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

FIP (<u>F</u>tsH5 Interacting <u>P</u>rotein): uma proteína dedo-de-zinco envolvida no mecanismo de resposta a estresse abiótico em Arabidopsis thaliana

Karina Leticia Lopes

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

Piracicaba 2019 Karina Leticia Lopes Bacharel em Ciências Biológicas

FIP (*<u>F</u>tsH5 Interacting <u>P</u>rotein*): uma proteína dedo-de-zinco envolvida no mecanismo de resposta a estresse abiótico em *Arabidopsis thaliana*

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 2019

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

Lopes, Karina Leticia

FIP (FtsH5 Interacting Protein): uma proteína dedo-de-zinco envolvida no mecanismo de resposta a estresse abiótico em *Arabidopsis thaliana /* Karina Leticia Lopes. - - Piracicaba, 2019.

81 p.

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

1. Fotossíntese 2. Estresse abiótico 3. Dedo-de-zinco 4. FtsH 5. Redutase I. Título

"Transmita o que aprendeu. Força, maestria, hmm... Mas fraqueza, insensatez, fracasso também. Sim, fracasso acima de tudo. O maior professor, o fracasso é". Yoda

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Orientador Prof. Marcio de Castro Silva-Filho por toda a orientação, suporte e motivação. E por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu iniciasse as minhas atividades na sua área de pesquisa como treinamento técnico.

À FAPESP por todo o apoio financeiro no país, por quatro anos, e por mais um ano de estágio no exterior, que me proporcionaram muito conhecimento e experiências, que resultou em uma publicação na revista *Frontiers in Plant Science* em 2018.

Aos co-autores do primeiro paper FIP publicado, Ricardo A. O. Rodrigues, Marcos de C. Silva, Wiliane G. S. Braga e claro, o Prof. Marcio. Demorou, mas saiu! E ao Dr. Kenneth Cline pela leitura crítica do manuscrito do paper FIP.

À todos os professores do PPG Internacional, da Esalq e da USP que de alguma forma me ajudaram durante o Doutorado. Se eu cheguei até esse ponto, também foi pela ajuda de vocês.

Ao Prof. Patrice P. Hamel por ter me recebido por um ano no seu laboratório na *Ohio State University* por um ano durante meu estágio no exterior. A supervisão, as idéias, dicas e sugestões foram de muita importância para este trabalho.

Ao Prof. Daniel Scherer pela grande ajuda durante a etapa de produção da proteína FIP para a confecção do anticorpo anti-FIP.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP) durante esses mais de 4 anos de convivência. Foram muitas idas e chegadas e meu agradecimento vai a todos sem exceção. Mas meu agradecimento mais que especial vai para Flávia Franco, Larissa Spoladore e Thais Paula de Souza (em ordem alfabética porque não dá para colocar em ordem de importância). Vocês fizeram toda a diferença para minha vida em Piracicaba.

Aos técnicos do LBMP, Rafael Colombi e Rodinei J. Graciani por manterem nosso laboratório organizado e facilitarem nosso trabalho.

Às minhas âncoras. Minha amada família. Minha mãe Luiza, minhas irmãs Andréa e Ana Paula, meus sobrinhos lindos João Pedro, Anthony, Cynthia e Joaquim (ordem de nascimento). Vocês são tudo para mim.

Aos meus Rs, Rafa pelos 12 anos de companheirismo e conforto no coração. Rufus, por ser o cachorro mais lindo e querido desse mundo...para mim.

À família do Rafa, que é uma segunda família para mim. Valéria, Élcio, Carine, Junior e Matheus. Muito obrigada por me receber e me incluir na família de vocês.

Às minhas amigas de todo o sempre, Estela e Kelly (vó). Não importa a distância, o amor e amizade por vocês não muda.

Ao Pessoal de Columbus-Ohio. Nitya, Ankita e Andrew do Hamel Lab pela amizade e ajuda. À Munemi por ter feito me sentir em casa. Aos amigos da Flux+Flow, tudo é mais fácil quando a gente dança. O ano passou voando.

A todos que de alguma forma fizeram parte dessa trajetória, meu muito obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. A Fotossíntese	13
2.1.1. As reações luminosas da fotossíntese	14
2.2. Controle de qualidade nos cloroplastos	16
2.3. Proteases FtsH	17
2.3.1. Controle da atividade proteásica das FtsHs	19
2.3.2. FtsH no controle de qualidade do Fotossistema II	21
2.4. Proteínas dedo-de-zinco no controle de qualidade da fotossíntese	22
2.4.1. Família DNAJE1 nos cloroplastos	23
2.4.2. FIP, uma proteína dedo-de-zinco	
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. A amplificação das sequências de interesse e clonagens iniciais	
3.2. Linhagens de plantas e condições de crescimento	
3.2.1. Identificação das linhagens mutantes	
3.2.2. Transformação de Arabidopsis thaliana	
3.3. Extrações de DNA e RNA	
3.4. Análises por PCR	
3.5. Extração de proteínas de tilacóides de folhas de arabidopsis	
3.5.1. SDS-PAGE e immunoblot	
3.6. Medidas de fluorescência de clorofila	
3.7. Análises de tolerância à estresse em plantas	
3.8. Ensaios de duplo-híbrido em levedura (Y2H)	
3.8.1. Seleção de proteínas interagentes com FIP	
3.8.2. Confirmação das interações de FIP	
3.9. Produção e purificação da proteína recombinante 6xHis-FIP	
3.9.1. Purificação da proteína 6xHis-FIP em condições nativas	
3.9.1.1. Ensaio de estado redox das cisteínas in vitro	

3.9.1.2. Ensaio de redução de insulina
3.9.2. Purificação da proteína 6xHis-FIP em condições desnaturantes
3.9.2.1. Produção do anticorpo anti-FIP
4. RESULTADOS
4.1. Obtenção de plantas mutantes <i>fip e</i> superexpressoras (OE) de FIP
4.2. Efeito da superexpressão e da baixa expressão de FIP no acúmulo de proteínas dos complexos PSII, PSI e Citocromo <i>b</i> 6 <i>f</i> em folhas de arabidopsis
4.3. Plantas expressando baixos níveis de FIP são mais tolerantes à estresses abióticos
4.4. FIP interage com proteínas envolvidas na fotossíntese em ensaio de duplo híbrido de levedura
4.5. Investigando a interação de FIP com as FtsHs tipo A
4.6. FIP possui um domínio dedo-de-zinco com atividade redutase in vitro53
5. DISCUSSÃO
5.1. Envolvimento de FIP na resposta ao estresse abiótico
5.2. Mutação no gene FIP afeta acúmulo de proteínas do PSI e PC60
5.3. Possível papel regulador de FIP pela atividade do domínio dedo-de-zinco 61
6. CONCLUSÕES63
REFERÊNCIAS
ANEXOS

RESUMO

FIP (<u>F</u>tsH5 Interacting <u>P</u>rotein): uma proteína dedo-de-zinco envolvida no mecanismo de resposta a estresse abiótico em Arabidopsis thaliana

As reações luminosas da fotossíntese em plantas envolvem quatro complexos proteicos multi-unidades na membrana dos tilacóides incluindo o fotossistema II (PSII), o complexo citocromo bef, o fotossistema I (PSI) e o complexo ATP sintase. Uma atividade apropriada desse processo exige um mecanismo de controle de qualidade mediado por chaperonas, DnaJs e proteases, como o complexo FtsH. Esse conjunto de proteínas garantem um dobramento correto de proteínas, as montagens devidas dos complexos e a degradação de algumas subunidades danificadas quando necessário. Neste trabalho nós mostramos o envolvimento de FIP, uma proteína com um domínio dedo-de-zinco localizada nos tilacóides de cloroplastos de A. thaliana, no mecanismo de resposta à estresses abióticos. Plantas mutantes fip foram, fenotipicamente, mais tolerantes à estresses abióticos de alta luminosidade, elevado potencial osmótico e excesso de sal. Também mostramos que a expressão de FIP é diminuída em resposta às diferentes condições de estresse, assim como o acúmulo de transcritos de genes relacionados à estresse foi menor nas plantas mutantes fip. Análises por immunoblot mostraram que os mutantes fip acumulam menos proteínas PsaA e PsaB do fotossistema I e plastocianina (PC) do que as plantas selvagens, no entanto não são afetados quanto ao acúmulo de proteínas do fotossistema II e do Complexo do Citocromo bef sob condições controle. Esses mutantes também acumulam menos FtsH5 nos tilacóides, sem afetar a eficiência dos fotossistemas I e II. Foi testado também o potencial redutase do domínio dedo-de-zinco da proteína recombinante FIP (6xHis-FIP) em ensaios in vitro de redução de insulina. Vimos que FIP apresenta atividade redutase, significantemente, maior que o controle negativo nas condições testadas. Considerando todos os resultados obtidos até o momento, acreditamos que FIP possa estar agindo como uma redutase na membrana dos tilacóides, tendo como alvos não somente FtsH5, mas também outras proteínas com resíduos de cisteína nas suas estruturas, e que sua atividade tem influência no acúmulo de proteínas dependentes de redução para a maturação como PsaA, PsaB e PC. Uma investigação mais aprofundada da atividade de FIP nos cloroplastos ainda é necessária para o completo entendimento da sua função.

Palavras-chave: Fotossíntese; Estresse abiótico; Dedo-de-zinco; FtsH; Redutase

ABSTRACT

FIP (<u>F</u>tsH5 Interacting <u>P</u>rotein): a zinc-finger protein involved in the abiotic stress response mechanism in *Arabidopsis thaliana*

The light-driven photosynthetic reactions in plants take place within four multisubunit protein complexes in the thylakoid membranes, including photosystem II (PSII), the cytochrome $b_{6}f$ complex, photosystem I (PSI) and the ATP synthase complex. Regulation of all these molecular machineries requires a fine-tuning control mechanism mediated by specific proteins, including chaperones, DnaJs, and proteases, such as the FtsH complex. These set of proteins guarantee the proper folding, assembly and degradation of the photosynthetic complexes' subunits. In this work we showed the involvement of FIP, a zinc-finger protein localized in the thylakoid membranes in A. thaliana, in the abiotic stress response mechanism. Mutants fip knockdown plants were phenotypically more tolerant to abiotic stresses like high light, increased osmotic potential and salt excess. We also showed that FIP is downregulated by different abiotic stresses, with lower levels of stress-related gene transcripts accumulation in mutant fip plants. Analysis of accumulation of photosynthetic proteins by immunoblot under control conditions showed that mutants fip displayed lower levels of PsaA, PsaB (PSI) and Plastocyanin (PC) proteins than wild-type plants, however are not affected for PSII and Cyt bef proteins accumulation under the same growth conditions. In addition, the mutants accumulated slightly less FtsH5 proteins in thylakoid membranes, without affecting PSII and PSI efficiency. We tested the putative reductase activity probably mediated by FIP zinc-finger domain, using the recombinant form of the protein 6xHis-FIP in *in vitro* insulin reduction assays. FIP presented a reductase activity higher than the negative control under the same assay conditions. Taking all together, these results suggest that FIP may be acting as a reductase in the thylakoid membranes, having as targets not only FtsH5 but other targets with available cysteine residues, depending on the reduction step for proper accumulation such as PsaA, PsaB and PC. Further investigations regarding the role of FIP in chloroplasts are still necessary to completely understand its function.

Keywords: Photosynthesis; Abiotic stress; Zinc-finger; FtsH; Reductase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reações da fotossíntese dependentes de luz na membrana dos tilacóides.
Figura 2. Proteases interplastidiais de plantas17
Figura 3. Complexo FtsH de Arabidopsis thaliana19
Figura 4. Ativação do complexo FtsH de arabidopsis por estresse luminoso20
Figura 5. Modelo proteolítico da degradação da proteína D122
Figura 6. Esquema de separação dos grupos de DNAJs e proteínas DNAJ-related em
plantas23
Figura 7. Análise filogenética das proteínas DNAJE25
Figura 8. FIP é uma proteína com um domínio dedo-de-zinco localizada nos tilacóides
de Arabidopsis27
Figura 9. Confirmação dos mutantes fip40
Figura 10. Caracterização de plantas FIP41
Figura 11. Acúmulo de proteínas dos tilacóides em plantas expressando diferentes
níveis de FIP43
Figura 12. Mutantes fip são mais tolerantes a estresse abiótico
Figura 13. Plantas mutantes fip são mais tolerantes a estresse abiótico em placas. 47
Figura 14. Expressão de diferentes genes em resposta a condições de estresse 48
Figura 15. FIP interage com proteínas cloroplastidiais in vitro usando o sistema
ProQuest Two-Hybrid (Gateway)51
Figura 16. Alinhamento das proteases FtsH53
Figura 17. Esquema dos dois possíveis modos de ação de FIP54
Figura 18. Estado redox dos grupos tiol das proteínas com potencial atividade
redutase55
Figura 19. Ensaio de redução de insulina utilizando a proteína recombinante 6xHis-
FIP
Figura 20. Diferenças no dobramento de FIP com e sem tag de histidina57

1. INTRODUÇÃO

Fotossíntese é o processo metabólico onde CO₂ é fixado na forma de açúcar com o gasto de moléculas energéticas de ATP e NADPH. Este processo acontece nos cloroplastos de todas as plantas e algas, e nas células de bactérias fotossintéticas conhecidas como cianobactérias.

As reações luminosas da fotossíntese, em plantas e algas, envolvem quatro complexos proteicos na membrana dos tilacóides dos cloroplastos, incluindo o fotossistema II (PSII), o complexo citocromo b₆f, o fotossistema I (PSI) e o complexo ATP sintase, além das proteínas plastoquinona, plastocianina e ferrodoxina (Wollman *et al.*, 1999, Nelson and Yocum, 2006). A manutenção de uma atividade apropriada da fotossíntese exige uma ação coordenada de proteínas para fazer a montagem desses complexos, assim como a degradação para substituição de suas subunidades quando essas se encontram degradadas, num processo denominado "controle de qualidade proteico" (Bukau *et al.*, 2006). O complexo PSII é alvo inevitáveI de dano foto-oxidativo causado por alta radiação, o que pode levar à sua inibição (Barber and Andersson, 1992, Tyystjärvi and Aro, 1996, Murata *et al.*, 2007). A proteína D1 do centro de reação do PSII é considerada o principal alvo de dano por luz visíveI (Aro *et al.*, 2005).

Nos cloroplastos de células vegetais estão chaperonas envolvidas no processo de dobramentos de proteínas nascentes, mas também estão envolvidas na degradação de proteínas danificadas, juntamente com as proteases celulares. Proteases como ClpP, FtsH e DegP desempenham importantes funções em aspectos como biogênese e manutenção de cloroplastos, remoção e degradação de sequências sinal (Chaal *et al.*, 1998, Richter and Lamppa, 2003, Nilsson Cederholm *et al.*, 2009), e degradação de proteínas danificadas por foto-oxidação ou mal dobradas (Adam and Clarke, 2002, Adam *et al.*, 2006). O complexo FtsH é o principal responsável pela degradação da proteína D1 danificada no centro de reação do PSII. A ativação desse complexo se dá principalmente por mudanças conformacionais nos monômeros das proteases FtsH promovidos por estresse luminoso (Yu *et al.*, 2004, Yoshioka and Yamamoto, 2011). Para evitar a degradação indesejada de proteínas intactas, a atividade das proteases precisa ter algum mecanismo de regulação. Em arabidopsis, sabe-se que a fosforilação do PSII previne a degradação dosnecessária da proteína D1 (Kato and Sakamoto, 2014). O controle da ativação do complexo FtsH

em plantas por fatores proteicos vem sendo sugerido, no entanto nenhuma evidência foi reportada até este momento (Kato *et al.*, 2018).

Em trabalhos anteriores, nosso grupo encontrou uma proteína plastidial denominada FIP (*FtsH5 Interacting Protein*), interagindo com o complexo FtsH nos tilacóides dos cloroplastos (Rodrigues, 2011). A sequência da proteína FIP apresenta um peptídeo de trânsito N-terminal processado, seguido de uma região hidrofóbica e um domínio dedo-de-zinco na região C-terminal. O domínio dedo-de-zinco mostrouse essencial para a interação entre as proteínas FIP e FtsH5 em ensaios de Y2H (*Yeast-two Hybrid*) (Rodrigues, 2011). Análises filogenéticas revelaram que proteínas tipo FIP de várias espécies de plantas estão coevoluindo com proteases FtsH tipo A, e que estas estão sob pressão de seleção negativa, evidenciando a importância da conservação da estrutura para a função das proteases FtsH5 e de FIP, bem como para a interação (Silva, 2015).

Considerando todas as informações coletadas até o momento, o objetivo neste trabalho foi aprofundar a investigação sobre a proteína FIP em plantas de arabidopsis visando um melhor entendimento da sua atividade nos cloroplastos, e verificar a possibilidade de FIP atuar como um regulador da atividade da protease FtsH5. Para isso, primeiramente avaliamos o efeito da baixa e alta acumulação de transcritos *FIP* no desenvolvimento fenotípico das plantas, quanto ao acúmulo de transcritos e de proteínas envolvidas na fotossíntese, assim como, na eficiência da atividade dos fotossistemas I e II (PSI e PSII) em plantas crescidas em condição controle. Em seguida, avaliamos a resposta das plantas *FIP* sob diferentes condições de estresse quanto ao acúmulo de transcritos de genes de resposta à estresse e o efeito fenotípico nas partes aéreas e raízes. Também checamos a interação de FIP com outras proteínas cloroplastidiais. Por fim, testamos a atividade do domínio dedo-de-zinco para a atividade redutase, que poderia sugerir um papel na regulação de proteínas plastidiais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Fotossíntese

A fotossíntese é o processo pela qual os organismos utilizam a energia proveniente do sol, transformando-a em energia química para a produção de compostos orgânicos necessários para o seu desenvolvimento. É o único processo biológico capaz de utilizar a energia vinda do sol diretamente, sendo o processo metabólico mais difundido e de maior sucesso na Terra. Estudos visando o entendimento desse processo tem datas desde metade do século 17, e, até hoje, não é completamente entendido. O processo é responsável pela produção de 100 milhões de toneladas de oxigênio por dia e pela fixação de 258 bilhões de toneladas de carbono por ano (Raven and Ralph, 2015, Borisov and Bjorn, 2018).

A fotossíntese acontece nos cloroplastos de todas as plantas e algas, e nas células de bactérias fotossintéticas conhecidas como cianobactérias. Este processo acontece em duas etapas e dois compartimentos distintos nos cloroplastos, sendo denominadas de reações luminosas, que ocorrem na membrana dos tilacóides e reações de carboxilação, que ocorrem no estroma (Eberhard *et al.*, 2008).

As reações luminosas da fotossíntese, em poucas palavras, utilizam a energia do sol para a quebra de moléculas de água e a formação das moléculas energéticas ATP e NADPH. Já as reações de carboxilação utilizam essas moléculas de ATP e NADPH para a incorporação do CO₂ atmosférico em açúcares, que serão estocados nos cloroplastos na forma de amido, ou exportados das folhas na forma de sacarose, para serem utilizados conforme a necessidade do organismo fotossintetizante. Esse processo é conhecido como o Ciclo de Calvin-Benson, e possue três etapas distintas: a carboxilação, a redução e a regeneração. É na etapa de carboxilação que a enzima mais abundante da Terra, a Rubisco (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/ oxigenasse) faz a sua participação (Cleland *et al.*, 1998).

A eficiência da fotossíntese pode ser afetada por diversos fatores externos que consequentemente modulam fatores internos (Anderson *et al.*, 1995, Eberhard *et al.*, 2008). Podemos citar a disponibilidade e qualidade da luz, temperatura, suprimento de água, disponibilidade de nutrientes e CO₂ atmosférico (Ma *et al.*, 2001, Moseley *et al.*, 2002, Im *et al.*, 2003, Jiao *et al.*, 2005, Amme *et al.*, 2006, Goulas *et al.*, 2006, Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006, Schachtman and Shin, 2007). Como internos devemos citar as proteínas, complexos protéicos, fatores e co-fatores,

desempenhando funções na biogênese, manutenção e regulação dessas proteínas, trabalhando em conjunto para o correto funcionamento do processo fotossintético, que envolve diferentes compartimentos celulares. Como exemplo, a enzima Rubisco possui oito subunidades grandes codificadas nos cloroplastos (genes *rbcL*) e oito subunidades pequenas codificadas no núcleo (genes *rbcS*), sendo sua produção e montagem influenciada por EROs produzidos durante situações de estresse luminoso (lrihimovitch and Shapira, 2000, Buchanan and Balmer, 2005, Cohen *et al.*, 2006). Foi estimado que aproximadamente 1000 genes são essenciais para a função dos cloroplastos, através de estudos com mutantes, sendo que um grande número desses está direta ou indiretamente associado com o processo da fotossíntese (Leister, 2003).

