeos, os dois sistemas de importação de proteínas não possuem homologia e se derivaram independentemente (CALIEBE; SOILL, 1999).

Como os sinais necessários ao direcionamento estão presentes em sequências curtas de aminoácidos, não são necessárias muitas mutações para que um sinal seja adquirido ou perdido. Dessa forma, ocorreram diversos casos de redirecionamento de proteínas ao longo do processo evolutivo, levando a diversidade na composição proteômica em organelas de linhagens distantes (DANPURE, 1997).

A seleção levou à especificidade do direcionamento, com co-evolução entre sequências de direcionamento e os sistemas de importação que eliminou combinações que causavam erros letais (GABALDON; PITTIS, 2015).

2.2.4 O duplo direcionamento

Existem proteínas que possuem funções em mais de um compartimento celular, e mesmo codificadas pelo mesmo gene, podem gerar dois produtos finais distintos. Isso ocorre por alterações no início da transcrição ou tradução, ou *splicing* alternativo, que geram sequências com sinais de direcionamento diferentes (SILVA-FILHO, 2003; CHABREGAS et al., 2003).

A mesma proteína pode ser localizada a diversos compartimentos, incluindo peroxissomos, núcleo, cloroplastos e mitocôndrias, e também secretadas; várias combinações já foram relatadas (AST et al., 2013; SMALL et al., 1998; CARRIE; SMALL, 2013; PORTER et al., 2015). Existem relatos de mais de 50 proteínas duplo-direcionadas para mitocôndrias e cloroplastos em plantas, e a maior parte delas está presente em *Arabidopsis thaliana*, sendo 16 delas aminoacil-tRNA sintetases (aaRS) (CARRIE; GIRAUD; WHELAN, 2009; DUCHENE et al., 2005).

Muitos casos de proteínas duplo direcionadas, geram o mesmo produto final com uma pré-sequência de direcionamento ambígua, que é reconhecida por mais de uma organela. Essa pré-sequência pode possuir características intermediárias às sequências cloroplastidiais e mitocondriais (SILVA-FILHO, 2003; YOGEV; PINES, 2011).

A maioria das aaRS organelares são duplo-direcionadas e possuem pré-sequências ambíguas, mas ainda não foram determinadas quais informações contidas nessa sequência seriam reconhecíveis pelas organelas distintas, se os sinais se sobrepõem ou se organizam em domínios (BERGLUND et al., 2009).

Determinados contextos celulares podem requerer que uma proteína duplo-direcionada seja enviada a apenas uma organela, em resposta a contextos fisiológicos internos e externos, que agem na regulação do direcionamento (SILVA-FILHO, 2003).

2.2.5 Outros sinais que afetam a localização de proteínas organelares

Foram relatados outros sinais importantes em proteínas organelares em plantas responsáveis pelo direcionamento, além das sequências N-terminais descritas previamente.

A proteína TOC159, que faz parte do complexo proteico que reconhece e importa proteínas aos cloroplastos, ao ser sintetizada e direcionada para inserção na membrana externa da organela, depende de uma sequência C-terminal com estrutura e características fisico químicas similares aos peptídeos de trânsito N-terminais mais comuns, e em construções que fusionaram este sinal C-terminal com outras proteínas, também resultou em direcionamento aos cloroplastos (LUNG; CHUONG, 2012).

Estudos do proteoma cloroplastidial mostraram a ocorrência de proteínas que não possuem os peptídeos de trânsito preditos com características esperadas (NADA; SOLL, 2004; MIRAS et al, 2002). Além disso, muitas proteínas do proteoma cloroplastidial possuem sequências preditas em interação com SRP (*signal-recognition particle*) (FRISO et al., 2004) e estes sinais C-terminais podem ser responsáveis por direcionar proteínas cloroplastidiais pela via secretória antes de atingirem seu destino celular final de modo desconhecido, como é verificado na anidrase carbônica CAH1 (VILLAREJO et al., 2005).

2.3 Regulação do direcionamento organelar e o tráfego de proteínas no citosol

Apesar da especificidade das pré-sequências de direcionamento e da maquinaria de importação nas membranas das organelas, existem casos em que se observa o direcionamento de proteínas cloroplastidiais a mitocôndrias (BRINK et al,. 1994; HURT et al., 1996), frequentemente estes casos são observados em testes de importação *in vitro*, utilizando organelas isoladas. Essas observações indicam que em condições naturais da célula, há fatores essenciais que regulam o direcionamento e que as sequências N-terminais não agem sozinhas na determinação da localização de proteínas.

As proteínas destinadas a mitocôndrias e cloroplastos são sintetizadas no citosol em ribossomos livres e são então translocadas de modo pós-traducional às membranas das organelas. A necessidade das pré-proteínas estarem com suas estruturas mais relaxadas durante a importação às organelas deve-se às características da maquinaria de importação que não pode acomodar complexos oligoméricos grandes, e por isso há a necessidade do

envolvimento de chaperonas moleculares, um grupo diversificado de fatores que facilitam processos de dobramento e conformação estrutural de outras proteínas (FLORES-PÉREZ; JARVIS, 2013; MAYER, 2010).

As chaperonas moleculares foram primeiro descritas como fatores sintetizados em organismos expostos a calor ou outros estresses fisiológicos. Muitas são denominadas “hsp” (*heat- shock proteins*) pois o aumento na temperatura causa a produção dessas proteínas, cuja função é minimizar danos causados pela desnaturação (FRYDMAN, 2001).

No entanto, foi descoberto que chaperonas são sintetizadas constitutivamente e que exercem funções centrais na organização da estrutura celular (BREIMAN, 2014). Sua função básica é manter seus alvos em conformação apropriada até que estejam estabilizados pela interação com outros componentes de uma via. Ambos os sistema Hsp70 (com 70 kDa) e chaperonina agem em uma grande diversidade de proteínas alvo. Outro sistema, o Hsp90 (90 kDa), pode funcionar em conjunto com Hsp70, no entanto age em classes específicas de proteínas envolvidas em transdução de sinais (FRYDMAN, 2001).

As chaperonas mais abundantes são as Hsp90 e Hsp70 que somam de 2 a 4 % da massa total de proteína na célula. As Hsp90 e 70 são auxiliadas por co-chaperonas, responsáveis pela especificidade de ligações, interações e auxiliam em sistemas regulatórios e outras vias celulares diversas controladas pelas chaperonas (ECHTENKAMP; FREEMAN, 2012; BREIMAN, 2014).

Várias chaperonas atuam na importação de proteínas aos cloroplastos, em diferentes fases do processo. No citosol, após a liberação do ribossomo, agem para previnir dobramentos errôneos da cadeia polipeptídica ou a agregação de pré-proteínas, e as guiam até a superfície do cloroplasto; durante o processo de importação, agem na manutenção da competência de translocação das pré-proteínas, e impulsionam o transporte, com a hidrólise de ATP; e após a importação, auxiliam no dobramento, montagem ou no seguimento do transporte para destinos internos da organela (FLORES-PÉREZ; JARVIS, 2013).

Hsp90 já foi encontrada em complexos-guia com pré-proteínas direcionadas aos cloroplastos, envolvendo a co-chaperona Hop (FELLERER et al., 2011). Em sistema animal, Hsp90 é uma chaperona que auxilia no direcionamento citosólico de proteínas às mitocôndrias, até o receptor Tom70 (YOUNG; HOOGENRAAD; HARTL, 2003).

A Hsp70 é uma proteína importante na fase citosólica do transporte de proteínas aos cloroplastos e mitocôndrias. A maioria dos peptídeos de trânsito cloroplastidiais (82%) e mitocondriais (97%) possui ao menos um sítio de ligação a Hsp70, e interações diretas entre

Hsp70 e essas sequências N-terminais foram demonstradas (RIAL; ARAKAKI; CECCARELLI, 2000; ZHANG; GLASER, 2002).

Existem evidências de que Hsp70 pode agir na importação de proteínas em conjunto com outros fatores citosólicos, como proteínas 14-3-3, formando complexos guia. Muitos peptídeos de trânsito cloroplastidiais contêm um motivo de ligação a proteínas 14-3-3 (MARTIN et al., 2006; MAY; SOLL, 2000). Relatos de formação de complexos-guia entre Hsp70, 14-3-3 e pré-proteínas cloroplastidiais fosforiladas, indicam que há aumento na eficiência de importação às organelas, *in vitro* (MAY; SOLL, 2000). No entanto, não são conhecidas quais das diferentes isoformas (de Hsp70 e 14-3-3) são responsáveis por essas funções e se a formação desses complexos pode ser observada *in planta*.

2.4 Proteínas 14-3-3 e seu potencial como reguladora do destino celular de proteínas organelares

O estudo de redes biomoleculares se tornou um dos focos chave de biologia de sistemas, pois estuda dados biológicos de forma integrada, e não como componentes isolados. Uma maneira de identificar mecanismos de localização subcelular é o estudo de interações proteína-proteína, com a identificação de proteínas associadas que possuam papel no reconhecimento de proteínas por membranas. Um dos tipos de redes biomoleculares é de interações proteína-proteína (PPI). Interações proteína-proteína são essenciais na localização sub-celular. Estudos dessas redes podem direcionar a descoberta de funções básicas e de mecanismos essenciais para a ocorrência de fenômenos biológicos (ZHANG et al., 2007).

Em estudos anteriores, deu-se início a uma busca por proteínas citosólicas possivelmente envolvidas na localização de proteínas organelares. Utilizando-se bioinformática foram construídas redes de PPI com proteínas de duplo direcionamento (mitocôndrias e cloroplastos) confirmadas in planta (BERGLUND et al., 2009; MORGANTE et al., 2009) e as demais proteínas de *Arabidopsis thaliana* (SPOLADORE, 2011) (Figura 2). A rede foi construída utilizando-se o programa AtPIN - Arabidopsis thaliana protein interaction network (BRANDÃO, M.M.; DANTAS, L.L.; SILVA-FILHO, M.C., 2009) e visualizada com o programa Cytoscape v2.8.1 (SHANNON et al., 2003) com a colaboração do Dr. Marcelo Mendes Brandão.

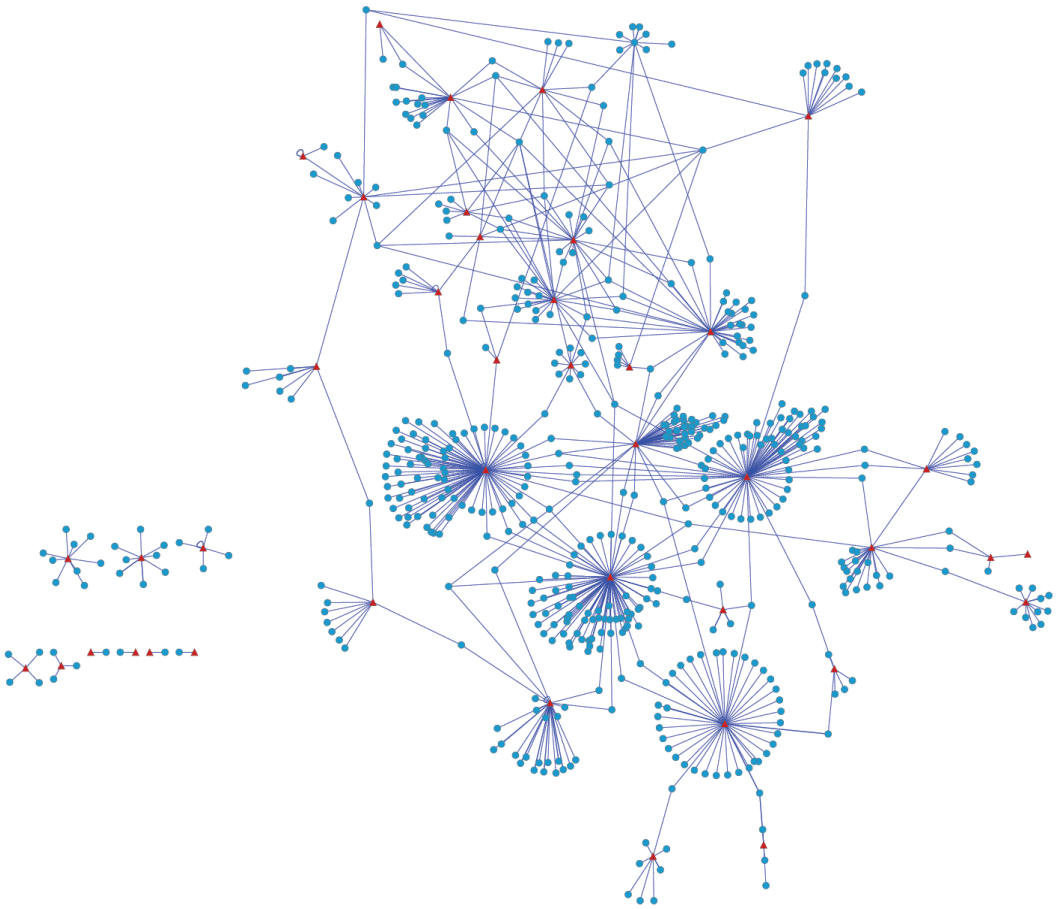


Figura 2- Rede de interações proteína-proteína gerada pelo sistema AtPIN. As proteínas de duplo direcionamento estão representadas pela cor vermelha, enquanto que as proteínas de A. thaliana que apresentam interação com proteínas de duplo direcionamento estão representadas em azul (SPOLADORE, 2011).

Foram listadas 72 proteínas que possuem interação protéica com ao menos duas proteínas de duplo direcionamento e dentre elas, foram selecionadas candidatas citosólicas. Uma das candidatas é a proteína GRF9 (AT2G42590.3) que pertence ao grupo 14-3-3 ε. A isoforma 14-3-3 ε é a mais conservada da família 14-3-3 (AITKEN, 2002).

No estudo, foi indicado que as proteínas THI1 (AT5G54770) e mercaptopiruvato sulfur-transferase (MST1) (AT1G79230), que são proteínas duplo-direcionadas aos cloroplastos e mitocôndrias, estavam em interação com a proteína GRF9 (AT2G42590), que é uma proteína citosólica da família 14-3-3.

Apesar das funções das 14-3-3 terem sido abordadas quanto a sua participação na formação de complexos com chaperonas e pré-proteínas cloroplastidiais (MAY; SOLL, 2000), seu papel na localização de proteínas organelares ainda não é conclusivo.

Após seleção em ensaios de duplo-híbrido em levedura, utilizando a proteína 14-3-3 GRF9 contra biblioteca de cDNA de A. thaliana (SPOLADORE, 2011), foram encontradas diversas proteínas organelares, o que nos levou a prosseguir com o estudo da GRF9.

2.4.1 THI1 e TH-1, enzimas responsáveis pela biossíntese de tiamina em plantas

A tiamina (vitamina B1) é produzida em Bacteria, Archaea, Fungi e Plantae. Os animais não sintetizam tiamina e a obtém por ingestão. A tiamina pirofosfato é um co-fator essencial a todos os organismos, participando em reações bioquímicas de formação de ligação carbono-carbono, age no metabolismo de carboidratos, na biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada e na resposta a estresses bióticos e abióticos (DONG et al, 2015; GODOI 2006).

O processamento industrial pode levar a perda da tiamina, particularmente no refinamento de grãos. Em países do leste asiático, onde o arroz polido é base alimentar, doenças resultantes da falta de tiamina tem sido um problema de longa data. O beriberi é definido como um grupo de sintomas que incluem disfunções no sistema nervoso central, no sistema cardiovascular, respiratório, muscular e gastrointestinal, que podem levar à síndrome de Korsakoff e encefalopatia de Wernicke (SINGLETON; MARTIN, 2001).

Em *Saccharomyces cerevisiae* e muitos outros eucariotos, um único gene foi relacionado a biossíntese da metade tiazol da tiamina pirofosfato, thi4, e um gene para metade pirimidina, thi5 (PRAEKELT, BYRNE, MEACOCK, 1994; XI *et al*., 2001). THI4 é uma proteína conservada, com ortólogos em plantas e Archaea. Em *Arabidopsis thaliana*, o ortólogo é a proteína THI1, chamada assim por ser a primeira enzima da via a ser identificada em plantas. THI1 foi inicialmente identificada por sua habilidade em complementar linhagens mutantes de bactérias com dano em seus mecanismos de reparo de DNA (MACHADO *et al*., 1996) e em seguida sua habilidade em complementar mutantes nulos em thi4 de *S. cerevisiae* foi confirmada. A estrutura tridimensional da THI1 se configura em um homo-octâmero com quatro subunidades em cada um dos dois anéis (GODOI et al., 2006).

Em plantas, a biossíntese de tiamina pirofosfato ocorre nos cloroplastos (JULLIARD; DOUCE, 1991) pela condensação de dois precursores intermediários, geralmente referidos como porções tiazol (4-metil-5-β-hidroxietil tiazol fosfato) e pirimidina (2-metil-4-amino-5-hidroxi-metil-pirimidina pirofosfato). O restante da reação ocorre no citosol, com a transformação da tiamina pirofosfato em tiamina difosfato pela ação da tiamina pirofosfoquinase (AJJAWI et al., 2007). O precursor para tiazol (com 5 carbonos) se origina de 2-pentulose (WHITE; SPENSER, 1982; JULLIARD; DOUCE, 1991) e glicina e cisteína

também são considerados precursores (Figura 3) (TAZUYA et al., 1987). A tiamina monofosfato sintetase (HMPPK/TMPPase), ou TH-1 (A1G22940), também participa da mesma via, sendo apenas localizadas aos cloroplastos, onde atua condensando Het-P e HMP-PP.

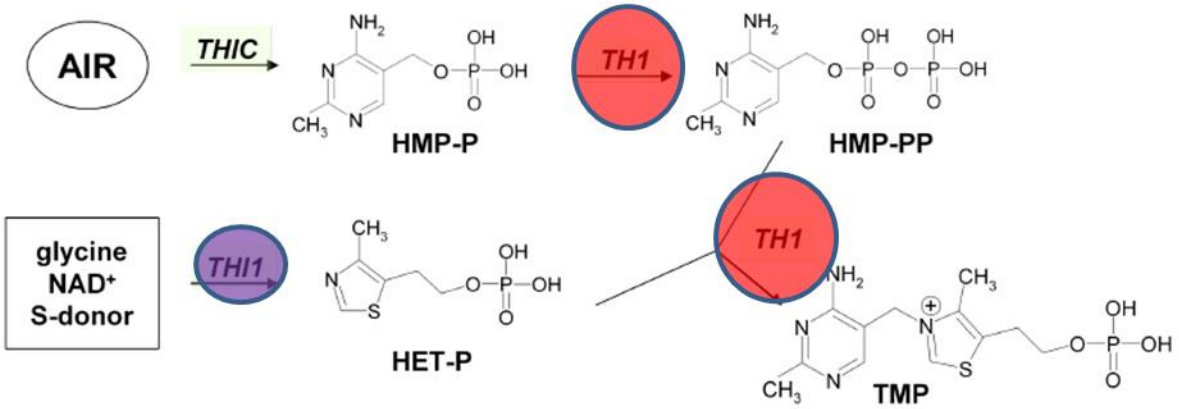


Figura 3 - Representação da via biosintética de tiamina em plantas. Em destaque, as enzimas TH1 (cloroplastidial) e THI1 (duplo-direcionada). As enzimas e genes responsáveis pelas reações representadas são AIR, 5-aminoimidazol ribonucleotideo; HET-P, 4-metil-5-(2-hidroxietil) tiazol fosfato; HMP-P/HMP-PP, 4-amino-2-metil-5-hidroximethilpirimidina monofosfato/di-fosfato; TA, tiamina; TMP, tiamina monofosfato. Adaptado de RAPALA-KOZIK et al. 2012

Os mecanismos de direcionamento de THI1 (AT5G54770) em Arabidopsis têm sido estudados pelo nosso grupo por alguns anos e levou à confirmação da dupla localização de THI1 pela geração de um transcrito com dois sítios de início da tradução (CHABREGAS et al., 2001). A tradução a partir do primeiro ATG da sequência transcrita resulta no direcionamento da proteína aos cloroplastos pois os resíduos iniciais são característicos de uma sequência de direcionamento cloroplastidial. Já o segundo ATG causa a tradução de uma pré-sequência de conformação alfa-hélice que caracteriza proteínas destinadas a mitocôndrias (Figura 4).

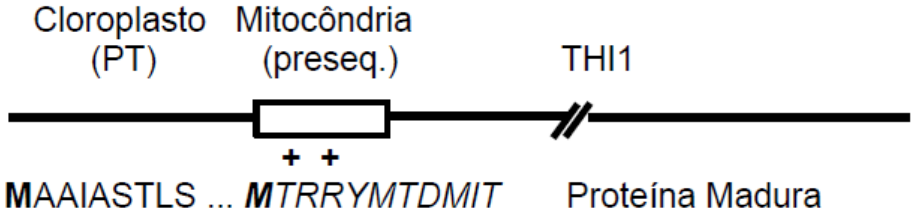


Figura 4 - Representação da extensão N-terminal de THI1 de *Arabidopsis thaliana*, com as metioninas resultantes dos códons de início da tradução destacadas (Adaptado de CHABREGAS, 2001)

2.4.2 Estrutura e funções das proteínas 14-3-3

A proteína GRF9 ou GF14 mu (AT2G42590) é uma proteína da família 14-3-3 de *Arabidopsis thaliana* cujas funções conhecidas são alocação de carbono para crescimento da raiz sob estresse hídrico leve (HE et al., 2015), desenvolvimento dos cloroplastos (MAYFIELD; PAUL; FERL, 2012), sinalização para o florescimento via sistema fotossensível, ao interagir com CONSTANS, um regulador central da via de fotoperíodo (MAYFIELD et al., 2007) e respostas em adaptação ao estresse por calor intenso (DOBRÁ et al., 2015). A proteína GRF9 (F4IP55_ARATH) possui 276 aminoácidos e 30,96 kDa.

Uma proteína 14-3-3 é uma candidata interessante para o estudo de componentes genéticos que afetam a localização sub-celular de proteínas. A localização das 14-3-3 em diversos compartimentos sub-celulares demonstra seu potencial regulatório em toda a célula (DE LILLE et al., 2001; FERL, 2002) e sua função biológica é principalmente interagir com proteínas cliente específicas e causar um efeito que altera a cliente, que estão envolvidas em diversas funções. As 14-3-3 estão envolvidas com diversos processos regulatórios como resposta a estresse, transdução de sinais, controle do ciclo celular e apoptose (FERL et al., 2002; FORD et al., 1994; HE et al., 2015; VAN HEMERT et al., 2001).

