

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

HISTÓRIA EVOLUTIVA E CARACTERIZAÇÃO DE GENES HIPP  
*(Heavy Metal Associated Isoprenylated Plant Protein)*

**JOÃO BRAGA DE ABREU NETO**

Porto Alegre

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**HISTÓRIA EVOLUTIVA E CARACTERIZAÇÃO DE GENES HIPP (Heavy Metal  
Associated Isoprenylated Plant Protein)**

**JOÃO BRAGA DE ABREU NETO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular do Centro de  
Biotecnologia da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, como requisitos parcial para a  
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora

Prof. Dra. Márcia Pinheiro Margis

Porto Alegre

2013

## **Instituição e Fontes Financiadoras**

Esta tese de doutorado foi plenamente realizada na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Núcleo de Genômica Funcional de Plantas do Laboratório de Genética Vegetal, localizado no Instituto de Biociências, e em colaboração com o Laboratório de Genomas e Populações de Plantas do Centro de Biotecnologia, ambos pertencentes a esta universidade.

Os recursos para a realização deste estudo foram providos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*"Se você acha que a educação é cara,  
experimente pagar o preço da ignorância."*

*Derek Bok,  
ex-reitor da Universidade Harvard*



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos membros da banca, por aceitarem avaliar este trabalho.

À Professora Doutora Márcia Pinheiro Margis, que me orientou desde minha graduação. Que, por sua compreensão, força de vontade e integridade, é um exemplo para mim e a todos que a conhecem.

À amiga e colega Andréia Turchetto Zolet, minha maior colaboradora na elaboração do nosso artigo e desta tese.

A todos os amigos dos laboratórios de Genética Molecular Vegetal e de Genomas e Populações de Plantas, com os quais compartilhei bons e maus momentos ao longo destes sete anos. Encontrando-os desde domingos pela manhã à sexta-feiras à noite, encarando com bom humor as dificuldades que iam surgindo em nossos projetos.

Ao meu colega Eduardo Soares, que sempre me lembrava de comer e sair um pouco da frente do computador nestes últimos meses de doutorado.

Aos amigos que seguiram por caminhos diferentes na vida. E que mesmo não entendendo o quê eu fazia ou porque, sempre torceram por mim.

Um agradecimento em especial para o pessoal da secretaria do PPGBCM, Silvia Regina Centeno e Luciano Saucedo, que me ajudaram muito em diversos momentos ao longo destes últimos anos.

Aos meus pais, Paulo Oliveira de Abreu e Marli Krein de Abreu, pela confiança e apoio durante todos os momentos, e por possibilitarem que eu pudesse estudar e seguir a carreira de minha escolha.

Obrigado.

## SUMÁRIO

INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCIADORAS.....	3
AGRADECIMENTOS .....	5
SUMÁRIO .....	6
LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE TABELAS .....	11
LISTA DE ABREVIATURAS .....	12
RESUMO .....	13
ABSTRACT.....	14
<b><u>INTRODUÇÃO .....</u></b>	<b>15</b>
METAIS E PLANTAS .....	16
METALOCHAPERONAS.....	19
IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA DAS PROTEÍNAS HIPPS.....	24
O ARROZ COMO ORGANISMO MODELO .....	26
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b><u>CAPÍTULO I: HIPP – UMA FAMÍLIA DE GENES EXCLUSIVOS DE PLANTAS VASCULARES.</u></b>	<b>29</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
BUSCA E ANÁLISE DE GENES HIPPS .....	32
ANÁLISES FILOGENÉTICAS .....	32
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b><u>CAPÍTULO II: ANÁLISES DA EXPRESSÃO DOS GENES HIPPS E DA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DOS SEUS PRODUTOS GÊNICOS.....</u></b>	<b>49</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>52</b>
ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA EXPRESSÃO DE GENES HIPP.....	52

TRATAMENTOS DAS PLANTAS PARA ANÁLISE DE RESPOSTA A ESTRESSES ABIÓTICOS.....	52
ANÁLISE POR RT-QPCR (QUANTITATIVE REVERSE TRANSCRIPTION PCR) .....	53
LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR .....	54
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
EXPRESSÃO DE GENES HIPPS EM DIFERENTES ÓRGÃOS E AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO .....	55
EXPRESSÃO DE GENES HIPP EM RESPOSTA A CÁDMIO .....	60
EXPRESSÃO DOS GENES HIPPS EM RESPOSTA AO FRIO E À SECA .....	62
EXPRESSÃO DE GENES HIPP EM RESPOSTA A PATÓGENOS .....	64
LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR .....	67
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
EXPRESSÃO DE HIPPS EM DIFERENTES ÓRGÃOS E FASES DO DESENVOLVIMENTO DA PLANTA .....	69
PARTICIPAÇÃO DE HIPPS NA RESPOSTA A METAL PESADO .....	69
HIPPS EXPRESSOS NA RESPOSTA AO FRIO E SECA.....	71
PARTICIPAÇÃO DE HIPPS NA INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO .....	72
HIPPS CITOSÓLICAS SOLÚVEIS .....	74
<b><u>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</u></b>	<b><u>76</u></b>
<b><u>REFERÊNCIAS .....</u></b>	<b><u>80</u></b>
<b><u>ANEXO 1</u></b> Artigo publicado no periódico FEBS Journal: <b><u>Heavy Metal-Associated Isoprenylated Plant Protein (HIPP): Characterization of a family of proteins exclusive to plants .....</u></b>	<b><u>87</u></b>
<b><u>ANEXO 2</u></b> CURRICULUM VITAE .....	<b><u>101</u></b>

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1 – Modelo de transporte de íons metálicos pela célula vegetal (*A. thaliana*) mostrando transportadores, quelantes, e metalochaperonas já descritas pela literatura (Barth *et al.*, 2009; Festa e Thiele, 2011; Hossain *et al.*, 2012; Lin e Aarts, 2012; Palmer e Guerinot, 2009). Os metais preferenciais de cada proteína estão simbolizados pela cor, azul para Cu, roxo para Zn e laranja para Fe. .... 18
- Fig. 2 - Transferência de um íon de cobre ( $\text{Cu}^{+1}$ ) entre o domínio HMA de uma metalochaperona (ATX1) e o domínio HMA de sua proteína alvo (a bomba de Cu, ATPase, CCC2) – Ilustração retirada da revisão de O'Halloran e Culotta (2000). .... 20
- Fig. 3 – Rotas de transporte de cobre por uma célula eucariótica que utilizam as chaperonas de cobre ATX1, CCS ou COX17. Ilustração adaptada de Culotta e Luk (2004)..... 21
- Fig 4 - Filogenia e tempo estimado de divergência (em milhões de anos) de oito espécies representativas de Viridiplantae. Fonte: Guo, 2013 ..... 31
- Fig 5 - Árvore filogenética de proteínas similares a ATX1 inferida por análise Bayesiana usando sequências do domínio HMA de proteínas ATX1, CCH, HIPP, HPP de espécies representativas de fungos, animais, plantas e algas: *Saccharomyces cerevisiae* (Sce), *Schizosaccharomyces pombe* (Spo), *Homo sapiens* (Hsa), *Mus musculus* (Mmu), *Danio rerio* (Dre), *Aedes aegypti* (Aae), *Drosophila melanogaster* (Dme), *Selaginella moellendorffii* (Smo), *A. thaliana* (Ath), *O. sativa* (Osa), *Populus trichocarpa* (Ptr), *Setaria italica* (Sit), *Physcomitrella patens* (Ppa), *Chlamydomonas reinhardtii* (Cre), *Volvox carteri* (Vca) e *Ostreococcus lucimarinus* (Olu). .... 41
- Fig. 6 - Análise filogenética de HIPPs inferida por análise Bayesiana usando a sequência peptídica do domínio HMA de todas as HIPPs identificadas em cinco espécies de plantas: *Selaginella moellendorffii* (em letras pretas), *A. thaliana* (em verde), *O. sativa* (em vermelho), *Populus trichocarpa* (em azul) e *Setaria italica* (em laranja). .... 42
- Fig 7 - Arquitetura e tamanho de proteínas HIPP de *A. thaliana* (A) e arroz (B). O dendograma contendo todas as HIPP identificadas nesses genomas foi montado pelo programa MEGA 5.1, usando a metodologia de neighbor-joining com 2000 repetições de bootstrap. A arquitetura de domínios conservados baseada nos resultados do programa MEME 5.05. .... 43

Fig.8 - Modelo da diversificação das metalochaperonas de plantas a partir de proteína ATX1 de organismo ancestral das plantas terrestres composta essencialmente por um domínio HMA globular. Ao longo da evolução das plantas, retratada em etapas diferentes (1-5), algumas proteínas foram mais conservadas (setas cinza escuro) outras se alteraram (setas cinza claro) com a adição de novas sequências compostas de diferentes motivos proteicos (linha volteada) e pela adição de um grupamento de farnesil ou geranylgeranyl (em azul).	45
Tabela 4. Número de genes de algumas famílias de transportadores de metais e metalochaperonas nos genomas analisados.	46
Fig 9 A) Estrutura de proteínas HIPP representativas em comparação com a de outras metalochaperonas conhecidas. Domínios conservados identificados pelo programa MEME 5.1 (B-E): Domínio HMA (B) representado em vermelho em A; motivo de isoprenilação (C) representado pelas caixas azuis; GRD (D) em rosa; e, em amarelo, PRM (E).	47
Fig. 10 Modelos de estruturas secundárias atribuídas aos motivos GRD (A) e PRM (B). Fonte: Sachetto-Martins et al, 2000; Kay et al., 2000	48
Fig. 11 – Perfil de expressão de genes HIPP de <i>A. thaliana</i> e <i>O. sativa</i> ao longo do desenvolvimento da planta (em log <sub>2</sub> ). Adaptado de Genevestigator 4.0	56
Fig. 12 – Perfil de expressão de genes HIPP de <i>A. thaliana</i> em diferentes órgãos da planta (em log <sub>2</sub> ). Adaptado de Genevestigator 4.0	57
Fig. 13 – Perfil de expressão de genes HIPP de <i>O. sativa</i> em diferentes órgãos e tecidos da planta (em log <sub>2</sub> ). Adaptado de Genevestigator 4.	58
Fig. 14– Perfil de expressão de genes HIPP de <i>O. sativa</i> em diferentes tecidos da planta ao longo do seu desenvolvimento. Adaptado de RiceXPro. Cladograma apresenta o agrupamento de sondas por similaridade de perfil de expressão.	59
Fig. 15 - Perfil de expressão de genes HIPP de <i>A. thaliana</i> e <i>O. sativa</i> em plantas expostas a diferentes estresses por metal (em log <sub>2</sub> ). Adaptado de Genevestigator 4.0	60
Fig 16 – Análise por RT-qPCR de genes HIPP em plântulas de duas semanas de idade expostas à CdCl <sub>2</sub> 60µM por 6, 12 e 24 horas. Expressão relativa de cada gene foi normalizada pela expressão de três genes controles <i>OsFDH</i> , <i>OsNSL</i> e <i>OsGAPDH</i> ). Diferenças estatisticamente significantes entre plantas tratadas e seus controles são representadas por *(P< 0.05) e ** (P< 0.01).	61

Fig. 17 – Expressão de HIPPs de arroz em resposta à tratamentos de frio (*cold*), sal (*salt*) e seca (*drought*). Heat map mostrando mudanças de expressão significantes ( $p > 0.05$ ) de genes HIPP em microarranjo. Sondas com diferença não significantes estão em branco, entre amostras controle e tratadas reprimidas em verde e induzidas em vermelho. Cladograma à direita representa o agrupamento das sondas analisadas por similaridade de perfil de expressão. .... 63

Fig. 18 – Resposta de *OsHIPP21*, *OsHIPP28* e *OsHIPP41* em plântulas de arroz submetidas a diversos tratamentos: Cádmio (exposição de 24 h com  $\text{CdCl}_2$  60  $\mu\text{M}$ - barras pretas); seca (15 dias - rachurado) e frio ( $4^\circ\text{C}$ / 24 h – colunas brancas). Resultados de RTqPCR mostrando a expressão relativa de cada gene normalizada pela expressão de três genes controles. Valores apresentados na tabela. Diferenças significantes entre plantas tratadas e seus controles são representadas por \*( $P < 0.05$ ) e \*\* ( $P < 0.01$ ). .... 64