2.1.1. As reações luminosas da fotossíntese

As reações luminosas da fotossíntese utilizam a energia proveniente da luz para quebrar moléculas de água e gerar ATP e NADPH, como resultado da cadeia transportadora de elétrons e do gradiente de prótons, que envolve quatro complexos de proteínas, além de fatores associados à membrana dos tilacóides (Figura 1). A produção de ATP se dá pela forma motriz dos prótons, quando esses são translocados através do complexo da ATP Sintase do lúmen dos tilacóides para o estroma dos cloroplastos (Boyer, 1997, Holger *et al.*, 2000, Meyer Zu Tittingdorf *et al.*, 2004). A produção de NADPH se dá devido ao transporte de elétrons através dos complexos proteicos associados à membrana dos tilacóides até alcançar a ferrodoxina-NADP redutase (FNR) que reduz NADP em NADPH (Kramer *et al.*, 2004).

Os quatro complexos proteicos incluem o fotossistema II (PSII), o complexo citocromo bef, o fotossistema I (PSI) e o complexo ATP sintase, além das proteínas plastoquinona, plastocianina e ferrodoxina (Wollman *et al.*, 1999, Nelson and Yocum, 2006). O PSII é composto por aproximadamente 40 proteínas, associadas covalente ou transientemente, com um centro de reação formado pelas proteínas D1 e D2, subunidades α e β do citocromo b559, e proteína PsbI (Nanba and Satoh, 1987, Nelson and Yocum, 2006, Shi *et al.*, 2012). De fato, o PSII foi o primeiro a ter sua estrutura cristalográfica conhecida e foi obtido de uma cianobactéria (Umena *et al.*, 2011, Suga *et al.*, 2015, Kern *et al.*, 2018). No PSII é onde ocorre a quebra das

moléculas de água, dirigida por luz, liberando O₂ e os elétrons, que irão suprir a cadeia transportadora de elétrons (Renger, 2011).



Figura 1. Reações da fotossíntese dependentes de luz na membrana dos tilacóides. Esquema da fotossíntese mostrando todos os complexos e proteínas envolvidos para a geração de ATP. PSII (fotossistema II), PQ (plastoquinona), b6f (complexo do citocromo b6f), PC (plastocianina), PSI (fotossistema I), Fd (ferrodoxina), FNR (ferrodoxina-NADP redutase) e ATP synthase (ATP sintase). Caminho dos elétrons sinalizado por pontilhado azul. Caminho dos prótons sinalizado por pontilhado vermelho. Fonte: Wikipedia- Light-depending reactions.

A biogênese desses complexos requer o auxílio de muitos fatores auxiliares envolvidos nas diferentes etapas do processo como, transcrição, tradução, mudanças pós-trancricionais e pós-traducionais, dobramento das subunidades e montagem desses complexos nas membranas dos tilacóides (Lyska *et al.*, 2013). Além disso, todo esse processo involve três compartimentos celulares, núcleo, citoplasma e cloroplastos, considerando que muitos dos genes de proteínas cloroplastidiais são transcritos pelo DNA nuclear, traduzidos no citoplasma e transportados para o interior dos cloroplastos. Isto porque a grande maioria dos genes de proteínas cloroplastidiais foram transferidos para o núcleo durante a co-evolução do simbionte fotossintetizante com a célula hospedeira, após o evento de incorporação do ancestral de cianobactéria há ~1,5 bilhões de anos atrás (Martin and Russell, 2003, Woodson and Chory, 2008).

Um dos aspectos da maturação desses complexos é a ligação de co-fatores. Por exemplo, o PSII precisa se ligar a clorofilas, xantofilas, feofitinas, grupos heme e diversos íons para se tornar maduro (Guskov *et al.*, 2009). De forma similar, o PSI também está associado a pigmentos fotossintetizantes e grupos 4Fe-4S (Amunts *et* *al.*, 2007). O complexo do citocromo b₆f precisa de ligar à quatro hemes, grupos 2Fe-2S e clorofilas e xantofilas (Kurisu *et al.*, 2003, Stroebel *et al.*, 2003).

O auxílio no dobramento de subunidades da fotossíntese, como no caso do citocromo f, ocorre pela ação de proteínas tipo tiorredoxina. Essas tiorredoxinas promovem reações de oxirredução do domínio de ligação à heme (CxxCH) do apocitocromo f, reduzindo os resíduos de cisteína formando ligações tio-éster com os grupos vinil de heme (Kranz *et al.*, 2009). Como exemplos de tiorredoxinas envolvidas na maturação do citocromo f podemos citar a proteína HCF164 em arabidopsis (Lennartz *et al.*, 2001) e a proteína CCS5, seu homólogo em *Chlamydomonas* (Gabilly *et al.*, 2010). Podemos citar também o envolvimento de proteínas tipo chaperonas, como a proteína LPA1 em arabidopsis, importante para a montagem do PSII interagindo com a proteína D1 (Peng *et al.*, 2006). Essas proteínas com atividade tiorredoxina e chaperona são extremamente importantes para o sistema de controle de qualidade dos cloroplastos e serão abordadas com mais detalhes no tópico 2.6 desta tese (Proteínas dedo-de-zinco no controle de qualidade da fotossíntese).

2.2. Controle de qualidade nos cloroplastos

Os plastídios atuais são organelas bastante complexas que apresentam seis diferentes compartimentos: membrana externa, membrana interna, espaço intramembranas, estroma, membrana do tilacóide e lúmen. Cada um desses compartimentos apresenta um conjunto próprio de proteínas que permitiu a especialização da organela nas reações fotossintéticas e outros processos essenciais (Aluru *et al.*, 2006, Sakamoto *et al.*, 2008, Pogson *et al.*, 2015). Assim como nas demais organelas celulares, um sistema de controle de qualidade rigoroso é indispensável para manutenção das funções dos cloroplastos. Chaperonas regulam a biogênese e o funcionamento dos cloroplastos. Chaperonas estão envolvidas diretamente em processos de dobramentos de proteínas essenciais para a maturação e atividade dessas, mas também possuem um papel na degradação de proteínas malformadas e danificadas, trabalhando lado-a-lado com as proteases (Bukau *et al.*, 2006, Kampinga and Craig, 2010, Sharma *et al.*, 2010).

Vinte e uma maquinarias proteolíticas foram identificadas nos cloroplastos até 2016 (Figura 2) (van Wijk, 2015, Nishimura *et al.*, 2016). Nos tilacóides encontram-se complexos proteásicos como Clp, FtsH, Lon e Deg. Essas proteases fazem parte da

família AAA (ATPases Associadas à Diversas Atividades Celulares) e desempenham importantes papéis em numerosos aspectos da biogênese e manutenção de cloroplastos, desde a remoção à degradação de sequências sinais (Chaal *et al.*, 1998, Richter and Lamppa, 2003, Nilsson Cederholm *et al.*, 2009) e manutenção da homeostase em cloroplastos (Nakagawara *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2009) à degradação de complexos parcialmente montados ou proteínas danificadas (Adam and Clarke, 2002, Adam *et al.*, 2006). O módulo AAA, comum a todos os membros da família, é constituído de um domínio ATPásico conservado de 200-250 aminoácidos. Este domínio é caracterizado pelos motivos *Walker* A e *Walker B*, relacionados à ligação ao ATP, e o motivo *SRH* (*Second Region of the Homology*), relacionado à hidrólise do ATP (Karata *et al.*, 1999, Ogura and Wilkinson, 2001, Hanson and Whiteheart, 2005, Ito and Akiyama, 2005).



Figura 2. Proteases interplastidiais de plantas. Cloroplasto de plantas superiores possuem três grupos de proteases encarregadas do controle de qualidade organelar: metaloproteases (laranja), serino proteases (amarelas) e proteases aspárticas (azul). Fonte: Nishimura, Kato e Sakamoto, Plant Phisiology, 2016.

2.3. Proteases FtsH

Proteases FtsH (*Filamentous temperature sensitive H*) são metaloproteases encontradas desde eubactérias a organelas de origem bacteriana, isto é, cloroplastos

e mitocôndrias (Janska *et al.*, 2013). Foram, primeiramente, descritas em *E. coli* através da caracterização do mutante *ftsH Y16* incapazes de formar o septo durante a divisão celular em altas temperaturas(Ogura *et al.*, 1991). O termo FtsH tem sido mais usado para referenciar proteases bacterianas e cloroplastidiais, enquanto o termo proteases AAA é, preferencialmente, usado para proteínas mitocondriais. As proteases FtsH são altamente conservadas, com cerca de 40% de identidade entre proteínas de *E. coli, Saccharomyces cerevisiae, Homo sapiens* e *A. thaliana*. Seus membros possuem três domínios em um único polipeptídio: o domínio hidrofóbico na região N-terminal, ancorando a proteína à membrana; seguido pelo domínio ATPásico, característico da família AAA; e o domínio proteásico na região C-terminal, cujo centro catalítico é formado por um motivo conservado de ligação a zinco (Sakamoto, 2006, Janska *et al.*, 2013).

O genoma de *E. coli* contém apenas um gene FtsH, a cianobactéria *Synechocystis* sp. possui quatro cópias; e o genoma de *A. thaliana* contém 12 genes. Essa multiplicação dos genes de FtsH parece estar relacionada com a evolução do aparato fotossintético (Adam *et al.*, 2005). Em *A. thaliana*, das 12 proteínas deduzidas, apenas oito são direcionadas aos cloroplastos (FtsH 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 e 12), três são direcionadas exclusivamente para as mitocôndriais (FtsH3, 4 e 10) (Sakamoto *et al.*, 2003) e a FtsH11 apresenta duplo direcionamento, tanto para cloroplastos, quanto para mitocôndrias (Urantowka *et al.*, 2005).

Análises cristalográficas da FtsH de *E. coli* mostraram que o complexo constitue um anel hexamérico com resíduos aromáticos conservados voltados para a estrutura em anel (Krzywda *et al.*, 2002). Estudos topológicos da FtsH de *E. coli* mostra dois domínios ancorados na membrana plasmática, situados na porção N-terminal, e um domínio proteásico C-terminal exposto ao citoplasma (Tomoyasu *et al.*, 1993, Ito and Akiyama, 2005, Langklotz *et al.*, 2012). Os hexâmeros FtsH estão associados a outras proteínas de membrana, como HflKC (Kihara *et al.*, 1996) e formam um grande complexo proteico, com massa molecular de aproximadamente 1000 kDa (Saikawa *et al.*, 2004).

Em cloroplastos de *A. thaliana* observa-se a presença de complexos heterohexâmeros, formados por isômeros dos tipos A (FtsH1/FtsH5) e do tipo B (FtsH2/FtsH8) sempre numa razão de 2:4 (Figura 3) (Yu *et al.*, 2004, Yoshioka and Yamamoto, 2011, Moldavski *et al.*, 2012). Mutações nos genes que codificam dois desses isômeros, FtsH2 (*var2*) e FtsH5 (*var1*), conferem fenótipos de variegação foliar em *A. thaliana* (Sakamoto *et al.*, 2003). O heterocomplexo de arabidopsis possui uma massa de proximadamente 450 kDa, com uma região transmembrana que ancora cada protease na membrana dos tilacóides, sendo o domínio catalítico exposto ao estroma (Rodrigues *et al.*, 2011).



Figura 3. Complexo FtsH de *Arabidopsis thaliana*. O complexo FtsH de arabidopsis constitui-se de um hetero-hexâmero formado por isômeros dos tipos A (FtsH1/FtsH5, Iaranja) e do tipo B (FtsH2/FtsH8, azul) sempre numa razão de 2:4. Fonte: Moldavski et al., PlosOne, 2012.

2.3.1. Controle da atividade proteásica das FtsHs

Um sistema de controle de qualidade organelar precisa ser bem regulado para evitar desperdício energético celular, isto é, só estar ativo quando necessário, caso contrário, a degradação de proteínas normais teria igual probabilidade de ocorrer. Como as proteases FtsHs sabem quando suas atividades catalíticas são necessárias, é uma pergunta que ainda precisa ser entendida, mas alguns fatores dessa regulação já são conhecidos.

Em *E. coli*, o complexo FtsH está associado a outro complexo proteico, chamado HfIKC (Kihara *et al.*, 1996, Kihara *et al.*, 1997). Estudos *in vitro* mostram que o complexo FtsH isolado apresenta atividade, o que indica que HfIKC não é necessário para a atividade proteásica (Akiyama *et al.*, 1996, Ito and Akiyama, 2005, Akiyama, 2009). Mutantes hfIK e hfIC apresentaram aumento da atividade proteásica de FtsH, sugerindo que as proteínas HfIK e HfIC estão atuando em *E. coli* como reguladores negativos do complexo (Akiyama *et al.*, 1996, Ito and Akiyama, 2005, Akiyama, 2009) e se ligam diretamente aos substratos do complexo (Kihara *et al.*, 1996, Saikawa *et al.*, 2004).

Em plantas, embora a estrutura do complexo FtsH seja bem conhecida, o seu mecanismo de ativação não foi completamente elucidado. Existe um controle de ativação do complexo FtsH por estresse luminoso que desencadeia a formação do anel hexamérico ativo (Figura 4). Os três fatores podem ocorrer independentemente ou em conjunto para a ativação do complexo FtsH, sendo eles a hidrólise de ATP, acidificação do lúmen e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs=*ROS*, na figura). A hidrólise de ATP pelo domínio ATPase das proteases FtsH pode induzir mudanças conformacionais promovendo a formação do complexo e é essencial para a sua atividade (Figura 4-1). A acidificação do lúmen protona resíduos de aminoácidos das alças podendo induzir mudanças conformacionais que favorecem a formação do complexo (Figura 4-2). Também é possível que EROs produzidas na condição de estresse, atuem na oligomerização do complexo devido a mudanças oxidativas das proteínas (Figura 4-3). Além de causar danos oxidativos em diversas moléculas, sabese que EROs atuam como sinais que ativam resposta ao estresse (Yoshioka and Yamamoto, 2011).



Figura 4. Ativação do complexo FtsH de arabidopsis por estresse luminoso. Estresse luminoso promove a formação do complexo hexamérico. Possíveis fatores que desencadeiam o processo são: hidrólise de ATP (1), acidificação do lúmen (2) modificações causadas por *ROS (reactive oxygen species*) (3) Esquema do anel hexamérico do complexo FtsH visto de cima, contendo dois monômeros de FtsH tipo A e quatro tipo B. Fonte: Yoshioka e Yamamoto, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2011.

Estresse luminoso também induz o relaxamento do grana, permitindo o tráfego de complexos FtsH pelas membranas dos tilacóides não empilhadas, facilitando o acesso à proteína D1 foto-danificada do fotossistema II (Khatoon *et al.*, 2009, Kirchhoff *et al.*, 2011, Herbstova *et al.*, 2012). A ativação do complexo FtsH em plantas por fatores proteicos vem sendo sugerida, mas nenhuma evidência concreta foi obtida até o momento (Kato *et al.*, 2018).

2.3.2. FtsH no controle de qualidade do Fotossistema II

O envolvimento das proteases FtsHs no processo de degradação da proteína D1 do centro de reação do PSII já é bem conhecido. Os primeiros produtos da clivagem de D1 produzidos pelo complexo FtsH induzido pela luz são os fragmentos de 23 kDa N-terminal e 9 kDa C-terminal, em um processo dependente de ATP e íons de Zn (Yoshioka *et al.*, 2010). Estudos com mutantes para FtsH2 mostraram que, em condições de alta intensidade luminosa, a proteína D1 danificada é acumulada, enquanto que em plantas selvagens isso não ocorre (Bailey *et al.*, 2002, Sakamoto, 2006, Nixon *et al.*, 2010, Chi *et al.*, 2012). Esses resultados mostram a importância do complexo FtsH no mecanismo de reparo do PSII danificado.

O modelo para degradação da proteína D1 envolve a participação das proteases FtsH e Deg em *A. thaliana* (Figura 5). O processo possui dois passos: primeiro ocorre uma clivagem da alça estromal que conecta as hélices transmembranas D e E da proteína D1, pela protease Deg2, seguido pela remoção do fragmento N-terminal pelo complexo FtsH (Huesgen *et al.*, 2009, Kato *et al.*, 2009, Kato and Sakamoto, 2009, Kato *et al.*, 2012).



Figura 5. Modelo proteolítico da degradação da proteína D1. Esquema mostrando a ação das proteases FtsH e Deg na degradação da proteína D1 do centro de reação do PSII. A proteína D1 possui 5 hélices transmembrana (A-E). Os sítios de clivagem pelas proteases Deg são indicados por tesouras. A degradação da proteína D1 pelo complexo FtsH se inicia pela extremidade N-terminal no lado estromal e é facilitado pela clivagem inicial da proteína D1 pelos proteases Deg. Fonte: Kato e Sakamoto, Journal of Biochemistry, 2009.

Nos grana dos tilacóides, a proteína D1 é reversivelmente fosforilada (ELICH et al., 1993), e tem sido sugerido que a defosforilação do aminoácido treonina na extremidade N-terminal, é necessária antes que a degradação da proteína D1 danificada inicie (Aro *et al.*, 2005). Assim, a degradação não específica de proteínas D1 funcionais do PSII é prevenida. No entanto, ainda não foi elucidado como as fosfatases alcançam o complexo PSII nos grana sob estresse luminoso e como elas auxiliam no reconhecimento das proteínas D1 danificadas.

2.4. Proteínas dedo-de-zinco no controle de qualidade da fotossíntese

A maioria das proteínas dependem da ação de chaperonas em algum estágio da sua biogênese (dobramento, transporte, estabilização, etc) para desempenharem suas funções apropriadamente. Nos cloroplastos, DnaJs são proteínas dedo-de-zinco que trabalham em conjunto com chaperonas HSP70 (Pulido *et al.*, 2013). As DnaJs foram, primeiramente, descritas em *E. coli* (Liberek *et al.*, 1991) e possuem três domínios característicos: um domínio J de interação com chaperonas; um domínio C-terminal que facilita a dimerização de DNAJ e as interações com os substratos; e dois domínios dedo-de-zinco, num total de quatro repetições CxxCxGxG, envolvido na interação proteína-proteína. De acordo com a presença ou ausência de um ou mais desses domínios, essas proteínas, dependentes da associação com HSP70, são

classificadas em três grupos: DNAJA contém os três domínios; DNAJB não possuem os dedos-de-zinco; e DNAJC possuem somente o domínio J (Kampinga and Craig, 2010).

DNAJS somente com um domínio J não muito conservados são agrupadas no grupo das DNAJD, pois são capazes de dobrar seus substratos, mas sua atividade é independente de HSP70 (Rajan and D'Silva, 2009, Finka *et al.*, 2011). Recentemente, mais dois grupos foram identificados entre as DNAJS independentes de HSP70. A família DNAJE é composta de proteínas somente com o domínio dedo-de-zinco similar ao encontrado nas DNAJAS e são chamadas de DnaJ-*like*. Essas DNAJE são subdivididas em 2 grupos, DNAJE1 e DNAJE2. DNAJE1 possuem somente o domínio dedo-de-zinco, já as DNAJE2 possuem um domínio GRL (tipo glutarredoxina). E por último o grupo das DNAJFs que apresentam somente o domínio C-terminal similar ao encontrado nas DNAJAS (Pulido and Leister, 2018).



Figura 6. Esquema de separação dos grupos de DNAJs e proteínas DNAJ-related em plantas. Proteínas DNAJA contém os três domínios típicos de DnaJs: domínio J, dedo-de-zinco e C-terminal; DNAJB não possuem o domínio dedo-de-zinco; DNAJC possuem somente o domínio J. As proteínas DNAJ-related ou independentes de HSP70 também são classificadas em três grupos, DNAJD, DNAJE e DNAJF, que possuem respectivamente, um domínio tipo J, um domínio dedo-de-zinco tipo DNAJA e um domínio C-terminal tipo DNAJA/B. Fonte: Pulido e Leister, New Phytologist, 2018.