As 14-3-3 formam uma família altamente conservada de proteínas encontradas em todos os eucariotos que possuem múltiplas isoformas (DE LILLE et al., 2001; ICHIMURA et al., 1988). Todas as proteínas 14-3-3 parecem compartilhar de estrutura similar, organizada em nove α-helices anti-paralelas, cada uma separada por um *loop* curto (LIU et al., 1995; XIAO et al., 1995). As quatro hélices N-terminais criam uma superfície de dimerização, levando a organização de homo ou heterodímeros (JONES et al., 1995); no entanto, podem interagir com proteínas em forma de monômero (PAN et al., 1999). Os resíduos nos domínios

de dimerização não são conservados, o que pode levar a formação de dímeros diferentes com outras isoformas.

As 14-3-3 tipicamente se ligam a motivos fosforilados nas proteínas alvo, e os sítios de interação de cada sub-unidade do dímero são supostamente independentes, o que torna possível que cada monômero se ligue a proteínas diferentes (LIU et al., 1995; OBSIL et al., 2001 RITTINGER et al., 1999). A fosforilação e desfosforilação da proteína cliente é importante para a ligação a 14-3-3 (FURUKAWA et al., 1993; MUSLIN et al., 1996), no entanto, outros modos de contato que não envolvem fosforilação também existem (NOMURA et al., 2003; SOROKINA et al., 2011; PAN et al., 1999).

Foram propostas algumas formas que a interação com proteínas 14-3-3 pode afetar a proteína alvo, como apresentada na Figura 5 (GÖKIRMAK; PAUL; FERL, 2010). Ao interagir com outras proteínas, elas podem alterar a conformação da proteína cliente, servindo como adaptadoras, ativadoras e repressoras, e ainda controlar a localização citosólica/nuclear da proteína alvo (JAHN et al., 1997; MUSLIN; XING, 2000; OBSIL et al., 2001, WEINER; KAISER, 1999; YAFFE, 2002).

A estrutura cristalina de várias 14-3-3 de mamíferos e plantas foram resolvidas (LIU et al., 1995; XIAO et al., 1995) e a extrema conservação da região central (Box 1) pode ser verificada na estrutura de todas as 14-3-3 de eucariotos. Existe grande divergência nas regiões N e C- terminais, que contribuem para a especificidade das funções, interações e localização (AITKEN, 2002; PAUL et al., 2009). Apesar da especificidade dos alvos de interação, a conservação das isoformas entre organismos leva a possibilidade de complementação de funções entre isoformas, até mesmo entre organismos distantes (VAN HEUSDEN et al., 1996).

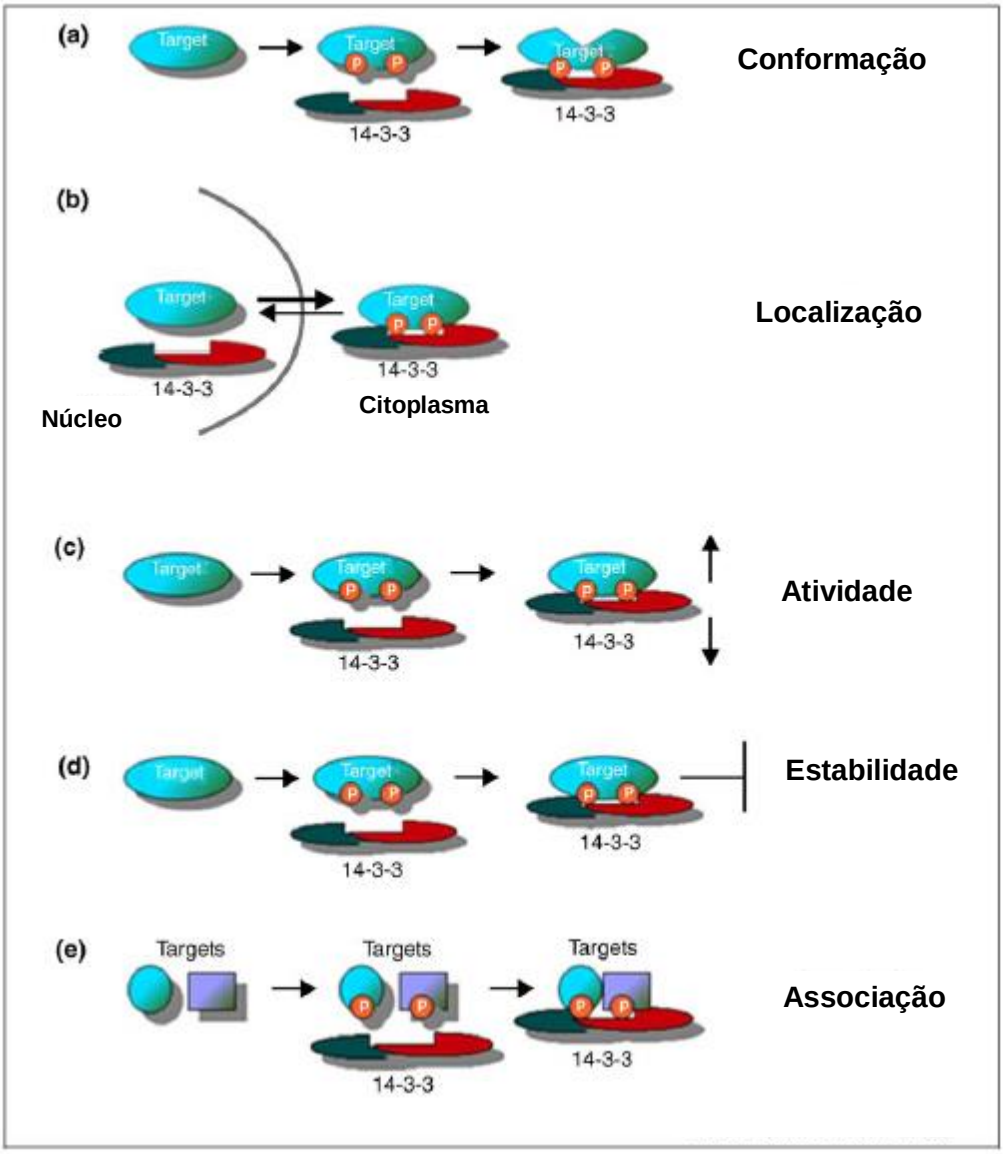


Figura 5 - Modos de interação entre 14-3-3 e proteínas cliente. A ligação de uma proteína 14-3-3 com seu alvo pode induzir mudanças conformacionais (a), alterar a distribuição núcleo/citoplasma (b), regular a atividade catalítica intrínseca (c), controlar o *turnover* da proteína alvo (d) ou associar múltiplos alvos (e). Adaptado de GÖKIRMAK; PAUL; FERL (2010)

Em *Arabidopsis thaliana*, a família gênica das 14-3-3 possui 13 isoformas. As isoformas podem variar de 241 a 268 aminoácidos e todas compartilham uma região central conservada (Figura 6). Os aminoácidos nas regiões N e C-terminais são os mais divergentes. Os membros da família se dividem em dois grandes ramos evolutivos, o grupo Epsilon e Não-Epsilon (DELILLE; SEHNKE; FERL, 2001). Esses dois grupos diferem quanto à estrutura íntron-éxon de suas sequências.

Essa separação entre isoformas é bem clara entre plantas e animais que possuem múltiplas isoformas, indicando a formação antiga dessa divergência. Em Arabidopsis o grupo Epsilon inclui as isoformas mu, epsilon, omicron, rho e pi.

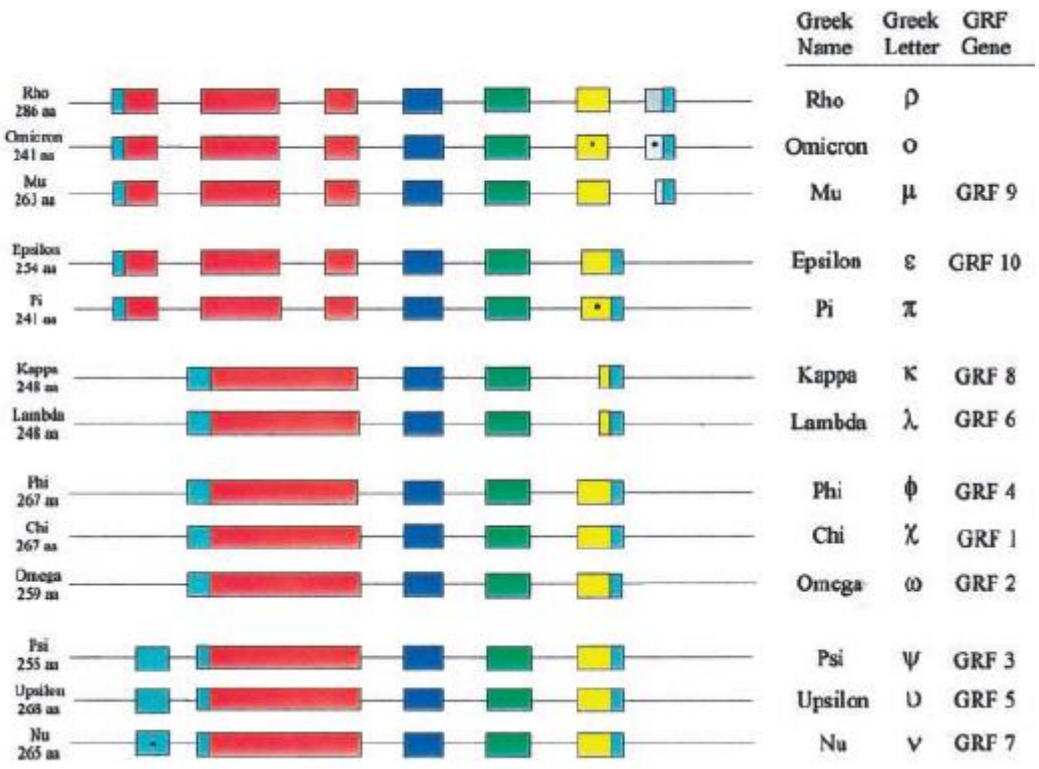


Figura 6 - Estrutura gênica das 14-3-3 em Arabidopsis. Caixas coloridas representam exons, em escala e cores representam similaridade entre genes. Linhas representam posição dos introns, não estão em escala. Caixas azuis representam sequências mais divergentes. Adaptado de DE LILLE; SEHNKE; FERL (2001)

As funções associadas às isoformas incluem respostas fisiológicas a estresses abióticos, transdução de sinais, regulação de transcrição, metabolismo de carbono, e no sistema de fotossensibilidade (DOBRÁ et al., 2015; MAYFIELD; PAUL; FERL, 2012; MAYFIELD et al., 2007; PAN et al., 1999).

A anotação da localização das 13 isoformas de *A. thaliana* inclui o citosol, núcleo, membrana plasmática, citoesqueleto, cloroplastos ou peroxissomos (The SubCellular Proteomic Database (SUBA3), HOOPER et al., 2014). Há indicações que a localização sub-celular das proteínas 14-3-3 em Arabidopsis é afetada pelas interações com as proteínas cliente (PAUL; SEHNKE; FERL, 2005).

Existem várias referências sobre a participação de proteínas 14-3-3 como reguladoras da localização sub-celular de proteínas, como por exemplo movimentação (*shuttling*) entre dois compartimentos celulares. A ligação com 14-3-3 mantém uma proteína alvo em um compartimento sub-celular, e a liberação permite que o alvo se realoque, muitas vezes pela exposição de uma sequência de direcionamento antes ocultada pelo dímero 14-3-3.

Um exemplo de *shuttling* entre o núcleo e o citoplasma ocorre com o fator de transcrição DBP1 em *Nicotiana tabacum* que, quando ligado ao promotor do gene de defesa CEVI1 inibe sua transcrição. A infecção por um patógeno viral induz a expressão de uma 14-3-3 que interage com DBP1 e o exporta ao citoplasma, permitindo a transcrição do gene de defesa (CARRASCO et al., 2006).

O *shuttling* núcleo/citoplasma realizado pela ação de proteínas 14-3-3 já foi bastante relatado e afeta a regulação de uma variedade de processos (CAHILL et al., 2001; GROZINGER; SCHREIBER, 2000; BASU et al., 2003; JIANG et al., 2003; KUMAGAI; DUNPHY, 1999; SEIMIYA et al., 2000; YANG et al., 1999)

Proteínas 14-3-3 também podem atuar como facilitadoras da importação aos cloroplastos e mitocôndrias (NOMURA et al., 2003).

Em sistema animal, foi descoberto um fator citosólico que estimula o transporte de proteínas às mitocôndrias, MSF (*mitochondrial import stimulation factor*). Esse fator foi purificado e identificado como um complexo heterodimérico de proteínas 14-3-3 que exibem atividade de ATPase (ALAM et al., 1994). As MSF reconhecem especificamente pré-proteínas mitocondrias e as transportam aos receptores TOM70 e TOM73, e a liberação do complexo é dependente de ATP (KOMIYA et al., 1997).

Foi proposto que 14-3-3s afetam o direcionamento de proteínas carregadoras de ânions UCP (*uncoupling proteins*) às mitocôndrias. O domínio C-terminal das proteínas UCP interagem com as isoformas zeta, teta e beta de 14-3-3 em humanos (PIERRAT et al., 2000). Como mencionado anteriormente, foi relatada a formação *in vitro* de um complexo entre 14-3-3, Hsp70 e pré-proteínas cloroplastidiais dependentes de fosforilação (MAY; SOLL, 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo do material vegetal

Sementes de *Arabidopsis thaliana* ecótipo Col-0 foram tratadas a frio (4°C), em Eppendorfs contendo água destilada, por 4 dias para quebrar a dormência e assegurar que a germinação de todas as plantas ocorreria em sincronia. Foram então semeadas em potes de 7 cm de diâmetro contendo uma mistura de solo/vermiculita (1:1) previamente esterilizada em autoclave. Os potes foram dispostos em bandejas de plástico que foram cobertas com tampa (ou filme plástico) transparente. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento (Conviron AT26) sob regime de 16 h de luz e 8 h de escuro, a 22°C e 70% de umidade. Após 2 semanas as tampas foram removidas, e os vasos foram regados com solução nutritiva a cada 3 dias.

Plantas de *Nicotiana tabacum* SRI foram cultivadas em substrato orgânico Basaplant em igual proporção a vermiculita, não esterilizados. As plantas foram mantidas em sala de crescimento sob condições de 14 h de luz, e 10 h de escuro a 25°C (SPARKES et al., 2006). As plantas foram sub-irrigadas em bandejas plásticas e uma vez por semana, foi adicionada solução nutritiva à água.

3.2 Extração de RNA total

Para extração do RNA total, material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido, e adicionado a um tubo contendo 1 mL de Trizol (Thermo Fisher). Em seguida foi adicionado 250 µL de clorofórmio e o tubo foi centrifugado a 13.000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo contendo 500 µL de isopropanol. O tubo foi incubado por 10 min a temperatura ambiente e centrifugado a 13.000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 200 µL de álcool 75% foi adicionado ao pellet, o tubo foi novamente centrifugado por 5 min e o sobrenadante descartado. O pellet foi seco naturalmente e eluído em água DEPC.

Foi adicionado às amostras DNAse 1 U/L (Promega) seguindo-se instruções do fabricante. As amostras foram purificadas novamente, repetindo-se os passos de extração com Trizol. As amostras foram quantificadas no equipamento Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) e armazenado a -80°C.

3.3 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com a transcriptase reversa ImProm-II (Promega), segundo instruções do fabricante. Um micrograma de RNA total foi adicionado a 1 µL de OligoDT 50 µM. Após incubação a 70 ºC por 5 min seguida por 4 ºC por 5 min, foi adicionado tampão ImProm-II 1X, 1,5 mM $MgCl_2$, dNTPs (10 mM cada) e 1 U da enzima ImProm-II. Os tubos foram então incubados a 25 ºC por 5 min, 42 ºC por 60 min e 70 ºC por 15 min.

3.4 Eletroforese em gel de agarose

Para aferir o tamanho obtido de mini-preparações plasmidiais e reações de PCR, foram realizadas corridas em gel de agarose 1% por meio de eletroforese. Para a corrida em cuba eletroforética e também no preparo do gel, foi utilizado tampão 0,5X TBE (5X TBE: 54 g de Tris-base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5 M pH 8.0, em 1 L de água destilada). Aos géis foi adicionado GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) diluído 1:10.000. Às amostras, se adicionou 20% do volume de tampão de carregamento (0,25% azul de bromofenol). O tamanho dos fragmentos foi comparado com marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher). Para a quantificação da concentração do DNA foi feita a comparação com marcadores moleculares de DNA (GeneRuler High/Low Range DNA Ladder- Thermo Fisher Scientific). Os géis foram visualizados sob luz UV e fotografados utilizando o programa L-Pix Image 1.21 (Loccus Biotecnologia).

3.5 Digestões enzimáticas do DNA

As digestões foram realizadas seguindo recomendações do fabricante quanto aos tampões e concentrações. Nos casos de digestões utilizando duas enzimas ao mesmo tempo foram utilizadas plataformas que auxiliam na montagem da melhor reação para atividade de 100% de ambas as enzimas, com indicações de concentração e tampões (DoubleDigest Calculator no caso de enzimas da Thermo Scientific ou Double Digest Finder, para enzimas NEB, disponíveis online).

3.6 Purificação dos fragmentos de DNA a partir de gel de agarose

Para a purificação de fragmentos de DNA após digestões enzimáticas, foi utilizado o QIAEX II Gel Extraction Kit. O protocolo para extração de DNA a partir de géis de agarose indica que seja recortada a banda contendo o fragmento desejado a partir do gel sob luz UV utilizando um bisturi limpo. O fragmento de gel é então pesado e colocados em um tubo

Eppendorf de 1,5 mL, ao qual são adicionados 3 volumes do tampão QX1 (para fragmentos entre 100 pb a 4 kb) para 1 volume do gel e 10 µL da resina QIAEX II . O tubo é então incubado a 50°C por 10 min, vortexando a cada 2 min para solubilizar a agarose e ligar o DNA. A amostra é centrifugada a 13.000 rpm por 30 s e o sobrenadante descartado. O precipitado deve então ser vortexado com 500 µL do tampão QX1 para remover qualquer agarose residual. O tubo foi centrifugado novamente, e o sobrenadante descartado. Em seguida, o pellet é lavado duas vezes com com 500 µL do tampão PE, por meio de vortex, centrifugação e remoção do sobrenadante. O pellet é então seco naturalmente até que adquira cor branca, e o DNA então pode ser eluído pela adição de 20 µL de água Milli-Q, vortex e incubação por 10 min. Em seguida, o tubo é centrifugado e o sobrenadante coletado para um novo tubo, para guardar o eluído.

3.7 Clonagens

As clonagens nos vetores pGBKT7 / pGADT7 (APÊNDICE F), utilizados em experimentos para duplo-híbrido em levedura e pSPYCE / pSPYNE (APÊNDICE G), para BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation), foram realizadas segundo procedimentos descritos em SAMBROOK; RUSSEL (2001). Já as clonagens em vetores de expressão em plantas pK7FWG2, pK7WG2 (APÊNDICE H) (KARIMI et al.. 2002) foram realizadas por recombinação pelo sistema Gateway (Invitrogen). Todos os clones tiveram as construções confirmadas por sequenciamento. As sequências codificadoras dos genes desse estudo foram obtidas do banco de dados TAIR (The Arabidopsis Information Resource) e as sequências CDS foram utilizadas para a construção de iniciadores específicos (APÊNDICES), conforme as características dos vetores de expressão.

A deleção realizada na proteína GRF9 foi feita em uma região relatada na literatura como importante para a interação de 14-3-3 com proteínas cliente. O domínio Box 1 é conhecido por ser uma região extremamente conservada entre proteínas 14-3-3 de diversos organismos e possuir resíduos que direcionam a interação com fosfoserinas (ICHIMURA et al.., 1995; SEHNKE et al., 2002). Os resíduos desse motivo foram identificados em GRF9 (Figura 6), e para a deleção foram feitas reações de PCR de fragmentos do gene GRF9, com iniciadores específicos para a amplificação dos primeiros 513 pb, e em outra reação dos últimos 186 pb (APÊNDICE D). Em seguida, iniciadores para o início e fim do gene foram utilizados em uma reação de amplificação contendo os dois fragmentos previamente gerados, dando origem à sequência GRF9-Del1 que exclui a região Box 1 destacada na Figura 7. A

sequência resultante foi transformada no vetor para duplo-híbrido pGBKT7 para testes contra as demais proteínas do estudo, inseridas completas no vetor pGADT7.

```
η    171 :IRLGLALNFSVFYYEIQNAPEQACLLAKQAFDDAIAELDTLNE:213
β    166 :IRLGLALNFSVFYYEILNSPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLNE:208
γ    171 :IRLGLALNYSVFYYEIQNAPEQACHLAKTAFDDAIAELDTLNE:213
ε    169 :IRLGLALNFSVFYYEILNSPDRACRLAKAAFDDAIAELDTLSE:211
ζ    166 :IRLGLALNFSVFYYEILNSPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLSE:208
GF14 172 :IRLGLALNFSVFYYETLNSPDRACNLAKQAFDEAIAELDTLGE:214
BMH1 172 :IRLGLALNFSVFYYEIQNSPDKACHLRKQAFDDAIAELDTLSE:214
```

GRF9 (GF14 mu):

MGSGKERDTFVYLAKLSEQAERYEEMVESMKSVAKLNVDLTVEERNLLSVGYKNVIGSR
RASWRIFSSIEQKEAVKGNDVNVKRIKEYMEKVELELSNICIDIMSVLDEHLIPSASEGEST
VFFNKMKGDYYRYLAEFKSGNERKEAADQSLKAYEIATTAAEAKLPPTHP**IRLGLALN**FS
VFYYEIMN**AP**ER**AC**H**LA**K**QAFDEAISELDTLNE**ESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSDISEE
GGDDAHKTNGSAKPGAGGDDAEVSIRDSFTRGKSN

Figura 7 – Alinhamento das sequências de aminoácidos de 14-3-3 Box 1, conservada entre isoformas bovinas, GF14 de Arabidopsis e BMH1 de leveduras, e o destaque na mesma sequência presente em GRF9. Adaptado de ICHIMURA et al.(1995)

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

Construções preservadas em culturas de *Escherichia coli* presentes no laboratório foram inoculadas em placas com meio seletivo adequado para realização de mini-preparações de DNA plasmidial. As construções são: TH-1 fusionado a GFP no vetor pK7FWG2 (SCARSO, 2011) (KARIMI et al., 2002), que foi utilizada para análises de expressão transiente por meio de agroinfiltrações; TH-1 no vetor de duplo-híbrido pGADT7, que foi usada para transformação de levedura (DANTAS, 2010) e THI1 (promotor endógeno de THI1 fusionado à proteína completa de THI1) fusionada a GFP no vetor pCAMBIA 2300 (ALMEIDA, 2004) foi utilizada para agroinfiltração.

A obtenção de DNA plasmidial purificado a partir de *Escherichia coli* foi necessária também para a preparação dos vetores utilizados em clonagens, além da análise de clones isolados para confirmação por sequenciamento do DNA.