Fig. 19 – Perfil de expressão de HIPPs em plantas de *A. thaliana* expostas a diferentes organismos patogênicos. Adaptado de Genevestigator 4.0 ..... 65

Fig. 20 – Perfil de expressão dos genes HIPPs em plantas de arroz expostas a diferentes organismos patogênicos. Adaptado de Genevestigator 4.0 ..... 66

Fig. 21 – Localização subcelular em protoplastos de arroz. Em verde, marcação em cor-falsa, da clorofila enquanto a proteína repórter é mostrada em vermelho. A e B- Protoplastos expressando somente RFP (controle positivo da transformação); C e D) – expressando RFP+*OsHIPP21*; E – K) - RFP+*OsHIPP41* . H e I) marcação do núcleo com DAPI em azul . A – F cada imagem mostra uma célula de uma transformação independente. H – J mostra o mesmo protoplasto sob diferentes filtros. K mostra uma célula necrótica com seu conteúdo celular extravasando ..... 68

Fig. 22 – Modo de ação de *AtHIPP26*, captando  $\text{Zn}^{2+}$  ao entrar na célula e o levando até o núcleo, onde o íon é transferido para *AtHB29*, permitindo que esse fator de transcrição se ligue à região promotora de genes de resposta à desidratação ..... 72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Micronutrientes metálicos das plantas, suas concentrações no solo (litosfera), numa planta típica, famílias de transportadores e exemplos de proteínas que usam estes metais (adaptado de Palmer e Guerinot, 2009).....	17
Tabela 2- Número de metalochaperonas identificadas em diferentes genomas analisados. HPPs (incluindo ATX1, CCH e outras HPPs) e HIPPs.....	34
Tabela 3a - Proteínas identificadas em diferentes genoma de referência, proteínas similares a ATX1 em organismos não-vegetais e HIPPs e HPPs em plantas. O tamanho de cada proteína é mostrado pelo número de aminoácidos e sua composição, pela porcentagem de prolina, glicina e glutamina, além do número de resíduos de cisteína. ....	35
Tabela 3b -HIPPs e HPPs putativas identificadas no genoma de <i>A. thaliana</i> . Proteínas descritas quanto ao número de aminoácidos (tamanho) e composição. Predição subcelular dada por três aplicativos distintos (CELLO, PredSL e TargetP).....	36
Tabela 3c - HIPPs e HPPs putativas identificadas no genoma de <i>O. sativa</i> . Proteínas descritas quanto ao número de aminoácidos (tamanho) e composição. Predição subcelular dada por três aplicativos distintos (CELLO, PredSL e TargetP). ....	37
Tabela 3d - HIPPs e HPPs putativas identificadas no genoma de <i>P. trichocarpa</i> . Proteínas descritas quanto ao número de aminoácidos (tamanho) e composição.....	38
Tabela 3e - HIPPs e HPPs putativas identificadas no genoma de <i>S. italica</i> . Proteínas descritas quanto ao número de aminoácidos (tamanho) e composição.....	39
Tabela 4. Número de genes de algumas famílias de transportadores de metais e metalochaperonas nos genomas analisados. ....	46
Tabela 5. Sequências dos pares de <i>primers</i> utilizados nas reações de RT-qPCR.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

AtHB29: *Zinc-finger Homeodomain Binding protein 29*  
ATX1: antioxidant protein 1  
CCC2: ATPase transportadora de cobre em levedura  
CCH: copper chaperone (chaperona de cobre);  
CCS: copper chaperone for Cu–Zn superoxide dismutase;  
CDF: *cation diffusion facilitator*;  
cDNA: DNA complementar  
CopZ: Chaperona de cobre bacteriana  
COX: citocromo oxidase  
COX17: chaperona de cobre para a citocromo c oxidase;  
CTR: *copper transporter*  
GFP: *Green Fluorescent Protein* (proteína fluorescente verde)  
GRD: *Glycine Rich Domain*  
HIPP: Heavy metal-associated isoprenylated plant protein;  
HMA: Heavy metal-associated domain;  
HM-ATPase ou HMA: *Heavy metal transporting ATPase*  
HPP: Heavy metal-associated plant protein.  
IRT: *iron-regulated transporte*  
LCT: Low-affinity Cation Transporter  
MTP: *metal tolerance protein*  
NRAMP: *natural resistance-associated macrophage protein*  
PCR: *polymerase chain reaction*  
PRM: *Proline Rich Motif*  
RFP: *Red Fluorescent Protein* (proteína fluorescente verde)  
RT-qPCR: PCR quantitativo em tempo real  
YSL: *yellow stripe like*  
ZIP: *zinc-iron permease*



## RESUMO

Metalochaperonas são proteínas chave para o transporte seguro de íons metálicos dentro das células. HIPPs (*Heavy metal associated Isoprenylated Plant Proteins*) são metalochaperonas que contêm um domínio de ligação a metais pesados (HMA) e um motivo C-terminal de isoprenilação. Estudos anteriores demonstraram que HIPPs podem se ligar e transportar íons metálicos diferentes como  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  e  $\text{Cd}^{+2}$ . Proteínas desta família foram descritas como envolvidas em diferentes processos: (i) homeostase de metais pesados e mecanismos de desintoxicação, em especial na tolerância a cádmio; (ii) resposta transcricional a frio e seca, e (iii) interações planta-patógeno. Devido a sua grande diversidade e possível redundância funcional entre proteínas semelhantes, as HIPPs foram pouco estudadas até o momento. A caracterização desta família gênica é importante não somente para a compreensão de seu papel na homeostase celular, mas também porque pode ter fortes aplicações no melhoramento de plantas cultivadas. No presente estudo, demonstramos que HIPPs compõem uma grande e diversa família de genes encontrados somente em plantas vasculares e que, em angiospermas podem ser divididos em cinco clusters distintos. Ao explorar dados da transcrição de HIPPs em *Arabidopsis thaliana* e arroz (*Oryza sativa*), observa-se que os genes desta família apresentam um amplo espectro de padrões de expressão. Análises de expressão por RT-qPCR permitiram mostrar que os genes HIPPs de arroz *OsHIPP21*, *OsHIPP28* e *OsHIPP41* são induzidos por cádmio. O gene *OsHIPP41* também se mostrou altamente expresso em resposta a frio e seca. Em protoplastos de arroz, as proteínas OsHIPP21 e OsHIPP41 foram observadas no citosol e no núcleo da célula. Nossos resultados indicam que as proteínas da família HIPP desempenham um papel importante no desenvolvimento das plantas vasculares e na resposta das plantas a mudanças ambientais.

## ABSTRACT

Metallochaperones are key proteins for the safe transport of metallic ions inside the cell. HIPPs (Heavy metal associated Isoprenylated Plant Proteins) are metallochaperones that contain a metal binding domain (HMA) and a C-terminal isoprenylation motif. Previous studies demonstrated that HIPPs can bind and transport different metallic ions as  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  and  $\text{Cd}^{+2}$ . Proteins of this family are shown to be involved in diverse processes as (i) heavy metal homeostasis and detoxification mechanisms, especially those involved in cadmium tolerance; (ii) transcriptional responses to cold and drought, and (iii) plant-pathogen interactions. Because of their diversity and possible functional redundancy between similar proteins, few studies were made with HIPPs until now. The characterization of this family is important not only for the understanding of its role in cellular homeostasis, but also for its possible biotechnological application in crops improvement. In this study, we provided evidence that HIPPs compose a vast family of genes found only in vascular plants and that, in angiosperms, can be separated into five distinct clusters. Exploring transcriptional data from *Arabidopsis thaliana* and rice (*Oryza sativa*) it was observed that genes from this family show a broad spectrum of expression patterns. By RTqPCR analysis it was identified that the rice Hipp genes *OsHIP21*, *OsHIP28* and *OsHIP41* are induced by Cd stress. The latter was also highly expressed in response to cold and drought stresses. In rice protoplasts, the proteins OsHIP21 and OsHIP41 were localized in the cytosol and the cell nucleus. Our results suggest that HIPPs play an important role in the development of vascular plants and in plant responses to environmental changes.

## **INTRODUÇÃO**

## Metais e Plantas

Uma das características que diferencia um ser vivo de algo não vivo é a sua capacidade de manter a ordem, quando a tendência natural seria para a desordem (entropia) (Schrödinger, 1944). Para tal, diversos mecanismos evoluíram para controlar a concentração e o estado em que diferentes elementos se encontram dentro da célula, de forma a direcionar as reações metabólicas e impedir interações que causem dano ao organismo. Entre esses elementos essenciais encontramos metais como ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), níquel (Ni), manganês (Mn) e cobalto (Co) (Clemens, 2006).

Estima-se que de metade a um terço de todas as proteínas sejam metaloproteínas, proteínas que possuem um ou mais íons metálicos na sua estrutura, agindo como componente estrutural ou como cofator catalítico (Dupont *et al.*, 2010; Huffman e Halloran, 2001; Rubino & Franz, 2012). As propriedades físico-químicas desses elementos de transição permitem diversas reações metabólicas, como a transferência de elétrons e a oxidação de moléculas. Essas mesmas propriedades fazem com que os metais sejam potencialmente tóxicos ao interagir sem controle e danificando elementos da célula. Por esse motivo, um organismo vivo precisa de diversos mecanismos para manter a homeostase correta de cada um desses elementos (Dupont *et al.*, 2010).

Em plantas, muitos metais são denominados de micronutrientes, por serem essenciais em pequenas concentrações (Tabela 1), outros são tóxicos mesmo em baixas concentrações. Este é o caso do cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e Chumbo (Pb). Portanto, a planta precisa ser capaz de selecionar os diferentes íons metálicos, e regular precisamente sua concentração e disponibilidade dentro da célula (Palmer & Guerinot, 2009). Porém a concentração destes elementos dentro da célula não é a única variável a ser regulada pelos seres vivos. Esses elementos metálicos, em especial na formação de complexos com íons divalentes de metais de transição, possuem uma ordem natural de afinidade e estabilidade conhecida como a série de equilíbrio Irving-Williams:  $Mg^{+2}/Ca^{+2} < Mn^{+2} < Fe^{+2} < Co^{+2} < Ni^{+2} < Cu^{+2} > Zn^{+2}$ . Sem um controle rígido, metais mais competitivos como o cobre ( $Cu^{+2}$ ) ocupariam o lugar de outros íons metálicos nas ligações com metaloproteínas. Por esse motivo esses metais, e o cobre em especial são imediatamente quelados por proteínas e pequenos ligantes assim que entram nas células eucarióticas (Rubino & Franz, 2012).

Tabela 1 - Micronutrientes metálicos das plantas, suas concentrações no solo (litosfera), numa planta típica, famílias de transportadores e exemplos de proteínas que usam estes metais (adaptado de Palmer e Guerinot, 2009)

Metal	Estado relevante biologicamente	Litosfera (mg/kg)	Planta (mg/kg)	Família de transportadores	Exemplos de metaloproteínas
Cu	Cu <sup>+</sup> , Cu <sup>+2</sup>	50	6	CTR, HM-ATPase	Plastocianinas, COX, SOD
Fe	Fe <sup>+2</sup> , Fe <sup>+3</sup>	45.000	100	FRD3, NRAMP, OPR, VIT, YSL, ZIP	Citocromos, Fe-S Proteínas, SOD
Mn	Mn <sup>+2</sup> , Mn <sup>+3</sup> , Mn <sup>+4</sup>	950	50	CAX, NRAMP, ZIP	SOD, enzimas do fotossistema II,
Mo	Mo <sup>+4</sup> , Mo <sup>+6</sup>	1,5	0,1	MOT	Nitrato redutase, aldeído oxidase
Ni	Ni <sup>+2</sup>	80	0,1		Urease
Zn	Zn <sup>+2</sup>	75	20	ZIP, HM-ATPase, MTP	RNA polimerase, álcool desidrogenase, SOD

Geralmente, uma enzima só se torna ativa quando ligada a um íon metálico específico. Se outro íon ocupar seu sítio catalítico, a proteína não será capaz de funcionar corretamente. Então, para desempenhar seu papel, o íon metálico correto deve ser apresentado à metaloproteína correta e no momento apropriado (Culotta e Luk, 2004).