2.4.1. Família DNAJE1 nos cloroplastos

Muitos membros dessa família foram reportados por estarem envolvidos em diferentes processos na biogênese e/ou manutenção dos cloroplastos de arabidopsis

como B2D2 (Brutnell *et al.*, 1999), ORANGE (Lu *et al.*, 2006), PTAC5 (Zhong *et al.*, 2013) e ANGULATA7 (Munoz-Nortes *et al.*, 2017). Além disso, LQY1 (Lu *et al.*, 2011), 2011), PSA2 (Fristedt *et al.*, 2014), CYO1 (Shimada *et al.*, 2007) HCF222 (Hartings *et al.*, 2017) e PTAC5 também apresentaram atividades redutase e isomerase em plantas, pela ação dos seus domínios dedo-de-zinco durante ensaios *in vitro*. Como pode ser visualizado na Figura 7, os membros da família DNAJE1 formam um gupo monofilético.

B2D2 foi o primeiro membro da família a ser caracterizado. Localizado no estroma dos tilácoides, está envolvido na acumulação de uma das proteínas mais abundantes da fotossíntese, a Rubisco, em plantas de milho (Brutnell *et al.*, 1999). ANGULATA7 está envolvido na acumulação de pigmentos fotossintetizantes em cloroplastos de arabidopsis participando do mecanismo de crescimento e desenvolvimento foliar (Munoz-Nortes *et al.*, 2017).



Figura 7. Análise filogenética das proteínas DNAJE. Árvore filogenética baseada na sequência complete dos genes de arabidopsis DNAJE1.1 (B2D2, AT3G47650), DNAJE1.2 (PTAC5, AT4G13670), DNAJE1.3 (Tsip1, AT2G24860), DNAJE1.4 (OR, AT5G61670), DNAJE1.5 (CYO1, AT3G19220), DNAJE1.6 (LQY1, AT1G75690), DNAJE1.7 (PSA2, AT2G34860), DNAJE1.8 (ORL, AT5G06130), DNAJE1.9 (FIP, AT5G02160), DNAJE1.10 (GRL12, AT1G22630), DNAJE1.11 (ANGULATA7, (AT5G20220), (HCF222, AT5G53860), DNAJE1.12 (AT2G24395), DNAJE1.13 DNAJE1.14 AT5G15802), DNAJE1.15 (AT5G17840), DNAJE1.16 (GRL11, AT3G44020), DNAJE1.17 DNAJE1.18 (AT3G45050), DNAJE1.19 (AT5G43260), DNAJE1.20 (AT2G38000), (AT3G17668), DNAJE2.1 (GRL3, AT1G64500), DNAJE2.2 (GRL2, AT5G58530), DNAJE2.3 (GRL6, AT5G01420), DNAJE2.4 (GRL7, AT5G06470), DNAJE2.5 (AT3G11773), DNAJE2.6 (GRL1, AT5G13810), DNAJE2.7 (AT1G32760), DNAJE2.8 (GRL8, AT4G10630), DNAJE2.9 (GRL4, AT5G03870), DNAJE2.10 DNAJE2.11 (GRL10, AT3G28850), DNAJE2.12 (AT2G41330), DNAJE2.13 (GRL9, (AT5G39865), AT3G57070), e as sequências relacionadas de Embriofita, Carofita, Clorofita e Cianofita. Proteínas de arabidopsis estão em negrito. Fonte: Pulido e Leister, New Phytologist, 2018.

PSA2 é uma proteína do lúmen dos tilacóides, possui atividade tiol-dissulfeto isomerase e está envolvida na montagem do PSI. Mutantes *psa2* tiveram severa redução no acúmulo de PSI e severa foto-inibição (Fristedt *et al.*, 2014). LQY1 (Lu *et al.*, 2011) e CYO1 (Shimada *et al.*, 2007) localizados nos tilacóides, estão envolvidos na montagem e manutenção do PSI. HCF222 participa da biogênese de

componentes do aparato fotossintético, onde mutantes acumularam menos subunidades do Complexo do Citocromo *b*₆*f*, no entanto não foram afetados quanto à eficiência dos fotossistemas I e II (Hartings *et al.*, 2017).

Como mencionado antes, muitos membros da família apresentaram atividades redutase e isomerase em ensaios *in vitro*. Isto se deve aos grupos tiol do domínio dedo-de-zinco (CxxCxGxG), que são capazes de doar dissulfeto para seus substratos numa reação de oxirredução, onde o doador se torna oxidado e o substrato reduzido (Aller and Meyer, 2013, Onda, 2013). Esse tipo de reação é muito comum para a maturação de proteínas que possuem resíduos de cisteínas na sua sequência, processo chamado de "dobramento oxidativo", muito comum em proteínas de cloroplastos (Hall *et al.*, 2010, Kieselbach, 2013).

2.4.2. FIP, uma proteína dedo-de-zinco

FIP (*FtsH5 Interacting Protein*) é uma proteína de localização cloroplastidial e foi encontrada associada ao complexo FtsH nos tilacóides de arabidopsis (Rodrigues, 2011). A localização plastidial de FIP foi determinada pela fusão da proteína a GFP, e sua inserção na membrana dos tilacóides foi mostrada por experimentos de importação *in vitro*, utilizando FIP marcada radiotivamente, por fracionamento de cloroplastos intactos (Rodrigues, 2011). FIP estava associada a um complexo de aproximadamente 440 kDa, o tamanho esperado para o complexo FtsH (Rodrigues, 2011). A análise *in silico* de FIP revelou que esta proteína pode ser dividida em três regiões distintas: um peptídeo de trânsito processado N-terminal, uma região hidrofóbica para ancoramento na membrana e um domínio dedo-de-zinco C-terminal do tipo C4 com dois motivos CxxCxGxG conservados (Figura 8) (Rodrigues, 2011, Lopes *et al.*, 2018). O domínio dedo-de-zinco de FIP está voltado para o lado estromal, assim como os sítios ativos da protease FtsH5 (Rodrigues, 2011).



Figura 8. FIP é uma proteína com um domínio dedo-de-zinco localizada nos tilacóides de Arabidopsis. (A) FIP é uma proteína com 129 amino ácidos, contendo um peptídeo de trânsito Nterminal, um domínio transmembrana e um domínio dedo-de-zinco C-terminal. (B) Modelo topológico perdito usando o software online PROTTER. (C) Ensaio de *GST-Pull Down* mostrando a interação de FIP com a protease FtsH5, utilizando o anticorpo anti-FtsH5 e a construção GST-FIP. Fonte: LOPES et al., Frontiers in Plant Science, 2018.

Em experimentos de Y2H, FIP interagiu apenas com a protease FtsH5 tipo A, mas não interagiu com FtsH2 tipo B (Rodrigues, 2011). A interação de FIP e FtsH5 também foi mostrada em experimento de GST-Pull Down utilizando a proteína FIP fusionada à GST, a protease FtsH5 purificada e o anticorpo anti-FtsH5 (Lopes et al., 2018). Foi visto que o domínio dedo-de-zinco completo é essencial para a manutenção da interação de FIP com FtsH5 (Braga, 2013). Análises de expressão gênica de FIP e FtsH5 sob estresse salino e frio mostraram que esses dois genes respondem de maneira antagônica ao estresse, com diminuição da expressão de FIP e aumento da expressão de FtsH5 em ambas condições (Braga, 2013). Análises Mirrortree suportam a existência de coevolução entre FIP e FtsH5, uma protease do tipo A. Por outro lado, nenhuma correlação foi encontrada entre FIP e as proteases FtsH tipo B (Silva, 2015), o que corrobora as observações experimentais anteriores de interação. A atividade proteásica das proteínas do tipo B é totalmente dispensável, embora sejam necessárias para a montagem do complexo (Zhang et al., 2010). Ambas proteínas, FIP e FtsH5, estão sob pressão de seleção negativa, evidenciando a importância da conservação da estrutura para a função das proteases FtsH5 e de FIP, bem como para a interação (Silva, 2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. A amplificação das sequências de interesse e clonagens iniciais

Todas as amplificações das sequências de interesse foram feitas utilizando a tecnologia Gateway. Para isso as sequências foram amplificadas por PCR a partir de DNA genômico de arabidopsis utilizando a enzima Platinum Pfx DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) e iniciadores específicos encontrados na tabela do Anexo A. As extrações de DNA genômico de plantas foram feitas de acordo com (Edwards et al., 1991). Os produtos de PCR foram clonados no vetor de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen) do sistema e transformados nas células de *E. coli* competentes TOP10. Os plasmídeos foram isolados com Plasmid Mini Kit (Qiagen) e sequenciados utilizando os iniciadores attR forward e reverse (Anexo B) para confirmar a fidelidade nucleotídica das sequências de interesse. Após a confirmação as sequências são foram transferidas para os vetores de expressão por recombinação LR da tecnologia Gateway, utilizando a enzima LR Clonase II (Invitrogen) e transformadas por eletroporação nas células de E. coli TOP10 (Invitrogen) utilizando pulsos de 1,8kV com o eletroporador Gene Pulse (Bio-Rad). As colônias resultantes após a seleção em placas contendo meio LB mais os antibióticos apropriados tiveram os vetores extraídos das células usando Plasmid Mini Kit (Qiagen), e estes foram confirmados por clivagem, ou sequenciamento se necessário. As sequências de interesse neste trabalho são da planta modelo Arabidopsis thaliana e foram obtidas do banco de dados TAIR (The Arabidopsis Information Resource: www.arabidopsis.org).

3.2. Linhagens de plantas e condições de crescimento

Arabidopsis thaliana ecótipo Col-0 foi usada como linhagem selvagem neste estudo. As linhagens mutantes de T-DNA usadas aqui foram obtidas do ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*) para o gene *FIP* (Salk_080769C and Salk_069143C) e são referidas a partir de agora como *fip-1* and *fip-2*.

Plantas superexpressando *FIP* foram geradas clonando a sequência completa de *AtFIP* (At5g02160) ao lado do promotor CaMV35S no vetor pK7WG2 (Gateway) (Lopes *et al.*, 2018). As plantas foram crescidas por 21 dias em câmara de crescimento

num regime de 16 horas luz (120 μ mol m⁻² s⁻¹) e 8 horas escuro à 22°C, regadas a cada dois dias, com água destilada ou meio MS 1X, alternadamente.

3.2.1. Identificação das linhagens mutantes

Para identificar os mutantes *FIP* em homozigose, as linhagens Salk_080769C e Salk_069143C foram crescidas até a geração T3 (3ª geração de transformantes crescida no laboratório). Foram realizadas reações de PCR com três iniciadores, um anelando na borda esquerda (*left border, LB mut*), um na borda direita (*right border, RB reverse*) e um que anela no T-DNA (LBb1.3), cujas sequências se encontram no anexo B. Foram usadas amostras de DNA de folhas de plantas de três semanas crescidas em solo em câmara de crescimento num regime de 16 horas luz (120 µmol $m^{-2} s^{-1}$) e 8 horas escuro à 22°C.

3.2.2. Transformação de Arabidopsis thaliana

As plantas de arabidopsis ecótipo *Col-0* foram crescidas por um mês antes de serem transformadas através do método *floral dip* (Clough and Bent, 1998). O vetor pK7WG2-FIP foi inserido na linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 por eletroporação utilizando pulso de 1,8kV e o eletroporador *Gene Pulse* (Bio-Rad). Após o evento de transformação as plantas foram mantidas no escuro por 24 horas à 22°C em condições úmidas para aumentar a eficiência de transformação. Após esse período, as plantas para as condições normais de crescimento e mantidas em câmara de crescimento até a maturação das sementes. As sementes resultantes da transformação foram esterilizadas e plaqueadas em meio MS 0,5X contendo 50 mg/l canamicina. As plantas T1 (1ª geração de transformantes) que se mantiveram verdes em meio seletivo após 2 semanas foram transferidas para substrato e crescidas em câmara de crescimento até a obtenção das sementes T2 (Anexo C). As plantas foram crescidas até a geração T3 e confirmadas por PCR utilizando a enzima *Taq DNA Polimerase* (Thermo) e os iniciadores P35S *forward* e FIP pENTR *reverse* (Anexo A e B).

3.3. Extrações de DNA e RNA

As extrações de DNA genômico de plantas foram feitas de acordo com (Edwards *et al.*, 1991). Para a obtenção das amostras de cDNA, foi feita a extração de RNA total utilizando o *Kit RNA Plant* (Qiagen). A seguir as amostras foram tratadas com TURBO DNase (Thermo) e a enzima transcriptase reversa ImProm-II (Promega) foi utilizada para a síntese da primeira fita a partir de 1 µg de RNA total, seguindo instruções do fabricante. As amostras de DNA e RNA foram quantificadas com o auxílio do equipamento *Nanodrop* 2000 (Thermo).

3.4. Análises por PCR

Para as análises de PCR foi utilizado aparelho termociclador *Bioneer*, a enzima *Taq DNA Polimerase* (Thermo) e iniciadores específicos para cada um dos genes encontrados na tabela do Anexo A e B. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1% por corridas eletroforéticas, e a visualização e captura das imagens das bandas foram feitas com o uso de Transiluminador LPix (Loccus Biotecnologia).

Para as análises de expressão por PCR em tempo real foi utilizado o aparelho da *Applied Biosystems StepOne real time PCR systems*, o reagente *Mix SYBR Green/ROX* (Fermentas), iniciadores específicos para cada gene analisado (Anexo B) e amostras de cDNA. Os valores de eficiência da amplificação foram obtidos com o auxílio do programa *LinRegPCR* (Ramakers *et al.*, 2003) e as expressões relativas foram calculadas pelo método Δ CP (Eff gene referência^{Ct} gene referência/ Eff gene interesse^{Ct} gene interesse) utilizando a expressão do gene da Actina como gene de referência (Pfaffl, 2001). Diferenças significantes entre a condição controle e a tratamento foram identificadas por asteriscos utilizando o método estatístico *t-Student* (*P* < 0,05). *One-way ANOVA* seguido de *Tukey's pairwise* (*P* < 0,05) foi aplicado para mostrar diferenças significantes entre todas as plantas em tratamentos diferentes. As medidas foram realizadas usando seis replicatas biológicas. Todos os valores de expressão relativa foram normalizados com a expressão de WT em condição controle valendo 1.

3.5. Extração de proteínas de tilacóides de folhas de arabidopsis

A extração de proteínas dos tilacóides foi realizada utilizando um método modificado (Aronsson and Jarvis, 2002) e os níveis de proteínas da fotossíntese determinadas por SDS-PAGE. Folhas de arabidopsis foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas. As amostras foram mantidas à 4°C todo o tempo. Quatro gramas (4 g) de folhas maceradas foram homogeneizadas em 20 ml de isolation buffer (0.3 M sorbitol, 5 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 20 mM HEPES/KOH, pH 8,0, 10 mM NaHCO₃) e filtradas através de 4 camadas de *Miracloth* (Calbiochem). O processo foi repetido mais uma vez com 20 ml de buffer fresco. O filtrado resultante (40 ml) foi centrifugado a 1000xg por 5 minutos e os pellets ressuspendidos em 500 µl de isolation buffer. Os cloroplastos ressuspendidos foram adicionados sobre o gradiente de Percoll e centifugados a 1500xg por 10 minutos para a separação de cloroplastos intactos. A solução de Two-step Percoll consiste de uma camada inferior (3 ml) compreendendo 2,55 ml de solução de Percoll (95% (w/v) Percoll, 3% (w/v) PEG 6000, 1% (w/v) Ficoll, 1% (w/v) BSA) mais 0,45 ml de mistura de gradiente (25 mM HEPES-NaOH, pH 8,0, 10 mM EDTA, 5% (w/v) sorbitol) e a camada superior (7 ml) com 2,94 ml solução de Percoll mais 4,06 ml de mistura de gradiente. A banda verde inferior, entre as fases, consistiu de cloroplastos intactos e a banda verde superior de cloroplastos rompidos, que são mais leves. A banda superior foi removida e descartada antes da coleta dos cloroplastos intactos com a utilização de uma ponteira de pipeta de 1ml com a ponta cortada. Os cloroplastos intactos foram coletados, lavados com 10 ml de buffer HMS (50 mM HEPES, 3 mM MgSO4 e 0,3 M sorbitol) e centrifugados a 1000xg por 5 minutos para remover o Percoll residual. O sobrenadandte foi descartado e os cloroplastos ressuspendidos com 500 µl de 50 mM Tris-HCI, pH 7,5 e vortexados para uma lise osmótica. Os tilacóides foram coletados após uma centrifugação a 3000xg por 5 minutos.

3.5.1. SDS-PAGE e immunoblot

As proteínas dos tilacóides foram separadas por SDS-PAGE 12 ou 20 % dependendo do tamanho das proteínas. Para uma melhor resolução das proteínas de baixo peso molecular foi usado géis de 20% de Bis-Acrilamida. As amostras foram resuspendidas em *4x loading blue buffer* (200 mM Tris-HCI, pH 6,8, 8% SDS, 40%

glicerol, 0,4% Azul de bromofenol), fervidas por 10 minutos e colocadas para correr dentro de uma sala fria (4°C) por duas a quatro horas, dependendo da concentração do gel. As proteínas foram transferidas para a membrana de nitroceloluse por duas horas a 100V com marcador de proteínas PageRuler Plus Prestained (10-250 kDa, Thermo) como guia. As membranas foram blogueadas por 30 minutos com TBS-Tween buffer contendo 10% de leite desnatado. As proteínas foram imunodetectadas com anticorpos específicos da empresa Agrisera, com excessão do anticorpo anti-FIP produzido durante este trabalho. As proteínas testadas e as diluições utilizadas foram as seguintes: proteínas do complexo do citocromo bef PetA (1:5000), PetB (1:5000), PetC (1:10000) e PetD (1:5000), fotossistema II PsbA (1:5000), PsbB (1:2000), PsbD (1:5000), PsbE (1:5000) e PsbO (1:5000), fotossistema I PsaA (1:5000) e PsaB (1:1000), Plastocianina (PC, 1:2000), FIP (1:1000) e FtsH5 (1:5000), seguido pela incubação com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG-HRP (horseradish peroxidase, Bio-Rad) na diluição 1:10000 e resolvido com o reagente fluorescente ECL western blotting detection (VWR). A intensidade das bandas dos immunoblots foram calculadas com o auxílio da ferramenta de análise de géis do software ImageJ.

3.6. Medidas de fluorescência de clorofila

Os parâmetros de fluorescência da clorofila do PSII foram medidos em plantas adaptadas ao escuro com a versão *MAXI* do *IMAGING-PAM M-Series chlorophyll fluorescence system* (Heinz-Walz), como descrito por (Lu *et al.*, 2008). Os parâmetros de fluorescência FV/FM (*maximum quantum yield*) foram medidos usando pulsos de 10-µs de luz a 430-nm e filtros apropriados para transmitir luz vermelha. Luz actínica (531 µmol photons m⁻² s⁻¹) foram ligadas por 715 segundos. Durante o tratamento de luz actínica 36 pulsos de saturação (2800 µmol photons m⁻² s⁻¹) foram implementados a cada 20 segundos. Ao final da iluminação actínica, a recuperação de FM foi examinada por 14 minutos. Durante o período de relaxamento, 16 pulsos de saturação foram implementados com os intervalos crescendo exponencialmente.

Medidas de fotoinibição do P700 do PSI foram realizadas em folhas destacadas de plantas adaptadas ao escuro com o sistema de medição Dual-PAM-100 (Heinz Waltz), como descrito por (Nath *et al.*, 2016). Oxidação do P700 induzida por luz vermelha-distante (ΔA830m) é calculada como a diferença da absorbância antes e depois de 25 segundos de iluminação com luz vermelha-distante saturada (720 nm na

intensidade máxima de luz). Após atingir o nível estacionário de oxidação do P700 por luz vermelha-distante, pulsos rápidos de recuperação de luz branca saturada, simples e múltiplos, foram aplicados.

Essas medidas foram realizadas em colaboração com a Prof. Dr. Yan Lu da Western Michigan University, USA.