Para a extração de DNA plasmidial foi inoculada uma colônia a partir de uma placa de Petri com meio de cultura e *E. coli* contendo o plasmídeo/clone de interesse em 5 mL de meio LB líquido acrescido de antibiótico adequado. Essa solução de cultivo ficou sob agitação de

200 rpm por 16 h a 37°C. Em seguida, os 5 mL foram sequencialmente transferidos para um tubo de Eppendorf de 1,5 mL e centrifugados a 13.000 rpm para que as células de *E. coli* fossem precipitadas, seguindo-se do descarte do meio sobrenadante, isso foi repetido com o restante da solução de cultivo. Em seguida, o pellet de células foi ressuspendido em 200 µL de solução de ressuspensão (50 mM de glicose, 25 mM de Tris-HCl pH 8.0, e 10 mM de EDTA pH 8.0) e 1 µL da enzima RNAse (10 mg/mL). Após 20 min, foi adicionado 200 µL do tampão para lise alcalina (0,2 M de NaOH, e SDS 1%). O tubo foi invertido gentilmente por 3 min e então se adicionou o tampão de neutralização (3 M acetato de potássio, pH 5.5) e o tubo foi invertido por mais 1 min. O tubo foi então centrifugado a 13.000 rpm por 20 min a temperatura ambiente. Foi então removida a solução, cuidando-se para não perturbar o material pelletizado, e esta foi colocada em um novo tubo, contendo 1 mL de etanol absoluto. O tubo foi centrifugado a 13.000 rpm por 30 min a 4°C para precipitação do DNA. O sobrenadante foi então descartado e 200 µL de etanol 70% foi adicionado para limpar o pellet da solução anterior e o tubo foi novamente centrifugado a 13.000 rpm por 5 min, a 4°C. A solução sobrenadante foi descartada e o pellet foi seco naturalmente por 30 min e em seguida ressuspendido em 50 µL de água Milli-Q.

3.9 Transformação de *Escherichia coli*

3.9.1 Preparo de células eletrocompetentes de *Escherichia coli*

Uma suspensão de *E.coli* (TOP 10 Electrocompetent *E. coli* - Thermo Fisher Scientific) foi estriada em uma placa de LB (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl, 15 g/L ágar). A placa foi incubada por 16 h a 37°C, e uma colônia foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido. A suspensão foi incubada por 16 h a 37°C, e então 1 mL foi transferido a 500 mL de meio 2XYT (5 g/L de NaCl, 10 g/L de extrato de levedura, 17 g/L de triptona) para agitação a 200 rpm, 37°C, por aproximadamente 4 h até que a leitura da absorbância (A_{600}) atingisse um valor entre 0,6 e 0,9. A suspensão foi incubada em gelo por 10 min, e em seguida, centrifugada a 1100 g por 12 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram gentilmente ressuspendidas em 200 mL de água Milli-Q estéril gelada. As células foram novamente centrifugadas a 1100 g por 12 min, a 4°C, o sobrenadante descartado, e as células foram ressuspendidas em 100 mL de água, e novamente centrifugadas, desta vez a 1600 g. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 30 mL de água. Após uma última centrifugação a 1600 g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em um volume final de 2 mL de glicerol 10% a 4°C e armazenadas em alíquotas de 70 µL a - 80°C.

3.9.2 Eletroporação de *Escherichia coli*

Os volumes necessários das reações de ligação (ou recombinação) foram transferidos para tubos contendo células eletrocompetentes de *E. coli* previamente descongeladas em gelo, e homogeneizadas gentilmente com pipeta. Em seguida a suspensão foi transferida para cuvetas de eletroporação a 4°C. As cuvetas foram submetidas a pulsos de 2,5 kV/25 µF em eletroporador Gene Pulse (BioRad) e imediatamente em seguida, foi adicionado 1 mL de meio LB líquido e as células foram delicadamente ressuspendidas e transferidas para um eppendorf, que foi incubado a 37°C sob agitação de 200 rpm por 1 h. Alíquotas foram plaqueadas em meio LB contendo antibiótico seletivo adequado, e as placas incubadas por 16 h a 37°C.

3.10 Transformação de *Agrobacterium tumefasciens*

3.10.1 Preparo de células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefasciens*

Uma placa de *Agrobacterium tumefasciens* GV3101 foi estriada a partir de um estoque em glicerol a - 80°C, em placa de meio LB contendo 50 mg/mL de rifampicina e 50 mg/mL de gentamicina e incubadas a 28°C por 2 dias. Colônias foram então inoculadas em 30 mL de meio LB líquido, tambén contendo antibióticos seletivos, e crescidas sob agitação de 200 rpm a 28°C por 16h. A suspensão foi transferida para um frasco com 500 mL de meio LB com rifampicina e gentamicina, e incubadas a 28°C, sob agitação de 200 rpm, até que a leitura de absorbância (A_{600}) atingisse um valor entre 1 e 1,5. A suspensão foi mantida em gelo por 20 min e centrifugadas a 1100 g por 12 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células, ressuspendidas em 200 mL de água Milli-Q estéril gelada. Esse passo foi repetido por mais 4 vezes. As células foram ressuspendidas em um volume final de 2 mL de glicerol 10% gelado, e alíquotas de 70 µL foram armazenadas a - 80°C.

3.10.2 Eletroporação de *Agrobacterium tumefasciens*

Foi adicionado 1 µg de DNA plasmidial a 70 µL de células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefasciens*, previamente descongeladas em gelo, e homogeneizadas gentilmente com pipeta. Em seguida a suspensão foi transferida para cuvetas de eletroporação a 4°C. As cuvetas foram submetidas a pulsos de 2,5 kV/25 µF em eletroporador Gene Pulse (BioRad) e imediatamente em seguida, foi adicionado 1 mL de meio LB líquido e as células foram delicadamente ressuspendidas e transferidas para um eppendorf, que foi incubado a 28°C sob agitação de 200 rpm por 4 h. Alíquotas foram plaqueadas em meio LB contendo antibióticos seletivos e as placas incubadas por 3 dias a 28°C.

3.11 Transformação para expressão transiente de *Nicotiana tabacum*

Para os experimentos de localização sub-celular utilizando construções fusionadas a GFP, e também em ensaios de BiFC, foram feitas transformações utilizando plantas de *Nicotiana tabacum* para expressão transiente dessas construções, que permitiram a observação dos resultados poucos dias após a transformação.

Para isso, *Agrobacterium tumefasciens* transformadas com os plasmídeos de interesse foram crescidas em placas de meio LB contendo os antibióticos apropriados e em seguida inoculadas em tubos contendo 5 mL de meio de cultura líquido MGL (2,5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de triptona, 5 g/L de NaCl, 5 g/L de manitol, 0,25 g/L de KH_2PO_4, 0,1 g/L de $MgSO_4$.7H2O, e 1 µg/L de biotina, pH 7.0) e agitadas a 200 rpm de 16-20 h, a 28°C. Em seguida, 1 mL da suspensão foi centrifugada a 2300 g por 5 min a temperatura ambiente, e as células ressuspendidas em 1 mL de tampão para infiltração (10 mM MES-KOH pH 5.6, 10mM $MgCl_2$, 200 µM de acetoseringona) e incubadas a temperatura ambiente por 3 h, para permitir ativação pela acetoseringona. A solução foi então diluída no mesmo tampão, de modo a atingir a OD_{600} final de 0,2 para cada construção. No caso de infiltração contendo mais de uma construção, estas eram homogeneizadas 1:1, e em todos os casos, também foi incluso o vetor p19, contendo gene do Tomato Bush Stunt Virus que é um supressor do silenciamento gênico (VOINNET et al.., 2003).

A infiltração foi realizada na superfície abaxial de folhas de *Nicotiana tabacum*, com aproximadamente 5 semanas de idade, mantidas a 25°C sob regime de 16 h de luz e 8 h de escuro. Ranhuras foram feitas delicadamente com bisturi e a infiltração foi feita utilizando uma seringa de plástico de 3 mL sem agulha pressionada contra os micro-ferimentos. Após a infiltração as plantas foram mantidas nas mesmas condições e observadas em microscópio confocal de fluorescência 3 dias depois, no caso de análises de localização sub-celular utilizando GFP e 4 a 7 dias depois, no caso de ensaios de BiFC. Células plasmolisadas foram obtidas pela imersão de fragmentos foliares infiltrados com a construção de GRF9 em solução de 0,8 M de manitol por 2 h.

3.12 Transformação para expressão transiente em *Arabidopsis thaliana*

Ensaios de co-cultivo de *A. tumefasciens* e plântulas de *A. thaliana* foram conduzidos conforme descrito em (LI et al. 2009) com modificações. Sementes de Col-0 foram esterilizadas superficialmente, e inoculadas em placas de meio MS 0,25X contendo 0,8% agar e 1% sucrose. Após estratificação a 4°C por 24 h, as sementes foram germinadas em condições de 16 h de luz, 8 h de escuro a 22°C. No dia anterior ao co-cultivo, *A. tumefasciens*

contendo a construção para expressão foi inoculada em 2 mL de meio líquido LB com antibiótico (100 µg/mL espectinomicina) para crescimento a 28°C por 18-24 h. Um volume de 1.6 mL da cultura saturada foi diluído em 10 mL de meio YEB (5 g/L beef extract, 1 g/L yeast extract, 5 g/L peptona, 5 g/L sacarose, 0.5 g/L $MgCl_2$) até OD_{600} final de 0.3 e inoculada para crescimento até OD_{600} 1.5. As culturas foram centrifugadas a 6.000 g por 5 min e lavadas 1X com 10 mL de solução de lavagem contendo 10 mM $MgCl_2$ e 100 µM acetoseringona. As culturas foram novamente centrifugadas a 6.000 g por 5 min e o pellet foi ressuspendido em 1 mL de solução de lavagem. Em uma placa de Petri estéril, 40 plântulas de Arabidopsis de 4 dias de idade foram imergidas em meio de co-cultivo preparado em 20 mL, contendo MS 0,25X (pH 6.0), 1% de sacarose, 100 µM acetoseringona, 0.005% (v/v) Silwet L-77 e Agrobacteria a OD_{600} final de 0.5. O co-cultivo foi realizado no escuro na mesma temperature de crescimento das plantas, por 30-40 h, ao que se seguiu a observação em microscópio confocal.

3.13 Transformação de *Arabidopsis thaliana*

Para os experimentos de transformação as inflorescências das plantas foram cortadas para remover a dominância apical e estimular a produção de maior número hastes secundárias (e assim, de botões florais), e tornar a transformação mais eficiente.

3.13.1 Transformação de plantas

A transformação das plantas de *Arabidopsis thaliana* foi feita pelo método de Floral Dip (CLOUGH; BENT, 1998) entre 4 e 8 dias após o corte das hastes.

Uma cepa de *Agrobacterium tumefasciens* GV3101 (pMP90) (KONCZ; SCHELL, 1986) contendo o plasmídeo de interesse foi inoculada em meio líquido LB contendo os antibióticos necessários, e crescido até a fase estacionária (entre 18 e 24 h) a 28°C, 200 rpm. As células foram centrifugadas a 4000 g por 20 min a temperatura ambiente, e em seguida ressuspendidas em meio de infiltração (5% sucrose, 0,05% Silwet L-77 (OSi Specialties, Inc., Danbury, CT, USA), diluídas até OD_{600} final de aproximadamente 0,8.

Os vasos foram cuidadosamente invertidos e os botões florais da planta mergulhados na solução de infiltração, e em seguida colocados verticalmente em uma bandeja de plástico, e cobertas com outra bandeja escura para manter a umidade e mantida na câmara de crescimento até o dia seguinte. A cobertura foi removida 12 h após a infiltração e as plantas foram crescidas por mais 3 a 5 semanas até as sílicas estarem secas. A parte aérea de cada planta foi mantida separada das vizinhas por cilindros plásticos. As sementes foram coletadas

ao se puxar as inflorescências sobre um papel limpo e foram em seguida peneiradas para separação de sílicas secas e quaisquer outro material vegetal e as sementes mantidas em sala seca por 3 semanas.

3.13.2 Seleção de plantas transformadas

Para a seleção dos transformantes, as sementes de Arabidopsis tiveram a superfície esterilizada em fluxo laminar, primeiramente com a adição de etanol 95% em um tubo contendo as sementes, por 30 s, e em seguida, com a incubação em solução de hipoclorito de sódio (2.5%) e 0,05% de Tween 20 por 20 min. Após esse período, a solução foi descartada e as sementes foram lavadas com água estéril 5X, e mantidas a 4°C por 4 dias e plaqueadas em meio MS 0,5X (Phytotechnology Laboratories #M524), 0,8% de Phytagel (Sigma), contendo canamicina (50 mg/mL). As placas foram transferidas para sala de crescimento *in vitro* para germinação das sementes. As plantas que cresceram com vigor (produzindo folhas verdes e raízes bem estabelecidas no meio seletivo) foram transplantadas para vasos de 7 cm de diâmetro 15 dias depois, quando folhas verdadeiras estavam desenvolvidas.

3.14 Extração de DNA genômico de planta

Para genotipar as plantas transformadas, o DNA genômico foi extraído de folhas seguindo a metodologia de EDWARDS et al.., 1991, com buffer de extração (200 mM Tris HCl pH 7.5, 25 mM EDTA, 250 mM NaCl, 0,5% SDS) adicionado ao tubo com o material vegetal e macerado a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm, por 5 min a temperatura ambiente. Uma fração do sobrenadante foi transferida para um novo tubo contendo 1V de isopropanol e as amostras foram incubadas por 1 h e em seguida centrifugadas por 30 min a 13.000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi removido e se adicionou álcool 70% para lavar o pellet, e após centrifugação a 13.000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet seco naturalmente. O DNA foi eluído e armazenado a –20°C.

3.15 Ensaios de duplo-híbrido em levedura

3.15.1 Transformação da linhagem AH109 com os genes de interesse

Os clones confirmados por sequenciamento foram transformados em *Saccharomyces cerevisiae* cepa AH109. Para os ensaios de duplo-híbrido as construções realizadas com os vetores pGADT7 e pGBKT7 foram transformadas em conjunto, segundo adaptação do protocolo PEG/LiAc/ssDNA (GIETZ; WOODS, 2002) descrito a seguir. Uma amostra de *S.*

cerevisiae AH109 inoculada em placa de meio de cultivo YPDA sólido (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glicose, 100 mg/L de hemissulfato de adenina, 20 g/L de ágar bacteriológico) foi transferida para 10 mL de YPDA líquido, e incubada a 30 ºC por 16 h.

Após esse período, a suspensão foi centrifugada em tubos estéreis por 30 s a 8000 rpm, seguido de lavagem do precipitado com água mili-Q estéril. A centrifugação foi repetida, e foram adicionados ao precipitado 240 µl de polietilenoglicol (PEG) 50%, 36 µl de acetato de lítio 1M, 50 µL de ss-DNA de salmão (2 mg/mL Sigma® #L-1626) e de 0.1 a 1 µg do DNA plasmidial de interesse e o volume foi completado até um volume total de 360 µL com água estéril. A mistura foi agitada em vórtex e os tubos incubados a 42ºC por 60 minutos.

As células foram precipitadas por centrifugação, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspendidas em água estéril e este volume plaqueado em meio seletivo na ausência de aminoácidos seletivos para a transformação dos vetores para duplo-híbrido (triptofano e leucina) ou para a interação das proteínas em construção (histidina e adenina) (MATCHMAKER Two-Hybrid System, Clontech Laboratories, Inc). A preparação do meio é descrita a seguir: 20 g/L de nitrogênio básico, 2 g/L de mistura sintética de nutrientes Drop Out Powder (USBiological®), 20 g/L de ágar bacteriológico, pH 5.6. As quantidades adicionadas de cada aminoácido, quando usados são: 20 mg/L de histidina e 40 mg/L de adenina. As placas foram incubadas a 30ºC por aproximadamente 4 dias.

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

Para verificar se houve interação entre as proteínas dessas construções, as colônias obtidas com a transformação foram inoculadas em placas contendo meio SC-trp-leu-his e SC-trp-leu-his-ade e incubadas a 30 ºC por 2-3 dias. Nas mesmas placas de crescimento seletivo foram inoculadas colônias transformadas com as proteínas FtsH5 e FIP (RODRIGUES, 2011) como controle positivo para interação e para o controle negativo, foram usadas colônias transformadas com apenas uma construção em conjunto com o vetor complementar vazio (sem clonagem de genes).

3.16 Complementação de Fluorescência Bimolecular (BiFC)

Para a confirmação de interação entre as proteínas do estudo já indicadas pelas análises *in silico* e *in vivo*, verificadas em ensaios de duplo-híbrido em levedura foi utilizado o sistema BiFC (Complementação de Fluorescência Bimolecular) (WALTER et al.., 2004) para expressão transiente *in planta*. A técnica de BiFC se baseia na reconstituição da proteína YFP

(Yellow Fluorescence Protein) e demonstra se houve interação entre as proteínas pela emissão de fluorescência.

Foram construídos iniciadores específicos para as seqüências codificadoras das proteínas do estudo contendo sítios de restrição para a clonagem nos vetores para BiFC, pSPYNE-35S e pSPYCE-35S, sendo que o plasmídio pSPYNE-35S, codifica a região N-terminal da YFP e o plasmídio pSPYCE codifica a região C-terminal da YFP.

As construções foram clonadas em células de *E.coli* por eletroporação e as construções verificadas por sequenciamento. Em seguida, as construções foram utilizadas para transformação de *Agrobacterium tumefasciens* GV3101. As colônias transformadas foram incubadas para crescimento e diluídas em tampão de infiltração (MES 10 mM; $MgCl_2$ 10 mM; acetoseringona 200 µM, pH 5.6) para OD_{600} final de 0,3 e incubadas por 3 h a temperatura ambiente. As soluções contendo construções dos vetores pSPYNE-35S, pSPYCE-35S e p19 foram misturadas na proporção 1:1:1 e utilizadas para infiltração de folhas de *Nicotiana tabacum*. Fragmentos de folhas infiltradas foram utilizados para visualização em microscópio confocal.

3.17 Microscopia confocal de fluorescência

Os experimentos foram visualizados em microscópio confocal de varredura a laser Olympus® FV1000 e software Fluoview FV10-ASW. Para a detecção da GFP foi utilizado comprimento de onda de excitação de 488 nm e a emissão entre 510 a 550 nm. Para a detecção da YFP foi utilizado comprimento de onda de excitação de 512 nm e emissão entre 670 a 700 nm.

As imagens para os ensaios de expressão transiente foram realizadas, para BiFC, de 4 a 7 dias após a infiltração e nos ensaios para verificar a localização sub-celular, 3 dias após a infiltração.

3.18 Modelagem estrutural e predição de interações proteína-proteína

A fim de se investigar o modo de interação entre a GRF9 e as duas proteínas duplo-direcionadas do estudo (THI1 e MST), as sequências proteicas foram submetidas a predição estrutural por homologia e a análises de *docking* proteína-proteína. Para estas análises, foi realizada colaboração com a Dra. Renata de Oliveira Dias. Para isso, as sequências foram pesquisadas quanto a proteínas homólogas presentes no banco de dados de estruturas tridimensionais de proteínas PDB (*Protein Data Bank*) (BERMAN et al., 2000) utilizando-se o software PSI-BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). Os modelos escolhidos para cada uma das

proteínas estudadas são apresentados na Tabela 1. O dímero de GRF9 foi predito com base no posicionamento dos monômeros na estrutura 1QJB do PDB (FERL et al., 2002).

Tabela 1 – Descrição das estruturas proteicas escolhidas como moldes por homologia

Proteína estudada	**Proteína molde**					
	Acesso	**Resolução**	**Espécie**	**Identidade**	**Cobertura**	**Referência**
GRF9	3UBW	1.9 Å	*Homo sapiens*	73%	85%	(Molzan et al., 2012)
THI1	1RP0	1.6 Å	*A. thaliana*	99%	80%	(Godoi et al., 2006)
MST	3OLH	2.5 Å	*H. sapiens*	41%	75%	Não publicada
14-3-3 em complexo	1QJB	2.0 Å	*H. sapiens*			(FERL et al., 2002)

As estruturas tridimensionais preditas foram preparadas para o *docking* utilizando-se o software UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004), onde 1000 *steep descent steps* foram utilizadas para a minimização de energia das estruturas. Posteriormente, as estruturas foram submetidas ao HADDOCK *web server* (DE VRIES et al., 2010), onde as regiões de interface de cada estrutura foram preditas pelo método CPORT (DE VRIES; BONVIN, 2011) e submetidas ao *docking* no HADDOCK (DOMINGUEZ et al., 2003). Os resíduos envolvidos na interação proteína-proteína foram preditos pelo PIC Web Server (TINA et al., 2007), utilizando-se como critério os limites de 3.5, 5 e 6 Å de distância entre os resíduos, para interações do tipo ponte de hidrogênio, hidrofóbica e iônica, respectivamente. Os complexos foram visualizados no software PYMOL.

3.19 Obtenção de genótipo mutante

Uma construção do gene de TH-1 (AT1G22940) no vetor pk7FWG2 (KARIMI et al., 2002) para expressão de GFP C-terminal foi transformada em *Agrobacterium tumefasciens* GV3101 para transformação de plantas mutantes CS3469 de *A. thaliana* por *floral dip* (Clough et al., 1998). CS3469 é um duplo mutante para gl-1 e th1-32, sendo deficiente na produção de TH-1, e ausente em tricomas (Figura 8). Esse mutante possui fenótipo condicional letal, dependendo de complementação de tiamina no meio de crescimento ou solo. As sementes e plantas foram irrigadas com solução de 0,01% de tiamina (T4625 SIGMA-ALDRICH) 2X por semana.

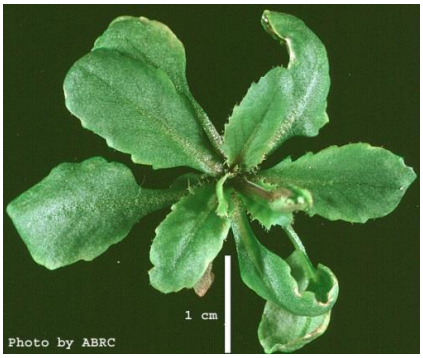


Figura 8 – Fenótipo do mutante CS3469 para o gene Th1 (A1G22940) com folhas ausentes de tricomas (glabra) e bordas foliares amareladas (Foto do banco de dados do ABRC)

4 RESULTADOS

4.1 Localização sub-celular das proteínas GRF9, THI1 e MST1

A partir do estudo *in silico* previamente mencionado, foi indicado que a proteína GRF9 interage com ao menos duas proteínas de duplo direcionamento em *A. thaliana*. Experimentos anteriores também demonstraram sua interação com diversas proteínas organelares. Além desses dados iniciais, informações sobre as características de proteínas da família 14-3-3 e seu potencial em regular a localização de proteínas na célula, tanto em plantas como animais, direcionaram os experimentos.