Ao longo dos últimos anos, pesquisadores vêm identificando proteínas acessórias que coexistem com metaloproteínas e são capazes de lhes fornecer o íon correto na hora e lugar apropriado (Shin *et al.*, 2012). Essas proteínas receberam o nome de metalochaperonas ou chaperonas para metaloproteínas. Esta denominação se originou da definição de chaperona como aquela responsável por manter o comportamento adequado, e portanto, uma metalochaperona é responsável por fazer um íon metálico potencialmente promiscuo se comportar adequadamente (Cobine, *et al.*, 2006; Culotta e Luk, 2004; Robinson e Winge, 2010). Existem vários tipos de proteínas diferentes envolvidas no processo de homeostase e transporte de metais. Podem-se destacar três classes muito distintas que compõem esses mecanismos: transportadores, quelantes e metalochaperonas.

Íons metálicos são incapazes de ultrapassarem sozinhos a bicamada lipídica das membranas biológicas, necessitando para isso da ação de transportadores transmembrana (bombas ou canais iônicos), que translocam os íons para dentro ou fora da célula ou de determinados compartimentos celulares. Estes podem pertencer a diferentes famílias de proteínas que possuem estruturas e mecanismos distintos de funcionamento. Exemplos destas famílias são: CTR (*copper transporter*), CDF (*cation diffusion facilitator*), ZIP (*zinc-iron permease*), NRAMP (*natural resistance-associated macrophage protein*) e HM-

ATPase (ou simplesmente HMA, *Heavy metal transporting ATPases*) que agem no transporte de diferentes metais (Tabela 1) (Migeon *et al.*, 2010).

Estudos que buscam identificar elementos que conferem à planta maior tolerância a determinados metais pesados tendem a identificar proteínas transportadoras, por esse motivo um grande número destas proteínas transmembrana já foram descritas detalhadamente. No modelo apresentado na Figura 1 é possível observar transportadores pertencentes a diferentes famílias: CTR (COPT1, 4 e 5), HM-ATPases (HMA2, 3, 4, 5, 7 e 8), ZIP (ZIP4, ZIF1, IRT1-*iron-regulated transporter*), NRAMP (NRAMP1, 3 e 4), ABC (ABCC1,2), CDF (MTP1,3 - *metal tolerance protein*) e YSL (*yellow stripes like*) (Festa e Thiele, 2011; Hossain *et al.*, 2012; Lin e Aarts, 2012; Palmer e Guerinot, 2009).

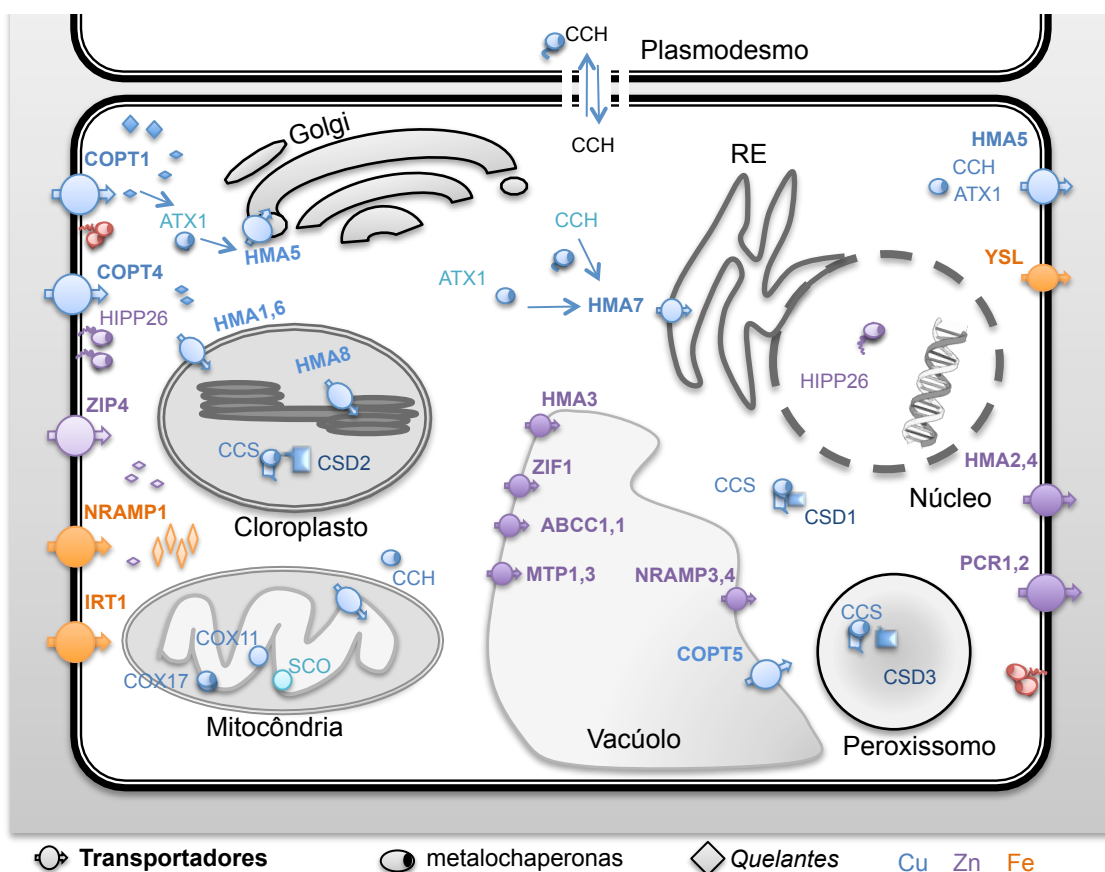


Fig. 1 – Modelo de transporte de íons metálicos pela célula vegetal (*A. thaliana*) mostrando transportadores, quelantes, e metalochaperonas já descritas na literatura (Barth *et al.*, 2009; Festa e Thiele, 2011; Hossain *et al.*, 2012; Lin e Aarts, 2012; Palmer e Guerinot, 2009). Os metais preferenciais de cada proteína estão simbolizados pela cor, azul para Cu, roxo para Zn e laranja para Fe.

Ao entrar na célula os íons metálicos enfrentam uma segunda barreira, os quelantes. Estes são diferentes peptídios e proteínas com alta afinidade aos íons metálicos e que são

capazes de capturar o íon metálico do citosol assim que ele entra na célula. Entre eles estão a glutathiona, a nicotianamina, as fitoquelatinas e as metalotioneínas (Gautam e Verma, 2012; Yruela, 2009).

Para ultrapassar a barreira imposta pelos quelantes e chegar até as proteínas que os necessitam, os íons metálicos precisam da interseção das metalochaperonas. Essas são proteínas solúveis presentes no meio intracelular e que possuem a capacidade de se ligar a íons metálicos de forma estável, porém reversível. Dessa forma elas conseguem evitar que a carga do íon cause alguma reação danosa aos componentes celulares, transportar esse metal pelo citosol de forma segura e, ao chegar ao seu destino, doar o metal diretamente a uma proteína específica, por interações proteína-proteína (Robinson e Winge, 2010).

Metalochaperonas também apresentam a capacidade de intermediar o transporte de íons metálicos entre transportadores e quelantes. Por exemplo, foi demonstrado que em células eucarióticas o  $\text{Cu}^+$  entra no citoplasma pelo transportador de alta afinidade da família CTR (COPT1) e se associa imediatamente a moléculas de glutathiona, a qual poderá então transferi-lo por afinidade para outros quelantes, tais como as tioneínas (Miras *et al.*, 2008). Recentemente foi verificado que uma metalochaperona de levedura, a proteína ATX1 (Antioxidant 1), é capaz de formar dímeros na presença de glutathiona *in vitro* e dessa forma resgatar íons capturados por ela (Miras *et al.*, 2008). Em seguida, essa metalochaperona é capaz de entregar este íon para um transportador da família HM-ATPase na membrana do complexo de Golgi (CCC2 em leveduras, HMA5 em *A. thaliana* ou MNK1 em humanos) (Fig 1).

### **Metalochaperonas**

O conceito de metalochaperona foi cunhado a partir do estudo de duas proteínas: uma bacteriana, CopZ, e outra de levedura, ATX1 (antioxidant protein 1) (Cobine *et al.*, 2002; Lin and Culotta, 1995). Apesar de pertencerem a organismos muito diferentes, estas são proteínas muito semelhantes tanto em tamanho (69 e 73 resíduos, respectivamente) quanto em estrutura. Ambas possuem um motivo de associação a metais Cys-XX-Cys (sendo Cys, um resíduo de cisteína, e X, um resíduo qualquer) presente na primeira alça de um domínio de conformação estrutural similar a da ferroxina ( $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ ). Esse domínio é altamente conservado em todos os seres vivos, usualmente recebendo a denominação de HMA (Hheavy Metal Associated domain; pfam00403.6) (Robinson e Winge, 2010).

O íon de cobre se liga a proteína por interação com os átomos de enxofre destas cisteínas e a transferência para a proteína alvo é realizada pela interação entre o domínio HMA da metalochaperona e um domínio HMA homólogo na proteína alvo (Fig. 2) (O'Halloran e Culotta, 2000).

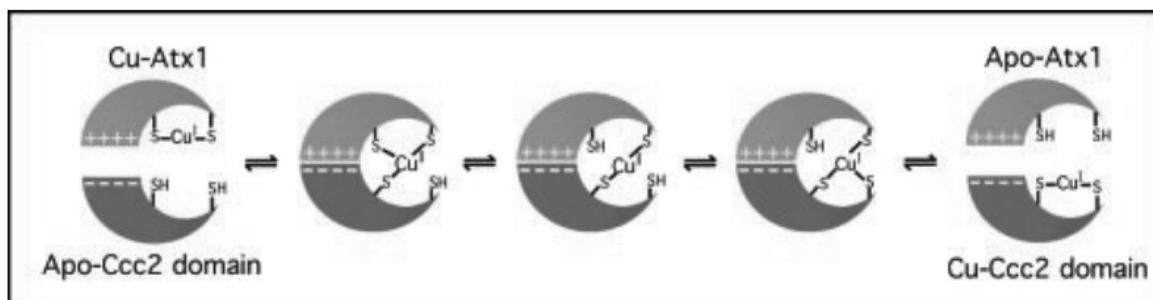


Fig. 2 - Transferência de um íon de cobre ( $\text{Cu}^{+1}$ ) entre o domínio HMA de uma metalochaperona (ATX1) e o domínio HMA de sua proteína alvo (a bomba de Cu, ATPase, CCC2) – Ilustração retirada da revisão de O'Halloran e Culotta (2000).

Baseando-se em ensaios bioquímicos e modelagem estrutural, Badarau e Dennison (2011) estudaram essa interação usando a ATX1 humana (HAH1) e o primeiro domínio HMA de sua proteína alvo, MNK1 (Menkes proteins, uma ATPase transportadora de cobre) e demonstraram que a afinidade destes domínios a  $\text{Cu}^{+1}$  e, em especial, a termodinâmica da transferência do íon entre as proteínas é diretamente influenciada pelo pH, sendo menos favorável quando o pH é menor que 7,0. A partir de análises comparativas e de mutações pontuais, os autores evidenciam que as propriedades destes domínios favorecem o transporte do metal da ATX1 para sua proteína alvo e dificultam o processo inverso. Tal propriedade (determinada pela composição de resíduos em pontos chave da estrutura do domínio HMA) que permite a transferência basicamente unidirecional não é observada em CopZ e seu alvo, o que pode ser o motivo desta metalochaperona bacteriana agir mais como um elemento regulatório do que diretamente no transporte de cobre (Badarau e Dennison, 2011).

Na levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi descrito que ATX1 interage com CCC2, uma ATPase que realiza o transporte ativo de íons de Cu pela membrana do Golgi, captando os íons  $\text{Cu}^{+}$  da ATX1 no citosol e o transportando para o interior do Golgi, onde esse íon metálico será incorporado a novas metaloproteínas em maturação (Huffman e Halloran, 2001; Rubino e Franz, 2012) (Fig. 3). Aparentemente, essa associação entre uma metalochaperona e um transportador de membrana (bomba de íons) é um dos tipos mais antigos de associação entre cuproproteínas. Por exemplo, em organismos em que o cobre



não é necessário à vida, sendo tóxico mesmo em baixíssimas concentrações (e.g., *Archaeoglobus fulgidus*, *Thermoplasma acidophilum* e *Thermotoga maritima*), esse pareamento de proteínas forma o sistema básico de efluxo e desintoxicação, no qual uma proteína semelhante a ATX1 captura o Cu que entra na célula e o entrega a uma bomba presente na membrana celular (semelhante a CCC2) que irá expulsar o íon da célula (Bertini, Cavallaro e McGreevy, 2010).