3.7. Análises de tolerância à estresse em plantas

Para as análises de tolerância à estresse com plantas de três semanas, as linhagens superexpresssando o gene *FIP* (OE), mutantes *knockdown (fip)* e linhagem selvagem (WT) foram crescidas em câmara de crescimento num regime de 16 horas luz (120 µmol m⁻² s⁻¹) e 8 horas escuro à 22°C, regadas a cada dois dias, com água destilada ou meio MS 1X, alternadamente. Para o tratamento de estresse luminoso, as plantas foram transferidas após as três semanas para a condição de alta luminosidade (400 µmol m⁻² s⁻¹) sob o mesmo regime de luz/escuro, temperatura e irrigação. Para o tratamento de estresse osmótico, as plantas de três semanas foram suprimidas com 300 mM de manitol. Após 24 horas as folhas das plantas foram tempo-real. A lista dos genes analisados e as sequências dos iniciadores específicos se encontra no Anexo B.

Para entender o efeito fenotípico do estresse luminoso em plantas de três semanas, após a coleta do material para as análises de PCR em tempo-real, algumas plantas foram mantidas por mais 10 dias sob alta luminosidade (400 μ mol m⁻² s⁻¹) e o mesmo regime de luz/escuro, temperatura e irrigação.

Para os ensaios de estresse com plantas de 7 dias, sementes das plantas OE, mutantes *fip* e WT foram esterilizadas e plaqueadas em meio MS 0,5X sólido (Phyto Technology Lab.) e mantidas à 4°C por dois dias. As placas foram então transferidas para a condição controle num regime de 16 horas luz (120 µmol m⁻² s⁻¹) e 8 horas escuro à 22°C por sete dias, e então as plantas foram submetidas a diferentes tratamentos de estresse por mais dez dias. As concentrações de paraquat (metil viologênio) para o estresse oxidativo foram de 0,01, 0,05, 0,1 e 0,2 µM. As concentrações de manitol para o estresse osmótico foram de 25, 50, 100 e 150 mM. As concentrações de NaCl para o estresse salino foram de 25, 50, 100 e 150 mM. O comprimento médio das raízes foi calculado considerando a diferença entre o comprimento antes e depois do tratamento de todas as repetições de um tratamento independente. *One-way ANOVA* seguido de *Tukey's pairwise* (P < 0,05) foi aplicado para mostrar diferenças entre todas as plantas em diferentes concentrações do mesmo tratamento.

3.8. Ensaios de duplo-híbrido em levedura (Y2H)

3.8.1. Seleção de proteínas interagentes com FIP

A linhagem de Saccharomyces cerevisiae AH109 (*MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4 gal80 LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ*) foi usada para os testes de Y2H (*Yeast-two Hybrid*) iniciais. As transformações foram realizadas utilizando o método LiAc/SS carrier DNA/PEG (Gietz and Schiestl, 2007). Os testes utilizaram o gene *FIP* clonado no vetor pGBKT7 (Clontech) como isca, e a biblioteca de cDNA CD4-10 de *A. thaliana* clonada no vetor pACT como presa. Estas construções já estavam prontas no laboratório (Rodrigues, 2011). Como controle positivo foi utilizada a interação de FIP e FtsH5 (Lopes *et al.*, 2018). Como controle negativo da transformação, o procedimento foi realizado sem vetores e como controle negativo da de interação foi utilizada a linhagem transformada com os vetores pGBKT7 e pGADT7 vazios.

Após a transformação de AH109 com isca e presa, as células foram plaqueadas em meio SC (*synthetic complete*) na ausência de triptofano e leucina (-trp-leu) e incubadas a 30°C por dois a quatro dias. As colônias obtidas foram estriadas em placas contendo meio SC na ausência de triptofano, leucina, histidina e adenina (-trp-leu-his-ade) e incubados a 30°C por 48 h para a confirmação da interação. As colônias positivas tiveram o DNA plasmidial isolado da levedura (Hoffman and Winston, 1987) e foram re-transformados em células competentes de *E. coli* para multiplicação do material genético. Os clones resultantes foram submetidos à extração de DNA plasmidial segundo protocolo presente em (Ausubel, 1994) e sequenciamento. As sequências encontradas interagindo com FIP, foram identificadas por BlastN no NCBI utilizando o banco de dados de *Arabidopsis thaliana* como referência para a identificação dos genes. O resultado se encontra na tabela 2.
3.8.2. Confirmação das interações de FIP

Para a segunda etapa dos ensaios de Y2H, foram testadas par-a-par as interações de FIP, clonada no vetor pDEST32, com as proteínas de localização cloroplastidial da tabela 2, no vetor pDEST22 (Gateway). Foi utilizada a linhagem de *S. cerevisiae* MaV203 (*MATa, leu2-3,112, trp1-901, his3* Δ 200, ade2-101, gal4 Δ , gal80 Δ , SPAL10::URA3, GAL1::lacZ, HIS3UAS GAL1::HIS3@LYS2, can1^R, cyh2^R) do Sistema ProQuestTM Two-Hybrid da tecnologia Gateway (Vidal *et al.*, 1996). As transformações foram realizadas segundo o manual. Os controles utilizados foram: as interações da proteína FIP e da protease FtsH5 (AT5G42260) como positivo de interação, ambos os vetores vazios como negativo de interação e a linhagem MaV203 sem nenhum vetor como controle negativo da transformação.

Após a transformação de MaV203 com isca e presa, as células foram plaqueadas em meio SC-trp-leu e incubadas a 30°C por 2 a 4 dias. As colônias obtidas foram repicadas em placas contendo meio SC-trp-leu-his+3AT (3-Amino-1,2,4-Triazole) nas concentrações de 50 e 100 mM e incubados a 30°C por 48 h para a confirmação da interação. O reagente 3AT seleciona interações médias e fortes na linhagem MaV203.

3.9. Produção e purificação da proteína recombinante 6xHis-FIP

A produção da proteína recombinante 6xHis-FIP, a sequência codificante da porção solúvel de FIP (nucleotídeos 235 a 387) foi clonada no vetor de expressão em bactéria pDEST17 (Gateway) e transformada na linhagem de *E. coli BL21 CodonPlus.* As células foram crescidas até uma OD de 0,6 a 600nm e então foram induzidas na presença de 1mM de IPTG (isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside) por cinco horas à 30°C.

3.9.1. Purificação da proteína 6xHis-FIP em condições nativas

A purificação de 6xHis-FIP em condições nativas foi realizada seguindo as instruções do protocolo *QIAexpressionist* (Qiagen). As células foram tratadas com lisozima por 1 hora em gelo seguidas de 10 pulsos de 10 segundos de sonicação para o rompimento da parede celular das bactérias. O lisado foi clarificado por

centrifugação à 10000xg por 20 minutos à 4°C. O supernadante foi passado na coluna de resina de níquel (Ni-NTA, Qiagen). A coluna foi lavada com tampão fosfato contendo 50 mM de Imidazol, e as proteínas foram eluídas com o mesmo tampão contendo 250 mM de Imidazol. As amostras foram dializadas para a remoção do Imidazol e concentradas usando os filtros *Microsep Advance Centrifugal device* (1K filter, Pall). A concentração das proteínas purificadas foi medida usando o reagente para *Bradford* (Bio-Rad) e a absorbância lida no comprimento de onda de 595 nm.

3.9.1.1. Ensaio de estado redox das cisteínas in vitro

Para testar o estado redox das cisteínas das proteínas 6xHis-FIP, DnaJ (MyBiosourse) e Tiorredoxina (sigma) em condição neutra (em tampão 50 mM Tris-HCI, pH 7,5), as proteínas foram primeiramente tratadas com 100 mM de DTT (DL-Dithiothreitol) por uma hora no gelo. O DTT foi então removido por troca de *buffer* utilizando os filtros *Microsep Advance Centrifugal devices* (1K filter, Pall) e o *buffer* 50 mM Tris-HCI, pH 7,5, e as proteínas foram em seguida incubadas com 10 mM de AMS (4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'- disulfonic acid) por 90 minutos em temperatura ambiente (T.A.). Para a determinação do estado redox as proteínas foram resolvidas em SDS-PAGE 20% e visualizadas corando os géis com *Coomassie Brilliant Blue*.

3.9.1.2. Ensaio de redução de insulina

Foi medida a atividade redutora da proteína recombinante 6xHis-FIP. O teste consistiu no monitoramento da redução da insulina por meio do aumento da densidade ótica (OD) da solução num comprimento de onda de 650 nm. Proteínas com atividade redutase quebram a molécula de insulina, reduzindo a ligação dissulfeto que une as cadeias A e B da insulina, promovendo a precipitação da cadeia B e consequentemente o aumento da turbidez da solução (Holmgren, 1979). A mistura da reação com um volume final de 1 ml contém 100 mM de fosfato de sódio pH 7,5, 2 mM de EDTA, 130 µM de insulina bovina (Sigma), e 10 µM da proteína 6xHis-FIP. A reação foi iniciada pela adição de 330 µM de DTT na mistura e a mudança da turbidez da solução foi monitorada à 650 nm à 25 °C por 60 minutos. O controle negativo não enzimático da redução da insulina foi a reação contendo apenas DTT. Como controle

positivo da atividade redutase foi utilizada a proteína Tiorredoxina de *E. coli* (Sigma) numa concentração final de 5 µM.

3.9.2. Purificação da proteína 6xHis-FIP em condições desnaturantes

Após a etapa de indução células foram centrifugadas e o *pellet* ressuspendido em tampão de Uréia pH 8,0 (100 mM NaH2PO4, 10 mM Tris-HCI, 8 M uréia) sob agitação por 40 minutos e lisadas sob pressão de 1500 psi em bomba de ruptura celular por pressão de gás nitrogênio (Parr Instruments Co), seguido de centrifugação à 10000xg por 20 minutos à 4°C. O supernadante foi passado na coluna de resina de níquel (Ni-NTA, Qiagen). Após a ligação da proteína na resina de níquel, esta foi lavada com tampão de Uréia pH 6,3 e eluída em tampão de Uréia pH 3,3. A proteína foi dialisada contra 40 litros de tampão de Bicarbonato de Amônio 50 mM durante cinco dias e então liofilizada. O produto final foi pesado em balança analítica de cinco casas para a determinação do peso.

3.9.2.1. Produção do anticorpo anti-FIP

Para a produção do anticorpo anti-FIP, a proteína recombinante 6xHis-FIP purificada sob condições desnaturantes foi identificada por Espectrometria de Massas (BIOMASS/CEFAP/USP). Para a identificação a proteína foi primeiramente digerida com Tripsina em buffer de digestão (50 mM NH4HCO3, 10% acetonitrila) por 16h à 37°C. A digestão foi interrompida pela adição de 10% de ácido fórmico. A seguir foi realizada uma etapa de dessalinização com a utilização de ponteiras *Zip-Tip C*₁₈ *Cartridge column* (Millipore) seguindo as recomendações do laboratório responsável pela identificação. Foi enviado aproximadamente 2 mg de proteína digerida e dessalinizada para a identificação. Após a confirmação da proteína recombinante FIP, ela foi enviada para o Laboratório de Imunologia do Centro de Biotecnologia – UFRGS (RS/Brasil) para a produção do anticorpo. O período de produção do anticorpo foi de dois meses.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção de plantas mutantes fip e superexpressoras (OE) de FIP

Para entender o papel de FIP, o primerio passo desse trabalho foi obter plantas mutantes para FIP e plantas com altos níveis de expressão de FIP. Dois mutantes independents para o gene FIP (fip) foram obtidos do banco de sementes do ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center, Ohio, USA), sendo eles as linhagens Salk 080769C (fip-1) e 069143C (fip-2). Ambos mutantes possuem uma inserção de T-DNA localizada no íntron do gene FIP nas posições +303 e +425 a partir do códon de início da tradução (+1) e antes do domínio dedo-de-zinco (Figura 9A). A inserção de T-DNA foi confirmada por PCR usado os iniciadores representados na Figura 9A, listados na tabela do Anexo B. Os géis resultantes das reacões de PCR para a seleção dos mutantes podem ser vistos na Figura 9B e em mais detalhes no Anexo D. Os mutantes fip-1 e fip-2 apresentaram, respectivamente, quatro e 14 vezes menos transcritos FIP quando analisados pela técnica de PCR em tempo real (Figura 10A) em comparação com as plantas selvagens (WT). O nível de transcritos por PCR (Figura 10B), assim como o acúmulo de proteínas FIP, também foi menor nos mutantes fip (Figura 10C). Detalhes da produção do anticorpo anti-FIP podem ser vistos no Anexo G. Nenhuma alteração significativa pode ser observada nas plantas mutantes fip quanto ao acúmulo de transcritos de *FtsH5* e *D1* (Figura 10B) ou dessas proteínas (Figura 10C) quando comparadas com plantas WT e OE.



Figura 9. Confirmação dos mutantes *fip.* (A) Diagrama do gene FIP (At5g02160) em Arabidopsis. Éxons são representados por caixas sólidas pretas. O íntron único do gene FIP é representado por uma linha contínua preta. As regiões intergênicas são representadas por linhas preta pontilhadas. Os resíduos de cisteína do dedo-de-zinco são representados por caixas sólidas amarelas. Os sítios de inserção de T-DNA no íntron do gene FIP nas linhagens mutantes SALK 080769C (*fip-1*) e 069143C (*fip-2*) são nas posições +303 e +425, respectivamente. Os sítios de anelamento dos iniciadores LP, RP e LBb3.1 utilizados para confirmar os mutantes estão assinalados. (B) Confirmação dos mutantes *knockdown*. Um fragmento de 307 pb foi amplificado usando os iniciadores LP e RP nas plantas WT. Um fragmento de 512 ou 390 pb foi amplificado usando os iniciadores RP e LBb1.3 em plantas mutantes homozigotas *fip-1* e *fip-2*, respectivamente; e nenhuma amplificação foi esperada usando os iniciadores LP e LBb1.3, considerando uma orientação upstream do T-DNA. Adaptado de LOPES et al., Frontiers in Plant Science, 2018.

Duas linhagens independentes de plantas de arabidopsis superexpressando o gene *FIP* foram obtidas e são chamadas OE-1 e OE-2 neste trabalho. As duas plantas OE apresentam 40 e oito vezes mais transcritos do gene *FIP*, respectivamente, quando comparadas com as plantas WT crescidas em condição controle por três semanas (Figura 10A e 10B). O acúmulo de proteínas FIP parece ser mais alto nas plantas OE do que em WT (Figura 10C). Não foi observado diferença significativa nas plantas OE quanto ao acúmulo dos transcritos de *FtsH5* e *D1* (Figura 10B) e das proteínas FtsH5 e D1 (Figura 10C) quando as plantas foram comparadas com os mutantes *fip* ou plantas WT. Nenhuma diferença fenotípica foi observada entre as plantas mutantes *fip*, OE e WT quando crescidas em condição controle por 3 semanas (Figura 10D).



Figura 10. Caracterização de plantas FIP. (A) A expressão relativa de FIP em plantas selvagens (WT) é 1 quando comparado com as plantas OE-1 e OE-2 ou com as plantas mutantes *fip-1* e *fip-2*. As expressões relativas foram obtidas por PCR em tempo real e calculadas pelo método de Δ CP usando actina como gene de referência. Valores foram normalizados em relação à expressão da planta WT como 1. Valores são médias ± EP (n = 6). Diferenças estatisticamente significativas são indicadas por asteriscos (*) usando o método *t-Student* (P < 0.05) comparando as plantas OE ou mutantes *fip* com as plantas WT. (B) Perfis de acumulação de mRNA de *FIP*, *FtsH5* e *D1* nas plantas WT, OE e mutantes *fip* crescidas em condições controle por 3 semanas, determinado por PCR e visualizadas em gem de agarose 1%. Expressão da *ACTINA* foi usada como controle. (C) Perfis de acumulação de proteínas FIP, FtsH5 e D1 nas plantas WT, OE e mutantes *fip* crescidas em condições controle por 3 semanas, determinado por PCR e visualizadas em gem de agarose 1%. Expressão da *ACTINA* foi usada como controle. (C) Perfis de acumulação de proteínas FIP, FtsH5 e D1 nas plantas WT, OE e mutantes *fip* crescidas em condições controle por 3 semanas, determinado por *immunoblot*. (D) Fenótipo das plantas FIP crescidas em condições controle por 3 semanas. Adaptado de LOPES et al., Frontiers in Plant Science, 2018.

Foram obtidas duas linhagens de plantas mutantes *knockdown fip, fip-1* e *fip-2,* expressando, respectivamente, quatro e 14 vezes menos *FIP* do que plantas WT e duas linhagens superexpressando *FIP,* OE-1 e OE-2, expressando 40 e oito vezes mais *FIP* do que plantas WT. Essas plantas serão usadas em experimentos seguintes para a caracterização da função de *FIP* nas plantas.

4.2. Efeito da superexpressão e da baixa expressão de FIP no acúmulo de proteínas dos complexos PSII, PSI e Citocromo *b*₆*f* em folhas de arabidopsis

Plantas *FIP* (OE e *fip*) quando crescidas sob condição controle não apresentam nenhuma diferença fenotípica óbvia. No entanto, ambas linhagens superexpressando *FIP*, OE-1 e OE-2, apresentaram níveis de transcritos *FIP* e de proteína significantemente mais altos, e ambos mutantes mostraram níveis extremamente

baixos quando comparados com plantas selvagens (WT). Para investigar se esta diferença nos níveis de transcritos e proteínas nas plantas *FIP* afetavam a abundância das subunidades dos complexos fotossintéticos foram realizados *immunoblots* com membranas de tilacóides purificados.

Os *immunoblots* foram realizados utilizando anticorpos específicos contra diferentes proteínas de tilacóides como proteínas do complexo citocromo *bef* (PetA, PetB, PetC e PetD), proteínas do fotosistema II (PsbA, PsbB, PsbD, PsbE e PsbO), proteínas do fotosistema I (PsaA e PsaB) e Plastocianina (PC). Nenhuma diferença foi detectada no acúmulo de proteínas do complexo citocromo *bef* e PSII entre todas as plantas. Por outro lado, houve um decréscimo significativo no acúmulo de proteínas do PSI e PC nas plantas mutantes quando comparados com as plantas WT nas mesmas condições. O mutante *fip-1* acumulou 70% menos proteína PsaA e 60% menos proteína PC do que plantas WT. O mutante *fip-2* acumulou 60% menos proteína PsaA e 90% menos proteína PC do que plantas WT. Ambos mutantes acumularam 50% menos proteína PsaB do PSI quando comparados com plantas WT (Figura 11).



Figura 11. Acúmulo de proteínas dos tilacóides em plantas expressando diferentes níveis de FIP. WT= plantas selvagens, OE= plantas superexpressando o gene FIP, fip= plantas mutantes knockdown para o gene FIP. Foram analisados o acúmulo de proteínas do complexo citocromo *ba*f (PetA, PetB, PetC e PetD), fotossistema II (PsbA, PsbB, PsbD, PsbE e PsbO) e fotossistema I (PsaA e PsaB), além dos níveis de Plastocianina (PC), FIP e da protease FtsH5. As proteínas foram isoladas pelo método Two-step Percoll e separadas em SDS-PAGE 12 ou 20%. Cada coluna corresponde a 10 µg de proteínas totais aplicadas no gel. Os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulos e antes da imunodetecção utilizando os anticorpos específicos para cada uma das proteínas. Todos anticorpos utilizados foram adquiridos da empresa AGRISERA, exceto pelo anticorpo anti-FIP produzido durante o doutorado da aluna Karina L. Lopes.

A fim de verificar se a baixa acumulação das proteínas do PSI e PC impactavam de alguma forma a capacidade fotossintética dos mutantes *fip*, foram realizadas medidas da eficiência da fluorescência do PSII e da oxidação do centro de reação P700 do PSI como indicação da função desses complexos fotossintéticos. As medidas de Δ A830m do PSI e de Fv/Fm do PSII comparando plantas OE e mutantes *fip* com plantas WT nas condições de crescimento não foram significantemente diferentes (Tabela 1), indicando que o menor acúmulo das proteínas PsaA, PsaB e PC nos mutantes *fip* não afeta a eficiência fotossintética dessas plantas.

	PSII 5 semanas Fv/Fm		PSI 5 semanas ΔA830m	
	AVE	SE	AVE	SE
WT	0.781	0.003	0.239	0.009
fip-1	0.779	0.002	0.226	0.012
fip-2	0.788	0.003	0.260	0.014
OE1	0.766	0.006	0.241	0.010
OE2	0.780	0.003	0.202	0.007

Tabela 1: Eficiência da fotossíntese em plantas FIP de 5 semanas.