Para a determinação da localização sub-celular das proteínas GRF9, THI1 e MST1 em expressão transiente, como controle para os estudos de interação proteína-proteína pelo método de BiFC (Biomolecular Fluorescence Complementation), foram realizadas construções contendo os genes completos para GRF9, THI1 e MST1 fusionados à sequência codificadora da proteína GFP. As construções resultantes foram utilizadas em experimentos de transformação de *Arabidopsis thaliana* para expressão transiente.

A transformação de plântulas de arabidopsis de 4 dias de idade foi realizada como descrito nos Materiais e Métodos, e 5 a 10 plântulas foram arranjadas em lâminas com lamínula para observação ao microscópio confocal. A plântula toda foi observada, e sinais de fluorescência puderam ser observados em células da epiderme dos cotilédones. A construção GRF9 fusionada a GFP transformada dessa maneira foi a que apresentou maior eficiência de expressão, com a visualização de muitas células exibindo fluorescência. Com o filtro para clorofila, podem ser observadas estruturas que se assemelham a cloroplastos, que demonstra que as células dos cotilédones estavam em boas condições. Os sinais de fluorescência observados com o filtro para GFP em células da epiderme dos cotilédones parecem se localizar no citosol e em uma região mais concentrada dentro das células, que se assemelha ao núcleo (Figura 9). Os resultados para o experimento de expressão transiente em arabidopsis mostram que GRF9 está localizada no citosol e núcleo.

Como esta metodologia não demonstrou a mesma eficiência de transformação para todas as construções, os experimentos de expressão transiente passaram a ser realizados em tabaco.

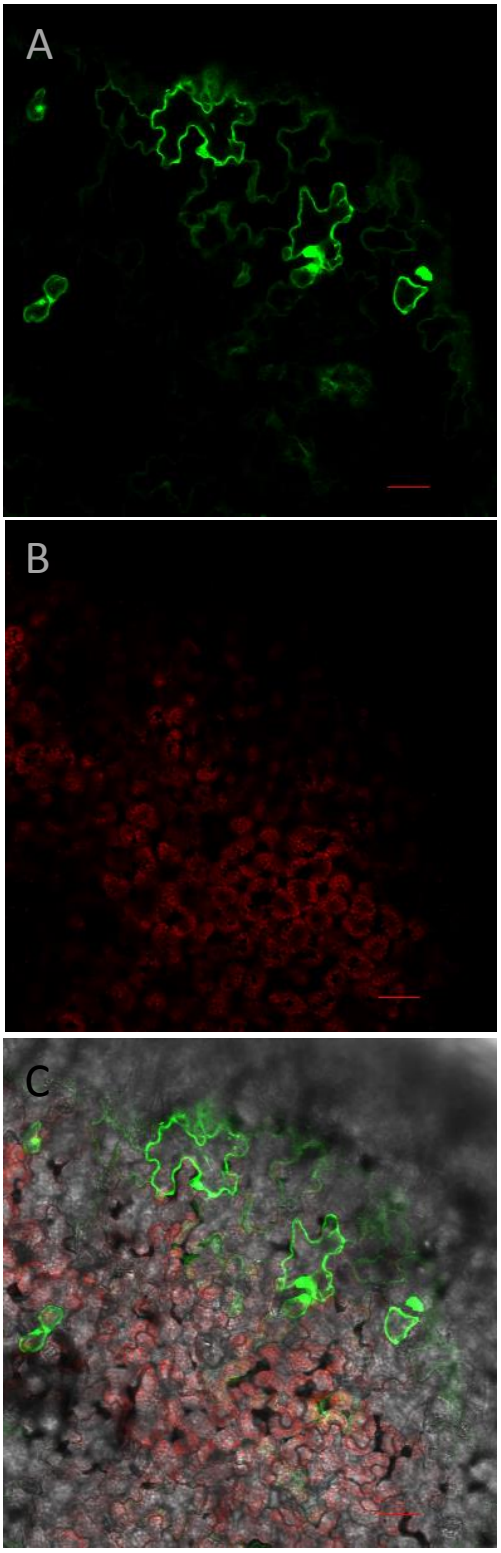


Figura 9 - Localização sub-celular de GRF9 em expressão transiente em Arabidopsis. A - Observação com filtro para GFP. B - Autofluorescência da clorofila nos cloroplastos. C - Sobreposição dos filtros para GFP, clorofila e luz transmitida. As barras de escala representam 20µm

A transformação com a construção de GRF9 fusionada a GFP também foi realizada em tabaco. Pela observação de células da epiderme de folhas de tabaco ao microscópio confocal pôde-se observar fluorescência novamente no núcleo e citosol, como nos experimentos anteriores, e também foram abservados sinais lineares por toda a célula, com aparência de uma rede de microtúbulos, semelhante a sinais verificados em células marcadas para o citoesqueleto (JACQUES; VERBELEN; VISSENBERG, 2013) (Figura 10A).

Para confirmação da presença de GRF9 no citosol, que demonstraria que a proteína poderia agir no direcionamento pelo citoplasma das proteínas organelares, fragmentos de folhas agroinfiltradas foram submetidas a tratamento para plasmólise das células. Pode-se observar que as células que apresentaram fluorescência para GFP tiveram a membrana separada da parede celular, verificada na imagem de sobreposição do filtro para GFP e imagem de luz transmitida. O recuo da membrana e do sinal para GFP juntamente com ela, demonstra que GRF9 estava contida no citosol (Figura 10C e D).

A transformação para expressão da construção THI1 fusionada a GFP permitiu a observação de muitos sinais de fluorescência em células da epiderme foliar, em estruturas que se assemelham a cloroplastos (Figura 11). Quando estes sinais são sobrepostos com o filtro para clorofila, pode-se constatar a co-localização dos sinais, provando que estas estruturas são os cloroplastos. O sinal de GFP não foi visualizado apenas nos cloroplastos. Muitas células apresentaram sinal aparentemente citosólico, que poderia indicar que a localização final de THI1 ainda não havia sido completada. Células também foram observadas com sinal de GFP em estruturas menores que os cloroplastos, supostamente as mitocôndrias. Já foi demonstrado que THI1 é duplo-direcionada (CHABREGAS et al.,2001), portanto isto sua localização mitocondrial também era esperada. Foram realizados ensaios para tratamento de fragmentos de folhas infiltradas com o marcador comercial para mitocôndrias (Mito Tracker - Thermo Fisher Scientific), no entanto a marcação não ocorreu com a intensidade esperada. Uma construção da sub-unidade β da ATP sintase mitocondrial (X02868) fusionada a GFP foi utilizada como referência para o sinal de GFP esperado na localização às mitocôndrias (Figura 12), no entanto, em agroinfiltração separada. Com isso, foi demonstrado que a localização de THI1 realmente ocorre nos cloroplastos e mitocôndrias.

A transformação com a construção de MST1 fusionada a GFP mostrou, em células da epiderme foliar, a presença de sinal de GFP em estruturas similares a cloroplastos e a co-localização destas estruturas com o sinal de fluorescência para clorofila indica que estes sinais provém dos cloroplastos (Figura 13). Apesar da proteína MST1 ser conhecidamente duplo-

direcionada aos cloroplastos e mitocôndrias (NAKAMURA; YAMAGUCHI; SANO, 2000), a visualização de GFP nas mitocôndrias não pôde ser verificada com estes experimentos.

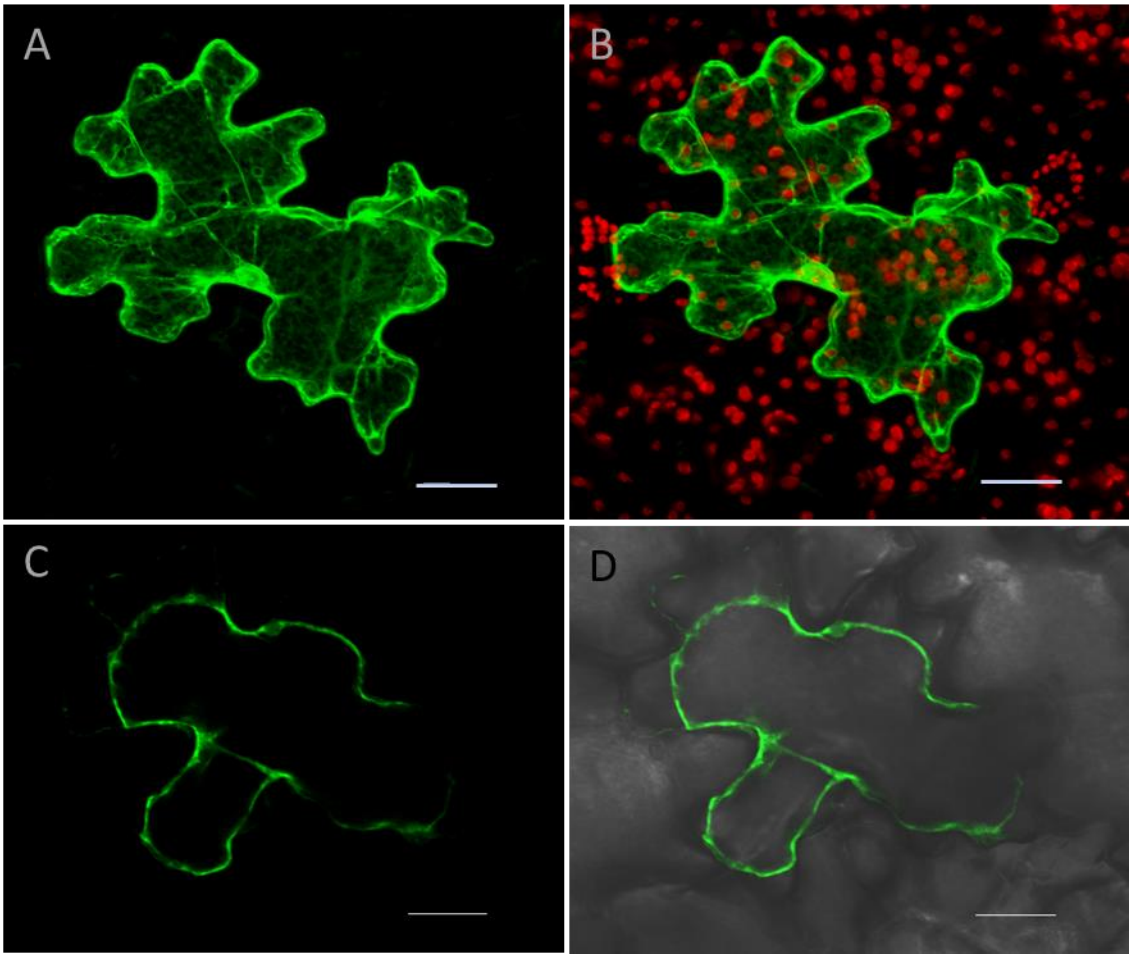


Figura 10 - Células da epiderme de folhas de *N. tabacum* transformadas com construção do gene GRF9 ligado à GFP. A e C- Observação com filtro para GFP. B - Sobreposição do filtro para GFP e autofluorescência da clorofila nos cloroplastos. D- Sobreposição do filtro para GFP e luz transmitida. C e D – folhas infiltradas e plasmolisadas, mostra o recuo da membrana e a contenção da proteína GFP no citosol. As barras de escala representam 20µm

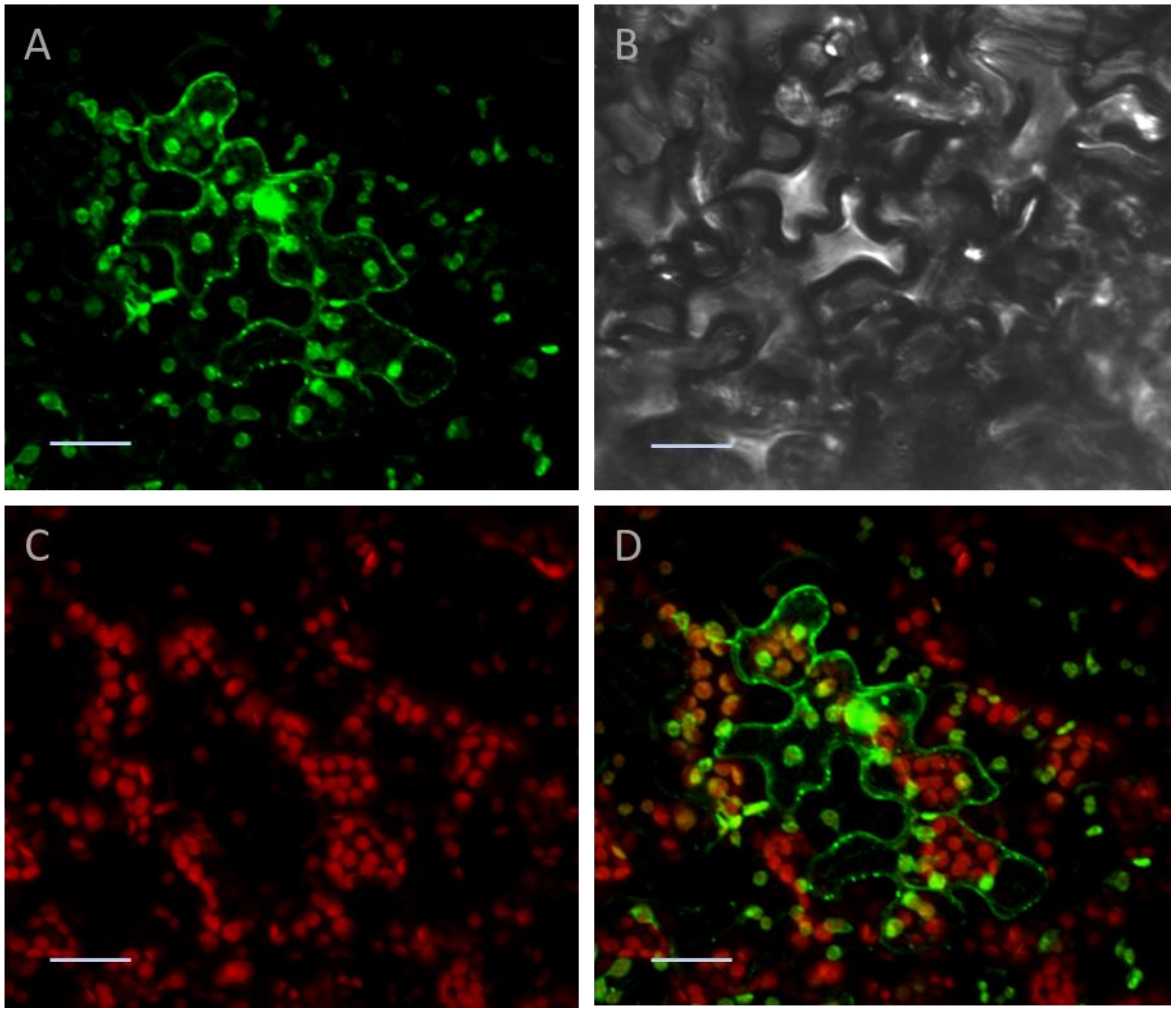


Figura 11 – Células da epiderme de folhas de *N. tabacum* transformadas com construção do gene THI1 fusionado a GFP. A -Observação com filtro para GFP. B – Imagem de luz transmitida. C- Autofluorescência de clorofila nos cloroplastos. D- Sobreposição do filtro para GFP e clorofila. As barras de escala representam 20µm

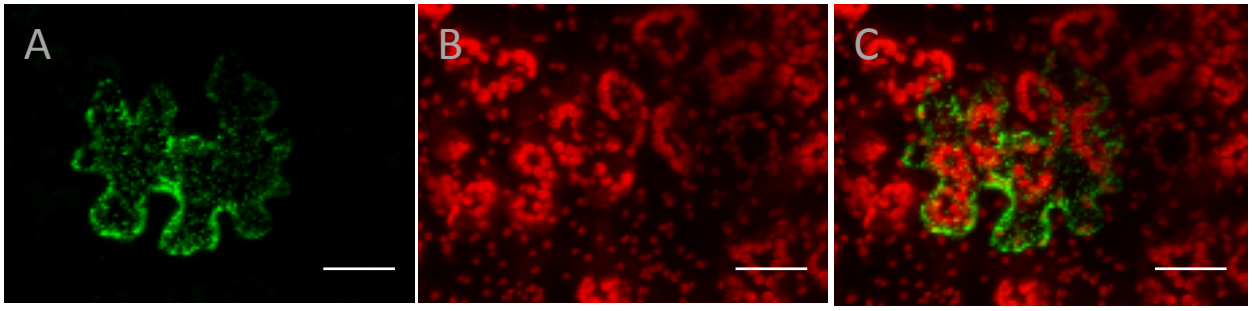


Figura 12 – Agroinfiltração de *N. tabacum* com construção usada como referência para localização mitocondrial (sub-unidade β da ATP sintase (locus X02868) fusionada a GFP. A -Observação com filtro para GFP. B – Autofluorescência de clorofila. D- Sobreposição do filtro para GFP e clorofila. As barras de escala representam 20µm

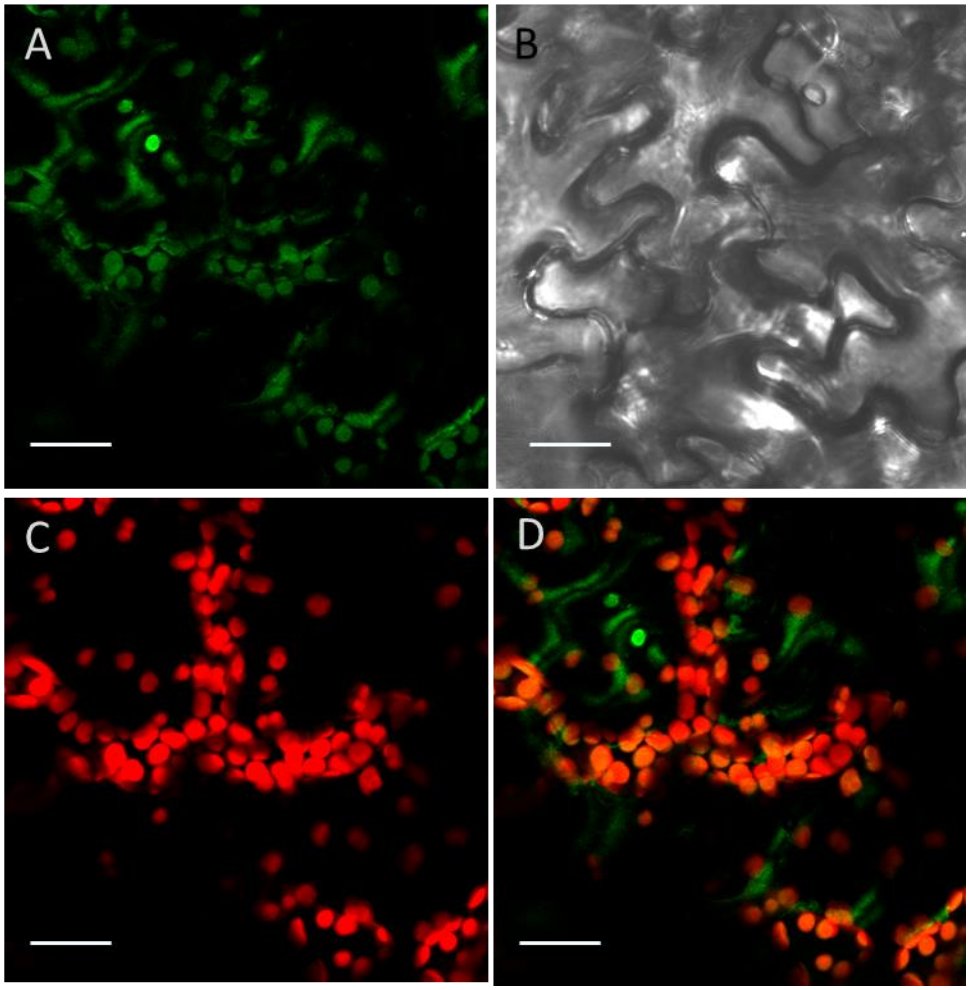


Figura 13 – Células da epiderme foliar de *N. tabacum* transformadas com construção do gene MST1 fusionado a GFP. A -Observação com filtro para GFP. B – Imagem de luz transmitida. C- Autofluorescência de clorofila nos cloroplastos. D- Sobreposição do filtro para GFP e clorofila. As barras de escala representam 20µm

4.2 A proteína GRF9 interage com THI1 e MST1 *in vivo* e *in planta*

Para confirmar as interações entre GRF9 e THI1 e entre GRF9 e MST1, indicados *in silico*, foram feitos experimentos *in vivo* e *in planta* com as sequências completas das proteínas. Para os experimentos *in vivo*, foram utilizados ensaios de duplo-híbrido em levedura e *in planta*, BiFC.

Nos experimentos de duplo-híbrido, as construções GRF9-pGBKT7, THI1-pGADT7 e MST1-pGADT7, confirmadas por sequenciamento, foram transformadas em levedura AH109 e crescidas em meio de seleção para colônias transformadas com sucesso com os dois vetores, sendo este meio de seleção para crescimento em ausência de triptofano e leucina: SC-trp-leu. Após o crescimento de colônias, estas foram diluídas em água destilada estéril para serem inoculadas em placas de meios seletivos em ausência dos aminoácidos histidina e adenina

(SC-trp-leu-his e SC-trp-leu-his-ade) que selecionam colônias que exibem interação entre as proteínas. Nas mesmas placas de crescimento seletivo foram inoculadas colônias como controle positivo e negativo para interação.

Os resultados mostram o crescimento das colônias inoculadas em meio seletivo SC-trp-leu-his-ade (Figura 14), que indica que as interações entre GRF9 e THI1, e entre GRF9 e MST1 ocorrem *in vivo*, como predito pelo estudo *in silico*.

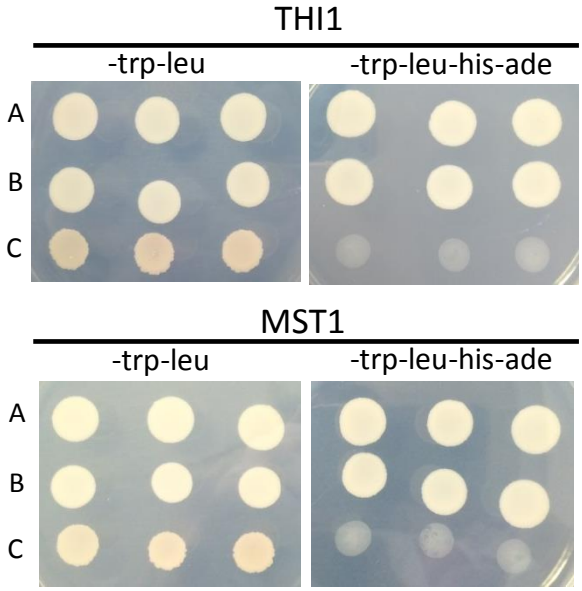


Figura 14 - Ensaios de duplo-híbrido em levedura de GRF9. Teste de interação entre GRF9 + THI1 e GRF9 + MST1. A- Controle positivo de interação. B- Ensaio de interação. C- Controle negativo de interação. Meio seletivo SC-trp-leu- demonstra transformação bem sucedida com os vetores para duplo-híbrido, e SC-trp-leu-his-ade o teste de interação

Para a confirmação dos resultados verificados *in vivo* em levedura, foram realizados testes de interação em ensaios de expressão transiente *in planta* pelo o sistema BiFC (*Biomolecular Fluorescence Complementation*). As sequências codificadoras das proteínas do estudo foram clonadas em 2 vetores contendo parte da sequência da proteína YFP (*YELLOW FLUORESCENT PROTEIN*). No caso de interação entre as proteínas, ocorre a restauração da proteína YFP completa, que então exibe fluorescência no local da célula onde as proteínas interagem. Fragmentos das folhas de tabaco agroinfiltradas foram observados em microscópio confocal.

