

ORIGEM, EVOLUÇÃO E DIRECIONAMENTO DA PROTEÍNA THI1 EM PLANTAS

JULIANA DANTAS DE ALMEIDA

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade
de São Paulo, para obtenção de título de
Doutor em Agronomia, Área de
Concentração: Genética E Melhoramento de
Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro – 2004

ORIGEM, EVOLUÇÃO E DIRECIONAMENTO DA PROTEÍNA THI1 EM PLANTAS

JULIANA DANTAS DE ALMEIDA
Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas

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

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade
de São Paulo, para obtenção de título de
Doutor em Agronomia, Área de
Concentração: Genética E Melhoramento de
Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro – 2004

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Almeida, Juliana Dantas de
Origem, evolução e direcionamento da proteína TH1 em plantas / Juliana Dantas
de Almeida. - - Piracicaba, 2004.
94 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.
Bibliografia.

1. Biologia celular 2. Enzimas 3. Expressão gênica 4. Filogenia 5. Genes 6.
Plantas transgênicas 7. Proteínas de plantas I. Título

CDD 575.1

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

OFEREÇO

Àqueles que apostam na ciência para produção do conhecimento.

“Sempre que alguém quer esgotar um assunto, esgota a paciência do leitor.”

Oscar Wilde

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcio de Castro Silva Filho pela orientação, pelos conhecimentos transmitidos, pela confiança, pelo incentivo e pelo exemplo de dedicação, eficiência e competência.

À Prof^a. Dra. Marie-Anne van Sluys, IB, USP e ao Prof. Dr. Carlos F. M. Menck, ICB2 - USP, pela colaboração, discussões de resultados, sugestões e amizade.

Ao Prof. Alberto Ribeiro, IB - USP e a Waldir Caldeira, pela realização das análises de microscopia confocal.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética, ESALQ - USP, em especial a Dra. Janay A. Santos, Dra. Sílvia M. Cuco e Dr. Mateus Mondin, pelo apoio técnico na utilização do microscópio e à Prof^a Dra Margarida L. R. de Aguiar Perecin por colocar seu laboratório à disposição.

A todos os professores, alunos e funcionários do Departamento de Genética da ESALQ – USP, especialmente aos funcionários do setor de manutenção pelos freqüentes reparos na sala de cultivo de *Arabidopsis thaliana*.

A Phellippe Arthur Santos Marbach pelo companheirismo, profissionalismo e parceria nas análises filogenéticas e Carolina Morgante Vianna pela significativa ajuda na confecção da tese.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, ESALQ - USP, pela amizade, paciência e incentivo em todos os momentos. Pelas riquíssimas discussões de cunho científico e pelos momentos de descontração.

À Fapesp, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

De maneira muito especial à Hélio da Costa Almeida e Maria Auxiliadora Dantas Almeida, meus pais. À Maria do Carmo Dantas e Maria Rita Dantas, minhas tias. À Marcus Vinícius Romano Lemos. Pessoas por quem tenho admiração e amor profundos e que estão sempre comigo em todos os momentos apesar das distâncias físicas.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Proteína THI1.....	3
2.2 Importação de proteínas para mitocôndrias e cloroplastos.....	6
2.2.1 Importação de proteínas em mitocôndrias.....	6
2.2.1.1 Maquinaria de translocação TOM.....	9
2.2.1.2 Maquinaria de translocação TIM.....	12
2.2.1.3 Processamento de precursores mitocondriais.....	14
2.2.1.4 Características estruturais dos precursores da matriz mitocondrial.....	15
2.2.2 Importação de proteínas para os cloroplastos.....	16
2.2.2.1 Direcionamento de proteínas aos envelopes externo e interno.....	18
2.2.2.2 Transporte de proteínas ao estroma e tilacóides.....	22
2.3 Duplo direcionamento.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Endereçamento da proteína THI1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
3.1.1 Cassetes de expressão.....	30
3.1.1.1 Seqüenciamento das regiões de ligação do fragmento <i>thi1</i> ao vetor pBSK ⁺	31