Parâmetros de fluorescência do PSII foram calculados baseados no cálculo Fv/Fm= (Fm-F0)/ Fm, onde F0 é a emissão inicial da fluorescência após o período de adaptação ao escuro e imediatamente antes do pulso de saturação, Fm é a emissão de fluorescência máxima imediatamente após o pulso de saturação, e o parâmetro de fluorescência variável, Fv = Fm-F0. A indução da oxidação do centro de reação P700 por luz vermelha-distante (ΔA830m) foi calculado como a diferença da absorbância antes e depois da iluminação saturante de 25 seg por luz vermelha-distante (720 nm). Os valores são médidas (AVE) e (SE) como o erro padrão, onde n=4 para os parâmetros de fluorescência da clorofila, e n= 6-9 para a foto-oxidação do centro de reação P700.

4.3. Plantas expressando baixos níveis de FIP são mais tolerantes à estresses abióticos

Os efeitos fenotípicos e na acumulação de transcritos de FIP foram avaliados nas plantas OE e mutantes fip em comparação com as plantas WT submetidas a diferentes condições de estresse abiótico. A expressão de FIP foi diminuida em todas as plantas após 24 horas de exposição aos estresses de alta luminosidade (400 µmol m⁻² s⁻¹) e osmótico (300 mM de manitol) quando avaliada por PCR em tempo real (Figura 12A). Nas plantas WT a redução nos níveis de transcritos de FIP foi de 40% em decorrência da alta luminosidade e de 60% devido ao estresse osmótico provocado pela elevada concentração de manitol. Ambas as plantas OE apresentaram uma redução de 50% nos transcritos de FIP tanto no tratamento de alta luminosidade, quanto na presença de manitol. Os mutantes fip, fip-1 e fip-2, foram os mais afetados quanto ao acúmulo de transcritos FIP, pois tiveram, respectivamente, uma redução de 55 e 45% nos transcritos sob alta luminosidade, e 90 e 85% de redução em exposição ao manitol. Os resultados foram apresentados em gráficos com escalas diferentes, pois os níveis de expressão de FIP iniciais nas plantas são diferentes. Diferenças fenotípicas foram observadas nos mutantes fip submetidos ao estresse de alta luminosidade por 10 dias quando comparados com plantas OE e WT nas mesmas



condições. Plantas mutantes *fip* mostraram-se mais verdes por mais tempo, indicando uma melhor adaptação ao estresse de alta luminosidade (Figura 12B).

Figura 12. Mutantes *fip* **são mais tolerantes a estresse abiótico.** Plantas de 3 semanas crescidas em condição controle (22°C, 16h/ 8h dia/noite, 120 µmol m⁻² s⁻¹) foram submetidas a estresse de alta luminosidade (400 µmol m⁻² s⁻¹) ou osmótico (300 mM of manitol). **(A)** Expressão de FIP diminuida sob estresse luminoso e osmótico após 24 horas de exposição. As expressões relativas foram obtidas por PCR em tempo real e calculadas pelo método de Δ CP usando actina como gene de referência. Valores foram normalizados em relação à expressão da planta WT como 1. Valores são médias ± EP (n = 6). Diferenças estatisticamente significativas são indicadas por asteriscos (*) usando o método t-Student (P < 0,05) comparando as plantas OE ou mutantes *fip* com as plantas WT. **(B)** Efeito do estresse de alta luminosidade em plantas FIP. Plantas foram mantidas em condição de alta luminosidade por mais 10 dias (22°C, 16h/ 8h dia/noite, 400 µmol m⁻² s⁻¹). Adaptado de LOPES et al., Frontiers in Plant Science, 2018.

O efeito de estresse oxidativo, osmótico e salino no desenvolvimento de folhas e raízes foi avaliado em plantas OE, mutantes *fip* e WT de 7 dias em placas contendo meio semi-sólido MS 0,5X e diferentes concentrações de paraquat, manitol ou NaCI.

As plantas quando crescidas sob as concentrações de 0,01 e 0,05 μ M de paraquat não apresentaram nenhuma diferença fenotípica. No entanto quando as plantas foram crescidas numa concentração de 0,1 μ M de paraquat, os mutantes *fip* apresentaram uma maior área foliar quando comparados com WT e OE-1 na mesma concentração (Figura 13A). Nenhuma diferença foi visível entre as partes aéreas de plantas sob 0,2 μ M de paraquat, mas os mutantes *fip* apresentaram raízes duas e três vezes mais longas do que as plantas OE-1 e WT, respectivamente (Figura 13A, 13B

e 13C). Nenhuma diferença fenotípica foi observada entre as folhas e raízes de plantas quando crescidas na presença de diferentes concentrações de manitol (Figura 13D, 13E e 13F). Por outro lado, as folhas das plantas mutantes *fip* ficaram claramente mais verdes do que OE-1 e WT, ao final do tratamento com 50 e 100 mM de NaCl (Figura 13G), e as raízes das plantas *fip* estavam estatisticamente mais longas e ramificadas sob 100 mM de NaCl, com comprimentos de raízes três vezes mais longas do que plantas WT (Figura 13H e 13I).

Foi avaliado o acúmulo de transcritos de genes de resposta à estresse por PCR em tempo real nas mesmas amostras de folhas de plantas WT, OE e mutantes fip analisadas na figura 12A, comparando as plantas expostas aos estresses com plantas em condição controle (Figura 14). A acumulação de transcritos FtsH5 não teve diferença significativa comparando-se todas as plantas nas três condições de tratamento (controle, alta luminosidade e excesso de manitol) (Figura 14A). Transcritos do gene Heat Shock Protein 60 (HSP60-2) foram induzidos nas plantas WT duas vezes sob os estresses de luz e manitol, e duas e três vezes mais, respectivamente, nas plantas OE sob os estresses de luz e manitol, em comparação à condição controle (Figura 14B). O mesmo padrão de resposta foi observado no acúmulo de transcritos do gene Alternative Oxidase 1A (AOX1a) em resposta ao excesso de luz (Figura 14C). Todas as plantas FIP induziram transcritos de Cu-Zn Super Oxide Dismutase (Cu-Zn-SOD) quando expostas a 300 mM de manitol, sendo esse aumento de três vezes nas plantas WT, de cinco e três vezes e meia nas plantas OE, e de duas e uma vezes nas plantas mutantes *fip* (Figura 14D). O aumento do nível de transcritos dos genes responsivos a estresse nas plantas selvagens (WT) confirmaram a eficiência dos tratamentos.



Figura 13. Plantas mutantes fip são mais tolerantes a estresse abiótico em placas. Plantas de WT, OE-1 e fip-1 foram crescidas por 7 dias em placas contendo meio sólido MS 0,5X e então transferidas para os diferentes tratamentos por mais 10 dias. As placas foram mantidas sob condições controladas de 22°C, 16h dia/8h noite, 120 µmol m⁻² s⁻¹. (A) Folhas de plantas submetidas a estresse oxidativo na presença de 0,01; 0,05; 0,1; e 0,2 µM de paraquat. (B) Efeito de 0,2 µM de paraquat no crescimento de raiz. (C) Média de crescimento de raízes submetidas a estresse oxidativo sob diferentes concentrações de paraguat. (D) Folhas de plantas submetidas a estresse osmótico na presenca de 25, 50, 100, e 150 mM de manitol. (E) Efeito de 100 mM de manitol no crescimento de raiz. (F) Média de crescimento de raízes submetidas a estresse osmótico sob diferentes concentrações de manitol. (G) Folhas de plantas submetidas a estresse oxidativo na presença de 25, 50, 100 e 150 mM de NaCl. (H) Efeito de 100 mM de NaCl no crescimento de raiz. (I) Média de crescimento de raízes submetidas a estresse salino sob diferentes concentrações de NaCl. Os testes foram realizados em triplicatas em três eventos distintos com resultados idênticos. Medidas do comprimento de raízes são médias ± EP (n = 6). Diferencas significativas são indicadas por letras diferentes (One-way ANOVA seguido de Tukey, P < 0,05). Barra de escala (branca) nas placas medem 1 cm. Adaptado de LOPES et al., Frontiers in Plant Science, 2018.





4.4. FIP interage com proteínas envolvidas na fotossíntese em ensaio de duplo híbrido de levedura

FIP foi identificada pela primeira vez interagindo com o complexo FtsH em arabidopsis pela técnica de duplo híbrido de levedura (Y2H, do inglês *yeast two-hybrid*) mais especificamente com a proteína FtsH5 (Rodrigues, 2011). Devido ao fato de FIP ser membro de uma família de proteínas dedo-de-zinco tipo DnaJ, a família DNAJE1 (Pulido and Leister, 2018), na qual vários membros apresentam atividade tiol-dissulfeto oxidorredutase, achou-se interessante procurar outras possíveis interações de FIP em arabidopsis. Sendo assim, foram realizados ensaios de Y2H utilizando vetores disponíveis no laboratório (Rodrigues, 2011), com *FIP* clonada no vetor pGBKT7 (Clontech) como isca e a biblioteca de ESTs CD4-10 de *A. thaliana* clonada no vetor pACT como presa.

Após a transformação da linhagem de *S. cerevisiae* AH109 com isca e presa, as células foram plaqueadas em meio SC-trp-leu. A transformação resultou em 4 placas com aproximadamente 90 colônias cada, num total de 360 colônias. Estas colônias foram estriadas em meio SC-trp-leu-his-ade para a confirmação das interações, sendo que todas cresceram e foram consideradas positivas e 60% dessas foram sequenciadas utilizando os iniciadores pACT *forward* e *reverse* (Anexo B).

O resultado do sequenciamento é apresentado na tabela 2 e mostra proteínas deduzidas de funções e localizações subcelulares diferentes. Para a seleção de candidatos em potencial foram selecionadas proteínas que possuiam a mesma localização de FIP. Foram selecionadas seis proteínas de localização cloroplastidiais envolvidas na fotossíntese exclusivamente (AT1G76100, AT2G34430, AT4G05180, AT4G10340, AT4G21280 e AT5G54270).

Tabela 2: Resultado do sequenciamento das colônias obtidas da transformação de uma biblioteca de cDNA de *A. thaliana* (presas) na linhagem de *S. cerevisiae* expressando a proteína FIP (isca), clonada no vetor pGBKT7. Localizações subcelulares preditas pelo TAIR: MP= membrana plasmática, CL= cloroplasto, MT= mitocôndria, NC= núcleo, CG= complexo de golgi, PC= parede celular, AP= apoplasto, RB=ribossomo, VC= vacúolo, CT= citoplasma.

Gene	Nome TAIR	Função	Localização
AT1G02150	Tetratricopeptídeo (TPR)-like	Organização do cloroplasto	CL, MT
AT1G05850	Quitinase	Ligação a polissacarídeos	CG, AP
AT1G30820	CTP sintase	Atividade CTP sintase	СТ
AT1G47128	Granulina protease	Proteolítica, glicolítica	AP, CL, MP, VC
AT1G53420	Quinase rica em leucina	Ligação a ATP	MP
AT1G66200	Glutamina sintase	Ligação a cobre	CL, CT, RB, VC
AT1G73930	Desconhecida	Desconhecida	CL
AT1G76100	Plastocianina 1	Fotossíntese	CL
AT2G34430	LHCII subunit B1	Fotossíntese	CL
AT3G26782	Tetratricopeptídeo (TPR)-like	Desconhecida	MT
AT3G41768	RNA ribossomal	Tradução	RB
AT3G46060	RAB GTPase 8A	Ligação a GTP	CG, MP, VC
AT3G49720	Desconhecida	Desconhecida	CG, CL, MP, VC
AT4G05180	PSII subunidade Q-2	Fotossíntese	CL
AT4G10160	RING/U-box	Ubiquitinação de proteínas	MP, NC
AT4G10340	LHCII subunidade 5	Fotossíntese	CL
AT4G14940	Amina oxidase 1	Oxirredução, síntese de parede	PC
AT4G21280	PSII subunidade QA	Fotossíntese	CL
AT4G24270	Embrião defectivo 140	Processamento de RNA	NC
AT4G34260	1,2-alfa-L-fucosidase	Atividade 1,2-alfa-L-fucosidase	AP
AT5G06380	Desconhecida	Desconhecida	NC
AT5G35535	Transposon	Desconhecida	
AT5G47910	Oxidase D respiratória	Desconhecida	CG, MP, NC
AT5G54270	LHCII B-binding protein 3	Fotossíntese	CL
AT5G60710	Proteína dedo-de-zinco (C3HC4)	Ligação a zinco	MP
AT5G61290	Monooxigenase Flavina-binding	Ligação a NADP, NADPH, FAD e atividade monooxigenase	NC
ATCG00920	16S RNA ribossomal	Síntese de proteína	RB
ATCG01180	23S RNA ribossomal	Tradução	RB

Para testar as interações encontradas com FIP par-a-par, foi utilizada a linhagem de *S. cerevisiae* MaV203. Devido ao fato de FIP interagir com a protease FtsH5, do complexo FtsH na membrana dos tilacóides, e este complexo ser responsável pela degradação da proteína D1 do PSII, foi testada a interação de FIP com a proteína D1. Foi visto que FIP tem uma interação forte com a proteína D1, crescendo em todas as diluições de células, tanto em 50 quanto em 100 mM de 3AT (Figura 15). As seis proteínas cloroplastidiais resultantes dos ensaios iniciais de interação proteína-proteína tiveram as sequências nucleotídicas clonadas no vetor pDEST22 e tiveram a interação com FIP testada (Figura 15). Os resultados dessas interações foram positivos, pois as células são capazes de crescer nas duas concentrações de 3AT no meio (50 e 100 mM). As interações ainda serão confirmadas em experimento de *GST-Pull down*.



Figura 15. FIP interage com proteínas cloroplastidiais in vitro usando o sistema *ProQuest Two-Hybrid* (Gateway). Os vetores pDEST32 e pDEST22 vazios foram utilizados como controle negativo de interação. Como controle positivo de interação foi utilizado FIP no vetor pDEST32 e FtsH5 no vetor pDEST22. A interação de FIP foi testada com as proteínas D1, AT1G76100, AT2G34430, AT4G05180, AT4G10340, AT4G21280 e AT5G54270. Placas de meio SC (synthetic complete) na ausência de triptofano e leucina (-trp-leu) foi utilizado como meio mínimo. Placas SC na ausência de triptofano, leucina, histidina e adição de 3-amino-1,2,4-triazole (3AT) nas concentrações de 50 e 100 mM foram usadas para selecionar interações médias e fortes entre as proteínas. As gotas são diluições seriadas das células de 0, 10 e 100 vezes. As placas foram incubadas a 30°C por 48h.

4.5. Investigando a interação de FIP com as FtsHs tipo A

Em experimentos anteriores nosso grupo encontrou a proteína FIP interagindo com o complexo FtsH nos tilacóides dos cloroplastos (Rodrigues, 2011). A interação de FIP foi testada com a proteína FtsH tipo A (FtsH5) e a tipo B (FtsH2). FIP interagiu somente com o tipo A (Rodrigues, 2011). Porém, análises filogenéticas mostraram a coevolução de *FIP* com FtsH tipo A, não com o tipo B (Silva, 2015). Tentando entender esta interação preferencial de FIP com a FtsH do tipo A, foi realizada uma análise comparativa das sequências das FtsHs dos tipos A e B de Arabidopsis, além das sequências de FtsHs de outros organismos (Figura 16). Todas as sequências, de bactérias a plantas, possuem motivos *Walker A* e *B* conservados, SRH (*Second Region of Homology*) e o domínio de ligação ao zinco, todos necessários para a atividade ATPase das proteases FtsH (Sakamoto *et al.*, 2002).

Ao se alinhar as sequências das FtsHs dos tipos A e B de Arabidopsis, observase a presença de duas cisteínas (*Cys*) apenas nas FtsHs do tipo A, sendo uma *Cys* dentro do domínio *Walker A* e a outra próxima a este domínio, sinalizadas por asteriscos na figura 16. Assumindo-se que esta região é importante para a interação com FIP, essas *Cys* poderiam explicar a especificidade de FIP pela FtsH5, protease do tipo A. Esta hipótese ainda precisa ser testada experimentalmente.

	Α
	*
AtftsH5 Type 4	275 YTALGAKIPKGCLLVGPPGTGKTLLARAVAGEAGVPFFSCAASEFVELFVGVGASRVRDLFEKA
AtFtsH1	YTALGAKIPKG <mark>CLLVGPPGTGKTLLA</mark> RAVAGEAGVPFFSCAASEFVELFVGVGASRVRDLFEKA
AtFtsH2 Type B	FTAVGAKIPKGV <mark>LLIGPPGTGKTLLA</mark> KAIAGEAGVPFFSISGSEFVEMFVGVGASRVRDLFKKA
AtFtsH8	FTAVGARIPKGV <mark>LLVGPPGTGKTLLA</mark> KAIAGEAGVPFFSISGSEFVEMFVGVGASRVRDLFKKA
Glycine	FTAVGARIPKGV <mark>LLVGPPGTGKTLLA</mark> KAIAGEAGVPFFSISGSEFVEMFVGVGASRVRDLFKKA
Oryza	FTAVGARIPKGV <mark>LLVGPPGTGKTLLA</mark> KAIAGEAGVPFFSISGSEFVEMFVGVGASRVRDLFKKA
Araucaria	FTAIGARIPKGVL <mark>LIGPPGTGKTLLA</mark> KAIAGEAGVPFFSISGSEFVEMFVGVGASRVRDLFKKA
Physcomitrella	FTAVGAKIPKGV <mark>LLVGPPGTGKTLLA</mark> KAIAGEAGVPFFSISGSEFVEMFVGVGASRVRDLFKKA
Selaginella	FTAVGARIPKGV <mark>LLVGPPGTGKTLLA</mark> KAIAGEAGVPFFSISGSEFVEMFVGVGASRVRDLFKKA
Chlamydomonas	FTAVGARIPKG <mark>CLLVGPPGTGKTLLA</mark> KAIAGEAGVPFFSVSGSEFVEMFVGVGASRVRDLFKKA
E. coli	FAELGARIPKGV <mark>LLVGPPGTGKTLLA</mark> KACAGEAGVPFFSISGSDFVEMFVGVGASRVRDLFENA
	BC
_	
AtFtsH5	339 KSKAP <mark>CIVFIDEIDAV</mark> GRQRGAGMGGGNDEREQTINQLLTEMDGFSGNSG <mark>VIVLAATNRPDVL</mark> D
AtFtsH1	KSKAP <mark>CIVFIDEIDAV</mark> GRQRGAGMGGGNDEREQTINQLLTEMDGFSGNSG <mark>VIVLAATNRPDVL</mark> D
AtFtsH2	KENAP <mark>CIVF</mark> V <mark>DEIDAV</mark> GRQRGTGIGGGNDEREQTLNQLLTEMDGFEGNTG <mark>VIV</mark> VAATNRADILD
AtFtsH8	KENAP <mark>CIVF</mark> V <mark>DEIDAV</mark> GRQRGTGIGGGNDEREQTLNQLLTEMDGFEGNTG <mark>VIVVAATNRADIL</mark> D
Glycine	KENAP <mark>CIVF</mark> V <mark>DEIDAV</mark> GRQRGTGIGGGNDEREQTLNQLLTEMDGFEGNTGI <mark>IV</mark> VAATNRADILD
Oryza	KENAP <mark>CIVF</mark> V <mark>DEIDAV</mark> GRQRGTGIGGGNDEREQTLNQLLTEMDGFEGNTGI <mark>IVIAATNRAD</mark> ILD
Araucaria	KENAP <mark>CIVF</mark> V <mark>DEIDAV</mark> GRQRGTGIGGGNDEREQTLNQLLTEMDGFEGNTGI <mark>IVIAATNRADIL</mark> D
Physcomitrella	KENAP <mark>CIVF</mark> V <mark>DEIDAV</mark> GRQRGTGIGGGNDEREQTLNQLLTEMDGFEGNTG <mark>VIVIAATNRAD</mark> ILD
Selaginella	KENAP <mark>CIVF</mark> V <mark>DEIDAV</mark> GRQRGTGIGGGNDEREQTLNQLLTEMDGFEGNTG <mark>VIV</mark> IAATNRSDILD
Chlamydomonas	KENAP <mark>CLVE</mark> V <mark>DEIDAV</mark> GRSRGTGIGGTNDEREQTLNQMLTEMDGFEGNTGI <mark>IV</mark> IAATNRADILD
E. coli	KKNAP <mark>C</mark> LI FIDEIDAV GRQRGAGLGGGHDEREQTLNQLLVEMDGFSANEGI <mark>I</mark> II <mark>AATNR</mark> ADILD
	D
FtsH5	400 AILAARRELKEISKDEISDALERIIAGPEKKNAVVSEEKKRLVAYHEAGHALVGALMPEYDPVA
FtsHI	AILAARRELKEISKDEISDALERIIAGPEKKNAVVSEEKKRLVAIHEAGHALVGALMPEIDPVA
FtsH2	AILAGRRARTSISSKEIDDSIDRIVAGMEG-TVMTDGRSRSLVAYHEVGHAVCGTLTPGHDAVQ
FtsH8	AILAGRRGKTAISSKEIDDSIDRIVAGMEG-TVMTDGKSKSLVAYHEVGHAICGTLTPGHDAVQ
Glycine	AILAGRRGKTGISSKEIDDSIDRIVAGMEG-TVMTDGKSKSLVAY <mark>HE</mark> V <mark>GHA</mark> ICGTLTPGHDAVQ
Oryza	AILAGRRGRTAISSKEIDDSIDRIVAGMEG-TVMTDGKSKSLVAY <mark>HE</mark> V <mark>GHA</mark> ICGTLTPGHDPVQ
Araucaria	AILAGRRGKTAISAKEIDDSIDRIVAGMEG-TVMTDGKSKSLVAY <mark>HE</mark> V <mark>GHA</mark> ICGTLTPGHDPVQ
Physcomitrella	AILTGRRGKTAISAKEIDDSIDRIVAGMEG-TVMTDGKSKSLVAY <mark>HE</mark> V <mark>GHA</mark> ICGTLTPGHDAVQ
Selaginella	AILAGRRGRSAISAKEVDDSIDRIVAGMEG-TVMTDGKVKSLVAY <mark>HE</mark> V <mark>GHA</mark> VCATLTQGHDPVQ
Chlamydomonas	AILAGRRGLKAITNKEIDDAIDRIVAGLEG-KPLVDGKAKALVAY <mark>HE</mark> V <mark>GHA</mark> ICGTLQPGHDPVQ
E. coli	ALVAARQNKKKIDARDIDEATDRVIAGPAKKSRVISKKERNIVAY <mark>HE</mark> G <mark>GH</mark> TVIGLVLDEADMVH

Figura 16. Alinhamento das proteases FtsH. Domínios das FtsHs: A) Walker A (amarelo), B) Walker B (verde), C) SRH- second region of homology (azul) e D) Zinc-binding (rosa). As duas cisteínas presentes somente na FtsH do tipo A estão marcadas por (*). Cisteínas fora dos domínios estão ressaltadas de cinza.