Puderam ser observados sinais de fluorescência de YFP em células de epiderme foliar de tabaco, e as imagens obtidas, apesar de baixa intensidade, mostram sinais aparentemente citosólicos. A sobreposição destas imagens com as de luz transmitida indicam que a expressão

de YFP no ensaio de GRF9-pSPYCE e THI1-pSPYNE no citosol é bem mais clara do que a visualizada no ensaio de GRF9-pSPYCE e MST1-pSPYNE, que não está preenchendo todas as células. O sinal visualizado na imagem de YFP para a interação de GRF9 e THI1 também inclui um estômato próximo à célula transformada, que também exibe fluorescência. Na imagem para a interação GRF9 e MST1, a fluorescência pode ser observada nos contornos de diversas células epiteliais que a imagem inclui, que indica a expressão de YFP no citosol. Os resultados dos ensaios de BiFC mostram a ocorrência de interação *in planta* entre GRF9 e THI1 (Figura 15) e entre GRF9 e MST1 (Figura 16), e que essas interações se localizam no citosol.

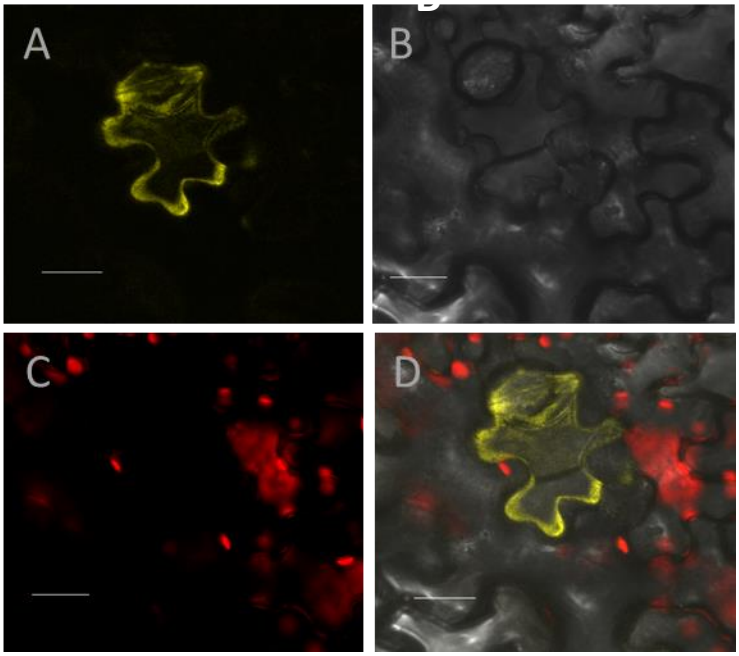


Figura 15 - Células da epiderme de folhas de *N. tabacum* agroinfiltradas com as construções GRF9 (pSPYCE) e THI1 (pSPYNE). A- Observação sob filtro para YFP. B- Imagem de luz transmitida. C- Filtro para clorofila. D- Sobreposição do filtro para YFP, clorofila e luz transmitida. As barras de escala representam 40 µm

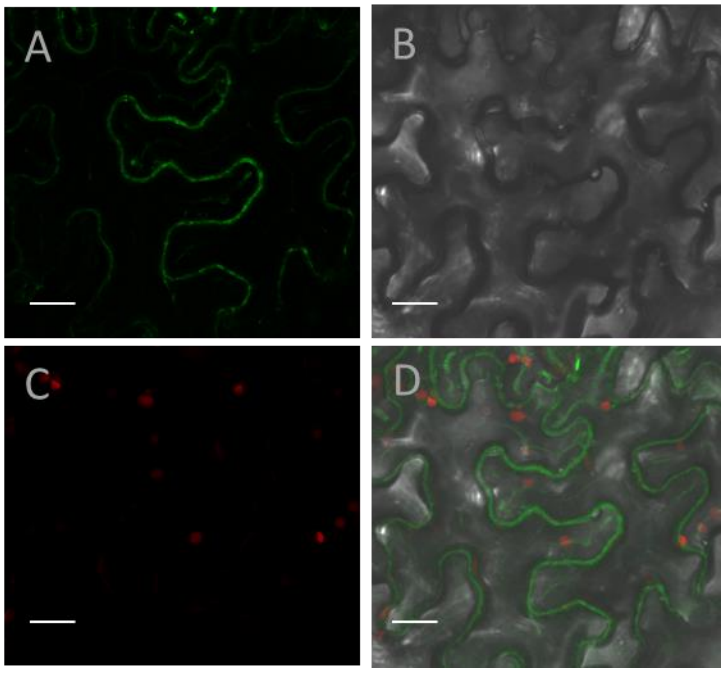


Figura 16 - Células da epiderme de folhas de *N. tabacum* agroinfiltradas com as construções GRF9 (pSPYCE) e MST1 (pSPYNE). A- Observação sob filtro para YFP. B- Imagem de luz transmitida. C- Filtro para clorofila. D- Sobreposição do filtro para YFP, clorofila e luz transmitida. As barras de escala representam 20 µm

4.3 A região Box 1 é importante para a interação entre GRF9 e proteínas cliente

Foi iniciada a caracterização da interação entre as proteínas GRF9 e THI1 e entre GRF9 e MST1 por meio de deleções na sequência codificadora da proteína GRF9 e subsequentes ensaios de duplo-híbrido em levedura.

A primeira deleção planejada e realizada na região Box 1 de 14-3-3 (Figura 17) foi utilizada nos experimentos que pretenderam verificar se esta região em GRF9 também é importante na interação com THI1 e MST1.

GRF9 (GF14 mu):

MGSGKERDTFVYLAKLSEQAERYEEMVESMKSVAKLNVDLTVEERNLLSVGYKNVIGSR
RASWRIFSSIEQKEAVKGNDVNVKRIKEYMEKVELELSNICIDIMSVLDEHLIPSASEGEST
VFFNKMKGDYYRYLAEFKSGNERKEAADQSLKAYEIATTAAEAKLPPTHP**IRLGLALN**FS
VFYYEIM**N**A**P**ER**AC**H**L**A**K**Q**AFD**E**AI**S**ELDTL**N**E**ESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSDISEE
GGDDAHKTNGSAKPGAGGDDAEVSIRDSFTRGKSN

Figura 17 – Região Box1 deletada na sequência de GRF9, destacada em negrito.

A construção GRF9-Del1-pGBKT7 foi testada contra as construções contendo as proteínas completas de THI1-pGADT7 ou MST1-pGADT7. Foi realizada seleção de colônias transformadas com os dois vetores (pGADT7 e pGBKT7) e após crescimento de 3-4 dias essas colônias foram inoculadas em 2 tipos de meio seletivo para indicar interação entre as proteínas, em ausência dos aminoácidos histidina e adenina (SC-trp-leu-his e SC-trp-leu-his-ade).

O resultado dos ensaios de GRF9-Del1 contra THI1 e GRF9-Del1 contra MST1 indicaram a ausência de interação em ambos os casos (Figura 18).

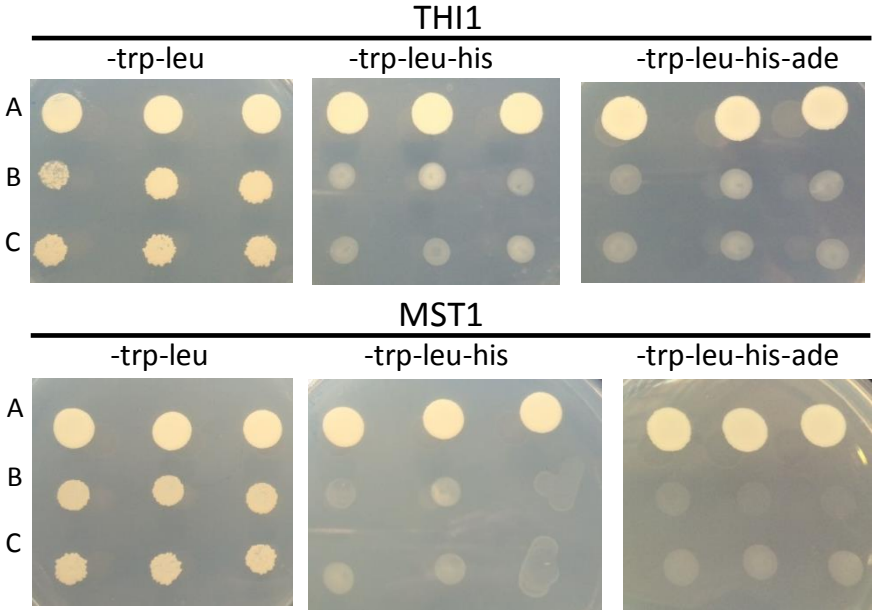


Figura 18 - Ensaios de duplo-híbrido em levedura. Teste de interação entre GRF9-Del1 + THI1 e GRF9-Del1 + MST1. A- Controle positivo de interação. B- Ensaio de interação. C- Controle negativo de interação. Meio seletivo SC-trp-leu- demonstra transformação bem sucedida com os vetores para duplo-híbrido, e SC-trp-leu-his- e SC-trp-leu-his-ade, os testes de interação

4.4 Predição de aminoácidos importantes na interação de GRF9 e proteínas alvo

Para a identificação de aminoácidos específicos de GRF9 envolvidos na interação com outras proteínas, foram conduzidos ensaios computacionais para predição das estrutura tridimensionais das proteínas e também das interações verificadas nos ensaios *in vivo,* a fim de direcionar futuros experimentos, de deleção ou substituição de resíduos de aminoácidos nas proteínas do estudo, e continuar a caracterização dessas interações.

A predição estrutural por homologia foi realizada para GRF9, THI1 e MST1, para as quais foi possível encontrar estruturas de proteínas homólogas disponíveis no banco de dados público do PDB.

Os modos de interação preditos entre o dímero da proteína GRF9 e as proteínas alvo mostraram THI1 e MST1 em interação com a região C-terminal dos monômeros de GRF9 (Figura 19), confirmando a relevância dessa região para interações proteína-proteína (ICHIMURA et al., 1997).

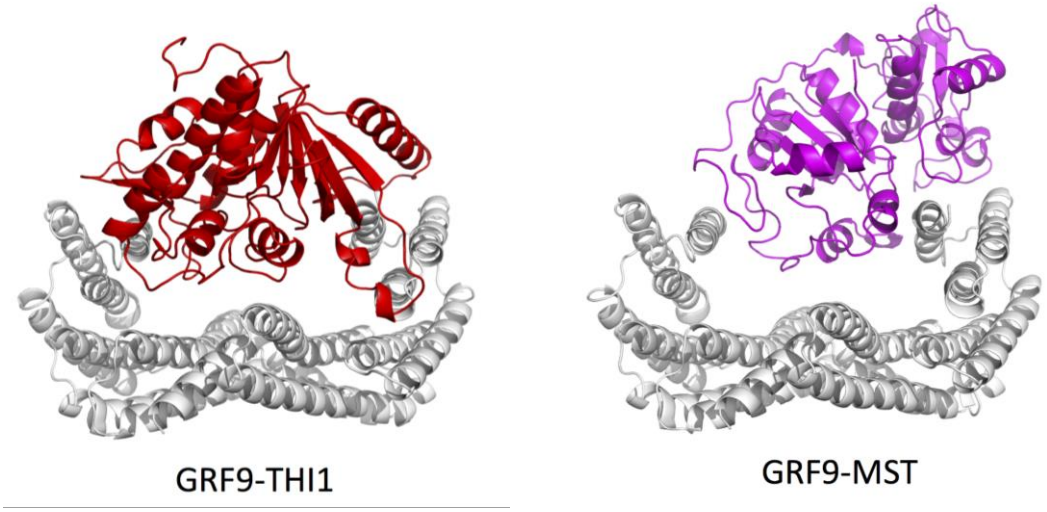


Figura 19 – Modos de interação preditos entre o dímero de GRF9 (branco) e as proteínas THI1 e MST (coloridas).

O papel da região Box 1 da GRF9 foi analisado nos resultados do *docking*. Os experimentos de predição mostram que resíduos presentes nesta região estão envolvidos em ambas as interações, GRF9-MST e GRF9-THI1. Todos os resíduos observados envolvidos na interação GRF9-MST e GRF9-THI1 são apresentados no ANEXO A.

Em um dos monômeros de GRF9, a previsão mostrou uma lisina presente na região Box 1 em ligação, por ponte de hidrogênio, com uma serina da proteína MST (Figura 20).

Essa mesma lisina da região Box 1 de GRF9 interage com uma serina de THI1 por ponte de hidrogênio, e também com um ácido glutâmico (ponte de hidrogênio e ligação iônica) (Figura 21). Além disso, um resíduo de ácido glutâmico da região Box 1, presente no outro monômero de GRF9, também foi predito como envolvido na interação, ligando-se a uma asparagina (ponte de hidrogênio) e uma arginina (ponte de hidrogênio e ligação iônica) de THI1.

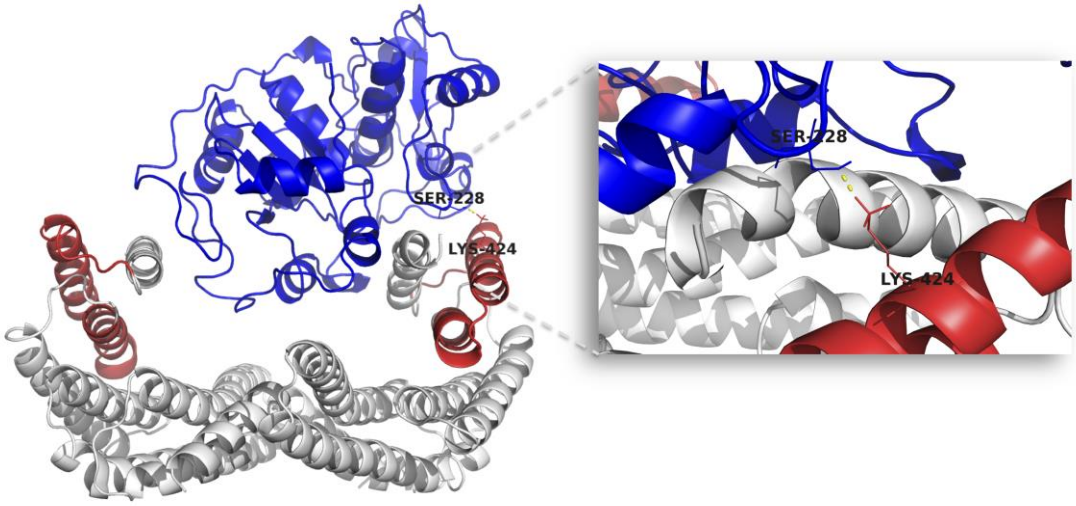


Figura 19 – Análise da interação entre o dímero de GRF9 (branco) e a proteína MST (azul), de acordo com a predição por *docking* estrutural. A região deletada de GRF9 nos ensaios *in vivo* é apresentada em vermelho em cada um dos monômeros. A linha pontilhada em amarelo representa a ponte de hidrogênio observada entre as proteínas

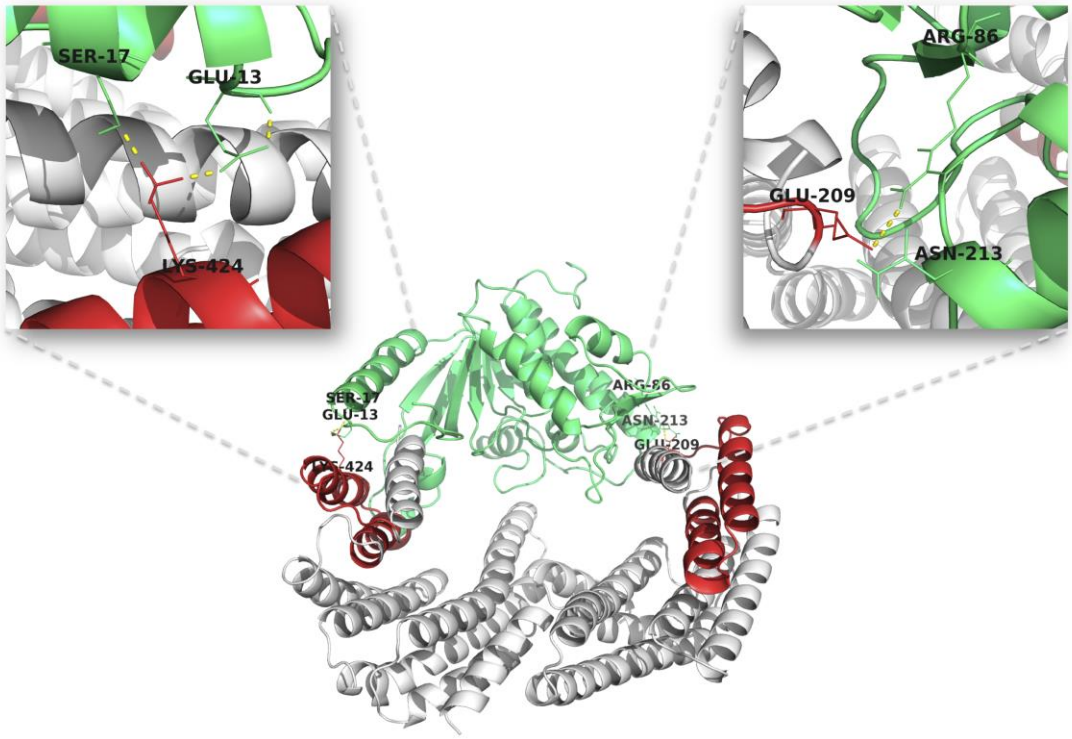


Figura 20 – Análise da interação entre o dímero de GRF9 (branco) e a proteína THI1 (verde), de acordo com a predição por *docking* estrutural. A região deletada de GRF9 nos ensaios *in vivo* é apresentada em vermelho em cada um dos monômeros. As linhas pontilhadas em amarelo representam as pontes de hidrogênio observadas entre as proteínas

A lisina da região Box 1 que foi indicada em interação nos dois casos pode ser visualizada na sequência de GRF9 (Figura 21).

GRF9 (GF14 mu):

MGSGKERDTFVYLAKLSEQAERYEEMVESMKSVAKLNVDLTVEERNLLSVGYKNVIGSR
RASWRIFSSIEQKEAVKGNDVNVKRIKEYMEKVELELSNICIDIMSVLDEHLIPSASEGEST
VFFNKMKGDYYRYLAEFKSGNERKEAADQSLKAYEIATTAAEAKLPPTHP**IRLGLALN**FS
VFYYEIM**N**A**P**ER**AC**H**L**A**K**Q**AFD**E**AIS**ELDTL**N**E**ESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSDISEE
GGDDAHKTNGSAKPGAGGDDAEVSIRDSFTRGKSN

Figura 21-Destaque na lisina de Box 1 numerada como Lys424 no complexo de GRF9 com THI1 e MST1.

Foram realizadas buscas na seqüência de THI1 e MST1 para verificar a presença de motivos consenso de ligação a proteínas 14-3-3 e sítios de fosforilação, utilizando-se os programas Prosite (http://kr.expasy.org/tools/scanprosite/) e PhosPhat (http://phosphat.mpimp-golm.mpg.de/) (DUREK et al., 2009; HEAZLEWOOD et al., 2008). Não foram encontrados em THI1 ou MST1 os sítios de ligação a proteínas 14-3-3 mais comuns (RSXpSXP e RXY/FXpSXP) (YAFFE et al., 1997). No entanto, um sítio alternativo de ligação a 14-3-3, SXP (SOROKINA et al.,2011), foi verificado em 3 pontos de MST1, mas não THI1, o que indica que seu modo de interação é outro.

A predição dos resíduos fosforilados dessas proteínas foi visualizada no programa PhosPhat (http://phosphat.uni-hohenheim.de/phosphat.html?code=AT5G54770.1, http://phosphat.uni-hohenheim.de/phosphat.html?code=AT1G79230.1). Os resultados da análise dos sítios fosforilados preditos mostra que THI1 possui 14 sítios de fosforilação, sendo que 3 deles são fosfoserinas. Já MST1 possui 16 sítios de fosforilação preditos, 4 fosfoserinas. A Ser17, na estrutura gerada para predição estrutural de THI1, corresponde a uma serina na sequência de *A. thaliana* que está em uma região considerada um *hotspot* para fosforilação. Já Ser228, que é a serina na predição estrutural de MST que interage com GRF9, não corresponde à posição das serinas fosforiladas na sequência de MST1 de *A. thaliana*.

4.5 Análises de expressão em mutantes silenciados

Para a continuidade dos experimentos de caracterização de GRF9 e subsequentemente testar os efeitos do silenciamento e superexpressão de GRF9 para a localização sub-celular de proteínas organelares, foram realizadas buscas por mutantes com inserção de DNA de transferência (T-DNA) para os experimentos com GRF9 silenciada, no banco de dados do

TAIR (“The Arabidopsis Information Resource”). Mutantes com inserção de T-DNA na região 5’-UTR de GRF9 (SALK_020026C) foram analisados utilizando iniciadores flanqueando a região do T-DNA (APÊNDICE E) e o iniciador Lbb1.3, utilizado para genotipagem de mutantes.

Alguns indivíduos analisados apresentaram amplificação em reações de PCR para o iniciador Lbb1.3 e não apresentaram produto de amplificação em reações de PCR utilizando primers para real-time PCR, específicos para a isoforma GRF9 (HE et al., 2015) utilizando os iniciadores flanqueadores, indicando genótipo de mutantes homozigotos (ANEXO B). Estas plantas foram utilizadas para análise de expressão gênica, com extração do RNA e produção de cDNA.