Em eucariotos existem duas outras metalochaperonas altamente conservadas, que desempenham o papel de entregar Cu para enzimas chaves do metabolismo celular: CCS, a chaperona que entrega Cu para Cu/Zn superóxido dismutase, e COX17, a chaperona de cobre que media a entrega de Cu para a citocromo c oxidase (COX), uma enzima essencial para a respiração celular. Além de um domínio HMA similar ao de ATX1, estas proteínas apresentam domínios adicionais que estão envolvidos no reconhecimento específico de suas proteínas alvo (Cobine, Pierrel e Winge, 2006; Huffman e Halloran, 2001; Nevitt, Ohrvik e Thiele, 2012).

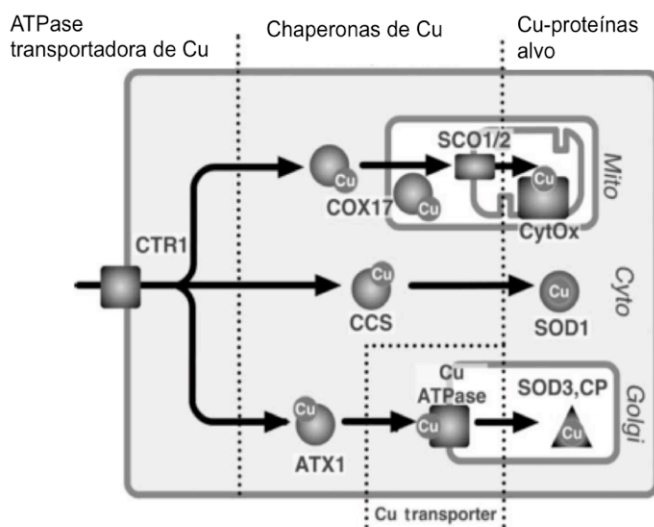


Fig. 3 – Rotas de transporte de cobre em uma célula eucariótica. Essas rotas utilizam as chaperonas de cobre ATX1, CCS ou COX17. Ilustração adaptada de Culotta e Luk (2004)

Além dessas três metalochaperonas, ATX1, CCS e COX17, que estão presentes em todas as células eucariontes, foram descobertas outras proteínas similares (ATX1-like) que estão presentes somente em vegetais. Na planta modelo *Arabidopsis thaliana*, foi identificada a proteína CCH (do inglês *Copper Chaperone*), que se diferencia da ATX1 de planta por apresentar 46 resíduos a mais em sua extremidade C-terminal. Em experimentos

de expressão em leveduras, tanto AtATX1 quanto AtCCH foram capazes de restaurar um fenótipo de tolerância normal ao Cu em mutantes sensíveis ( $\Delta$ ATX1) (Andre *et al.*, 2007; Mira *et al.*, 2001). Entretanto, a extremidade carboxil de CCH possui um domínio exclusivo de plantas, o qual permite que essa proteína faça algo que nunca antes fora observado em metalochaperonas, o transporte da proteína para células vizinhas nos tecidos vasculares da planta (Fig. 1) (Mira, Martínez-García e Peñarrubia, 2001; Mira *et al.*, 2001).

Em outros organismos, como algas, fungos e animais, existe um pequeno número de proteínas similares a essas metalochaperonas, geralmente existindo um gene de ATX1 em cada genoma. Porém em plantas esse grupo de proteínas se diversificou em uma ampla família que pode ser dividida em dois tipos de proteínas: HPPs (*Heavy metal associated Plant Proteins*) e HIPPs (*Heavy metal associated Isoprenylated Plant Proteins*), que se diferenciam justamente pela presença ou ausência de isoprenilação (Barth *et al.*, 2009; Tehseen *et al.*, 2010).

HIPPs são caracterizadas pela presença de um ou dois domínios HMA e de um motivo de isoprenilação. E, entre eles, está presente uma região flexível rica em glicina encontrada na maioria das HIPPs (Barth *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2002). A isoprenilação, também chamada de prenilação ou farnesilação, é uma modificação pós-traducional de proteínas na qual uma “âncora” hidrofóbica é adicionada à extremidade C-terminal da proteína, permitindo a associação desta com membranas celulares e diferentes interações com outras proteínas. Essa modificação ocorre por uma ligação covalente de uma cadeia de 15 carbonos (farnesyl) ou de 20 carbonos (geranylgeranyl) ao resíduo de cisteína de um motivo C-terminal CaaX (onde ‘C’ é uma cisteína, ‘a’ é um aminoácido alifático e ‘X’, um aminoácido qualquer) (Crowell, 2000; Tehseen *et al.*, 2010).

Embora tanto o domínio HMA quanto a isoprenilação sejam comuns a quase todos os organismos, desde bactérias até humanos, a presença de ambos numa mesma proteína é observada somente nas plantas (Dykema *et al.*, 1999).

A denominação HIPP foi cunhada por Barth *et al.* (2009). Trabalhos anteriores seguiam a denominação de Proteína Farnesilada (FP- *Farnesylated Protein*) ou Proteína Geranylgeranylada (GP- *Geranylgeranylated proteins*) dada por Dykema (1999) ao descrever essa família de proteínas pela primeira vez. Tehseen *et al.* (2010) foram responsáveis pelo emprego de HPP como denominação a outras proteínas semelhantes às

HIPPs, porém sem o sinal de isoprenilação e descreveram ambas (HIPP e HPP) como proteínas semelhantes a metalochaperonas.

Até o momento, poucas HIPPs foram estudadas e os estudos mais detalhados focaram quase que exclusivamente em *Arabidopsis*. Nessa planta modelo foram identificadas 45 HIPPs e 22 HPPs, incluindo a essas AtATX1 e AtCCH (Barth *et al.*, 2009; Tehseen *et al.*, 2010).

Nos 14 anos desde a sua descrição inicial, HIPPs já foram identificadas desempenhando basicamente duas funções: i) como parte de mecanismos de homeostase e desintoxicação de metais pesados (especialmente cádmio) (Chandran *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2002; Tehseen *et al.*, 2010); e ii) como um elemento regulatório na resposta transcricional à seca e frio (Barth *et al.*, 2004, 2009).

As funções descritas para as HIPPs estão diretamente envolvidas com a sua capacidade de capturar e entregar íons metálicos, transportando-os pelo citoplasma de forma segura. Trabalhos anteriores mostram que o domínio HMA de HIPPs é capaz de se ligar a diversos metais  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$  e  $\text{Pb}^{+2}$  (Dykema *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2002). Esta afinidade a diferentes metais, em conjunto com a grande diversidade das proteínas HIPPs é um forte indício de que proteínas dessa família possam estar envolvidas em mecanismos de transporte de diferentes metais e, conseqüentemente, de rotas metabólicas que utilizem estes metais como cofatores.

Por este motivo, as HIPPs podem estar envolvidas em uma grande variedade de rotas metabólicas e processos diferentes, visto que quase todos os processos celulares utilizam cofatores metálicos em algum momento.

Devido a sua grande variedade e possível redundância funcional, as HIPPs foram pouco estudadas. A caracterização desta família gênica é importante não somente para a compreensão de seu papel na homeostase celular, mas também porque apresentarem possíveis aplicações úteis no melhoramento das plantas cultivadas.

## **Importância biotecnológica das proteínas HPPs**

Projetos de melhoramento genético de cultivares geralmente buscam diversas características interessantes a serem adicionadas na planta trabalhada. No que se ao transporte e acúmulo de metais, diferentes características são buscadas. De um lado, procura-se o melhoramento da absorção e acúmulo de nutrientes na planta para aumentar a sua produtividade e/ou biofortificação; de outro lado busca-se plantas mais tolerantes a contaminações de solo por metais pesados e também plantas que possam agir como fitoremediadores, absorvendo ou imobilizando estes contaminantes do solo e da água.

O objetivo da biofortificação é proporcionar maior acúmulo de nutrientes em plantas, tornando-as mais nutritivas para a alimentação. Por este motivo, busca-se otimizar, por via de melhoramento tradicional ou manipulação gênica, os sistemas de absorção, transporte e acúmulo de metais como Fe e Zn na planta, especialmente nos grãos e frutos que irão servir de fonte de alimento para humanos e animais. Porém, metais potencialmente tóxicos, como o Cd, que podem ser transportados pela maioria dos transportadores de metais, precisam ser excluídos destes tecidos para evitar a intoxicação da célula vegetal e daqueles que consumirem estas partes da planta. Para estes objetivos é necessário o uso de genes envolvidos na translocação de íons metálicos específicos entre os diferentes órgãos da planta (Bashir *et al.*, 2013; Puig e Peñarrubia, 2009; Sperotto *et al.*, 2012).

Outra meta buscada por produtores e pesquisadores é a obtenção de plantas hipertolerantes, capazes de se desenvolverem em ambientes contaminados com altas concentrações de metais pesados. Para tal, o conhecimento profundo dos diferentes mecanismos de tolerância empregados por plantas é necessário (Thapa *et al.*, 2012; Uruguchi e Fujiwara, 2012).

Para tais objetivos, o estudo de HPPs pode ser muito interessante, visto que proteínas desta família se mostraram capazes de agir diretamente na homeostase de Cd. O cádmio é um elemento que se encontra pouco disponível em ambientes naturais, porém atividades humanas como a mineração, despejo de esgoto e de dejetos industriais e uso excessivo de adubos fosfatados aumentaram a concentração deste metal na água e em solo arados. Atualmente o Cd é um dos principais poluentes ambientais encontrados em áreas de cultivo. Apesar de sua concentração no solo muitas vezes não prejudicar o desenvolvimento das plantas, o acúmulo desse metal em grãos e frutos é uma das

principais formas de intoxicação por Cd em humanos (Clemens *et al.*, 2013; Uraguchi e Fujiwara, 2012).

Ao longo do último século, inúmeros casos de intoxicação por Cd foram relatados, sendo os que mais se destacam são aqueles que afetaram populações inteiras, como se verificou em Toyama no Japão (Inaba *et al.*, 2005) e, recentemente, na província de Tak na Tailândia (Honda *et al.*, 2010). Em ambos os casos, atividades intensas de mineração na região liberaram grandes quantidades de cádmio em rios, cujas águas serviam para a irrigação de campos de arroz. Pessoas que tinham estes grãos como base de sua alimentação começaram a desenvolver doenças renais e nos ossos (Clemens *et al.*, 2013; Uraguchi e Fujiwara, 2012).

Clemens *et al.* (2013) afirmam que grande parte da população humana está suscetível a um lento quadro de envenenamento por cádmio. Este metal pode ser retido nos rins por um longo período de tempo (de 10 a 30 anos), de forma que, mesmo se ingerido em baixas concentrações, ele pode se acumular no corpo e com o tempo levar a um quadro de envenenamento como o observado nos habitantes de Toyama. Além de doenças renais e osteoporose, outros trabalhos vem associando a exposição a pequenas concentrações de Cd a doenças cardiovasculares e câncer (Clemens *et al.*, 2013).

O  $Cd^{+2}$  entra nas células devido a sua similaridade a outros íons metálicos, em especial ao  $Zn^{+2}$ , sendo translocado juntamente com os íon essenciais por transportadores de Zn e Fe, como AtZIP1, AtIRT1, AtNRAMP1 e OsHMA2 (Lin e Aarts, 2012; Takahashi *et al.*, 2012). Fitoquelatinas e outros quelantes também apresentam alta afinidade por Cd, tanto que estudos mostraram que plantas hipertolerantes expressam mais estes peptídeos do que plantas suscetíveis (Hossain *et al.*, 2012).

Para evitar que o cádmio seja transportado para órgãos comestíveis das plantas, o conhecimento de proteínas capazes de distinguir Cd de outros metais é essencial. Dois transportadores se mostraram capazes de tal feito: OsHMA5 e OsLCT1 (Low-affinity Cation Transporter1). O primeiro é um transportador vacuolar que tem a função de aprisionar o Cd nesta organela, já o segundo é um transportador presente em células dos nódulos vasculares da planta, envolvido em levar o Cd a diferentes órgãos da planta. Inclusive, estudos recentes demonstraram que tanto ao superexpressar OsHMA5, quanto ao nocautear o gene *OsLCT1*, é possível obter plantas de fenótipo igual ao de plantas

selvagens em rendimento e concentração de nutrientes (inclusive Zn) com excessão somente do acúmulo de Cd nos grãos (Uraguchi e Fujiwara, 2012).