4.6. FIP possui um domínio dedo-de-zinco com atividade redutase in vitro

Uma hipótese considerada é a de que o dedo-de-zinco de FIP apresentar uma atividade redutase sobre diferentes substratos nas membranas dos tilacóides. Assim, as cisteínas do domínio dedo-de-zinco estariam sob a forma reduzida quando FIP estivesse ativa (e possivelmente ligando zinco), e tornando-se oxidada após sua atividade (Figura 17A). Outra possibilidade seria que FIP pudesse atuar como um regulador negativo da atividade do complexo FtsH, considerando que as plantas mutantes *fip* são mais tolerantes a estresses abióticos, situação em que as proteases FtsH precisam estar mais ativas. Neste caso, FIP estaria sob a forma reduzida interagindo diretamente com FtsH5 e sob uma condição produtora de EROs (Espécies

Reativas de Oxigênio), FIP se tornaria oxidada, não mais interagindo com o complexo FtsH, que se tornaria mais ativado (Figura 17B). Existem evidências dessa troca de estado redox baseado em cisteínas para diversas enzimas (Pace and Weerapana, 2014).



Figura 17. Esquema dos dois possíveis modos de ação de FIP. (A) Os grupos tiol (-SH) de FIP (Redutase) estão inicialmente na forma reduzida. Quando a redução ocorre (redução de pontes dissulfeto), a proteína alvo (Proteína A) cujo grupo tiol estava inicialmente oxidado, se torna reduzido e FIP se torna oxidada. A proteína A reduzida pode então agir/ interagir com diferentes alvos. (B) FIP reduzida interagindo com o complex FtsH. Após o envento produtor de EROs (estresse por alta luminosidade) FIP se torna oxidada e libera o complexo FtsH permitindo que esse ative sua atividade máxima e atue na reciclagem da proteína D1 do PSII foto-danificada.

A fim de verificar se FIP tem o potencial de estar agindo como uma redutase no ensaio de redução de insulina, há necessidade de verificar, primeiramente, o estado redox das cisteínas do domínio dedo-de-zinco em condições neutras (50 mM Tris-HCI, pH 7.5). Para os ensaios de estado redox das cisteínas, as proteínas FIP, DnaJ e Tiorredoxina foram tratadas com AMS, um reagente alquilante, antes e depois da incubação com DTT (Figura 18). Se as proteínas estiverem com os grupos tiol expostos sob condições neutras, elas reagem com AMS resultando num aumento da massa molecular de 0,5kDa/sulfidrila livre/molécula. Somente cisteínas reduzidas reagem com AMS e as espécies reduzidas midificadas pelo AMS são facilmente diferenciadas das espécies oxidadas por SDS-PAGE e coradas com *Coomassie blue*. A proteína 6xHis-FIP tem 9,8kDa e 4 cisteínas no domínio dedo-de-zinco. Sob condições neutras, FIP foi encontrada no seu estado oxidado, não reagindo com AMS. Após 60 minutos de incubação com DTT (o agente redutor), FIP foi reduzida apresentando uma mudança no seu tamanho em relação à forma oxidada, com um acréscimo de 2kDa no tamanho de FIP devido à reação com AMS (Figura 18A). A proteína DnaJ usada nestes experimentos possui 41kDa de tamanho e 10 cisteínas na sua sequência de aminoácidos. DnaJ estava no seu estado reduzido nas condições do teste antes e após a incubação com DTT (Figura 18B). Tiorredoxina de *E. coli* tem 12kDa de tamnho e 2 cisteínas na sua sequência e foi detectada no seu estado reduzido e oxidado sob condições neutras antes e depois da incubação com DTT (Figura 18C). O estado redox de FIP ainda precisa ser testado *in vivo*.



Figura 18. Estado redox dos grupos tiol das proteínas com potencial atividade redutase. Proteína recombinante (A) FIP, (B) DnaJ e (C) Tiorredoxina, foram tratadas com AMS, separadas por SDS-PAGE (12 ou 20%), e visualizadas por coração com Coomassie blue. As posições das formas reduzida (Red) e oxidada (Oxid) são indicadas por setas. -DTT significa amostras sem pré-tratamento com DTT; +DTT significa amostras pré-tratadas DTT antes do passo de incubação com AMS.

O ensaio de redução de insulina foi usado para monitorar a atividade dissulfeto redutase de 6xHis-FIP, onde foi medida a taxa de redução da insulina, devido ao aumento da turbidez provocada pela precipitação da cadeia B livre da insulina, liberada após a redução da ligação estrutural dissulfeto que liga as cadeias A e B (Holmgren, 1979). Este método foi usado com sucesso anteriormente para mostrar a atividade redutase das proteínas da família DNAJE1 de arabidopsis HCF222 (Hartings *et al.*, 2017), CYO1 (Shimada *et al.*, 2007) e PSA2 (Fristedt *et al.*, 2014).

Tiorredoxina apresentou atividade na redução da insulina nos primeiros 20 minutos do teste (Figura 19A e B). Na figura 19A, Tiorredoxina apresentou uma atividade cinco vezes maior que só DTT já nos primeiros 30 minutos de teste, e ao final dos 60 minutos, sua atividade foi seis vezes maior do que só DTT. Na figura 19B, a atividade da Tiorredoxina foi três vezes maior que só DTT ao final dos 60 minutos. A atividade redutase da Tiorredoxina é conhecida desde a década de 1960

(Thelander, 1968). A proteína DnaJ de *E. coli* é também bem conhecida por sua atividade isomerase/ oxidorreductase (Decrouychanel *et al.*, 1995, Tang and Wang, 2001), no entanto a versão da proteína DnaJ utilizada para os nossos ensaios não apresentou a atividade esperada, que deveria ser comparável à atividade da Tiorredoxina. O observado para a proteína DnaJ foi uma atividade somente a partir dos 40 minutos de teste, sendo que sua atividade ao final do teste foi apenas uma vez e meia maior que só DTT (Figura 19A). HCF164 teve somente metade da atividade medida anteriormente em (Lennartz *et al.*, 2001) e foi duas vezes maior que só DTT ao final dos 60 minutos (Figura 19B). FIP apresentou uma baixa atividade redutase nos testes realizados com a versão 6xHis-FIP (Figura 19A e 19B). Sua atividade só foi registrada após 40 minutos do início do teste, e ao final dos 60 minutos, a atividade de FIP foi duas vezes maior (Figura 19A) e uma vez e meia maior (Figura 19B) que só DTT. Para todos os ensaios foram usadas proteínas pré-tratadas com DTT por 60 minutos antes de iniciar os testes, devido ao fato de FIP ser encontrada na sua forma oxidada nas condições neutras utilizadas neste trabalho (Figura 18A).



Figura 19. Ensaio de redução de insulina utilizando a proteína recombinante 6xHis-FIP. A redução das pontes dissulfeto na molécula de insulina foi monitorada pelo aumento da absorbância a 650 nm, resultante da precipitação da cadeia B livre da insulina. A reação foi iniciada pela adição das proteínas pré-tratadas com 330µM de DTT. Só DTT serviu com controle negativo. Tiorredoxina foi usada como controle positivo. Foi usado para esses ensaios 5µM de Thioredoxin, 10µM de DnaJ, 10µM de FIP e 10µM de HCF164. Valores representam médias de 3 experimentos <u>+</u>DP.

Os resultados obtidos utilizando as proteínas DnaJ e HCF164 nos ensaios de redução de insulina, foram menores do que os relatados anteriormente para essas proteínas (Decrouychanel *et al.*, 1995, Lennartz *et al.*, 2001, Tang and Wang, 2001). Essas observações sugerem que a atividade redutase de FIP também possa ser maior, e estar sendo afetada devido a utilização de condições subótimas durante as

etapas de produção/ purificação da proteína, ou pela presença do *tag* de histidinas. Assim, um possível padrão de dobramento de FIP com e sem o *tag* foi avaliado a partir do software *PHYRE2*. Na figura 20 observa-se que, a presença da tag de histidinas, em qualquer uma das extremidades de FIP, pode alterar o enovelamento da proteína quando comparado com a versão sem o *tag*. Sendo assim, uma nova versão da proteína FIP será produzida para ter a atividade redutase testada novamente.



Figura 20. Diferenças no dobramento de FIP com e sem tag de histidina. Para o modelamento foi usado o software online PHYRE 2 e a sequência de FIP sem nenhuma tag ou a sequência da proteína FIP com tag de histidina na extremidade N ou C-terminal.

5. DISCUSSÃO

5.1. Envolvimento de FIP na resposta ao estresse abiótico

FIP (At5g02160) foi encontrada interagindo com FtsH5 em ensaios de Y2H. FIP possui 3 regiões distintas na sua estrutura primária: um peptídeo sinal clivável, um domínio transmembrana e um domínio dedo-de-zinco C-terminal, com duas repetições CxxCxGxG (Figure 8). FIP e FtsH5 estão inseridas na membrana dos tilacóides, estão num processo de co-evolução e ambas estão sob pressão de seleção negativa, evidenciando a importância da conservação da estrutura para a função das proteases FtsH5 e de FIP, bem como para a interação. FIP está presente em musgos e plantas, sugerindo um surgimento relacionado à adaptação dessas plantas ao ambiente terrestre, possivelmente, para ser parte de um mecanismo de resposta aos novos estresses decorrentes dessa mudança de ambiente. Esta hipótese é sustentada pela presenca de um domínio dedo-de-zinco conservado entre diferente espécies, característico pela função de interação proteína-proteína, que pode desempenhar um papel regulatório em plantas (Lopes et al., 2018). FIP também foi mostrada interagindo com outras proteínas cloroplastidiais envolvidas na fotossíntese AT1G76100, AT2G34430, AT4G05180, AT4G10340, AT4G21280 e como AT5G54270 pelo método de Y2H. Essas interações ainda precisam ser validadas por outros métodos, mas provavelmente ocorrem através do dedo-de-zinco de FIP, que pode estar regulando de alguma forma a atividade dessas proteínas.

Análises de plantas, de uma e três semanas, mostraram que os mutantes *fip* tem uma tolerância melhor sob diferentes condições de estresse (Figura 12 e 13), assim como tem uma menor acumulação de transcritos de genes de resposta a estresse como *HSP60, AOX1a* e *Cu-Zn-SOD* (Figura 14). No entanto, esses genes de resposta a estresse foram induzidos pelos tratamentos quando comparados com a condição controle em plantas WT e OE, o que é consistente com o papel protetor desses na prevenção de danos das plantas sob estresse (Moller, 2001, Bender *et al.,* 2011, Vanlerberghe, 2013). Os transcritos de FIP também são diminuídos sob as condições de estresse em todas as plantas FIP (OE, *fip* e WT) (Figura 12A). Um caso parecido que pode ser mencionado é o das pequenas DnaJs, AtJ11 e AtJ20, onde os mutantes acumulando baixos níveis das respectivas proteínas foram mais tolerantes ao estresse oxidativo, que, neste caso, foi devido a um maior acúmulo de enzimas detoxificantes (Chen *et al.,* 2010).

Considerando todas as observações feitas do efeito de diferentes estresses abióticos em plantas *FIP*, fenotípicos e de expressão gênica (baixos níveis de transcritos de genes de resposta a estresse mutantes *fip*, diminuição dos níveis de transcritos de FIP em resposta a estresse, e plantas mutantes *fip* tolerando melhor as condições de estresse), foi demonstrado que FIP está envolvida no mecanismo de resposta a estresse abiótico em Arabidopsis. Ainda assim, é cedo para afirmar que haja uma relação direta do aumento da tolerância a estresses abióticos devido aos níveis reduzidos de FIP nas plantas e ao aumento da atividade do complexo FtsH em Arabidopsis. Contudo, modelos de controle de proteases são descritos na literatura e sugerem que o complexo FtsH possivelmente conte com fatores protéicos adicionais na sua regulação da sua atividade (Nishimura *et al.*, 2017). Neste cenário, FIP estaria atuando como um regulador negativo da atividade de FtsH5.

5.2. Mutação no gene FIP afeta acúmulo de proteínas do PSI e PC

Plantas mutantes *fip* acumularam baixos níveis de proteínas das subunidades PsaA e PsaB do fotossistema I e de plastocianina (Figura 11). Apesar disso, medidas de eficiência da atividade dos PSI e PSII não revelaram nenhuma diferença entre as plantas FIP OE e mutantes *fip* sob condições de crescimento controle (Tabela 1). Resultados semelhantes foram observados por (Pesaresi *et al.*, 2009), onde plantas de arabidopsis mutantes acumulando baixos níveis da proteína plastocianina (PETE), não foram afetadas quanto à eficiência da fotossíntese.

Em experimentos anteriores do nosso grupo utilizando Y2H (Yeast Two-Hybrid) e tendo FIP como isca e a biblioteca de cDNA de arabidopsis como presa, foi mostrado que FIP interage com a Plastocianina (At1g76100), além de outras proteínas envolvidas com a fotossíntese (tabela 2). Junto com os resultados observados nos experimentos de *immunoblot*, acreditamos que FIP possa estar agindo na maturação de PsaA, PsaB e PC ou regulando algum passo da biogênese dessas proteínas. No caso da proteína PC, devido ao fato de o domínio ativo de FIP estar voltado para o lado estromal, é possível que FIP esteja controlando algum aspecto da biogênese de PC neste compartimento, provavelmente antes de PC ser translocado para o lúmen dos tilacóides.

Em relação ao PSI, este possui um intrincado mecanismo de montagem das suas subunidades que envolvem dois tipos de proteínas: (1) um tipo envolvido na

biossíntese de co-fatores, (2) e proteínas tipo chaperonas responsáveis pela montagem do complexo, atuando na interação proteína-proteína (Schottler *et al.*, 2011). Neste cenário, FIP estaria atuando como uma proteína tipo (2) devido à presença do seu domínio dedo-de-zinco, onde estaria reduzindo cisteínas nas subunidades do PSI, ou dos fatores de montagem do complexo, e promovendo interações entre proteínas, o mesmo modo de ação de PSA2 (Fristedt *et al.*, 2014).

5.3. Possível papel regulador de FIP pela atividade do domínio dedo-de-zinco

Em cloroplastos, a atividade de proteases é continuamente regulada por chaperonas que atuam de forma coordenada para garantir o mecanismo de controle de qualidade protéico (Nishimura et al., 2017), essencial para o desenvolvimento das plantas (Lu, 2016). Como já mostrado anteriormente, FIP possue um dedo-de-zinco com motivos CxxCxGxG conservados típico de DnaJs, fazendo parte da família DNAJE1 em arabidopsis (Figura 7) (Pulido and Leister, 2018). Nessa família, o domínio J das proteínas DnaJs está ausente. Este domínio é responsável pela interação com as chaperonas HSP70, enquanto o dedo-de-zinco é responsável por interações proteína-proteína (Kampinga and Craig, 2010, Veyel et al., 2014, Wang et al., 2015). Neste caso, diz-se que as proteínas membros da família DNAJE1 possuem atividade independente de HSP70 (Figura 6). A proteína OR (DNAJE1.4) dos cloroplastos, está envolvida na regulação da fitoeno sintase da biossíntese de carotenóides (Zhou et al., 2015). CYO1 (DNAJE1.5) e HCF222 (DNAJE1.14) estão envolvidas na formação dos tilacóides (Shimada et al., 2007, Hartings et al., 2017). LQY1 (DNAJE1.6) e PSA2 (DNAJE1.7) estão diretamente envolvidas na manutenção e montagem dos complexos do PSII e PSI, respectivamente (Lu et al., 2011, Fristedt et al., 2014).

Uma atividade redutase regulatória de FIP é sugerida devido à presença dos dois motivos canônicos CxxCxGxG formando um dedo-de-zinco no domínio C-terminal da proteína, típico da família de *DNAJ-related* DnaJE1 (Pulido and Leister, 2018). Além do envolvimento dos membros dessa família em diferentes processos na biogênese e/ou manutenção dos cloroplastos, também foram reportadas atividades oxidorredutase e isomerase em plantas. De fato, o domínio dedo-de-zinco das proteínas plastidiais CYO1 (Shimada *et al.*, 2007), LQY1 (Lu *et al.*, 2011), PSA2

(Fristedt *et al.*, 2014) e HCF222 (Hartings *et al.*, 2017) tiveram atividade tiol-dissulfeto oxidorredutases *in vitro* confirmadas.

A maturação de muitas proteínas de cloroplastos contendo cisteínas na sua estrutura dependem da formação de pontes dissulfeto para um dobramento apropriado, num processo chamado de "dobramento oxidativo" desempenhado por proteínas tipo tiorredoxinas e dissulfeto isomerases (Hall *et al.*, 2010, Kieselbach, 2013). Um exemplo de proteína envolvida nesse processo é LTO1 responsável pela maturação de PsbO do PSII (Karamoko *et al.*, 2011).