Estes mutantes apresentaram expressão gênica diminuída quando em comparação com a expressão do gene GRF9 em plantas selvagens (Figura 22). Este resultado indica que o nocaute é confirmado nesta linhagem mutante SALK_020026C

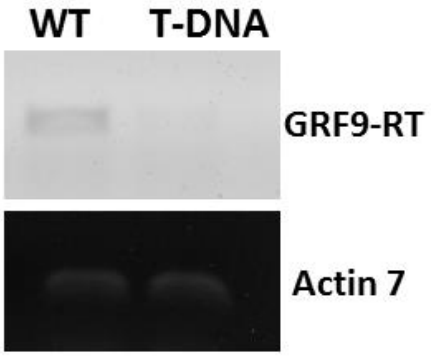


Figura 22- Análise de expressão gênica de SALK_020026C. O gene Actina 7 foi usado como controle

4.6 Obtenção de plantas trangênicas superexpressando GRF9

Plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 foram transformadas para expressão estável da proteína GRF9 em vetor de superexpressão na Ohio State University (ABRC Lab).

As plantas F1 foram selecionadas em meio MS com canamicina e genotipadas com iniciador 35S e iniciador reverso do gene GRF9. As sementes resultantes das plantas F1 com o genótipo 35S:GRF9 foram enviadas ao Brasil, e foram novamente selecionadas em meio com canamicina para seleção e análise das linhagens resultantes. Uma amostra das sementes selecionadas novamente por canamicina (25 plantas F2) foi analisada para cada linhagem F1 (previamente genotipada como 35S:GRF9).

Foi realizada a extração de RNA, produção de cDNA, e análises de PCR (F: 5' TGATTGGTTCAAGGAGAGCTT 3'; R: 5' AGTAGATTCACCCTCGGAAG 3') destas plantas. Pela comparação dos padrões de expressão verificados em um número de plantas pertencentes à mesma família (10-20 plantas), verificou-se que apenas uma linhagem transgênica em homozigose foi obtida (Figura 23). A análise de expressão confirmou que as plantas dessa linhagem apresentam nível de expressão de GRF9 maior do que plantas selvagens (WT).

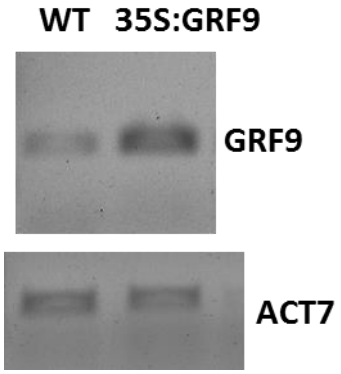


Figura 23 - Análise de expressão gênica de linhagem em homozigose superexpressando GRF9. O gene Actina 7 foi usado como controle

4.7 Obtenção de genótipo CS3469/TH-1-GFP

Foi gerado um genótipo inicial para a obtenção de população mutante em busca de novos fatores envolvidos no direcionamento de proteínas aos cloroplastos e estes procedimentos foram realizados na Ohio State University, no laboratório do ABRC, sob a supervisão da Dra. Jelena Brkljacic.

Como complementação dos experimentos de caracterização de GRF9 foi realizado um experimento de interação *in vivo* entre a proteína GRF9 e TH-1. A construção da sequência de TH-1 no vetor de duplo-híbrido pGADT7 foi usada para transformação de levedura e ensaios contra GRF9 em meios seletivos para a interação. Os resultados mostram a interação ainda não relatada de GRF9 e TH-1 (Figura 24).

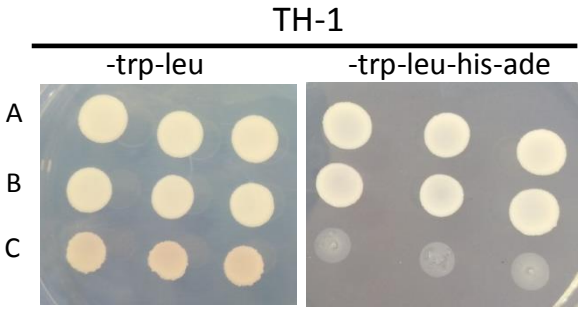


Figura 24 - Ensaio de duplo híbrido em levedura. Teste de interação entre GRF9 + TH-1. A- Controle positivo de interação. B- Ensaio de interação. C- Controle negativo de interação. Meio seletivo SC-trp-leu- demonstra transformação bem sucedida com os vetores para duplo-híbrido, e SC-trp-leu-his-ade, o teste de interação

A construção da sequência de TH-1 fusionada à GFP foi transformada em folhas de *N. tabacum* e visualizadas em microscópio confocal. As imagens para o filtro GFP mostram a expressão de GFP em estruturas que se assemelham aos cloroplastos, o que pode ser confirmado pela sobreposição da imagem do filtro para GFP e clorofila, que se co-localizam nas mesmas estruturas (Figura 25).

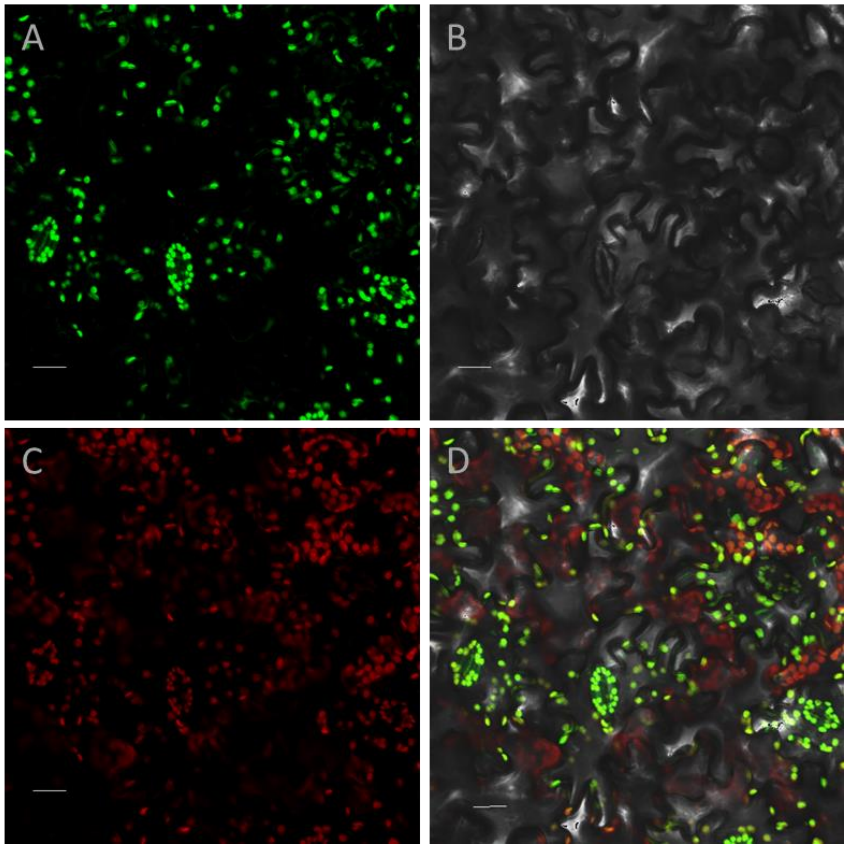


Figura 25 – Expressão transiente de TH-1 fusionada a GFP. A – Filtro para GFP. B- Imagem de luz transmitida. C- Filtro para clorofila. D- Sobreposição das imagens de luz transmitida, e filtros para GFP e clorofila, mostrando localização cloroplastidial de TH1. As barras representam 20 μm

Esta construção foi utilizada para a complementação do mutante CS3469. Foi obtido sucesso nas transformações com a continuidade da irrigação das plantas com solução de tiamina até a produção de sementes. A geração F1 do mutante CS3469 complementado com construção de TH-1 fusionada a GFP foi genotipada utilizando iniciadores do gene TH-1 e do vetor (GFP-Rev), que resultaram em produtos de tamanho esperado (Figura 26) mostrando que a complementação de TH-1-GFP foi realizada.

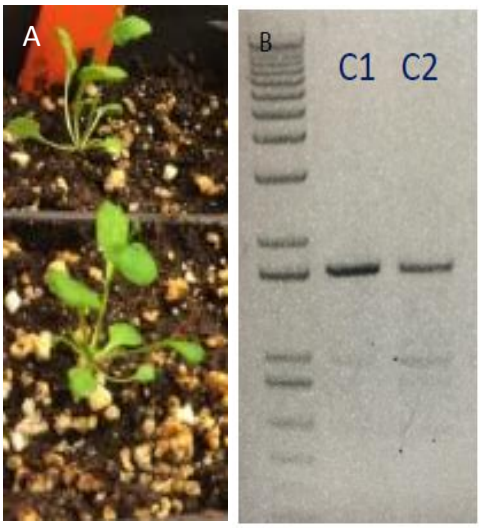


Figura 26- A- Plantas F1 resultantes da complementação de TH1-GFP em mutante CS3469 (C1 e C2); B- Resultados da genotipagem das plantas transgênicas

As linhagens F2 das plantas complementadas CS3469-TH1-GFP foram testadas em meio de crescimento com ausência de tiamina para verificar se a complementação foi bem sucedida.

Como pode-se ver na Figura 27, o mutante CS3469, que possui o gene th1 silenciado, não é capaz de realizar biossíntese de tiamina, necessitando de complementação no meio de cultura ou solo.

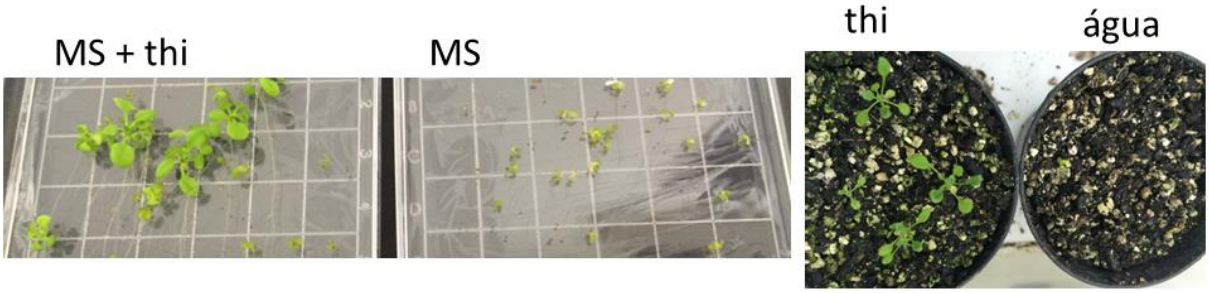


Figura 27- Testes de crescimento mutante CS3469. Meio de crescimento (MS ou solo) com presença ou ausência de tiamina 0,01% (thi).

Como um controle negativo para a fluorescência de GFP o mutante CS3469, não complementado com a construção, foi visualizado em microscópio confocal (Figura 28)

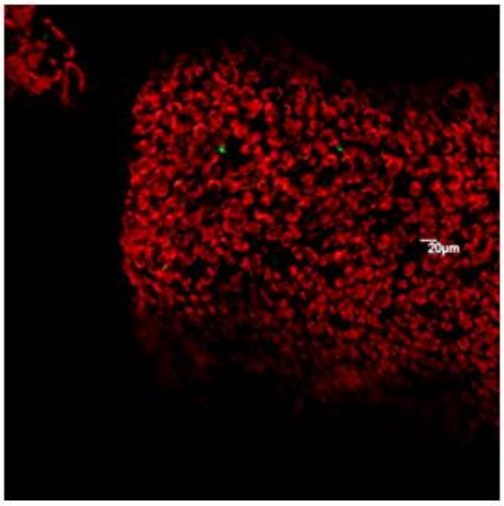


Figura 28 – Controle negativo de fluorescência de GFP em CS3469. Sobreposição GFP e clorofila.

As linhagens F2 das plantas complementadas CS3469-TH1-GFP foram testadas. Do teste realizado em 10 linhagens, 4 apresentaram o fenótipo complementado com TH1-GFP, com crescimento em meio na ausência de tiamina, pois a produção da proteína TH1 está sendo realizada, e nestas linhagens é possível a visualização de GFP nos cloroplastos das folhas, mostrando a localização de TH1 nestas organelas (Figura 29).

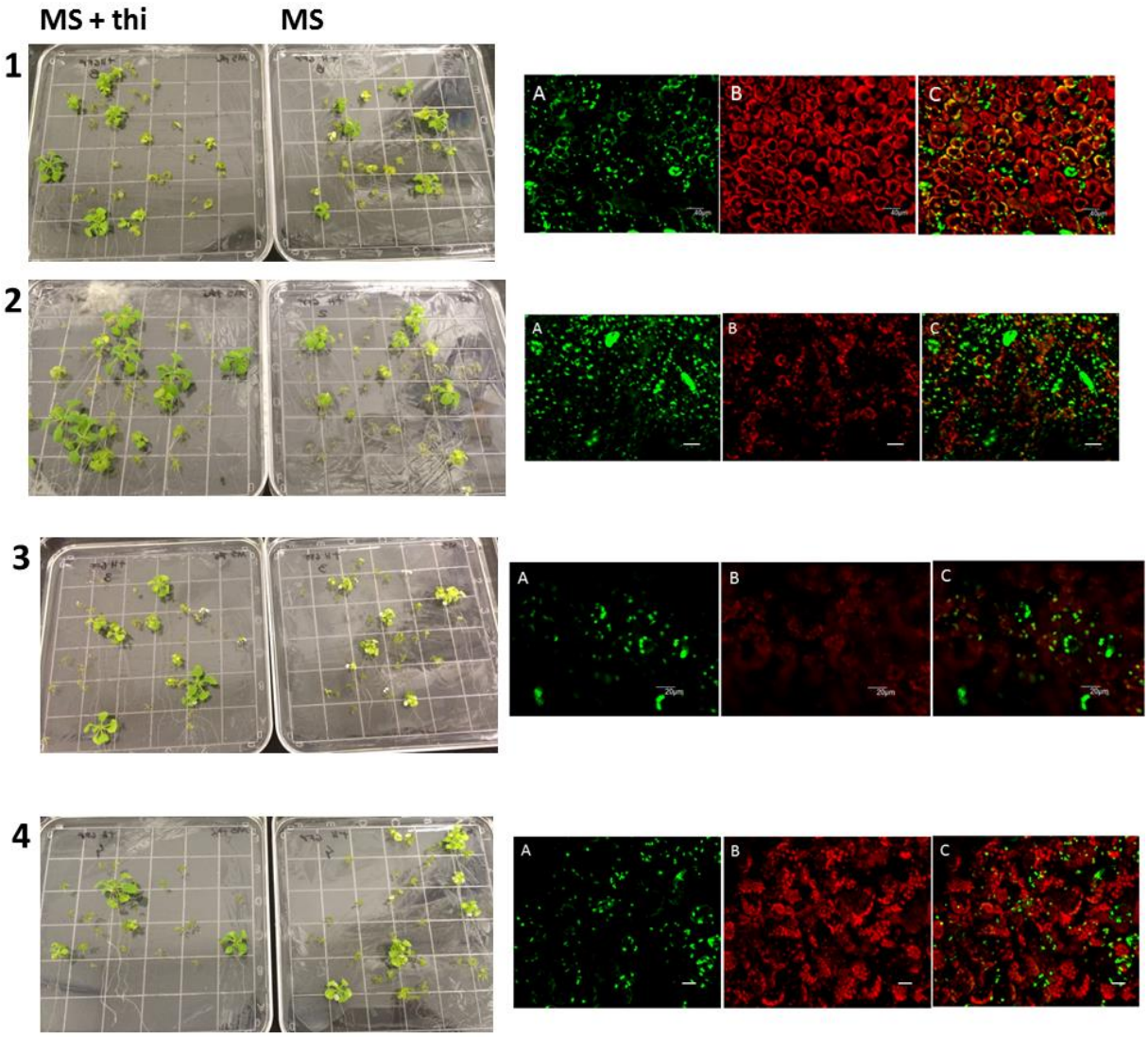


Figura 29 – Testes de crescimento linhagens 1, 2, 3 e 4 de CS3469/TH-1-GFP. Meio de crescimento com presença (thi) e ausência de tiamina 0,01% e visualização confocal destas plantas. A- GFP. B – Clorofila. C- Sobreposição GFP e clorofila. 20µm

As linhagens complementadas com TH-1-GFP estão sendo mantidas em solo com ausência de irrigação de tiamina e serão utilizadas na continuação dos experimentos (Figura 30).

Figura 30 – Plantas mutantes CS3469/TH-1-GFP.

As plantas serão utilizadas nos experimentos para indução de mutações aleatórias no genoma de sementes tratadas com o mutagênico químico EMS (etil metano sulfonato). Espera-se encontrar na população resultante, mutantes com alteração fenotípica relacionada à localização final da proteína TH-1 e, desta maneira, descobrir os genes responsáveis pela alteração.

5 DISCUSSÃO

A proteína GRF9 apresentou interação *in vivo* e *in planta* com as proteínas THI1 e TH-1, importantes na biossíntese da tiamina, e MST1. As evidências de interação de proteínas organelares com GRF9, uma proteína 14-3-3 com diversas funções relatadas mas até hoje, nenhuma em relação à biossíntese da tiamina, ou à detoxificação de ácido cianídrico (realizada pela proteína MST1) nos leva a cogitar se sua função ao interagir com as mesmas tem relação com o direcionamento, no momento em que ainda se encontram no citosol, onde parecem interagir, de acordo com os resultados de interação *in planta*.

O resultado dos ensaios de GRF9-Del1 contra THI1 e MST1 indicaram a ausência de interação em ambos os casos. A região Box1 de GRF9 se mostrou essencial para a interação com THI1 e MST1 *in vivo* e este resultado mostra que a região deletada é importante na conformação estrutural de GRF9 e que aminoácidos presentes nessa região podem estar em interação com THI1 e MST1.

Certamente essa deleção em GRF9 gerou uma alteração drástica para a proteína, que perdeu 2 hélices, no entanto a deleção desta sequência completa foi a mesma abordagem utilizada em estudos *in vitro* (ICHIMURA et al., 1997). Molzan et al. (2011) verificou a interação de 14-3-3ε (de humanos) e a proteína *myeloid leukaemia factor* 1 (MLF1), por um motivo de ligação fosforilado, também ocorrendo nesta região. Yaffe et al. (1997), após análise estrutural, identificou aminoácidos da sequência de 14-3-3 importantes para a interação com proteínas alvo, sendo que lisinas foram identificadas como essenciais para a manutenção de sua conformação estrutural e agindo nas interações proteína-proteína.

O papel da região Box 1 da GRF9 foi analisado nos resultados do docking. Nos ensaios *in vivo* observou-se que a remoção dessa região causa perda na capacidade de ligação entre GRF9 e as proteínas MST e THI1. Os experimentos de predição mostram que resíduos presentes nesta região estão envolvidos em ambas as interações, GRF9-MST e GRF9-THI1.

A interação de GRF9 com serinas em THI1 e MST1 está em acordo com dados sobre a importância de fosfoserinas na interação com 14-3-3 (MUSLIN et al., 1996). Esses resultados levantam uma hipótese de como a deleção da região Box 1 de GRF9 pode ter afetado a interação com THI1 e MST1, pela predição da interação entre resíduos desta região e das proteínas alvo.

Os sítios de ligação a proteínas 14-3-3 mais comuns não foram encontrados em THI1 e MST1, mas apesar de um grande número de proteínas alvo de 14-3-3 reproduzir esses sítios com exatidão, uma mesma porcentagem de proteínas não os possui (YAFFE et al., 1997). Nos motivos de interação a 14-3-3, os resíduos ao redor das fosfoserinas podem variar; no entanto,

quanto mais próximos estiverem das características presentes nos motivos conhecidos, mais forte a interação entre as proteínas, como a presença de Arg na posição -3 ou -4 das fosfoserinas; e isto pode ser determinante na função que 14-3-3 terá sobre a proteína alvo, como sequestradora, ou adaptadora (YAFFE et al., 1997). Como não foram verificadas as características esperadas em ligações com 14-3-3 em THI1 e MST1, talvez a interação entre elas poderia ser de menor força e estabilidade, pois seria uma interação transiente até o destino final das proteínas.

A interação de 14-3-3 a resíduos fosforilados em proteínas alvo é bem comum (RITTINGER et al., 1999; FURUKAWA et al., 1993; MUSLIN et al., 1996). Estes resíduos, além dos resíduos de THI1 e MST1 preditos na interação com GRF9 poderiam ser preferidos em próximas deleções e substituições para a identificação dos sítios essenciais à interação entre as proteínas do estudo.

Nos experimentos de localização sub-celular de GRF9, a fluorescência pôde ser observada no citosol e núcleo, como já foi reportado (KOROLEVA et al., 2005) e aparentemente também no citoesqueleto. A localização de GRF9 no citoesqueleto não havia sido verificada antes em estudos da fusão da proteína com GFP. Os tratamentos de folhas infiltradas para plasmólise mostram a presença de GRF9 no citosol, e a interação *in planta* com THI1 e MST1 ocorrendo no citosol. A localização de GRF9 no citosol tornaria possível sua interação com pré-proteínas que após a tradução se beneficiariam da estabilidade fornecida pela interação com proteínas chaperonas durante a movimentação até seus destinos finais. Existem estudos que mostram chaperonas purificadas em complexos proteicos, agindo com outras proteínas citosólicas ou co-chaperonas, que estabilizam a interação com proteínas recém sintetizadas (FELLERER et al., 2011). Dados sobre formação de complexos de 14-3-3 com chaperonas Hsp70 (MAY; SOLL, 2000) sugerem que sua participação na localização final de pré-proteínas seria como co-chaperona, auxiliando as interações proteína-proteína.

Os variados modos de ação que proteínas 14-3-3 possuem sobre suas proteínas alvo as tornam candidatas potenciais para a formação de complexos proteicos com outras proteínas. A formação de complexos ocorreria pela associação de duas proteínas com GRF9, interagindo com as duas partes do dímero no qual as 14-3-3 costumam se organizar. A possibilidade de formação de heterodímeros aumenta as possibilidades de interação com proteínas alvo (JONES et al., 1995). A ação das proteínas 14-3-3 também pode ser mascarar ou expor sinais de direcionamento, que levam a alteração da localização sub-celular de proteínas alvo, como diversos estudos de *shuttling* demonstram (CAHILL et al., 2001; GROZINGER;

SCHREIBER, 2000; BASU et al., 2003; JIANG et al., 2003; KUMAGAI; DUNPHY, 1999; SEIMIYA et al., 2000; YANG et al., 1999).

Recentemente, foi verificado o aumento de transcritos de 14-3-3 em plantas sob estresse térmico (altas temperaturas), especialmente da isoforma GRF9 (DOBRÁ et al., 2015), que indica seu potencial como proteína reguladora envolvida em resposta ao estresse. Estes dados podem indicar que GRF9 possui função similar a outras chaperonas na manutenção da conformação de proteínas alvo e evitar a denaturação (FRYDMAN, 2001). Já foi observado que a interação com proteínas 14-3-3 pode alterar a conformação estrutural de uma proteína alvo (GÖKIRMAK; PAUL; FERL, 2010), que é um dos modos de ação das chaperonas.

As 14-3-3 estão envolvidas em diversas funções e seu potencial no direcionamento de proteínas organelares em plantas poderá ser confirmado com a continuidade dos experimentos de caracterização da GRF9 e com testes de plantas nocaute cruzadas com plantas expressando proteínas organelares fusionadas a GFP, que poderá confirmar esta função, caso seja observada alteração na eficiência do direcionamento organelar.