Da mesma forma, várias HIPPs se mostraram envolvidas no transporte deste metal. A superexpressão de AtHIPP06 e AtHIPP26 produziu plantas mais tolerantes a Cd. O mesmo foi observado ao se expressar AtHIPP20, 22, 26 e 27 em leveduras, enquanto que plantas triplo nocautes para AtHIPP20/21/22 se mostraram mais sensíveis a este metal (Gao *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2002; Tehseen *et al.*, 2010). Porém este triplo mutante não se tornou mais sensível a Cu ou Zn, e a expressão heteróloga de AtHIPP20, 22, 26 e 27 não foi capaz de resgatar o fenótipo normal de leveduras sensíveis a estes metais, o que demonstra que estes quatro genes estariam envolvidos somente na homeostase de cádmio (Tehseen *et al.*, 2010). No entanto, até o momento nenhum trabalho caracterizou proteínas da família HIPP em arroz, a espécie onde se tem maior interesse científico e econômico em conhecer os mecanismos de regulação de Cd.

Do mesmo modo, variações climáticas como quedas de temperatura e déficit hídrico em fases críticas do desenvolvimento da planta são responsáveis por grandes perdas na produtividade agrícola. Em tempos de mudanças meteorológicas drásticas e frequentes, torna-se imprescindível a identificação e o entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta a estes fatores de ambientais e de genes capazes de aumentar a tolerância das plantas cultivadas a variações meteorológicas (Takeda e Matsuoka, 2008).

Conforme descrito por Barth e colaboradores (2009), HIPPs podem estar envolvidas na regulação de genes de resposta ao frio e à seca ao fornecer o íon metálico para um fator de transcrição dedo-de-zinco, AtHD29, descrito como responsável pela regulação de genes em resposta à dessecação. A importância dessa interação foi comprovada ao observar que genes induzidos em plantas superexpressando AtHD29 se encontram reprimidos em plantas nocautes para *AtHIPP26* ao se comparar com a expressão destes genes em plantas selvagens (Barth *et al.*, 2009).

### **O arroz como organismo modelo**

O arroz (*Oryza sativa*) pertence à família Poaceae e é considerado uma das mais importantes plantas cultivadas pelo homem, sendo essencial na alimentação de mais de metade da população mundial. Além de sua grande importância econômica e agrônômica, o arroz é um importante organismo modelo. Seu genoma é relativamente pequeno e

simples em comparação com o de outros cereais e foi o primeiro genoma de monocotiledônea a ser totalmente sequenciado com alta fidelidade. Desde 2005, dados do genoma completo de arroz (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) se encontram disponíveis para análise (International Rice Genome Sequencing Project, 2005). Este genoma está descrito juntamente com marcadores moleculares e informações de expressão oriundas de diversas técnicas de análise e sequenciamento. Ao longo dos últimos anos, novas cultivares de arroz e plantas próximas foram sequenciadas, permitindo um estudo detalhado da dinâmica da evolução gênica destas espécies (Akhunov *et al.*, 2013).

Plantas da família Poacea, como trigo, arroz, milho, sorgo, cevada, aveia e cana-de-açúcar, apresentam uma grande sintenia (ou co-lineariedade), semelhanças tanto em sequências gênicas conservadas, quanto na organização e estrutura do genoma. Por esse motivo, dados obtidos em uma espécie podem ser utilizados para se conhecer melhor as demais (Paterson *et al.*, 2009).

Em adição ao conhecimento adquirido de seu genoma, a existência de protocolos eficientes de transformação de arroz permite que esta planta seja um ótimo organismo para o estudo de genômica funcional. Devido a sua importância agrônômica, existe um vasto conhecimento acumulado da fisiologia do arroz, além de um grande banco de germoplasma contendo espécies selvagens e diversas cultivares. Programas de pesquisa e melhoramento genético do arroz existem em quase todos os países produtores (Jiang *et al.*, 2012).

Tais características levaram a um grande avanço na pesquisa global da genômica funcional do arroz ao longo da última década. Esta pesquisa se organiza em três frentes principais: i. Construção de plataformas de recursos e tecnologia para a identificação em massa (*highthroughput*) de genes (por exemplo: coleções de mutantes); ii. Análises de genômica funcional focada em caracteres agrônômicos e processos biológicos e iii. Identificação e isolamento de genes funcionais (Jiang *et al.*, 2012).

O presente estudo busca adicionar ao conjunto do conhecimento científico de genes de plantas diversos dados até então desconhecidos sobre genes da família HIPP. As informações e hipóteses descritas nesta tese se encontram, em parte, no artigo de nossa autoria “*Heavy metal- associated isoprenylated plant protein (HIPP): characterization of a family of proteins exclusive to plants*” publicado na revista **The FEBS Journal** em março de 2013 ( presente no anexo1).

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL:**

Esclarecer a origem e classificação estrutural das proteínas da família HIPP, buscando compreender suas relações filogenéticas, estrutura e funções em plantas, especialmente em arroz.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- i. Identificar genes que codifiquem HIPPs em arroz e outros organismos;
- ii. Determinar a história evolutiva da família HIPP a partir de análises filogenéticas;
- iii. Classificar proteínas HIPP a partir de similaridade de sequências e organização interna (arquitetura de domínio);
- iv. Analisar o perfil de expressão de genes HIPPs em diferentes órgãos e condições;
- v. Identificar genes HIPP envolvidos em funções já descritas para esta família (homeostase de metais e resposta a estresses de frio e seca) e em funções ainda não atribuídas a esta família.



## **CAPÍTULO I:**

### **HIPP – UMA FAMÍLIA DE GENES EXCLUSIVOS DE PLANTAS VASCULARES**

## INTRODUÇÃO

Uma das formas de identificar genes é usando abordagens de buscas por homologia, tendo como base a similaridade das sequências (Yang and Rannala, 2012). O avanço de tecnologias e ferramentas de análises, bem como a disponibilidade de bancos de dados de genomas cada vez mais robustos e completos, vem permitindo a realização de estudos que visam a identificação e caracterização de diversos genes e famílias gênicas. Além disso, utilizando ferramentas de análises filogenéticas é possível inferir sobre a história evolutiva de um grupo de genes, incluindo eventos que levaram a sua diversificação, e ao aumento ou diminuição do tamanho da família devido às pressões seletivas sofridas por esses genes ao longo da história desses organismos (Guo, 2012). Em conjunto, essas análises auxiliam e direcionam estudos de genômica funcional em muitos organismos. Existem muitos exemplos de trabalhos que relatam a diversidade, caracterização e história evolutiva de genes, tais como os descritos para genes da rota de síntese de lipídeos (Turchetto-Zolet *et al.*, 2011), fatores de transcrição em soja (Osorio *et al.*, 2012), fatores de transcrição da família MAD-box (Hernández-Hernández, Martínez-Castilla and Alvarez-Buylla, 2007; Shan *et al.*, 2009) dentre outros.

O foco deste capítulo foi a identificação e classificação de HIPP e outras metalochaperonas, buscando compreender a história deste grupo de proteínas. Para isso foram realizadas buscas em bancos de dados de genomas de diferentes espécies representativas: a alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, usada como modelo unicelular de viridiplantae e grupo externo ao se analisar plantas terrestres (Embryophytas); o musgo *Physcomitrella patens*, que é uma embriófita avascular; *Selaginella moellendorffii*, uma planta vascular (Tracheophyta) pertencente a Lycophyta, um ramo mais basal de tracheofitas; *A. thaliana*, a planta modelo mais utilizada em estudos moleculares, uma angiosperma dicotiledônea; *Populus trichocarpa*, uma dicotiledônea usada como modelo de planta arbórea; *Oryza sativa*, o principal modelo de estudo de monocotiledôneas e cereais, e, para análises comparativas para estes mesmos grupos utilizamos outra gramínea, *Sorghum bicolor* ou *Setaria italica*. A relação filogenética entre estas espécies pode ser observada no cladograma realizado por Guo (2013) em estudo da evolução de famílias gênicas em *A. thaliana* (Fig.4).

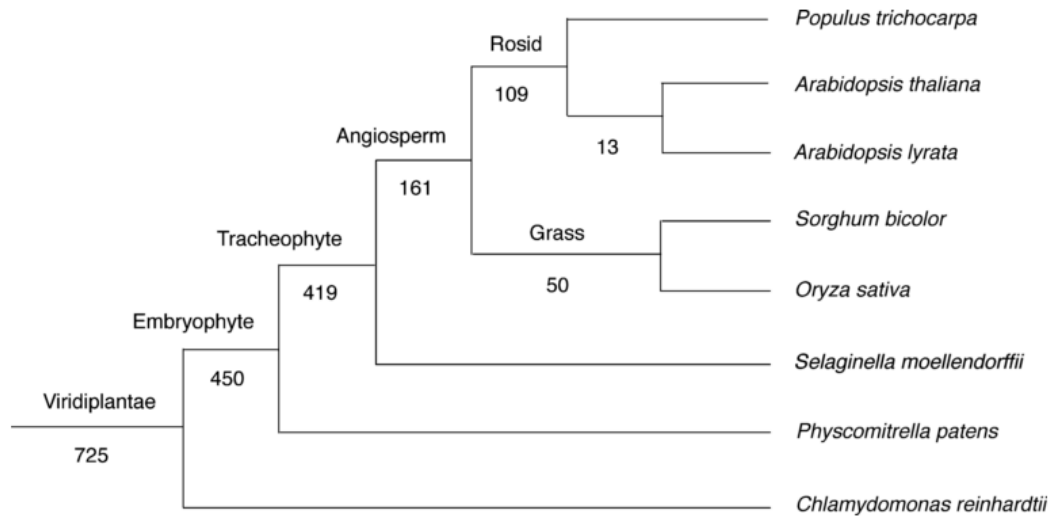


Fig 4 - Filogenia e tempo estimado de divergência (em milhões de anos) de oito espécies representativas de Viridiplantae. Fonte: Guo, 2013

## MATERIAL E MÉTODOS

### Busca e análise de genes HPPs

As sequências de genes HPPs putativos foram buscadas em diferentes bancos de dados públicos: NCBI (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Phytozome (<http://www.phytozome.net/>), e Gramene (<http://www.gramene.org>). A busca foi feita a partir de sequências peptídicas de HPPs conhecidas utilizando a metodologia BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Das sequências obtidas, somente as que possuíam o domínio HMA (*Heavy metal associated*, pfam 00403.6) e um motivo de isoprenilação (CaaX) foram categorizadas como HPPs. A presença do motivo de isoprenilação foi confirmada por um programa específico para a identificação e predição desse tipo de motivos, o PrePS - Prenylation Prediction Suite (<http://mendel.imp.ac.at/sat/PrePS/index.html>) (Maurer-StroheEisenhaber, 2005).

As sequências peptídicas foram identificadas e catalogadas, anotando-se informações relevantes como tamanho e composição da proteína prevista.

Para visualizar a arquitetura de distribuição de domínios dentro das sequências peptídicas, as proteínas HPP de *A. thaliana* e *O. sativa* (arroz) foram analisadas pelo programa MEME suit (Multiple EM for Motif Elucidation, versão 5.05 - <http://meme.nbcr.net/>), que identifica sequências conservadas e as posiciona dentro de uma representação da sequência peptídica analisada (Bailey *et al.*, 2009).

### Análises Filogenéticas

Para a compreensão da relação entre as HPPs e HPPs de diversos organismos diferentes análises filogenéticas foram realizadas. Proteínas ATX1 ou similares foram buscadas no genoma de organismos representativos de diferentes táxons que possuíssem o genoma totalmente sequenciado.

A partir do alinhamento de sequências de proteínas realizados no programa MUSCLE (Edgar, 2004) implementado no programa MEGA - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* - versão 5.1 (Tamura *et al.*, 2011), duas abordagens foram aplicadas: Neighbor-Joining e inferência Bayesiana. Somente o domínio HMA foi utilizado para alinhar as sequências peptídicas selecionadas, por ser um elemento comum e relativamente conservado entre todas as proteínas analisadas.

As análises por neighbor-joining foram realizadas no programa MEGA 5.1 usando o parâmetro de p-distance com 2000 replicas de bootstrap. As análises Bayesianas foram realizadas usando o programa BEAST 1.7 (Drummond e Rambaut, 2007). O modelo de evolução de proteínas usado foi o modelo JTT para a matriz de substituições. Foram realizadas 10.000.000 gerações com algoritmos de *Monte Carlo* via Cadeias de *Markov* (MCMC). As árvores resultantes foram visualizadas e editadas com o aplicativo FIGTREE 1.3.1 ([http:// tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/](http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/)).