A atividade redutase de FIP foi testada em ensaios de redução de insulina, onde pode-se observar uma atividade razoável da proteína, após tratamento prévio de 60 minutos com DTT, quando comparado com o controle contendo somente DTT (Figura 19). Acreditamos que a atividade de FIP pode estar sendo prejudicada pela presença da *tag* de histidina, considerando que a porção solúvel de FIP utilizada para a produção da proteína recombinante 6xHis-FIP é muito pequena, somente 6kDa, e com a adição da *tag* utilizando o vetor pDest17 (Gateway), a proteína quase dobra de tamanho (9,8kDa). A interferência de *tags* na atividade de proteínas é algo possível, principalmente considerando proteínas muito pequenas, como é o caso de FIP (Wu and Filutowicz, 1999, Terpe, 2003). Pela análise realisada com o software *PHYRE2* é possível verificar um padrão de dobramento alterado pela *tag*, que pode estar comprometendo o verdadeiro potencial de atividade redutase de FIP. A partir das predições acima, decidiu-se expressar FIP sem a presença da cauda de histidinas a fim de estudar sua ação novamente nos ensaios de redução de insulina.

Os resultados apresentados permitem concluir que FIP pode apresentar uma atividade tiol-dissulfeto redutase nos cloroplastos, provavelmente, envolvida na interação, maturação e/ou dobramento de proteínas envolvidas na fotossíntese na membrana dos tilacóides de Arabidopsis.

6. CONCLUSÕES

- Plantas acumulando diferentes quantidades de transcritos *FIP* não possuem diferenças fenotípicas ou eficiência de fotossíntese alteradas em condições controle.

- Mutantes *fip* acumularam menos proteínas PsaA e PsaB do PSI, e PC em condições controle, sem que isso afetasse a eficiência da fotossíntese nessas plantas.

- Os transcritos de *FIP* são menos acumulados sob condições de estresse abiótico e e podem estar sofrendo algum tipo de regulação pós-transcricional nas plantas.

- Mutantes *fip* acumulam menos transcritos de genes de resposta a estresse como *HSP60*, *AOX1a* e *Cu-Zn-SOD* sob condições de estresse rápido (24 horas) como alta luminosidade e elevado potencial osmótico, indicando uma melhor tolerância à estresse.

- Plantas mutantes *fip* toleraram melhor estresses com elevadas concentrações de paraquat, manitol e NaCI, demonstrando que FIP está envolvida no mecanismo de resposta a estresse abiótico em arabidopsis.

- FIP possui um domínio dedo-de-zinco com uma potencial atividade redutase.

REFERÊNCIAS

- Adam, Z. and Clarke, A.K. (2002) Cutting edge of chloroplast proteolysis. *Trends in Plant Science*, 7, 451-456.
- Adam, Z., Rudella, A. and van Wijk, K.J. (2006) Recent advances in the study of Clp, FtsH and other proteases located in chloroplasts. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 234-240.
- Adam, Z., Zaltsman, A., Sinvany-Villalobo, G. and Sakamoto, W. (2005) FtsH proteases in chloroplasts and cyanobacteria. *Physiologia Plantarum*, 123, 386-390.
- Akiyama, Y. (2009) Quality Control of Cytoplasmic Membrane Proteins in Escherichia coli. Journal of Biochemistry, 146, 449-454.
- Akiyama, Y., Kihara, A., Tokuda, H. and Ito, K. (1996) FtsH (HfIB) is an ATP- dependent protease selectively acting on SecY and some other membrane proteins. *The Journal of biological chemistry*, 271, 31196.
- Aller, I. and Meyer, A.J. (2013) The oxidative protein folding machinery in plant cells. *Protoplasma*, 250, 799-816.
- Aluru, M.R., Yu, F., Fu, A. and Rodermel, S. (2006) Arabidopsis variegation mutants: new insights into chloroplast biogenesis. *Journal of experimental botany*, 57, 1871.
- Amme, S., Matros, A., Schlesier, B. and Mock, H.-P. (2006) Proteome analysis of cold stress response in Arabidopsis thaliana using DIGE-technology. *Journal of experimental botany*, 57, 1537.
- Amunts, A., Drory, O. and Nelson, N. (2007) The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 angstrom resolution. *Nature*, 447, 58-63.
- Anderson, J., Chow, W. and Park, Y.-I. (1995) The grand design of photosynthesis: Acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynth Res*, 46, 129-139.
- Aro, E.M., Suorsa, M., Rokka, A., Allahverdiyeva, Y., Paakkarinen, V., Saleem, A., Battchikova, N. and Rintamäki, E. (2005) Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *Journal of experimental botany*, 56, 347.
- Aronsson, H. and Jarvis, P. (2002) A simple method for isolating import-competent Arabidopsis chloroplasts. *Febs Letters*, 529, 215-220.
- Ausubel, F.M. (1994) Current protocols in molecular biology New York: New York John Wiley.
- Bailey, S., Thompson, E., Nixon, P.J., Horton, P., Mullineaux, C.W., Robinson, C. and Mann, N.H. (2002) A critical role for the Var2 FtsH homologue of Arabidopsis thaliana in the photosystem II repair cycle in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 2006-2011.
- Barber, J. and Andersson, B. (1992) Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 17, 61-66.
- Bender, T., Lewrenz, I., Franken, S., Baitzel, C. and Voos, W. (2011) Mitochondrial enzymes are protected from stress-induced aggregation by mitochondrial chaperones and the Pim1/LON protease. *Molecular Biology of the Cell*, 22, 541-554.

- Borisov, A.Y. and Bjorn, L.O. (2018) On oxygen production by photosynthesis: A viewpoint. *Photosynthetica*, 56, 44-47.
- Boyer, P.D. (1997) THE ATP SYNTHASE—A SPLENDID MOLECULAR MACHINE. Annu. Rev. Biochem., 66, 717-749.
- Braga, W.G.d.S. (2013) Caracterização da interação entre FIP e FtsH5: mapeamento da região de interação e análise de expressão em condições de estresse(Silva Filho, M.d.C. ed. Piracicaba: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP; Universidade de São Paulo; Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- Brutnell, T.P., Sawers, R.J.H., Mant, A. and Langdale, J.A. (1999) BUNDLE SHEATH DEFECTIVE2, a novel protein required for post-translational regulation of the rbcL gene of maize. *Plant Cell*, 11, 849-864.
- Buchanan, B.B. and Balmer, Y. (2005) REDOX REGULATION: A Broadening Horizon. 56, 187-220.
- Bukau, B., Weissman, J. and Horwich, A. (2006) Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*, 125, 443-451.
- Chaal, B.K., Mould, R.M., Barbrook, A.C., Gray, J.C. and Howe, C.J. (1998) Characterization of a cDNA encoding the thylakoidal processing peptidase from Arabidopsis thaliana. Implications for the origin and catalytic mechanism of the enzyme. *The Journal of biological chemistry*, 273, 689.
- Chen, K.M., Holmstrom, M., Raksajit, W., Suorsa, M., Piippo, M. and Aro, E.M. (2010) Small chloroplast-targeted DnaJ proteins are involved in optimization of photosynthetic reactions in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biol*, doi, 10.
- Chi, W., Sun, X.W. and Zhang, L.X. (2012) The roles of chloroplast proteases in the biogenesis and maintenance of photosystem II. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1817, 239-246.
- Cleland, W.W., Andrews, T.J., Gutteridge, S., Hartman, F.C. and Lorimer, G.H. (1998) Mechanism of Rubisco: The Carbamate as General Base. *Chemical reviews*, 98, 549.
- Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 16, 735-743.
- Cohen, I., Sapir, Y. and Shapira, M. (2006) Conserved Mechanism Controls Translation of Rubisco Large Subunit in Different Photosynthetic Organisms. *Conserved Mechanism Controls Translation of Rubisco Large Subunit in Different Photosynthetic Organisms*, 141, 1089-1097.
- Decrouychanel, A., Kohiyama, M. and Richarme, G. (1995) A NOVEL FUNCTION OF ESCHERICHIA-COLI CHAPERONE DNAJ - PROTEIN-DISULFIDE ISOMERASE. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 22669-22672.
- Eberhard, S., Finazzi, G. and Wollman, F.-A. (2008) The Dynamics of Photosynthesis. *Annu. Rev. Genet.*, 42, 463-515.
- Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C. (1991) A SIMPLE AND RAPID METHOD FOR THE PREPARATION OF PLANT GENOMIC DNA FOR PCR ANALYSIS. *Nucleic Acids Research*, 19, 1349-1349.

- Finka, A., Mattoo, R.U.H. and Goloubinoff, P. (2011) Meta-analysis of heat- and chemically upregulated chaperone genes in plant and human cells. *Cell Stress & Chaperones*, 16, 15-31.
- Fristedt, R., Williams-Carrier, R., Merchant, S.S. and Barkan, A. (2014) A Thylakoid Membrane Protein Harboring a DnaJ-type Zinc Finger Domain Is Required for Photosystem I Accumulation in Plants. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 30657-30667.
- Gabilly, S.T., Dreyfuss, B.W., Karamoko, M., Corvest, V., Kropat, J., Page, M.D., Merchant, S.S. and Hamel, P.P. (2010) CCS5, a Thioredoxin-like Protein Involved in the Assembly of Plastid c-Type Cytochromes. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 29738-29749.
- Gietz, R.D. and Schiestl, R.H. (2007) High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols*, 2, 31-34.
- Goulas, E., Schubert, M., Kieselbach, T., Kleczkowski, L.A., Gardeström, P., Schröder, W. and Hurry, V. (2006) The chloroplast lumen and stromal proteomes of Arabidopsis thaliana show differential sensitivity to short- and long- term exposure to low temperature. *Plant Journal*, 47, 720-734.
- Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A. and Saenger, W. (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9-angstrom resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16, 334-342.
- Hall, M., Mata-Cabana, A., Akerlund, H.E., Florencio, F.J., Schroder, W.P., Lindahl, M. and Kieselbach, T. (2010) Thioredoxin targets of the plant chloroplast lumen and their implications for plastid function. *Proteomics*, 10, 987-1001.
- Hanson, P.I. and Whiteheart, S.W. (2005) AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 519-529.
- Hartings, S., Paradies, S., Karnuth, B., Eisfeld, S., Mehsing, J., Wolff, C., Levey, T., Westhoff, P. and Meierhoff, K. (2017) The DnaJ-Like Zinc-Finger Protein HCF222 Is Required for Thylakoid Membrane Biogenesis in Plants. *Plant physiology*, 174, 1807-1824.
- Herbstova, M., Tietz, S., Kinzel, C., Turkina, M.V. and Kirchhoff, H. (2012) Architectural switch in plant photosynthetic membranes induced by light stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 20130-20135.
- Hoffman, C.S. and Winston, F. (1987) A ten- minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli. *Gene*, 57, 267-272.
- Holger, S., Ansgar, P., Norbert, A.D., Andreas, E., Henning, S. and Daniel, J.M. (2000) Structural biology: Proton- powered turbine of a plant motor. *Nature*, 405, 418.
- Holmgren, A. (1979) THIOREDOXIN CATALYZES THE REDUCTION OF INSULIN DISULFIDES BY DITHIOTHREITOL AND DIHYDROLIPOAMIDE. *Journal of Biological Chemistry*, 254, 9627-9632.
- Huesgen, P.F., Schuhmann, H. and Adamska, I. (2009) Deg/ HtrA proteases as components of a network for photosystem II quality control in chloroplasts and cyanobacteria. *Research in Microbiology*, 160, 726-732.

- Im, C.-S., Zhang, Z., Shrager, J., Chang, C.-W. and Grossman, A. (2003) Analysis of light and CO 2 regulation in Chlamydomonas reinhardtii using genome- wide approaches. *Photosynthesis Research*, 75, 111-125.
- Irihimovitch, V. and Shapira, M. (2000) Glutathione redox potential modulated by reactive oxygen species regulates translation of Rubisco large subunit in the chloroplast. *The Journal of biological chemistry*, 275, 16289.
- Ito, K. and Akiyama, Y. (2005) Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. In *Annual Review of Microbiology*. Palo Alto: Annual Reviews, pp. 211-231.
- Janska, H., Kwasniak, M. and Szczepanowska, J. (2013) Protein quality control in organelles — AAA/ FtsH story. *BBA - Molecular Cell Research*, 1833, 381-387.
- Jiao, Y., Ma, L., Strickland, E. and Deng, X.W. (2005) Conservation and divergence of lightregulated genome expression patterns during seedling development in rice and Arabidopsis ([W]).(RESEARCH ARTICLES). *The Plant Cell*, 17, 3239.
- Kampinga, H.H. and Craig, E.A. (2010) The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11, 579-592.
- Karamoko, M., Cline, S., Redding, K., Ruiz, N. and Hamel, P.P. (2011) Lumen Thiol Oxidoreductase1, a Disulfide Bond-Forming Catalyst, Is Required for the Assembly of Photosystem II in Arabidopsis. *Plant Cell*, 23, 4462-4475.
- Karata, K., Inagawa, T., Wilkinson, A.J., Tatsuta, T. and Ogura, T. (1999) Dissecting the role of a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases. Site-directed mutagenesis of the ATP-dependent protease FtsH. *The Journal of biological chemistry*, 274, 26225.
- Kato, Y., Hyodo, K. and Sakamoto, W. (2018) The Photosystem II Repair Cycle Requires FtsH Turnover through the EngA GTPase. *Plant Physiology*, 178, 596-611.
- Kato, Y., Kouso, T. and Sakamoto, W. (2012) Variegated Tobacco Leaves Generated by Chloroplast FtsH Suppression: Implication of FtsH Function in the Maintenance of Thylakoid Membranes. *Plant and Cell Physiology*, 53, 391-404.
- Kato, Y., Miura, E., Ido, K., Ifuku, K. and Sakamoto, W. (2009) The Variegated Mutants Lacking Chloroplastic FtsHs Are Defective in D1 Degradation and Accumulate Reactive Oxygen Species. *Plant Physiology*, 151, 1790-1801.
- Kato, Y. and Sakamoto, W. (2009) Protein Quality Control in Chloroplasts: A Current Model of D1 Protein Degradation in the Photosystem II Repair Cycle. *Journal of Biochemistry*, 146, 463-469.
- Kato, Y. and Sakamoto, W. (2014) Phosphorylation of photosystem II core proteins prevents undesirable cleavage of D1 and contributes to the fine-tuned repair of photosystem II. *Plant Journal*, 79, 312-321.
- Kern, J., Chatterjee, R., Young, I.D., Fuller, F.D., Lassalle, L., Ibrahim, M., Gul, S., Fransson, T., Brewster, A.S., Alonso-Mori, R., Hussein, R., Zhang, M., Douthit, L., de Lichtenberg, C., Cheah, M.H., Shevela, D., Wersig, J., Seuffert, I., Sokaras, D., Pastor, E., Weninger, C., Kroll, T., Sierra, R.G., Aller, P., Butryn, A., Orville, A.M., Liang, M.N., Batyuk, A., Koglin, J.E., Carbajo, S., Boutet, S., Moriarty, N.W., Holton, J.M., Dobbek,

H., Adams, P.D., Bergmann, U., Sauter, N.K., Zouni, A., Messinger, J., Yano, J. and Yachandra, V.K. (2018) Structures of the intermediates of Kok's photosynthetic water oxidation clock. *Nature*, 563, 421-+.

- Khatoon, M., Inagawa, K., Pospisil, P., Yamashita, A., Yoshioka, M., Lundin, B., Horie, J., Morita, N., Jajoo, A. and Yamamoto, Y. (2009) Quality Control of Photosystem II THYLAKOID UNSTACKING IS NECESSARY TO AVOID FURTHER DAMAGE TO THE D1 PROTEIN AND TO FACILITATE D1 DEGRADATION UNDER LIGHT STRESS IN SPINACH THYLAKOIDS. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 25343-25352.
- Kieselbach, T. (2013) Oxidative Folding in Chloroplasts. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19, 72-82.
- Kihara, A., Akiyama, Y. and Ito, K. (1996) A protease complex in the Escherichia coli plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY. *Embo J*, 15, 6122-6131.
- Kihara, A., Akiyama, Y. and Ito, K. (1997) Host regulation of lysogenic decision in bacteriophage lambda: Transmembrane modulation of FtsH (HflB), the cll degrading protease, by HflKC (HflA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 5544-5549.
- Kim, J., Rudella, A., Rodriguez, V.R., Zybailov, B., Olinares, P.D.B. and Van Wijk, K.J. (2009) Subunits of the Plastid ClpPR Protease Complex Have Differential Contributions to Embryogenesis, Plastid Biogenesis, and Plant Development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21, 1669-1692.
- Kirchhoff, H., Hall, C., Wood, M., Herbstova, M., Tsabari, O., Nevo, R., Charuvi, D., Shimoni, E. and Reich, Z. (2011) Dynamic control of protein diffusion within the granal thylakoid lumen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 20248-20253.
- Kramer, D.M., Avenson, T.J. and Edwards, G.E. (2004) Dynamic flexibility in the light reactions of photosynthesis governed by both electron and proton transfer reactions. *Trends in Plant Science*, 9, 349-357.
- Kranz, R.G., Richard-Fogal, C., Taylor, J.S. and Frawley, E.R. (2009) Cytochrome c Biogenesis: Mechanisms for Covalent Modifications and Trafficking of Heme and for Heme-Iron Redox Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73, 510-+.
- Krzywda, S., Brzozowski, A.M., Verma, C., Karata, K., Ogura, T. and Wilkinson, A.J. (2002) The Crystal Structure of the AAA Domain of the ATP- Dependent Protease FtsH of Escherichia coli at 1.5 Å Resolution. *Structure*, 10, 1073-1083.
- Kurisu, G., Zhang, H.M., Smith, J.L. and Cramer, W.A. (2003) Structure of the cytochrome b(6)f complex of oxygenic photosynthesis: Tuning the cavity. *Science*, 302, 1009-1014.
- Langklotz, S., Baumann, U. and Narberhaus, F. (2012) Structure and function of the bacterial AAA protease FtsH. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1823, 40-48.
- Leister, D. (2003) Chloroplast research in the genomic age. Trends in Genetics, 19, 47-56.

- Lennartz, K., Plucken, H., Seidler, A., Westhoff, P., Bechtold, N. and Meierhoff, K. (2001) HCF164 encodes a thioredoxin-like protein involved in the biogenesis of the cytochrome b(6)f complex in Arabidopsis. *Plant Cell*, 13, 2539-2551.
- Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C. and Zylicz, M. (1991) ESCHERICHIA-COLI DNAJ AND GRPE HEAT-SHOCK PROTEINS JOINTLY STIMULATE ATPASE ACTIVITY OF DNAK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 2874-2878.
- Lopes, K.L., Rodrigues, R.A.O., Silva, M.C., Braga, W.G.S. and Silva-Filho, M.C. (2018) The Zinc-Finger Thylakoid-Membrane Protein FIP Is Involved With Abiotic Stress Response in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science*, 9, 13.
- Lu, S., Van Eck, J., Zhou, X., Lopez, A.B., O'Halloran, D.M., Cosman, K.M., Conlin, B.J., Paolillo, D.J., Garvin, D.F., Vrebalov, J., Kochian, L.V., Kupper, H., Earle, E.D., Cao, J. and Li, L. (2006) The cauliflower or gene encodes a DnaJ cysteine-rich domaincontaining protein that mediates high levels of beta-carotene accumulation. *Plant Cell*, 18, 3594-3605.
- Lu, Y. (2016) Identification and Roles of Photosystem II Assembly, Stability, and Repair Factors in Arabidopsis. *Frontiers in plant science*, 7, 168.
- Lu, Y., Hall, D.A. and Last, R.L. (2011) A Small Zinc Finger Thylakoid Protein Plays a Role in Maintenance of Photosystem II in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, 23, 1861-1875.
- Lu, Y., Savage, L.J., Ajjawi, I., Imre, K.M., Yoder, D.W., Benning, C., DellaPenna, D., Ohlrogge, J.B., Osteryoung, K.W., Weber, A.P., Wilkerson, C.G. and Last, R.L. (2008) New connections across pathways and cellular processes: Industrialized mutant screening reveals novel associations between diverse phenotypes in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 146, 1482-1500.
- Lyska, D., Meierhoff, K. and Westhoff, P. (2013) How to build functional thylakoid membranes: from plastid transcription to protein complex assembly. *Planta*, 237, 413-428.
- Ma, L., Li, J., Qu, L., Hager, J., Chen, Z., Zhao, H. and Deng, X.W. (2001) Light control of Arabidopsis development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *The Plant Cell*, 13, 2589.
- Martin, W. and Russell, M.J. (2003) On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 358, 59-83.
- Meyer Zu Tittingdorf, J.M.W., Rexroth, S., Schäfer, E., Schlichting, R., Giersch, C., Dencher, N.A. and Seelert, H. (2004) The stoichiometry of the chloroplast ATP synthase oligomer III in Chlamydomonas reinhardtii is not affected by the metabolic state. BBA Bioenergetics, 1659, 92-99.
- Moldavski, O., Levin-Kravets, O., Ziv, T., Adam, Z. and Prag, G. (2012) The Hetero-Hexameric Nature of a Chloroplast AAA plus FtsH Protease Contributes to Its Thermodynamic Stability. *Plos One*, 7, 10.
- Moller, I.M. (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 561-591.