A obtenção de populações mutantes é uma ferramenta que permite desvendar funções desconhecidas de genes relacionados a um fenótipo de interesse, pelo mapeamento das linhagens mutantes e posterior sequenciamento. Avanços de NGS (Next Generation Sequencing) para o sequênciamento de genomas facilitaram o processo de identificação de mutações, tornando-o mais rápido e acessível. Populações mutantes geradas através do uso de EMS permitiram a descoberta de genes responsáveis por diversos processos celulares, como o Constitutive Triple Response 1 (CTR1 - AT5G03730), envolvido no desenvolvimento de raiz mediado por boro (TABATA et al., 2013), identificado após seleção de população mutante. E também de componentes envolvidos na resposta a ABA. Através do estudo de fenótipos provenientes de uma população mutante se descobriu também uma ligação entre componentes envolvidos na resposta a ABA e estresses abióticos na germinação de sementes. O mutante abh1 possui tolerância à seca e hipersensibilidade a ABA durante a germinação. Após geração de um mutante com fenótipo insensível a ABA (soa1- suppressor of abh1 hypersensitivity to ABA 1), foi identificado que a mutação causadora de soa1 ocorre no gene de ABI4 (ABA insensitive 4) (DASZKOWSKA-GOLEC et al, 2013).

Em vista do fato que existem muitas questões não respondidas em relação ao mecanismo de importação de proteínas ao cloroplasto, é provável que proteínas adicionais, ou fatores regulatórios, ainda possam ser descobertos. Para a busca de novos mecanismos envolvidos no direcionamento organelar foi escolhido um mutante para a proteína TH-1 (A1G22940) na geração do genótipo inicial para os experimentos. Esta proteína também está

envolvida na biossíntese da tiamina (GOYER, 2010) e sua escolha foi realizada por esta se localizar apenas aos cloroplastos, diferentemente de THI1, que é duplo-direcionada. Desta forma, será possível isolar fatores celulares agindo o direcionamento, visto que proteínas duplo-direcionadas poderiam ter sua localização influenciada por determinados contextos ambientais (SILVA-FILHO, 2003).

Como base para o genótipo gerado foi utilizado um duplo mutante condicional letal (CS3469), que permite a sobrevivência da planta nula em th1 por irrigação com solução de tiamina no solo. Assim, haverá um fenótipo facilmente reconhecível (folhas branco/amareladas) para plantas que tiveram a biossíntese de tiamina afetada, e desta forma, a seleção de plantas para análise no microscópio de fluorescência será mais direta. Apenas as plantas que apresentem o fenótipo de seleção inicial serão analisadas para o fenótipo de interesse, que é a alteração da localização de TH-1 fusionada a GFP. Além disso, o mutante CS3469 permite que as plantas que apresentarem o fenótipo letal possam ser irrigadas com solução contendo tiamina para que retornem a sua forma saudável.

A geração do genótipo CS3469/TH-1-GFP para obtenção de população mutante abre a oportunidade de estudos futuros no laboratório. A seleção das linhagens resultantes pode levar à descoberta de mutantes que tiveram o transporte de TH1 ao cloroplasto impedido, por fatores ainda desconhecidos, que poderão ser então mapeados e identificados.

6 CONCLUSÕES

- GRF9 interage com as proteínas duplo-direcionadas MST1 e THI1, e com TH-1, direcionada aos cloroplastos.

- A região Box 1 de GRF9 é essencial para a interação com THI1 e MST1.

REFERÊNCIAS

AITKEN, A.; COLLINGE, D. B.; VAN HEUSDEN, B. P.; ISOBE, T.; ROSEBOOM, P. H.; ROSENFELD, G.; SOLL, J. 14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, Cambridge, v. 17, p. 498–501, 1992.

AJJAWI I.; RODRIGUEZ MILLA, M.A.; CUSHMAN J.; SHINTANI, D.K. Thiamin pyrophosphokinase is required for thiamin cofactor activation in Arabidopsis. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 65, p. 151-162, 2007.

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

ALMEIDA, J.D. **Origem, evolução e direcionamento da proteína THI1 em plantas**. 2004. 107p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST:
a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANDERSEN, J.S.; MANN, M. Organellar proteomics: turning inventories into insights. **EMBO Reorts**, Oxford, v. 9, p. 874-879, 2006.

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

BAUER, M.F.; ROTHBAUER, U.; MÜHLENBEIN, N.; SMITH, R.J.; GERBITZ, K.; NEUPERT, W.; RUNNER, M.; HOFMANN, S. The mitochondrial TIM22 preprotein translocase is highly conserved throughout the eukaryotic kingdom. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 464, p. 41-47, 1999.

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

BERMAN, H.M.; BATTISTUZ, T.; BHAT, T.N.; BLUHM, W.F.; BOURNE, P. E.; BURKHARDT, K.; FENG, Z.; GILLILAND, G.L.; IYPE, L.; JAIN, S.; FAGAN, P.; MARVIN, J.; PADILLA, D.; RAVICHANDRAN, V.; SCHNEIDER, B.; THANKI, N.; WEISSIG, H.; WESTBROOK, J.D.; ZARDECKI, C. The Protein Data Bank. **Acta Crystallographica,** Copenhagen, v. 58, p. 899-907, 2002.

BHATTACHARYA, D.; ARCHIBALD, J.M. Response to Theissen and Martin, "The difference between organelles and endosymbionts". **Current Biology**, Cambridge, v. 16, p. R1017–R1018, 2006.

BHATTACHARYA, D.; YOON, H.S.; HACKETT, J.D. Photosynthetic eukaryotes unite: Endosymbiosis connects the dots. **BioEssays**, Cambridge, v. 26, p. 50–60, 2004.

BLANCHARD, J L.; LYNCH, M. Organellar genes: why do they end up in the nucleus? **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 16, p. 315–320, 2000.

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

BREIMAN, A. Plant Hsp90 and its Co-Chaperones. **Current Protein & Peptide Science**, Hilversum, v. 15, p. 232-244, 2014.

BRINK, S.; FLÜGGE, U.I.; CHAUMONT, F.; BOUTRY, M.; EMMERMANN, M.; SCHMITZ, U.; BECKER, K.; PFANNER, N. Preproteins of chloroplast envelope inner membrane contain targeting information for receptor-dependent import into fungal mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, p. 16478-16485, 1994.

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

CARRASCO, J.L.; CASTELLO, M.J.; VERA, P. 14-3-3 Mediates transcriptional regulation by modulating nucleocytoplasmic shuttling of tobacco DNA-binding protein phosphatase-1. **Journal of Biological Chemistry**, Bathesda, v. 281, p. 22875-22881, 2006.

CARRIE, C.; SMALL, I. A reevaluation of dual-targeting of proteins to mitochondria and chloroplasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1833, p. 253-259, 2013.

CARRIE, C.; GIRAUD, E.; WHELAN, J. Protein transport in organelles: dual targeting of proteins to mitochondria and chloroplasts. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 276, 1187–1195, 2009.

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

CHAN, C.X.; YANG, E.C.; BANERJEE, T.; YOON, H.S.; MARTONE, P.T.; ESTEVEZ, J.M.; BHATTACHARYA, D. Red and green algal monophyly and extensive gene sharing found in a rich repertoire of red algal genes. **Current Biology**, Cambridge, v. 21, p. 328–333, 2011.

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.

DANPURE, C.J. Variable peroxisomal and mitochondrial targeting of alanine: glyoxylate aminotransferase in mammalian evolution and disease. **BioEssays**, Cambridge, v. 19, p. 317-326, 1997.

DANTAS, L. B.B. **Caracterização do papel da glutamyl-tRNA sintetase na localização subcelular de proteínas.** 2010. 112p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

DASZKOWSKA-GOLEC, A.; WOJNAR, W.; ROSIKIEWICZ, M.; SZAREJKO, I.; MALUSZYNSKI, M.; SZWEYKOWSKA-KULINSKA, Z.; JARMOLOWSKI, A. Arabidopsis suppressor mutant of abh1 shows a new face of the already known players: ABH1 (CBP80) and ABI4- in response to ABA and abiotic stresses during seed germination. **Plant molecular biology**, Dordrecht, v. 81, p. 189-209, 2013.

DE VRIES, S.J.; BONVIN, A.M. CPORT: a consensus interface predictor and its performance in prediction-driven docking with HADDOCK. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, p. 17695, 2011.

DE VRIES, S.J.; VAN DIJK, M.; BONVIN, A. M. The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. **Nature Protocols**, London, v. 5, p. 883-897, 2010.

DOBRÁ, J.; ČERNÝ, M.; ŠTORCHOVÁ, H.; DOBREV, P.; SKALÁK, J.; JEDELSKÝ, P. L.; LUKŠANOVÁ, H.; GAUDINOVÁ, A.; PEŠEK, B.; MALBECK, J.; VANEK, T.; BRZOBOHATÝ, B.; VANKOVÁ, R. The impact of heat stress targeting on the hormonal and transcriptomic response in Arabidopsis. **Plant Science** : an International Journal of Experimental Plant Biology, Shannon, v. 231, p.52-61, 2015.

DOMINGUEZ, C.; BOELENS, R.; BONVIN, A. M. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information**. Journal of the American Chemical Society**, Washington D.C., v. 125, p. 1731-1737, 2003.

DONG, W.; STOCKWELL, V. O.; GOYER, A. Enhancement of thiamin content in *Arabidopsis thaliana* by metabolic engineering. **Plant & Cell Physiology**, Tokyo, v. 56, p. 2285-2296, 2015.

DUBOIS, T., HOWELL,S., AMESS,B., KERAI,P., LEARMONTH,M., MADRAZO, J., CHAUDHRI,M., RITTINGER,K., SCARABEL, M., SONEJI,Y., AITKEN, A. Structure and sites of phosphorylation of 14-3-3 proteins. Role in coordinating signal transduction pathways. **Journal of Protein Chemistry**, New York, v. 16, p. 513–522, 1997.

DUCHENE, A.M.; GIRITCH, A.; HOFFMANN, B.; COGNAT, V.; LANCELIN, D.; PEETERS, N.M.; ZAEPFEL, M.; MARÉCHAL-DROUARD, L.; SMALL, I.D. Dualtargeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A,** Washington D.C., v. 102, p. 16484–16489, 2005.

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

ECHTENKAMP, F. J.; FREEMAN, B. C. Expanding the cellular molecular chaperone network through the ubiquitous cochaperones. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 3, p. 668-673, 2012.

EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**, London, v. 19, p. 1349, 1991.

FALKOWSKI, P.G.; KATZ, M.E.; KNOLL, A.H.; QUIGG, A.; RAVEN, J.A.; SCHOFIELD, O.; TAYLOR, F. J. The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. **Science**, Washington D. C., v. 305, p. 354–360, 2004.

FELLERER, C.; SCHWEIGER, R.; SCHONGRUBER, K.; SOLL, J.; SCHWENKERT, S. Cytosolic HSP90 cochaperones HOP and FKBP interact with freshly synthesized chloroplast preproteins of Arabidopsis. **Molecular Plant**, Oxford, v. 4, p. 1133–1145, 2011.

FERL, R. J.; MANAK, M. S.; REYES, M. F. The14-3-3s. **Genome Biology**, London, v. 3, p. 3010, 2002.

FLORES-PÉREZ, Ú.; JARVIS, P. Molecular chaperone involvement in chloroplast protein import. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1833, p. 332-340, 2013.

FORNER, F.; FOSTER, L.J.; CAMPANARO, S.; VALLE, G.; MANN, M. Quantitative proteomic comparison of rat mitochondria from muscle, heart, and liver. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 5, p. 608-619, 2006.

FRISO, G.; GIACOMELLI, L.; YTTERBERG, J.; PELTIER, J.B.; RUDELLA, A.; SUN, Q.; VAN WIJKA, K.J. In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of A*rabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 478-499, 2004.

FRYDMAN, J. Folding of newly translated proteins *in vivo*: the role of molecular chaperones. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 70, p. 603-647, 2001.

FUNES, S.; DAVIDSON, E.; REYES-PRIETO, A.; MAGALLÓN, S.; HERION, P.; KING, M. P.; GONZÁLEZ-HALPHEN, D. A green algal apicoplast ancestor. **Science**, Washington D. C.,v. 298, p. 2155, 2002.

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

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

GODOI, P.H.; GALHARDO, R.S.; LUCHE, D.D.; VAN SLUYS, M.A.; MENCK, C.F.; OLIVA, G. Structure of the thiazole biosynthetic enzyme THI1 from *Arabidopsis thaliana*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 281, p. 30957-30966, 2006.

GÖKIRMAK, T.; PAUL, A.L.; FERL, R.J. Plant phosphopeptide-binding proteins as signaling mediators. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.13, p. 527-532, 2010.

GOYER, A. Thiamine in plants: aspects of its metabolism and functions. **Phytochemistry**, London, v. 71, p. 1615-1624, 2010.

GRAY, M.W.; BURGER, G.; LANG, B.F. Mitochondrial evolution. **Science**, Washington, D. C., v. 283, p. 1476-1481, 1999.

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

HASEGAWA, M.; PENNY D. Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A,** Washington D.C., v. 99, p. 12246–12251, 2002.

HE, Y.; WU, J.; LV, B.; LI, J.; GAO, Z.; XU, W.; BALUŠKA, F.; SHI, W.; SHAW, P. C.; ZHANG, J. Involvement of 14-3-3 protein GRF9 in root growth and response under polyethylene glycol-induced water stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, p. 2271-2281, 2015.

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

HOOPER, C.M.; TANZ, S.K.; CASTLEDEN, I.R.; VACHER, M.A.; SMALL, I.D.; MILLAR, A.H. SUBAcon: a consensus algorithm for unifying the subcellular localization data of the Arabidopsis proteome. **Bioinformatics,** Oxford, v. 30, p. 3356-3364, 2014.

HURT, E.C.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M.; PESOLD-HURT, B.; ROCHAIX, J.D.; SCHATZ, G. A mitochondrial presequence can transport a chloroplast-encoded protein into yeast mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 261, p. 11440-11443, 1986.

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

JACQUES, E.; VERBELEN, J.P.; VISSENBERG, K. Mechanical stress in Arabidopsis leaves orients microtubules in a 'continuous' supracellular pattern. **BMC Plant Biology,** London, v. 13, p. 163, 2013.

JAHN, T.; FUGLSANG, A.T.; OLSSON, A.; BRÜNTRUP, I.M.; COLLINGE, D.B.; VOLKMANN, D.; SOMMARIN, M.; PALMGREN, M.G.; LARSSON, C. The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H(+)-ATPase. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1805-1814, 1997.

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

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

JULLIARD, J.H.; DOUCE, R. Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington D. C., v. 88, p. 2042-2045, 1991.

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

KEELING, P.J.; PALMER, J.D. Lateral transfer at the gene and subgenic levels in the evolution of eukaryotic enolase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington D. C., v. 98, p. 10745–10750, 2001.

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

KONCZ, C.; SCHELL, J. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 204, p. 383-396, 1986.

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

KOURANOV, A.; CHEN, X.; FUKS, B.; SCHNELL, D. J. Tic20 and Tic22 are new components of the protein import apparatus at the chloroplast inner envelope membrane. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 143, p. 991-1002, 1998.

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

KUNZE, M.; BERGER, J. The similarity between N-terminal targeting signals for protein import into different organelles and its evolutionary relevance. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 6, p. 259, 2015.

KRAUSE, K.; OETKE, S.; KRUPINSKA, K.
Dual targeting and retrograde translocation: regulators of plant nuclear gene expression can be sequestered byplastids. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, p. 11085-11101, 2012.

LANG, B.F.; GRAY, M.W.; BURGER, G. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 33, p. 351-397, 1999.

LATIJNHOUWERS, M.; XU, X.M.; MØLLER, S.G. Arabidopsis stromal 70-kDa heat shock proteins are essential for chloroplast development. **Planta**, Berlin, v. 232, p. 567-578, 2010.

LAUTERBORN, R. Protozoenstudien II. Paulinella chromatophora nov. gen., nov. spec., ein beschalter Rhizopode des Sußwassers mit blaugrunen chromatophorenartigen Einschlussen. **Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie**, Leipzig, v. 59, p.537–544, 1985.

LEE, D.W.; JUNG, C.; HWANG, I. Cytosolic events involved in chloroplast protein targeting. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1833, p. 245-252, 2013.

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

LI, J.F., PARK, E.; VON ARNIM, A.G.; NEBENFÜHR, A. The FAST technique: a simplified Agrobacterium-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of Arabidopsis and other plant species. **Plant Methods**, London, v. 5, p. 6, 2009.

LIU, D.; BIENKOWSKA, J.; PETOSA, C.; COLLIER, R.J.; FU, H.; LIDDINGTON, R. Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. **Nature**, London, v. 376, p.191-194, 1995.

LUNG, S.C.; CHUONG, S.D. A transit peptide-like sorting signal at the C-terminus directs the *Bienertia sinuspersici* preprotein receptor Toc159 to the chloroplast outer membrane. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, p. 1560-1578, 2012.

MACHADO, C.R.; DE OLIVEIRA, R.C.; BOITEUX, S.; PRAEKELT, U.M.; MEACOCK, P.A.; MENCK, C.F. Thi1, a thiamine biosynthetic gene in *Arabidopsis thaliana*, complements bacterial defects in DNA repair. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 31, p. 585–593, 1996.

MACHADO, C.R.; PRAEKELT, U.M.; DE OLIVEIRA, R.C.; BARBOSA, A.C.; BYME, K.L.; MEACOCK, P.A.; MENCK, C.F. Dual role for the yeast THI4 gene in thiamine biosynthesis and DNA damage tolerance.
Journal of Molecular Biology, Amsterdam, v. 273, p. 114-121, 1997.

MARIN, B.; NOWACK, E.C.; MELKONIAN, M. A plastid in the making: Evidence for a second primary endosymbiosis. **Protist**, Jena, v. 156, p. 425-432, 2005.

MARIN, B.; NOWACK, E.C.M.; GLÖCKNER, G.; MELKONIAN, M. The ancestor of the *Paulinella chromatophora* obtained a carboxysomal operon by horizontal gene transfer from a Nitrococcus-like gamma-proteobacterium. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, p. 85, 2007.

MARTIN, W.; HERRMANN, R.G. Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? **Plant Physiology**, Lancaster, v. 118, p. 9-17, 1998.

MARTIN, J.; MAHLKE, K.; PFANNER, N. Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, p. 18051-1807, 1991.

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

MARTIN, W.; RUJAN, T.; RICHLY, E.; HANSEN, A.; CORNELSEN, S.; LINS, T.; LEISTER, D.; STOEBE, B.; HASEGAWA, M.; PENNY, D. Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington D. C., v. 99, p. 12246-12251, 2002.

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

MAYER, M.P. Gymnastics of molecular chaperones. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 39, p. 321–331, 2010.

MAYFIELD, J.D.; PAUL, A.L.; FERL, R.J. The 14-3-3 proteins of Arabidopsis regulate root growth and chloroplast development as components of the photosensory system. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, p. 3061-3070, 2012.

MAYFIELD, J.D.; FOLTA, K.M.; PAUL, A.L.; FERL, R.J. The 14-3-3 Proteins mu and upsilon influence transition to flowering and early phytochrome response. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 145, p. 1692-1702, 2007.

MCFADDEN, G. I. Origin and evolution of plastids and photosynthesis in eukaryotes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Woodbury, v. 6, p. a016105, 2014.

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

MOKRANJAC, D.; SICHTING, M.; POPOV-CELEKETIĆ, D.; MAPA, K.; GEVORKYAN-AIRAPETOV, L.; ZOHARY, K.; HELL, K.; AZEM, A.; NEUPERT, W. Role of Tim50 in the transfer of precursor proteins from the outer to the inner membrane of mitochondria. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 20,p. 1400-1407, 2009.

MOLZAN, M.; WEYAND, M.; ROSE, R.; OTTMANN, C. Structural insights of the MLF1/14-3-3 interaction. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 279, p. 563-571, 2012.

MURCHA, M.W.; KMIEC, B.; KUBISZEWSKI-JAKUBIAK S.; TEIXEIRA, P.F.; GLASER, E.; WHELAN, J. Protein import into plant mitochondria: signals, machinery, processing, and regulation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, p. 6301-6335, 2014.

NADA, A.; SOLL, J. Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 177, p. 3975-3982, 2004.

NAKAMURA, T.; YAMAGUCHI, Y.; SANO, H. Plant mercaptopyruvate sulfurtransferases: molecular cloning, subcellular localization and enzymatic activities. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, Berlin, v. 267, p. 5621-5630, 2000.

NEUPERT, W.; BRUNNER, M. The protein import motor of mitochondria. **Nature reviews**. **Molecular Cell Biology**, London, v. 3, p. 555-565, 2002.

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

NOWACK, E.C.M.; MELKONIAN, M.; GLÖCKNER, G. Chromatophore genome sequence of Paulinella sheds light on acquisition of photosynthesis by eukaryotes. **Current Biology**, Cambridge, v. 18, p. 410-418, 2008.

NOWACK, E.C.; VOGEL, H.; GROTH, M.; GROSSMAN, A.R.; MELKONIAN, M.; GLÖCKNER, G. Endosymbiotic gene transfer and transcriptional regulation of transferred genes in *Paulinella chromatophora*. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 28, p. 407–422, 2011.

OBSIL, T.; GHIRLANDO, R.; KLEIN, D. C.; GANGULY, S.; DYDA, F. Crystal structure of the 14-3-3zeta:serotonin N-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation. **Cell**, Cambridge, v. 105, p.257-267, 2001.

O'MALLEY, M.A. Endosymbiosis and its implications for evolutionary theory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington D. C., v. 112, p. 10270-10277, 2015.

PAILA, Y.D.; RICHARDSON, L.G.; SCHNELL, D.J. New insights into the mechanism of chloroplast protein import and its integration with protein quality control, organelle biogenesis and development. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 427, p. 1038-1060, 2015.

PAN, S.; SEHNKE, P.C.; FERL, R.J.; GURLEY, W.B. Specific interactions with TBP and TFIIB in vitro suggest that 14-3-3 proteins may participate in the regulation of transcription when part of a DNA binding complex. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 1591-1602, 1999.

PAUL, A.L.; SEHNKE, P.C.; FERL, R.J. Isoform-specific subcellular localization among 14-3-3 proteins in Arabidopsis seems to be driven by client interactions. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 16, p. 1735-1743, 2005.

PAUL, A.L.; LIU, L.; McCLUNG, S.; LAUGHNER, B.; CHEN, S.; FERL, R.J. Comparative interactomics: analysis of Arabidopsis 14-3-3 complexes reveales highly conserved 14-3-3 interactions between humans and plants. **Journal of Proteome Research**, Washington D.C., v. 8, p. 1913-1924, 2009.