## RESULTADOS

Através da busca nos bancos de dados genômicos disponíveis foi demonstrado que sequências de genes HIPPs putativos são encontradas apenas em plantas vasculares (Thracheophyta) (Tabela 2 e 3a). Nas traqueófitas, essas proteínas estão presentes desde *Selaginella moellendorffii*, uma planta que pertence ao grupo vivo mais antigo de plantas vasculares, quanto na conífera *Picea glauca*, e em angiospermas domesticadas com genoma total ou parcialmente sequenciado como a videira (*Vitis vinifera*), a soja (*Glycine max*), o milho (*Zea mays*) e muitas outras.

Enquanto que em animais, fungos e algas, foram encontradas apenas uma metalochaperona do tipo ATX1, em plantas foi observado um grande número dessas proteínas, descritas em trabalhos anteriores como HPPs e HIPPs (Fig. 5). No genoma de *S. moellendorffii*, cinco genes putativos de HIPPs foram identificados. Ao mesmo tempo, foi encontrado um número muito maior desses genes em plantas pertencentes a grupos mais derivados: 59 em arroz, 44 em sorgo (*Sorghum bicolor*), 52 em *S. italica*, 74 em *P. trichocarpa* (Tabelas 2 e 3). Tal fato indica que ao longo da evolução desse grupo, as HIPPs se diversificaram e tornaram-se uma grande família gênica.

Tabela 2- Número de metalochaperonas identificadas em diferentes genomas analisados. HPPs (incluindo ATX1, CCH e outras HPPs) e HIPPs.

Espécie	Metalochaperonas			
	HPPs			HIPPs
	ATX1	CCH	outras	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0	0	0
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1	0	0	0
<i>Physcomitella patens</i>	1	1	12	0
<i>Selaginella moellendorffii</i>	1	1	4	5
<i>Sorghum bicolor</i>	1	1	4	44
<i>Oryza sativa</i>	1	1	7	59
<i>Populus trichocarpa</i>	1	1	10	79
<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	1	19	45

Enquanto proteínas descritas como ATX1 geralmente não possuem mais de 80 aminoácidos (aa), as proteínas identificadas em plantas apresentam comprimentos maiores e mais variados. Proteínas identificadas como HPP geralmente possuem entre 110 e 300

aa, enquanto HIPP chegam a tamanhos maiores variando de 113 aa (como a AtHIPP15) até 600 aa (PtHIPP51) (Tabela 3).

Tabela 3a – Proteínas identificadas em diferentes genoma de referência, proteínas similares a ATX1 em organismos não-vegetais e HPPs e HPPs em plantas. O tamanho de cada proteína é mostrado pelo número de aminoácidos e sua composição, pela porcentagem de prolina, glicina e glutamina, além do número de resíduos de cisteína.

		Propriedades				
		tamanho	% Pro	% Gly	% Glu	Cys
<b>ATX1 (Out group)</b>						
<b>amoeba</b>						
	Dictyostelium discoideum	67	0%	7%	4%	4
<b>Animal</b>						
	Aedes aegypti	73	1%	7%	12%	2
	Drosophila melanogaster	72	0%	8%	10%	2
	Danio rerio	67	1%	6%	6%	2
	Homo sapiens	68	3%	9%	7%	3
	Mus musculus	68	4%	7%	7%	3
<b>Fungi</b>						
	Saccharomyces cerevisiae	73	3%	5%	7%	2
	Schizosaccharomyces pombe	68	1%	6%	10%	2
<b>Algae</b>						
	Chlamydomonas reinhardtii	70	1%	9%	7%	2
	Ostreococcus lucimarinus	71	0%	6%	13%	4
	Synechocystis sp. PCC 6803	64	2%	3%	11%	2
	Volvox carteri	67	1%	7%	12%	2
<b>Plantas</b>						
<b><i>Physcomitella patiens</i></b>						
<b>HPP</b>						
	PpaATX1 Pp1s106_39V6.1	87	3%	7%	8%	2
	PpaCCH Pp1s239_9V6.1	165	5%	9%	7%	2
	PpaHPP01 Pp1s66_115V6.1	229	10%	9%	19%	3
	PpaHPP02 Pp1s81_75V6.1	249	24%	3%	18%	2
	PpaHPP03 Pp1s93_56V6.5	243	21%	3%	16%	2
	PpaHPP04 Pp1s89_84V6	215	11%	8%	18%	3
	PpaHPP05 Pp1s67_56V6.1	173	12%	4%	3%	4
	PpaHPP07 Pp1s69_239V6.1	229	6%	3%	19%	3
	PpaHPP08 Pp1s155_55V6.1	241	14%	4%	27%	2
	PpaHPP09 Pp1s177_46V6.1	266	8%	5%	5%	4
	PpaHPP10 Pp1s3_318V6.1	455	9%	5%	9%	3
	PpaHPP11 Pp1s55_32V6.1	179	8%	6%	8%	3
	PpaHPP12 Pp1s167_116V6.3	411	10%	5%	8%	5
<b><i>Selaginella moellendorffii</i></b>						
<b>HIPP</b>						
	SmHIPP01 Smo409960	131	4%	7%	8%	3
	SmHIPP02 Smo442871	277	4%	7%	2%	3
	SmHIPP04 Smo111936	125	2%	11%	4%	4
	SmHIPP05 Smo174037	168	5%	10%	7%	3
	SmHIPP06 Smo446343	155	3%	4%	5%	3
<b>HPP</b>						
	SmATX1 Smo109953	70	1%	10%	9%	2
	SmCCH Smo169899	88	9%	11%	7%	2
	SmHPP1 Smo29653	63	2%	5%	6%	2
	SmHPP2 Smo9116	63	2%	5%	6%	2
	SmHPP3 Smo9124	61	0%	3%	7%	2
	SmHPP4 Smo72758	60	2%	3%	7%	2

Tabela 3b –HIPPs e HPPs putativas identificadas no genoma de *A. thaliana*. Proteínas descritas quanto ao número de aminoácidos (tamanho) e composição. Predição subcelular dada por três aplicativos distintos (CELLO, PredSL e TargetP)

		Propriedades				predição de localização celular			
		tamanho	% Pro	% Gly	% Glu	Cys	CELLO	PredSL	TargetP
<b><i>Arabidopsis thaliana</i></b>									
<b>HIPP</b>									
AtHIPP39	AT1G01490	177	10%	7%	13%	2	N/Cyt	Cyt	*
AtHIPP28	AT1G06330	159	5%	8%	3%	4	N	Cyt	*
AtHIPP22	AT1G22990	152	5%	5%	4%	3	N	Cyt	*
AtHIPP37	AT1G23000	358	5%	8%	4%	5	N	Cyt	Cyt
AtHIPP04	AT1G29000	287	2%	3%	15%	6	N	Cyt	Cyt
AtHIPP29	AT1G29100	141	5%	6%	6%	4	N	Cyt	Cyt
AtHIPP41	AT1G55790	515	5%	6%	6%	14	N	Cyt	Cyt
AtHIPP35	AT1g56210	364	13%	6%	7%	7	N	Cyt	Cyt
AtHIPP17	AT1g57780	264	2%	3%	11%	8	N	Cyt	*
AtHIPP15	AT1g63950	113	3%	6%	10%	2	CYT/N	Cyt	*
AtHIPP20	AT1G71050	152	5%	5%	6%	3	N	Cyt	*
AtHIPP30	AT2G18196	178	4%	5%	4%	5	N	Cyt	*
AtHIPP01	AT2G28090	245	4%	6%	7%	10	N	Cyt	Cyt
AtHIPP05	AT2G36950	386	8%	12%	8%	5	N	Cyt	Cyt
AtHIPP08	AT3G02960	246	4%	6%	8%	7	N	Cyt	Cyt
AtHIPP42	AT3G04900	208	16%	6%	4%	6	N	Cyt	Cyt
AtHIPP34	AT3G05220	577	7%	26%	4%	4	N	Cyt	Cyt
AtHIPP43	AT3G05920	126	17%	6%	8%	7	N	Chl	*
AtHIPP32	AT3G06130	473	10%	20%	3%	4	N	Cyt	*
AtHIPP16	AT3G07600	157	12%	4%	11%	5	Cyt/ExCel	Cyt	*
AtHIPP47	AT3G20180	118	5%	5%	9%	6	Cyt/ExCel	Cyt	*
AtHIPP19	AT3G21490	136	1%	4%	10%	5	N/Cyt	Cyt	Cyt
AtHIPP31	AT3G48970	140	4%	6%	8%	3	Mit/N/Cyt	Cyt	Cyt
AtHIPP45	AT3G56891	166	4%	5%	5%	3	N	Sec	*
AtHIPP24	AT4G08570	150	5%	4%	5%	3	N	Cyt	Cyt
AtHIPP44	AT4G10465	183	5%	6%	4%	4	N	Chl	Chl
AtHIPP18	AT4G13380	195	3%	4%	17%	2	N	Cyt	*
AtHIPP25	AT4G35060	153	5%	6%	7%	4	N	Cyt	Cyt
AtHIPP26	AT4G38580	153	5%	7%	6%	4	N/Cyt	Cyt	Cyt
AtHIPP23	AT4G39700	158	5%	8%	3%	3	N	Chl	*
AtHIPP06	AT5G03380	392	9%	13%	10%	5	N	Cyt	Cyt
AtHIPP21	AT5G17450	149	7%	5%	3%	4	N	Cyt	*
AtHIPP33	AT5G19090	587	12%	25%	3%	4	N	Cyt	Cyt
AtHIPP09	AT5G24580	319	9%	6%	17%	7	N	Cyt	Cyt
AtHIPP02	AT5G26690	114	10%	4%	7%	6	N	chl	*
AtHIPP36	AT5G27690	352	10%	12%	7%	5	N	Cyt	Cyt
AtHIPP46	AT5G48290	181	12%	11%	7%	3	Cyt/N	Cyt	*
AtHIPP10	AT5G52720	274	6%	7%	9%	8	N	Cyt	Cyt
AtHIPP11	AT5G52730	185	7%	4%	9%	3	N	Cyt	*
AtHIPP12	AT5G52740	118	10%	4%	7%	7	ExC/N/Cyt	Sec	*
AtHIPP13	AT5G52750	139	14%	3%	7%	3	N/ExCel	Cyt	*
AtHIPP14	AT5G52760	126	9%	3%	6%	3	N	Cyt	*
AtHIPP03	AT5G60800	283	5%	11%	10%	6	N	Cyt	Cyt
AtHIPP07	AT5G63530	355	12%	7%	16%	7	N	Cyt	Cyt
AtHIPP27	AT5G66110	147	8%	5%	5%	4	N	Cyt	*
<b>HPP</b>									
AtATX1	AT1G66240.1	106	1%	8%	7%	2			
AtATX1.2	AT1G66240.2	66	2%	11%	11%	2			
AthCCH	AT3G56240	121	5%	14%	6%	2			
AthHPP01	AT5G50740	290	9%	16%	6%	7			
AthHPP02	AT5G02600	319	12%	4%	4%	5			
AthHPP03	AT2G37390	259	5%	5%	9%	7			
AthHPP04	AT3G53530	248	7%	3%	9%	7			
AthHPP05	AT4G05030	110	1%	5%	9%	3			
AthHPP06	AT5G52770	111	11%	8%	5%	4			
AthHPP07	AT5G23760.1	103	2%	16%	4%	0			
AthHPP08	AT5G52670.1	103	7%	10%	7%	1			
AthHPP09	AT5G52710	423	4%	8%	6%	0			
AthHPP10	AT5G52700	370	7%	6%	7%	4			
AthHPP11	AT5G52680.1	238	7%	6%	5%	2			
AthHPP12	AT5G52690.1	177	2%	8%	6%	0			
AthHPP13	AT4G27590	156	4%	6%	3%	3			
AthHPP14	AT3G24450	140	4%	9%	5%	7			
AthHPP15	AT5G05365.1	77	0%	8%	1%	2			
AthHPP16	AT5G37860.1	262	5%	6%	6%	2			
AthHPP17	AT2G35730	115	5%	4%	3%	4			
AthHPP18	AT1G30473	239	10%	5%	3%	5			
AthHPP19	AT4G23882	284	12%	3%	6%	7			



Tabela 3c – HIPPs e HPPs putativas identificadas no genoma de *O. sativa*. Proteínas descritas quanto ao número de aminoácidos (tamanho) e composição. Predição subcelular dada por três aplicativos distintos (CELLO, PredSL e TargetP).