- Moseley, J.L., Allinger, T., Herzog, S., Hoerth, P., Wehinger, E., Merchant, S. and Hippler, M. (2002) Adaptation to Fe- deficiency requires remodeling of the photosynthetic apparatus. *EMBO Journal*, 21, 6709-6720.
- Munoz-Nortes, T., Perez-Perez, J.M., Ponce, M.R., Candela, H. and Micol, J.L. (2017) The ANGULATA7 gene encodes a DnaJ-like zinc finger-domain protein involved in chloroplast function and leaf development in Arabidopsis. *Plant Journal*, 89, 870-884.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y. and Allakhverdiev, S.I. (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *BBA Bioenergetics*, 1767, 414-421.
- Nakagawara, E., Sakuraba, Y., Yamasato, A., Tanaka, R. and Tanaka, A. (2007) Clp protease controls chlorophyll b synthesis by regulating the level of chlorophyllide a oxygenase. *Plant Journal*, 49, 800-809.
- Nanba, O. and Satoh, K. (1987) Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b- 559. *Proceedings of the National Academy* of Sciences of the United States of America, 84, 109.
- Nath, K., Wessendorf, R.L. and Lu, Y. (2016) A Nitrogen-Fixing Subunit Essential for Accumulating 4Fe-4S-Containing Photosystem I Core Proteins. *Plant Physiology*, 172, 2459-2470.
- Nelson, N. and Yocum, C.F. (2006) Structure and function of photosystems I and II. Annual Review of Plant Biology, 57, 521-565.
- Nilsson Cederholm, S., Bäckman, H., Pesaresi, P., Leister, D. and Glaser, E. (2009) Deletion of an organellar peptidasome PreP affects early development in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol*, 71, 497-508.
- Nishimura, K., Kato, Y. and Sakamoto, W. (2016) Chloroplast Proteases: Updates on Proteolysis within and across Suborganellar Compartments. *Plant Physiology*, 171, 2280-2293.
- Nishimura, K., Kato, Y. and Sakamoto, W. (2017) Essentials of Proteolytic Machineries in Chloroplasts. *Molecular plant*, 10, 4-19.
- Nixon, P.J., Michoux, F., Yu, J.F., Boehm, M. and Komenda, J. (2010) Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II. *Annals of Botany*, 106, 1-16.
- Ogura, T., Tomoyasu, T., Yuki, T., Morimura, S., Begg, K.J., Donachie, W.D., Mori, H., Niki, H. and Hiraga, S. (1991) Structure and function of the ftsH gene in Escherichia coli. *Res Microbiol*, 142, 279-282.
- Ogura, T. and Wilkinson, A.J. (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure-- diverse function. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 6, 575.
- Onda, Y. (2013) Oxidative protein-folding systems in plant cells. Int J Cell Biol, doi, 10.
- Pace, N.J. and Weerapana, E. (2014) Zinc-binding cysteines: diverse functions and structural motifs. *Biomolecules*, doi, 10.
- Peng, L.W., Ma, J.F., Chi, W., Guo, J.K., Zhu, S.Y., Lu, Q.T., Lu, C.M. and Zhang, L.X. (2006) LOW PSII ACCUMULATION1 is involved in efficient assembly of photosystem II in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, 18, 955-969.
- Pesaresi, P., Scharfenberg, M., Weigel, M., Granlund, I., Schroeder, W.P., Finazzi, G., Rappaport, F., Masiero, S., Furini, A., Jahns, P. and Leister, D. (2009) Mutants, Overexpressors, and Interactors of Arabidopsis Plastocyanin Isoforms: Revised Roles of Plastocyanin in Photosynthetic Electron Flow and Thylakoid Redox State. *Molecular Plant*, 2, 236-248.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 6.
- Pogson, B.J., Ganguly, D. and Albrecht-Borth, V. (2015) Insights into chloroplast biogenesis and development. *BBA Bioenergetics*, 1847, 1017-1024.
- Pulido, P. and Leister, D. (2018) Novel DNAJ-related proteins in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist*, 217, 480-490.
- Pulido, P., Toledo-Ortiz, G., Phillips, M.A., Wright, L.P. and Rodriguez-Concepcion, M. (2013) Arabidopsis J-Protein J20 Delivers the First Enzyme of the Plastidial Isoprenoid Pathway to Protein Quality Control. *Plant Cell*, 25, 4183-4194.
- Rajan, V.B.V. and D'Silva, P. (2009) Arabidopsis thaliana J-class heat shock proteins: cellular stress sensors. *Functional & Integrative Genomics*, 9, 433-446.
- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H.L. and Moorman, A.F.M. (2003) Assumption-free analysis of quantitative real- time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339, 62-66.
- Raven, J. and Ralph, P. (2015) Enhanced biofuel production using optimality, pathway modification and waste minimization. *J Appl Phycol*, 27, 1-31.
- Renger, G. (2011) Light induced oxidative water splitting in photosynthesis: Energetics, kinetics and mechanism. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 104, 35.
- Richter, S. and Lamppa, G.K. (2003) Structural properties of the chloroplast stromal processing peptidase required for its function in transit peptide removal. *The Journal of biological chemistry*, 278, 39497.
- Rodrigues, R.A.d.O. (2011) Estudo do direcionamento das proteases FtsH plastidiais às membranas dos tilacóides(Silva Filho, M.d.C. ed. Piracicaba: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP; Universidade de São Paulo; Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- Rodrigues, R.A.O., Silva-Filho, M.C. and Cline, K. (2011) FtsH2 and FtsH5: two homologous subunits use different integration mechanisms leading to the same thylakoid multimeric complex. *Plant Journal*, 65, 600-609.
- Saikawa, N., Akiyama, Y. and Ito, K. (2004) FtsH exists as an exceptionally large complex containing HflKC in the plasma membrane of Escherichia coli. *J Struct Biol*, 146, 123-129.
- Sakamoto, W. (2006) Protein degradation machineries in plastids. In *Annual Review of Plant Biology*. Palo Alto: Annual Reviews, pp. 599-621.
- Sakamoto, W., Miyagishima, S.-y. and Jarvis, P. (2008) Chloroplast Biogenesis: Control of Plastid Development, Protein Import, Division and Inheritance. *The Arabidopsis Book*, 62.

- Sakamoto, W., Tamura, T., Hanba-Tomita, Y. and Murata, M. (2002) The VAR1 locus of Arabidopsis encodes a chloroplastic FtsH and is responsible for leaf variegation in the mutant alleles. *Genes to Cells*, 7, 769-780.
- Sakamoto, W., Zaltsman, A., Adam, Z. and Takahashi, Y. (2003) Coordinated regulation and complex formation of YELLOW VARIEGATED1 and YELLOW VARIEGATED2, chloroplastic FtsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in Arabidopsis thylakoid membranes. *Plant Cell*, 15, 2843-2855.

Schachtman, D.P. and Shin, R. (2007) Nutrient Sensing and Signaling: NPKS. 58, 47-69.

- Schottler, M.A., Albus, C.A. and Bock, R. (2011) Photosystem I: Its biogenesis and function in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 168, 1452-1461.
- Sharma, S.K., De Los Rios, P., Christen, P., Lustig, A. and Goloubinoff, P. (2010) The kinetic parameters and energy cost of the Hsp70 chaperone as a polypeptide unfoldase. *Nat Chem Biol*, 6, 914-920.
- Shi, L.-X., Hall, M., Funk, C. and Schröder, W.P. (2012) Photosystem II, a growing complex: Updates on newly discovered components and low molecular mass proteins. *Photosystem II, a growing complex: Updates on newly discovered components and low molecular mass proteins*, 1817, 13-25.
- Shimada, H., Mochizuki, M., Ogura, K., Froehlich, J.E., Osteryoung, K.W., Shirano, Y., Shibata, D., Masuda, S., Mori, K. and Takamiya, K. (2007) Arabidopsis cotyledonspecific chloroplast biogenesis factor CYO1 is a protein disulfide isomerase. *The Plant cell*, 19, 3157-3169.
- Silva, M.A.C.e. (2015) Evolução convergente da protease FtsH5 de Arabidopsis thaliana e seu regulador negativo putativo FIP (FtsH5 interacting protein)(Silva Filho, M.d.C. ed. Piracicaba: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP; Universidade de São Paulo; Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J.L. and Picot, D. (2003) An atypical haem in the cytochrome b(6)f complex. *Nature*, 426, 413-418.
- Suga, M., Akita, F., Hirata, K., Ueno, G., Murakami, H., Nakajima, Y., Shimizu, T., Yamashita, K., Yamamoto, M., Ago, H. and Shen, J.R. (2015) Native structure of photosystem II at 1.95 angstrom resolution viewed by femtosecond X-ray pulses. *Nature*, 517, 99-U265.
- Tang, W. and Wang, C.C. (2001) Zinc fingers and thiol-disulfide oxidoreductase activities of chaperone DnaJ. *Biochemistry*, 40, 14985-14994.
- Terpe, K. (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 523-533.
- Thelander, L. (1968) STUDIES ON THIOREDOXIN REDUCTASE FROM ESCHERICHIA COLI B - RELATION OF STRUCTURE AND FUNCTION. *European Journal of Biochemistry*, 4, 407-+.
- Tomoyasu, T., Yamanaka, K., Murata, K., Suzaki, T., Bouloc, P., Kato, A., Niki, H., Hiraga, S. and Ogura, T. (1993) Topology and subcellular localization of FtsH protein in Escherichia coli. *The Journal of Bacteriology*, 175, 1352.

- Tyystjärvi, E. and Aro, E.M. (1996) The rate constant of photoinhibition, measured in lincomycin- treated leaves, is directly proportional to light intensity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 2213.
- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.R. and Kamiya, N. (2011) Crystal structure of oxygenevolving photosystem II at a resolution of 1.9 angstrom. *Nature*, 473, 55-U65.
- Urantowka, A., Knorpp, C., Olczak, T., Kolodziejczak, M. and Janska, H. (2005) Plant Mitochondria Contain at Least Two i - AAA- like Complexes. *Plant Mol Biol*, 59, 239-252.
- van Wijk, K.J. (2015) Protein Maturation and Proteolysis in Plant Plastids, Mitochondria, and Peroxisomes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 66, 75-111.
- Vanlerberghe, G.C. (2013) Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 6805-6847.
- Veyel, D., Sommer, F., Muranaka, L.S., Rutgers, M., Lemaire, S.D. and Schroda, M. (2014) In vitro characterization of bacterial and chloroplast Hsp70 systems reveals an evolutionary optimization of the co-chaperones for their Hsp70 partner. *The Biochemical journal*, 460, 13-24.
- Vidal, M., Brachmann, R.K., Fattaey, A., Harlow, E. and Boeke, J.D. (1996) Reverse Two-Hybrid and One- Hybrid Systems to Detect Dissociation of Protein-Protein and DNA-Protein Interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 10315-10320.
- Wang, G., Kong, F., Zhang, S., Meng, X., Wang, Y. and Meng, Q. (2015) A tomato chloroplasttargeted DnaJ protein protects Rubisco activity under heat stress. *Journal of experimental botany*, 66, 3027-3040.
- Wollman, F.A., Minai, L. and Nechushtai, R. (1999) The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1411, 21-85.
- Woodson, J.D. and Chory, J. (2008) Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nature Reviews Genetics*, 9, 383-395.
- Wu, J. and Filutowicz, M. (1999) Hexahistidine (His6)-tag dependent protein dimerization: a cautionary tale. *Acta Biochim Pol*, 46, 591-599.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol*, 57, 781-803.
- Yoshioka, M., Nakayama, Y., Yoshida, M., Ohashi, K., Morita, N., Kobayashi, H. and Yamamoto, Y. (2010) Quality Control of Photosystem II FtsH HEXAMERS ARE LOCALIZED NEAR PHOTOSYSTEM II AT GRANA FOR THE SWIFT REPAIR OF DAMAGE. Journal of Biological Chemistry, 285, 41972-41981.
- Yoshioka, M. and Yamamoto, Y. (2011) Quality control of Photosystem II: Where and how does the degradation of the D1 protein by FtsH proteases start under light stress? Facts and hypotheses. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 104, 229-235.

- Yu, F., Park, S. and Rodermel, S.R. (2004) The Arabidopsis FtsH metalloprotease gene family: interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes. *Plant Journal*, 37, 864-876.
- Zhang, D., Kato, Y., Zhang, L., Fujimoto, M., Tsutsumi, N., Sodmergen and Sakamoto, W. (2010) FtsH Protease Heterocomplex in Arabidopsis: Dispensability of Type- B Protease Activity for Proper Chloroplast Development. *FtsH Protease Heterocomplex in Arabidopsis: Dispensability of Type-B Protease Activity for Proper Chloroplast Development*, 22, 3710-3725.
- Zhong, L.L., Zhou, W., Wang, H.J., Ding, S.H., Lu, Q.T., Wen, X.G., Peng, L.W., Zhang, L.X. and Lu, C.M. (2013) Chloroplast Small Heat Shock Protein HSP21 Interacts with Plastid Nucleoid Protein pTAC5 and Is Essential for Chloroplast Development in Arabidopsis under Heat Stress. *Plant Cell*, 25, 2925-2943.
- Zhou, X., Welsch, R., Yang, Y., Alvarez, D., Riediger, M., Yuan, H., Fish, T., Liu, J., Thannhauser, T.W. and Li, L. (2015) Arabidopsis OR proteins are the major posttranscriptional regulators of phytoene synthase in controlling carotenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 3558-3563.

ANEXOS

ANEXO A

Lista iniciadores clonagens.

Sequência	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
FIP pENTR	CACCATGACGATCGCACCGGCATTG	TGATTTATCAATCTGGTTAAGC
FIP sol pENTR	CACCAAACGCAAAGACACGTGTCC	TTATGATTTATCAATCTGGTTAAGCTT
FTSH5 pENTR	CACCATGGCGACCACATCATCAAA	AGAAACATATAACTCGGCTTGTCC
D1 pENTR	CACCATGGCATTAAGATTTCCAAGGTT	TTAACCGAATTTGCCCGA
AT4G05180 pENTR	CACCATGGCTCAAGCAGTGACTTC	TTAACCGAGCTTGGCAAGA
AT4G10340 pENTR	CACCATGGCGTCTTTGGGTGTG	TTAGAGAGTGGGAGCTCTCTCG
AT4G21280 pENTR	CACCATGGCTTCGATGGGTGGAT	TTAACCAAGCTTGGCAAGAACT
AT2G34430 pENTR	CACCATGGCCGCCTCGACA	TCACTTTCCGGGGACGA
AT5G54270 pENTR	CACCATGGCATCAACATTCACGAG	TTAAGCTCCAGGTGCAAACTTAG
AT1G76100 pENTR	CACCATGGCCGCAATTACATCAG	TTACTTGACGGTGAGTTTCCC

As análises de especificidade dos iniciadores foram feitas utilizando o *software online Primer Blast- NCBI* (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</u>), utilizando *A. thaliana* como organismo de referência.

ANEXO B

Lista iniciadores para PCR.

Sequência	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
attR	AAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCCCTTCA	AAAGCTGGGTCGGCGCGCCCACCCTT
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC	
LB mut	AACTGCATTCCCGATCCTCT	
RB mut		AAATCCTGCTCCGTCACATT
P35S	CGTAAGGGATGACGCACAATC	
Actin7 RT	CTAGAGACAGCCAAGAGCAGTTC	GTTTCATGGATTCCAGGAGCTTC
D1 RT	TCCGGAACTGCCATTCTAAC	TCCGATTCCAAAGTTCGTTC
FtsH5 RT	TTGCTGCTAGACGTGAGCTT	TGGATCATACTCCGGCATAA
FIP RT	CATTCCCGATCCTCTTCAAA	CGAGTCCATTGCAGTTAGCA
HSP60-2 RT	CCGCATTAGTTGATGCTGCAAGTG	CGTTGGAATCTCAGTCACAACTGC
AOX1a RT	AGCATCATGTTCCAACGACGTTTC	GCTCGACATCCATATCTCCTCTGG
Cu-Zn-SOD RT	GGAACTGCCACCTTCACAAT	TCCAGTAGCCAGGCTGAGTT
рАСТ	GCGTATAACGCGTTTGGAAT	GCACGATGCACAGTTGAAGT

As análises de especificidade dos iniciadores foram feitas utilizando o *software online Primer Blast- NCBI* (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</u>), utilizando *A. thaliana* como organismo de referência.

ANEXO C

Passos da seleção de plantas transformadas superexpressando *FIP*. Produção de plantas superexpressando o gene FIP. (A) Plantas produzindo sementes após o processo de transformação. (B) Plantas secas com sementes maturadas e prontas para serem colhidas. (C) Sementes F1 sendo selecionadas em placas com meio MS 0,5X mais 50mg/ml do antibiótico canamicina. (D) Detalhe da placa de seleção de transformantes mostrando que algumas plantas se mantêm mais verdes e outras aparentam sintomas de clorose. (E) Plantas de geração F2 crescendo em vasos separadamente.



ANEXO D

Confirmação dos mutantes knockdown FIP. Amplificação de fragmentos de tamanhos diferentes usando diferentes combinações de iniciadores em reações de PCR. Foi utilizado amostras de DNA de plantas de três semanas de plantas mutantes. Os iniciadores usados foram LBb1.3 que amplifica um fragmento de 250 pb do T-DNA; e LP (left) e RP (right) que flanqueiam a região de inserção do T-DNA de mabos os mutantes de acordo com o diagrama apresentado na Figura 9A. Um fragmento de 307 pb era esperado utilizando os iniciadores LP e RP nas plantas WT e em plantas mutantes heterozigotas. Um fragmento de 512 ou 390 pb era esperado utilizando os iniciadores RP e LBb1.3 em plantas mutantes fip-1 e fip-2, respectivamente, homo e heterozigotas. Nenhuma amplificação era esperada nos mutantes usando os iniciadores LP e LBb1.3, considerando uma orientação upstream da inserção do T-DNA. (A) Colunas 1-16 são amplificações obtidas de DNA de indivíduos independentes mutantes fip-1 (Salk_080769) da geração T3. (B) Colunas 1-12 são amplificações obtidas de DNA de indivíduos independentes mutantes fip-2 (Salk_069143) da geração T3. M: Marcador de DNA 1 kb Plus (Thermo); WT: amostras de DNA de plantas selvagens; C-: controle da reação de PCR sem nenhuma amostra de DNA. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em géis de agarose 1%. Adaptado de LOPES et al., Frontiers in Plant Science, 2018.



ANEXO E

Etapas da produção do anticorpo anti-FIP. (A) Etapa de purificação da proteína recombinante 6xHis-FIP em condições desnaturantes. Visualização em SDS-PAGE corado com *Comassie blue*. O tamanho da proteína é de 9,8 kDa. M: Marcador de peso molecular; PT: extrato de proteínas totais extraído em *buffer* 8M de uréia pH 8.0; L1-3: etapas de lavagens da coluna de níquel com *buffer* 8M de uréia pH 6.3; E1-2: Eluição da proteína com *buffer* 8M de uréia pH 3.3. **(B)** Proteína 6xHis-FIP foi digerida e dessalinizada antes de ser enviada para confirmação por Espectrometria de Massas (CEFAP/USP). Visualização em SDS-PAGE corado com *Comassie blue*. M: Marcador de peso molecular; FP: FIP purificada; FD1-2: FIP dessalinizada após etapa de disgestão. A etapa de dessalinização foi repetida até a obtenção de ~2mg de proteína. **(C)** anticorpo anti-FIP foi produzido em coelho pelo Laboratório de Imunologia do Centro de Biotecnologia – UFRGS (RS/Brasil). O processo levou cerca de 2 meses. O anticorpo foi testado por *immunoblot* contra diferentes concentração (1, 2, 4, 6 e 10 μg) da proteína 6xHis-FIP purificada.