PETTERSEN, E.F.; GODDARD, T.D.; HUANG, C.C.; COUCH, G.S.; GREENBLATT, D.M.; MENG, E.C.; FERRIN, T.E. UCSF Chimera-
a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry,** New York, v. 25, p. 1605-1612, 2004.

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

PRICE, D.C.; CHAN, C.X.; YOON, H.S.; YANG, E.C.; QIU, H.; WEBER, A.P.; SCHWACKE, R.; GROSS, J.; BLOUIN, N. A.; LANE, C.; REYES-PRIETO, A.; DURNFORD, D.G.; NEILSON, J.A.; LANG, B.F.; BURGER, G.; STEINER, J. M.; LÖFFELHARDT, W.; MEUSER, J. E.; POSEWITZ, M. C.; BALL, S.; ARIAS, M.C.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P. M.; RENSING, S. A.; SYMEONIDI, A.; DODDAPANENI, H.; GREEN, B. R.; RAJAH, V.D.; BOORE, J.; BHATTACHARYA, D. *Cyanophora paradoxa* genome elucidates origin of photosynthesis in algae and plants. **Science**, Washington D.C., v. 335, p. 843-847, 2012.

RAPALA-KOZIK, M.; WOLAK, N.; KUJDA, M.; BANAS, A. K. The upregulation of thiamine (vitamin B1) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* seedlings under salt and osmotic stress conditions is mediated by abscisic acid at the early stages of this stress response. **BMC Plant Biology**, London, v. 12, p. 2, 2012.

RIAL, D.V.; ARAKAKI, A.K.; CECCARELLI, E.A. Interaction of the targeting sequence of chloroplast precursors with Hsp70 molecular chaperones. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, Berlin, v. 267, p. 6239–6248, 2000.

RITTINGER, K.; BUDMAN, J.; XU, J.;VOLINIA, S.; CANTLEY, L.C.; SMERDON, S. J.; GAMBLIN, S.J.; YAFFE, M.B. Structural analysis of 14-3-
3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-
3 in ligand binding. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 4, p. 153-166, 1999.

ROCKWELL, N.C.; DUANMU, D.; MARTIN, S.S.; BACHY, C.; PRICE, D.C.; BHATTACHARYA, D.; WORDEN, A.Z.; LAGARIAS, J.C. Eukaryotic algal phytochromes span the visible spectrum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington D. C., v. 111, p. 3871-3876, 2014.

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

RODRÍGUEZ-EZPELETA, N.; BRINKMANN, H.; BUREY, S.C.; ROURE, B.; BURGER, G.; LÖFFELHARDT, W.; BOHNERT, H. J.; PHILIPPE, H.; LANG, B.F. Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: Green plants, red algae, and glaucophytes. **Current Biology**, Cambridge, v. 15, p. 1325-1330, 2005.

SAGAN, L. On the origin of mitosing cells. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 14, p. 255-274, 1967.

SCARSO, M.E. **Identificação e caracterização do papel da glutamil-tRNA sintetase na localização de proteínas cloroplásticas.** 2011. 70p. Dissertação (Melhoramento em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SCHLEYER, M.; SCHMIDT, B.; NEUPERT, W. Requirement of a membrane potential for the posttranslational transfer of proteins into mitochondria. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, Oxford, v. 125, p. 109-116, 1982.

SEHNKE, P.C.: DELILLE, J.M.; FERL, R.J. Consummating signal transduction. The role of 14-3-3 proteins in the completion of signal-induced transitions in protein activity. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. s339-s354, 2002.

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

SICKMANN, A.; REINDERS, J.; WAGNER, Y.; JOPPICH, C.; ZAHEDI, R.; MEYER, H. E.; SCHÖNFISCH, B.; PERSCHIL, I.; CHACINSKA, A.; GUIARD, B.; REHLING, P.; PFANNER, N.; MEISINGER, C. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A,** Washington D.C., v. 100, p. 13207-13212, 2003.

SILVA-FILHO, M.C. One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, p. 589-595, 2003.

SINGLETON, C.K.; MARTIN, P.R. Molecular mechanisms of thiamine utilization. **Current Molecular Medicine**, Hilversum, v. 1, p. 197-207, 2001.

SOROKINA, E.M.; FEINSTEIN, S.I.; ZHOU, S.; FISHER, A.B. Intracellular targeting of peroxiredoxin 6 to lysosomal organelles requires MAPK activity and binding to 14-3-3 epsilon. **Amercial Journal of Physiology, Cell Physiology**, Bethesda, v. 300, p. C1430-C1441, 2011.

SPARKES, I.A.; RUNIONS, J.; KEARNS, A.; HAWES, C. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. **Nature Protocols**, London, v. 1, p. 2019-2025, 2006.

SPOLADORE, L. **Identificação de interatores putativos envolvidos na localização de proteínas de duplo direcionamento em *Arabidopsis thaliana***. 2011. 79 p. . Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

STIBITZ, T.; KEELING, P.; BHATTACHARYA, D. Symbiotic origin of a novel actin gene in the cryptophyte *Pyrenomonas helgolandii*. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 17, p. 1731–1738, 2000.

TABATA, R.; KAMIYA, T.; SHIGENOBU, S.; YAMAGUCHI, K.; YAMADA, M.; HASEBE, M.; FUJIWARA, T.; SAWA, S. Identification of an EMS-induced causal mutation in a gene required for boron-mediated root development by low-coverage genome re-sequencing in Arabidopsis. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 8, p. 22534, 2013.

TAZUYA, K.; YAMADA, K.; NAKAMURA, K.; KUMAOKA, H. The origin of the sulfur atom of thiamin. **Biochimica et Biophysica Acta,** Amsterdam, v. 924, p. 210-215, 1987.

TINA, K.G.; BHADRA, R.; SRINIVASAN, N. PIC: Protein Interactions Calculator. **Nucleic Acids Research,** London, v. 35, p. W473-476, 2007.

TRUSCOTT, K.N.; KOVERMANN, P.; GEISSLER, A.; MERLIN, A.; MEIJER, M.; DRIESSEN, A.J.; RASSOW, J.; PFANNER, N.; WAGNER, R. A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. **Nature Structural Biology**, New York, v. 8, p.1074-1082, 2001.

VAN DER LAAN M1, HUTU DP, REHLING P. On the mechanism of preprotein import by the mitochondrial presequence translocase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1803, p. 732-739, 2010.

VAN HEUSDEN, G.P.; VAN DER ZANDEN, A.L.; FERL, R.J.; STEENSMA, H.Y. Four *Arabidopsis thaliana* 14-3-3 protein isoforms can complement the lethal yeast bmh1 bmh2 double disruption. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 391, p. 252-256, 1996.

VOINNET, O.; RIVAS, S.; MESTRE, P.; BAULCOMBE, D. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. **The Plant Journal**, Oxford, v. 33, p. 949-956, 2003.

VON HEIJNE, G.; NISHIKAWA, K. Chloroplast transit peptides. The perfect random coil? **FEBS Letters**, Amsterdam, 1991, v. 278, p. 01-03, 1991.

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

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

WEINER, H.; KAISER, W. M. 14-3-
3 proteins control proteolysis of nitrate reductase in spinach leaves. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 455, p.75-78, 1999.

WHITE, R.L.; SPENSER, I.D. Thiamin biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Origin of carbon-2 of the thiazole moiety. **The Biochemical Journal**, London, v. 179, p. 315-125, 1979.

XI, J.; GE, Y.; KINSLAND, C.; MCLAFFERTY, F.W.; BEGLEY, T.P. Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin in *Escherichia coli*: identification of an acyldisulfide-linked protein--protein conjugate that is functionally analogous to the ubiquitin/E1 complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A,** Washington D.C., v. 98, p. 8513-8518, 2001.

XIAO, B.; SMERDON, S.J.; JONES, D.H.; DODSON, G.G.; SONEJI, Y.; AITKEN, A.; GAMBLIN, S.J. Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. **Nature,** London, v. 376, 188-191. 1995.

YAMAMOTO, H.; ESAKI, M.; KANAMORI, T.; TAMURA, Y.; NISHIKAWA, S.; ENDO, T. Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. **Cell**, Cambridge, v. 111, p. 519-528, 2002.

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

YOON, H.S.; REYES-PRIETO, A.; MELKONIAN, M.; BHATTACHARYA, D. Minimal plastid genome evolution in the Paulinella endosymbiont. **Current Biology**, Cambridge, v. 16, p. R670–R672, 2006.

YOON, H.S.; HACKETT, J.D.; CINIGLIA, C.; PINTO, G.; BHATTACHARYA, D.A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 21, p. 809-818, 2004.

YOON, H.S.; NAKAYAMA, T.; REYES-PRIETO, A.; ANDERSEN, R.A.; BOO, S.M.; ISHIDA, K.; BHATTACHARYA, D. A single origin of the photosynthetic organelle in different Paulinella lineages. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 9, p. 98, 2009.

YOUNG, J.C.; HOOGENRAAD, N.J.; HARTL, F.U. Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. **Cell**, Cambridge, v. 112, p. 41–50, 2003.

ZHANG, X.P.; GLASER, E. Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. **Trends Plant Science**, Kidlington, v. 7, p. 14-21, 2002.

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

APÊNDICES

Apêndice A - Iniciadores específicos para os genes GRF9 (AT2G42590), THI1(AT5G54770), MST1 (AT1G79230), utilizados para inserção no vetor de entrada p-ENTR-D-TOPO (Invitrogen)

Genes	Iniciador (5'-3')
AT2G42590 pENTR Fwd	CACCATGGGTTCTGGAAAAGAG
AT2G42590 pENTR Rev	ATTTGATTTACCCCGAGTAA
AT5G54770 pENTR Fwd	CACCATGGCTGCCATAGCTTCTACT
AT5G54770 pENTR Rev	AGCATCTACGGTTTCAGCTGAATCT
AT1G79230 pENTR Fwd	CACCATGGCCTCGACCCTTTTCT
AT1G79230 pENTR Rev	TGAAGAAGATTCAACACTCTCTATGGG

Apêndice B - Iniciadores específicos para clonagem dos genes GRF9 (AT2G42590.3), THI1(AT5G54770), MST1 (AT1G79230) em vetores para ensaios de duplo-híbrido em levedura

Gene	Iniciador (5'-3')
AT2G42590 Fwd	TTAGAATTCATGGGTTCTGGAAAAGAGCGT
AT2G42590 Rev	TTAGGATCCTTAATTTGATTTACCCCGAGT
AT1G79230 Fwd	TTAGAATTCATGGCCTCGACCCTTTT
AT1G79230 Rev	TTACTCGAGTCATGAAGAAGATTCAACACT
AT5G54770 Fwd	TTAGAATTCATGGCTGCCATAGCTT
AT5G54770 Rev	TTACTCGAGTTAAGCATCTACGGTTTCA

Apêndice C - Iniciadores específicos para os genes GRF9 (AT2G42590), THI1(AT5G54770), MST1 (AT1G79230), para construções em vetores de BiFC

Gene	Iniciador (5'-3')
AT2G42590 BiFC Fwd	GCTCTAGAATGGGTTCTGGAAAAGAGCGT
AT2G42590 BiFC Rev	CGGGATCCATTTGATTTACCCCGAGTAAA
AT5G54770 BiFC Fwd	TTTCTAGAATGGCTGCCATAGCTTCTACTC
AT5G54770 BiFC Rev	TTGGATCCAGCATCTACGGTTTCAGC
AT1G79230 BiFC Fwd	TTATCTAGAATGGCCTCGACCCTTTTCTCC
AT1G79230 BiFC Rev	TTGGATCCTGAAGAAGATTCAACACTCTCTATGG

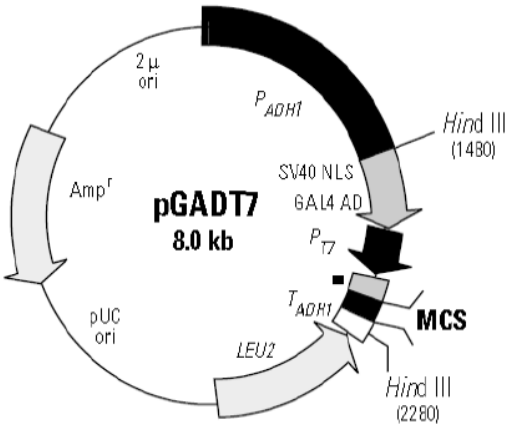
Apêndice D - Iniciadores gerados para a construção de GRF9-Del1

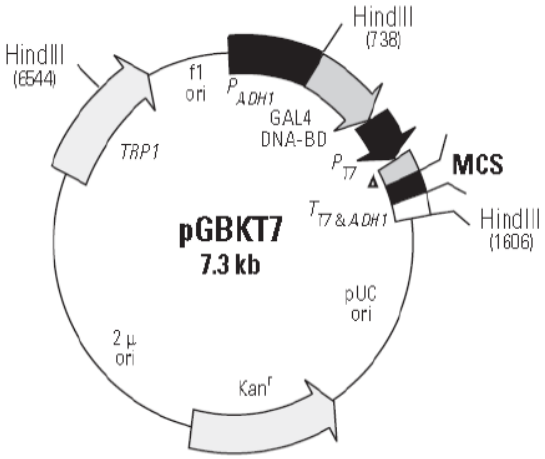
Nome iniciador	Sequência (5'-3')
GRF9-DEL-1-Fwd	TTAGAATTCATGGGTTCTGGAAAAGAGCGT
GRF9-DEL-4-Rev	TTAGGATCCTTAATTTGATTTACCCCGAGT
GRF9-DEL-2-Rev	TAAGCTCCCTCCAACACACCCT
GRF9-DEL-23-Rev	TTAAGGTGCTATCTTTGTAGGAAGGGTGTGTTGGAGGGAGCT
GRF9-DEL-3-Fwd	TCCTACAAAGATAGCACCTTAA
GRF9-DEL-32-Fwd	AGCTCCCTCCAACACACCCTTCCTACAAAGATAGCACCTTAA

Apêndice E - Iniciadores para detecção específica de GRF9

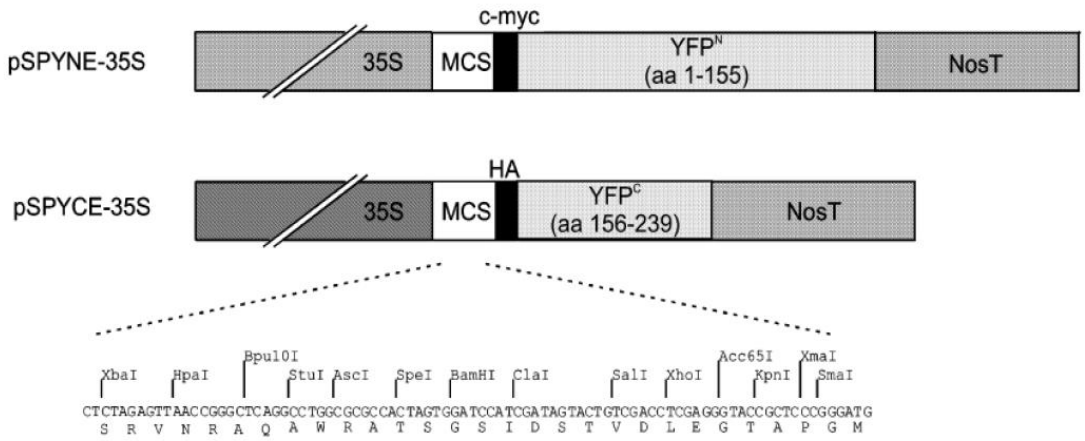
Nome iniciador	Sequência (5'-3')
GRF9 detect-1-FDW	T G A T T G G T T C A A G G A G A G C T T
GRF9 detect-1- REV	A G T A G A T T C A C C C T C G G A A G

Apêndice F - Mapa dos vetors utilizados no sistema duplo-híbrido em levedura, pGADT7 e pGBKT7 (MATCHMAKER Two-Hybrid System, Clontech Laboratories, Inc.)



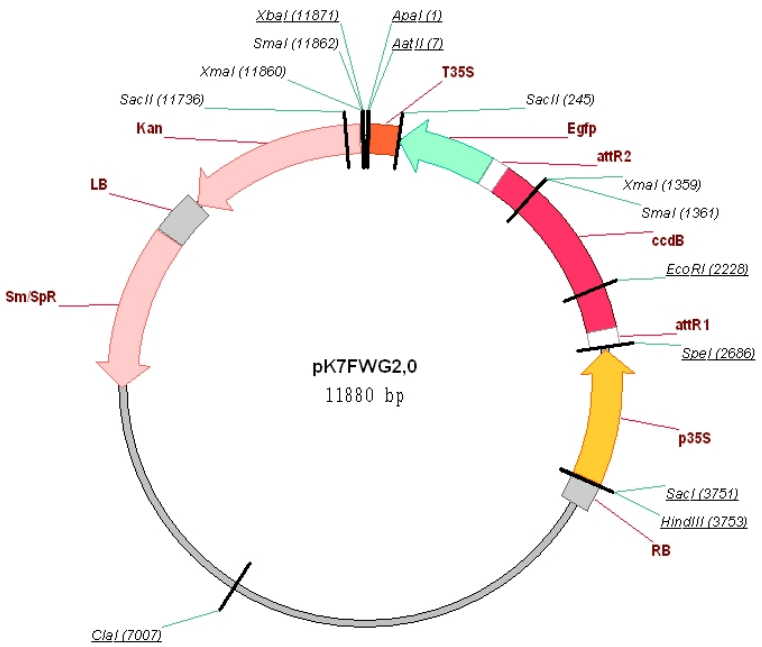


Apêndice G - Vetores para ensaios de BiFC. O plasmídio pSPYNE-35S, codifica a região N-terminal da proteína YFP, e o plasmídio pSPYCE, a região C-terminal. No caso de interação entre as proteínas inseridas nos vetores, a proteína YFP é restaurada e observada por fluorescência

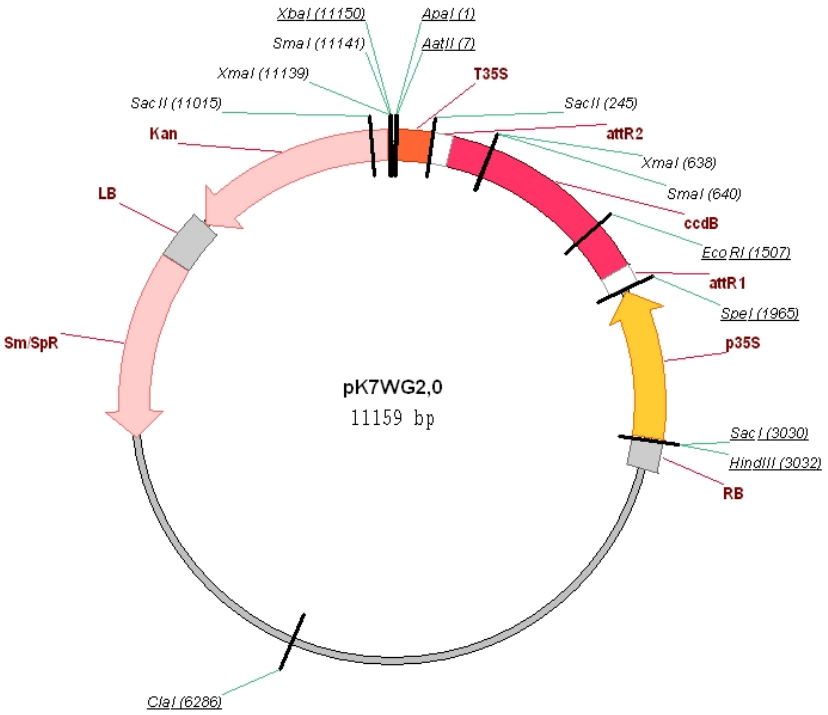


Apêndice H - Vetores pK7FWG2,0 (A) para expressão de GFP e pK7WG2 (B) para superexpressão, utilizados para clonagens com sequências do estudo

A



B



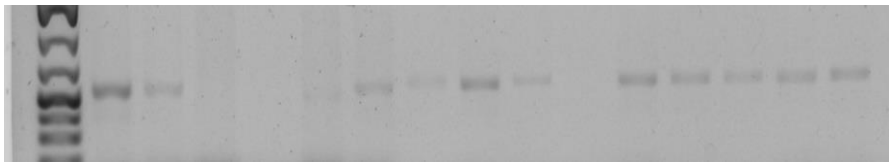
ANEXOS

Anexo A – Lista de resíduos envolvidos nas interações GRF9-MST e GRF9-THI1

GRF9-MST		GRF9-THI1	
GRF9	MST*	GRF9	THI1*
		Leu204	Asp104 (PH)
		Asp205	Asp104 (I)
		Leu207	Tyr106 (H)
		Glu209	Arg86 (PH e I); Asn213 (PH)
Tyr212	Ile152 (H); Tyr153 (H; PH)	Tyr212	Ile84 (H); Tyr106 (H); Met212 (H); Met246 (PH); Pro248 (H); Thr249 (PH)
		Lys213	Leu75 (PH); Phe80 (PH); Ala82 (PH)
Leu217	Ile139 (H); Leu140 (H); Tyr153 (H)	Leu217	Phe80 (H); Ala82 (H)
Gln220	Ser143 (PH); Ala144 (PH)		
Leu221	Ile139 (H); Leu140 (H); Tyr153 (H)		
Arg223	Glu147 (I); Val 158 (PH)		
Lys297	Asp129 (I)	Lys297	Asp184 (PH e I)
		Lys301	Asp184 (I)
		Tyr410	Leu156 (H); Val157(H)
		Asn414	Asn160 (PH)
		Pro416	Met167 (H)
Lys424	Ser228 (PH)	Lys424	Glu13 (PH e I); Ser17 (PH)
		Asp428	Glu13 (I)
Leu434	Ala196 (H); Ala202 (H)		
Lys443	Glu31 (PH e I); Gln32 (PH)		
Thr446	Gln32 (PH); Arg33 (PH)		
Leu447	Arg33 (PH)		
Gln450	Tyr27 (PH); Arg33 (PH); Gly92 (PH)	Gln450	Phe8 (PH)
Arg453	Asp91 (I); Lys93 (PH); Asn230 (PH)	Arg453	Ile11 (PH); Lys12 (PH); Glu13 (I)
Asp454	Arg33 (I); Gly92 (PH); Lys93 (I)	Asp454	Phe6 (PH)
		Leu456	Tyr1 (H e PH)
Thr457	Pro121 (PH); Asn230 (PH)	Thr457	Asp2 (PH)
Leu458	Ala125 (H); Tyr128 (H)	Leu458	Leu3 (H); Val67 (H)
Thr460	Ser228 (PH)	Thr460	Tyr1 (PH); Tyr24 (PH)

*Tipos de interação: H – hidrofóbica; PH – ponte de hidrogênio; e I – iônica

Anexo B - Confirmação da inserção de T-DNA em mutantes SALK_020026C feita por PCR do DNA genômico de plantas



GRF9-F2+ Lbb1.3