		Propriedades					predição de localização celular			
		tamanho	% Pro	% Gly	% Glu	Cys	CELLO	PredSL	TargetP	
<b><i>Oryza sativa</i></b>										
<b>HIPP</b>										
	OsHIPP50	LOC_Os01g03490	420	3%	12%	2%	3	N	Cyt	Cyt
	OsHIPP23	LOC_Os01g14700	153	8%	5%	6%	13	ExC/N/Cyt	Cyt	*
	OsHIPP38	LOC_Os01g20830	248	13%	8%	6%	3	N	Cyt	Cyt
	OsHIPP43	LOC_Os01g32330	119	13%	5%	8%	7	Cyt/N	Sec	Sec
	OsHIPP49	LOC_Os01g48710	145	3%	3%	14%	9	N	Cyt	Sec
	OsHIPP47	LOC_Os01g55320	158	3%	10%	4%	3	N	Cyt	Cyt
	OsHIPP56	LOC_Os01g70710	336	14%	5%	8%	5	N	Cyt	*
	OsHIPP33	LOC_Os02g30650	323	9%	6%	16%	5	N	Cyt	Cyt
	OsHIPP13	LOC_Os02g37160	246	8%	9%	3%	3	N	Cyt	*
	OsHIPP16	LOC_Os02g37330	133	5%	11%	8%	5	N	sec	*
	OsHIPP31	LOC_Os02g57360	356	6%	8%	6%	6	N	Mit	Cyt
	OsHIPP39	LOC_Os03g02860	193	5%	8%	7%	6	N	Sec	*
	OsHIPP27	LOC_Os03g03500	195	11%	12%	7%	2	N	Cyt	*
	OsHIPP36	LOC_Os03g05750	348	9%	11%	7%	5	N	Cyt	Cyt
#	OsHIPP41	LOC_Os03g06080	155	8%	5%	10%	3	N/Cyt	Cyt	*
	OsHIPP53	LOC_Os03g22490	378	13%	4%	9%	3	N	Mit	Chl
	OsHIPP45	LOC_Os03g26650	157	4%	8%	6%	4	N	Cyt	*
	OsHIPP06	LOC_Os03g29920	249	10%	13%	4%	5	N	Cyt	*
	OsHIPP08	LOC_Os03g54050	247	26%	4%	10%	18	N	Cyt	*
	OsHIPP34	LOC_Os03g64340	397	13%	6%	10%	8	N	Cyt	Cyt
	OsHIPP42	LOC_Os04g17100	155	6%	5%	6%	4	N	Cyt	*
	OsHIPP29	LOC_Os04g32030	385	12%	9%	17%	5	N	Cyt	Cyt
	OsHIPP01	LOC_Os04g32800	215	17%	8%	6%	24	N	Sec	*
	OsHIPP02	LOC_Os04g32810	213	18%	8%	5%	25	ExCel	Sec	*
	OsHIPP03	LOC_Os04g32820	225	13%	11%	7%	27	ExCel	Cyt	*
	OsHIPP04	LOC_Os04g32840	282	19%	10%	3%	29	ExCel	Cyt	*
	OsHIPP05	LOC_Os04g32850	266	27%	5%	8%	34	N/ExCel	Sec	*
	OsHIPP20	LOC_Os04g39010	253	9%	8%	8%	7	N	chl	*
	OsHIPP12	LOC_Os04g39290	229	7%	14%	4%	3	N	Cyt	*
	OsHIPP15	LOC_Os04g39300	239	6%	9%	4%	8	plMem	mit	*
	OsHIPP14	LOC_Os04g39320	201	8%	15%	4%	1	N	sec	*
	OsHIPP19	LOC_Os04g39350	122	8%	7%	9%	7	Cyt/N	Sec	*
	OsHIPP18	LOC_Os04g39360	131	13%	5%	9%	11	Cyt/N	sec	*
	OsHIPP30	LOC_Os04g50020	248	4%	5%	13%	9	Cyt	Cyt	*
	OsHIPP58	LOC_Os04g52530	162	6%	7%	7%	2	N	Cyt	*
	OsHIPP22	LOC_Os04g56570	155	10%	3%	6%	3	N	Cyt	*
	OsHIPP24	LOC_Os04g57200	179	6%	10%	8%	2	N	Cyt	*
	OsHIPP55	LOC_Os05g05820	368	11%	22%	4%	4	N	Cyt	Cyt
	OsHIPP57	LOC_Os05g30570	340	9%	11%	7%	6	N	Cyt	*
	OsHIPP48	LOC_Os06g35060	183	3%	8%	2%	3	N	Cyt	Cyt
	OsHIPP32	LOC_Os07g20340	418	9%	7%	11%	10	N	Mit	*
	OsHIPP07	LOC_Os07g41600	308	9%	11%	4%	9	N	Cyt	*
	OsHIPP54	LOC_Os07g47480	298	16%	7%	11%	3	N	Cyt	Cyt
	OsHIPP09	LOC_Os07g48390	282	10%	8%	11%	19	N	Cyt	*
	OsHIPP59	LOC_Os08g10490	235	9%	12%	4%	10	N	Cyt	*
	OsHIPP46	LOC_Os08g31140	150	6%	7%	4%	3	N	Cyt	*
#	OsHIPP21	LOC_Os09g09830	136	4%	2%	15%	4	N/Cyt	Cyt	Cyt
	OsHIPP17	LOC_Os09g09930	176	7%	19%	3%	1	N	Cyt	*
	OsHIPP44	LOC_Os09g20000	137	12%	4%	7%	2	Cyt/N	Cyt	Cyt
	OsHIPP10	LOC_Os10g14050	170	11%	11%	4%	18	ExCel	sec	*
#	OsHIPP28	LOC_Os10g14870	265	10%	2%	17%	6	N/Cyt	Cyt	Cyt
	OsHIPP37	LOC_Os10g30430	134	11%	8%	4%	3	N	Sec	*
	OsHIPP35	LOC_Os10g30450	359	7%	14%	7%	5	N	Cyt	Cyt
	OsHIPP25	LOC_Os10g38870	118	7%	8%	3%	9	ExCel	sec	Sec
	OsHIPP40	LOC_Os10g39210	185	4%	11%	6%	7	N	Sec	*
	OsHIPP51	LOC_Os11g05010	515	9%	22%	3%	4	N	Cyt	*
	OsHIPP11	LOC_Os11g41120	306	20%	7%	6%	19	N	Cyt	*
	OsHIPP52	LOC_Os12g05040	524	9%	24%	3%	4	N	Cyt	*
	OsHIPP26	LOC_Os12g23280	239	9%	17%	9%	2	N	Cyt	*
<b>HPP</b>										
	OsATX1	LOC_Os08g10480	81	4%	7%	9%	2			
	OsCCH	LOC_Os02g32814	255	8%	9%	5%	5			
	OsHPP01	LOC_Os01g74490	204	7%	5%	5%	3			
	OsHPP02	LOC_Os02g37280	119	8%	5%	7%	2			
	OsHPP03	LOC_Os02g37290	117	5%	4%	6%	1			
	OsHPP04	LOC_Os02g37300	121	7%	5%	7%	3			
	OsHPP05	LOC_Os03g60480	203	6%	5%	6%	6			
	OsHPP06	LOC_Os04g49260	122	3%	3%	6%	2			
	OsHPP07	LOC_Os08g31340	205	10%	3%	7%	4			

Tabela 3d – HIPPs e HPPs putativas identificadas no genoma de *P. trichocarpa*. Proteínas descritas quanto ao número de aminoácidos (tamanho) e composição.

		Propriedades				
		tamanho	% Pro	% Gly	% Glu	Cys
<b>Populus trichocarpa</b>						
<b>HIPP</b>						
PtHIPP01	POPTR_0001s09840	152	5%	7%	8%	4
PtHIPP02	POPTR_0001s38790	129	5%	5%	10%	2
PtHIPP03	POPTR_0001s45670	179	4%	4%	6%	5
PtHIPP04	POPTR_0001s47250	115	3%	3%	10%	6
PtHIPP05	POPTR_0002s09280	150	5%	5%	5%	3
PtHIPP06	POPTR_0002s16500	167	8%	2%	16%	2
PtHIPP07	POPTR_0002s20830	317	8%	9%	5%	6
PtHIPP08	POPTR_0003s13210	149	5%	7%	9%	3
PtHIPP09	POPTR_0004s05570	151	5%	4%	9%	3
PtHIPP10	POPTR_0004s07140	132	6%	2%	8%	2
PtHIPP11	POPTR_0004s07150	127	3%	4%	9%	2
PtHIPP12	POPTR_0004s18140	154	5%	6%	6%	4
PtHIPP13	POPTR_0004s22450	343	6%	15%	7%	5
PtHIPP14	POPTR_0005s00570	150	5%	5%	5%	3
PtHIPP15	POPTR_0005s02620	306	7%	10%	8%	6
PtHIPP16	POPTR_0005s03840	468	6%	18%	4%	4
PtHIPP17	POPTR_0005s08160	153	5%	7%	4%	3
PtHIPP18	POPTR_0005s11250	157	8%	6%	8%	5
PtHIPP19	POPTR_0005s12220	133	11%	5%	7%	6
PtHIPP20	POPTR_0005s14720	146	5%	5%	3%	4
PtHIPP21	POPTR_0005s16490	150	5%	5%	5%	3
PtHIPP22	POPTR_0006s00790	261	6%	3%	19%	6
PtHIPP23	POPTR_0006s01960	176	21%	5%	5%	23
PtHIPP24	POPTR_0006s02000	197	15%	7%	6%	20
PtHIPP25	POPTR_0006s02010	244	19%	6%	11%	16
PtHIPP26	POPTR_0006s02020	186	27%	4%	4%	24
PtHIPP27	POPTR_0006s02050	165	12%	5%	8%	21
PtHIPP28	POPTR_0006s02060	185	11%	3%	10%	23
PtHIPP29	POPTR_0006s02090	174	12%	5%	7%	21
PtHIPP30	POPTR_0006s02570	120	4%	3%	5%	3
PtHIPP31	POPTR_0006s07920	114	5%	7%	7%	6
PtHIPP32	POPTR_0006s12660	355	6%	12%	10%	6
PtHIPP33	POPTR_0007s06000	151	5%	7%	5%	3
PtHIPP34	POPTR_0007s13270	132	11%	6%	7%	7
PtHIPP35	POPTR_0008s12740	142	8%	6%	3%	2
PtHIPP36	POPTR_0008s20710	505	8%	18%	3%	4
PtHIPP37	POPTR_0008s22440	129	3%	3%	15%	2
PtHIPP38	POPTR_0009s01300	255	5%	9%	7%	5
PtHIPP39	POPTR_0009s05280	114	7%	11%	8%	1
PtHIPP40	POPTR_0009s05300	118	7%	11%	8%	1
PtHIPP41	POPTR_0010s00750	259	17%	6%	7%	4
PtHIPP42	POPTR_0010s01920	137	4%	2%	9%	5
PtHIPP43	POPTR_0010s02550	281	6%	11%	5%	6
PtHIPP44	POPTR_0010s12450	113	4%	4%	6%	3
PtHIPP45	POPTR_0010s12480	150	6%	4%	4%	3
PtHIPP46	POPTR_0011s07430	147	5%	4%	7%	3
PtHIPP47	POPTR_0011s15250	178	3%	4%	6%	5
PtHIPP48	POPTR_0012s00740	307	8%	5%	18%	7
PtHIPP49	POPTR_0012s10320	335	8%	6%	19%	6
PtHIPP50	POPTR_0013s01840	383	9%	9%	7%	3
PtHIPP51	POPTR_0013s02620	600	7%	21%	4%	4
PtHIPP52	POPTR_0014s08550	182	8%	3%	19%	2
PtHIPP53	POPTR_0014s12650	293	10%	8%	6%	3
PtHIPP54	POPTR_0014s13670	239	8%	6%	10%	8
PtHIPP55	POPTR_0014s16940	123	7%	11%	7%	1
PtHIPP56	POPTR_0014s16960	162	5%	9%	6%	4
PtHIPP57	POPTR_0014s17690	260	5%	2%	12%	5
PtHIPP58	POPTR_0015s00620	314	8%	4%	17%	7
PtHIPP59	POPTR_0015s11160	277	9%	3%	17%	8
PtHIPP60	POPTR_0015s13100	139	5%	4%	8%	3
PtHIPP61	POPTR_0016s00840	267	6%	4%	21%	6
PtHIPP62	POPTR_0016s00850	206	18%	7%	8%	19
PtHIPP63	POPTR_0016s01910	244	6%	7%	9%	7
PtHIPP65	POPTR_0016s09630	330	4%	11%	10%	6
PtHIPP66	POPTR_0017s01090	128	7%	5%	6%	4
PtHIPP67	POPTR_0017s01100	125	9%	5%	7%	5
PtHIPP68	POPTR_0017s01110	113	6%	2%	10%	3
PtHIPP69	POPTR_0017s01120	131	6%	5%	5%	3
PtHIPP70	POPTR_0018s14570	140	5%	6%	6%	9
PtHIPP71	POPTR_0019s13740	140	5%	7%	3%	3
PtHIPP72	POPTR_0019s13840	140	5%	7%	3%	3
PtHIPP73	POPTR_0063s00270	182	4%	7%	3%	4
PtHIPP74	POPTR_1177s00200	131	6%	4%	6%	3
PtHIPP75	POPTR_1183s00200	128	5%	11%	5%	2
<b>HPP</b>						
PtATX1	POPTR_0008s02430	84	4%	8%	10%	2
PtCCH	POPTR_0010s24290	85	5%	9%	8%	2
PtHPP01	POPTR_0001s24140	282	8%	2%	3%	8
PtHPP02	POPTR_0006s23040	287	8%	2%	4%	5
PtHPP03	POPTR_0009s13760	159	5%	6%	7%	5
PtHPP04	POPTR_0012s00730	138	7%	7%	2%	3
PtHPP05	POPTR_0015s00610	138	8%	7%	2%	3
PtHPP06	POPTR_0018s14710	111	9%	4%	5%	6
PtHPP07	POPTR_0045s00240	102	5%	3%	6%	2
PtHPP08	POPTR_0720s00200	130	4%	6%	4%	3
PtHPP09	POPTR_0872s00200	356	5%	10%	7%	8
PtHPP10	POPTR_0016s08120	281	10%	2%	4%	6