3.1.1.2 Amplificação dos fragmentos de DNA correspondentes às seqüências do promotor 35S e às regiões codificadoras das proteínas THI1 e GFP.....	32
3.1.1.3 Obtenção do fragmento Pr4 correspondente ao promotor <i>thi1</i>	33
3.1.1.4 Clonagem dos fragmentos em vetor pBSK ⁻	33
3.1.1.5 Transferência dos cassetes de expressão 1, 2, 3 e 4 para o vetor binário pCAMBIA 2300.....	37
3.1.1.6 Armazenamento das bactérias transformadas com os plasmídeos utilizados nas construções gênicas.....	37
3.1.2 Material vegetal.....	38
3.1.2.1 Cultivo <i>in vivo</i>	38
3.1.2.2 Cultivo <i>in vitro</i>	39
3.1.3 Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
3.1.3.1 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101::pMP90....	39
3.1.3.2 Inoculação de <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
3.1.3.3 Seleção e diagnóstico das plantas transformadas.....	41
3.1.4 Análise de <i>Arabidopsis thaliana</i> transgênica em microscópio confocal.....	41
3.1.4.1 Condições da análise no confocal.....	41
3.1.4.2 Tratamento com “MitoTracker”.....	42
3.2 Endereçamento de THI1 de cana de açúcar.....	42
3.2.1 Cassetes de expressão.....	42
3.2.1.1 Oligonucleotídeos iniciadores e amplificação dos fragmentos contendo a seqüência de direcionamento dos parálogos de THI1 de cana de açúcar.....	42
3.2.1.2 Clonagem dos fragmentos em vetor pBSK ⁻	43
3.2.2 Transformação via biobalística.....	44
3.2.2.1 Visualização de GFP.....	44
3.2.3 Análises filogenéticas.....	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47

4.1 THI1 em cana de açúcar: direcionamento e filogenia	47
4.1.1 Isoformas de THI1 de cana de açúcar estão presentes apenas em cloroplastos.....	47
4.1.2 THI1 é provavelmente herança de Archaea.....	54
4.2 Localização subcelular de THI1 em <i>Arabidopsis thaliana</i>	57
4.2.1 Análise da localização subcelular de THI1 em diferentes tecidos.....	57
4.2.1.1 THI1 está presente majoritariamente em cloroplastos de <i>Arabidopsis thaliana</i> expressando a construção Pr4+THI1+smGFPnos.....	57
4.2.1.2 Análise da localização subcelular de THI1 em diferentes etapas do desenvolvimento.....	66
4.2.1.3 Análise da localização subcelular de THI1 em diferentes concentrações de tiamina e tiamina pirofosfato.....	67
4.2.1.4 A proteína quimérica THI1-GFP não é expressa em plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transgênica contendo a construção 35S+THI1+smGFPnos.....	70
5 CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

ORIGEM, EVOLUÇÃO E DIRECIONAMENTO DA PROTEÍNA THI1 EM PLANTAS

Autora: Juliana Dantas de Almeida

Orientador: Prof. Dr. Marcio de Castro Silva Filho

RESUMO

THI1 é provavelmente uma proteína bifuncional, uma vez que está envolvida na biossíntese de tiamina e na estabilidade do DNA organelar, notadamente o mitocondrial. Interessantemente, a biossíntese de tiamina ocorre em compartimentos distintos em plantas (cloroplastos) e em leveduras (mitocôndrias). Ensaios de complementação funcional mostraram que o gene *thi1* de *Arabidopsis thaliana* é capaz de complementar uma cepa mutante de levedura para o gene ortólogo. A proteína THI1 de *Arabidopsis thaliana* é codificada por um único gene. Uma análise detalhada da região N-terminal da proteína, responsável pela sua localização na células, revelou a presença de duas sequências de direcionamento adjacentes. Na extremidade N-terminal encontra-se um peptídeo de trânsito cloroplástico seguida por uma região capaz de formar uma α -hélice anfifílica, tipicamente encontrada em pré-sequências de direcionamento mitocondriais. Com o objetivo de avaliar se a localização final de THI1 pode apresentar um tipo de regulação temporal ou espacial, foram obtidas plantas transgênicas expressando a proteína THI1 fundida a GFP

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