Tabela 3e – HIPPs e HPPs putativas identificadas no genoma de *S. italica*. Proteínas descritas quanto ao número de aminoácidos (tamanho) e composição.

			Propriedades				
			tamanho	% Pro	% Gly	% Glu	Cys
<b><i>Setaria italica</i></b>							
<b>HIPP</b>							
SiHIPP01	Si001095m		515	4%	11%	3%	10
SiHIPP02	Si002212m		328	16%	6%	8%	5
SiHIPP03	Si003229m		153	7%	7%	3%	5
SiHIPP04	Si003232m		153	7%	5%	6%	5
SiHIPP05	Si004055m		236	11%	6%	8%	3
SiHIPP06	Si007367m		178	6%	7%	4%	3
SiHIPP07	Si009856m		524	11%	22%	2%	4
SiHIPP08	Si010444m		362	10%	7%	15%	8
SiHIPP09	Si010573m		285	9%	6%	12%	5
SiHIPP10	Si010717m		278	4%	9%	11%	11
SiHIPP11	Si010853m		268	28%	4%	9%	20
SiHIPP12	Si010972m		235	17%	4%	8%	25
SiHIPP13	Si011133m		191	4%	10%	5%	2
SiHIPP14	Si011307m		130	6%	4%	9%	12
SiHIPP15	Si011958m		142	5%	10%	3%	1
SiHIPP16	Si012050m		117	10%	7%	11%	10
SiHIPP17	Si012150m		222	8%	14%	5%	6
SiHIPP18	Si012205m		129	9%	5%	11%	7
SiHIPP19	Si012363m		125	6%	6%	8%	4
SiHIPP20	Si012440m		141	5%	10%	6%	5
SiHIPP21	Si012698m		276	9%	9%	6%	9
SiHIPP22	Si014598m		144	6%	7%	6%	3
SiHIPP23	Si017801m		327	8%	10%	13%	5
SiHIPP24	Si018549m		163	6%	11%	4%	2
SiHIPP25	Si018698m		128	9%	8%	5%	4
SiHIPP26	Si019217m		204	6%	8%	6%	3
SiHIPP27	Si019468m		175	6%	10%	5%	4
SiHIPP28	Si019576m		140	10%	7%	4%	4
SiHIPP29	Si019599m		142	5%	4%	5%	3
SiHIPP30	Si022452m		362	12%	19%	4%	5
SiHIPP31	Si023380m		184	9%	5%	4%	3
SiHIPP32	Si023380m		184	9%	5%	4%	3
SiHIPP33	Si023557m		146	10%	4%	8%	4
SiHIPP34	Si024054m		230	7%	13%	6%	2
SiHIPP35	Si026474m		396	13%	6%	12%	9
SiHIPP36	Si026701m		298	22%	5%	6%	19
SiHIPP37	Si026946m		157	7%	6%	4%	4
SiHIPP38	Si029598m		501	14%	7%	8%	13
SiHIPP39	Si030624m		310	8%	15%	8%	12
SiHIPP40	Si031283m		175	5%	17%	5%	4
SiHIPP41	Si031355m		161	5%	12%	6%	3
SiHIPP42	Si031357m		161	7%	9%	5%	3
SiHIPP43	Si035920m		414	13%	4%	9%	5
SiHIPP44	Si036106m		386	9%	12%	7%	3
SiHIPP45	Si036295m		369	9%	10%	7%	5
SiHIPP46	Si036320m		300	9%	13%	8%	3
SiHIPP47	Si036676m		322	8%	20%	3%	4
SiHIPP48	Si037620m		196	5%	8%	6%	6
SiHIPP49	Si037868m		158	8%	5%	9%	4
SiHIPP52	Si039669m		195	5%	10%	4%	8
SiHIPP50	Si040003m		485	12%	19%	3%	4
SiHIPP51	Si040219m		140	12%	8%	5%	9
<b>HPP</b>							
SiATX1	Si027155m		79	4%	9%	9%	2
SiCCH	Si018567m		158	9%	9%	4%	2
SiHPP01	Si003226m		151	3%	11%	5%	6
SiHPP02	Si003326m		132	3%	8%	6%	3
SiHPP03	Si037250m		241	6%	5%	5%	4

O grande número de duplicações e a diversificação de genes dentro dessa família é notável. Análises filogenéticas mostram genes que se diversificaram em eras diferentes da evolução das plantas, algumas em eventos mais ancestrais, outros recentes, como observado em ramos da árvore filogenética que possuem proteínas exclusivas de uma espécie (como PtrHIPP23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 62) ou família de plantas (como OsaHIPP01-5, SitHIPP11-12 somente de Poacea) (Fig. 6).

Ao analisar somente o domínio HMA de todas as HIPPs de cinco espécies distintas de plantas, observa-se que estas proteínas se separam em cinco grupos (*clusters*). Com a exceção de *S. moellendorffii*, todas as plantas analisadas possuem HIPPs em cada um dos cinco clusters (Fig. 6), tal fato sugere que tais grupos se separaram no início da diversificação das angiospermas. A mesma distinção nesses cinco grupos pode ser observada ao analisar HIPPs de arroz e Arabidopsis usando a metodologia de Neighbor Joining (Fig. 7).

Além de similaridade de sequência no domínio HMA, as proteínas desses *clusters* são, em geral, similares quanto a sua composição e arquitetura (organização em domínios). Por exemplo, o Cluster I contém proteínas que possuem dois domínios HMA. Nossas análises, assim como a de trabalhos anteriores (Barth *et al.*, 2009; Tehseen *et al.*, 2010), indicam que essas proteínas surgiram de uma duplicação *in tandem*, visto que o segundo domínio, quando analisado separadamente se agrupa nesse mesmo grupo. Já no Cluster III, encontram-se proteínas maiores que as demais HIPPs, com mais de 500 resíduos de comprimento e compostas por várias repetições ricas em glicina (Fig. 7.).

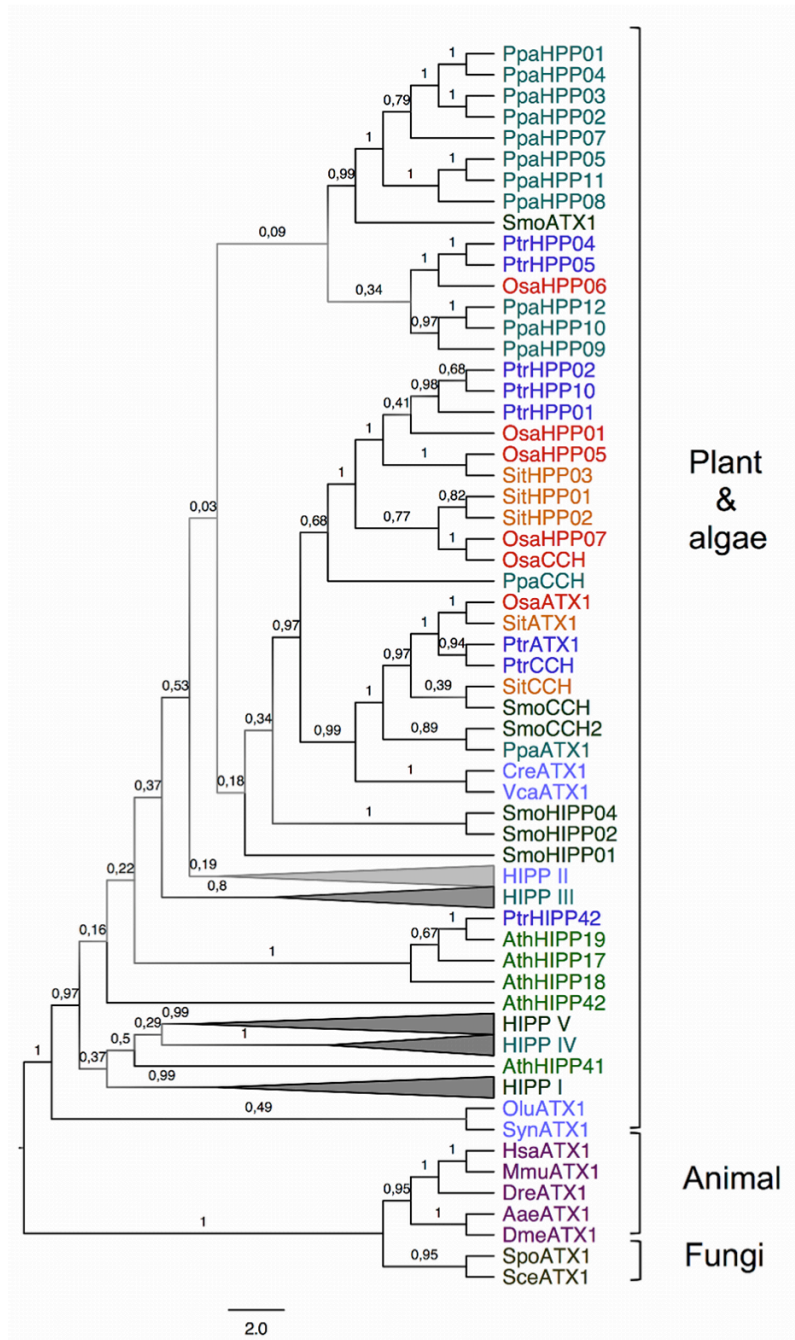


Fig 5 - Árvore filogenética de proteínas similares a ATX1 inferida por análise Bayesiana usando sequências do domínio HMA de proteínas ATX1, CCH, HIPP, HPP de espécies representativas de fungos, animais, plantas e algas: *Saccharomyces cerevisiae* (Sce), *Schizosaccharomyces pombe* (Spo), *Homo sapiens* (Hsa), *Mus musculus* (Mmu), *Danio rerio* (Dre), *Aedes aegypti* (Aae), *Drosophila melanogaster* (Dme), *Selaginella moellendorffii* (Smo), *A. thaliana* (Ath), *O. sativa* (Osa), *Populus trichocarpa* (Ptr), *Setaria italica* (Sit), *Physcomitrella patens* (Ppa), *Chlamydomonas reinhardtii* (Cre), *Volvox carteri* (Vca) e *Ostreococcus lucimarinus* (Olu). HIPP I a V: proteínas que se agrupam nos clusters da Fig.6)

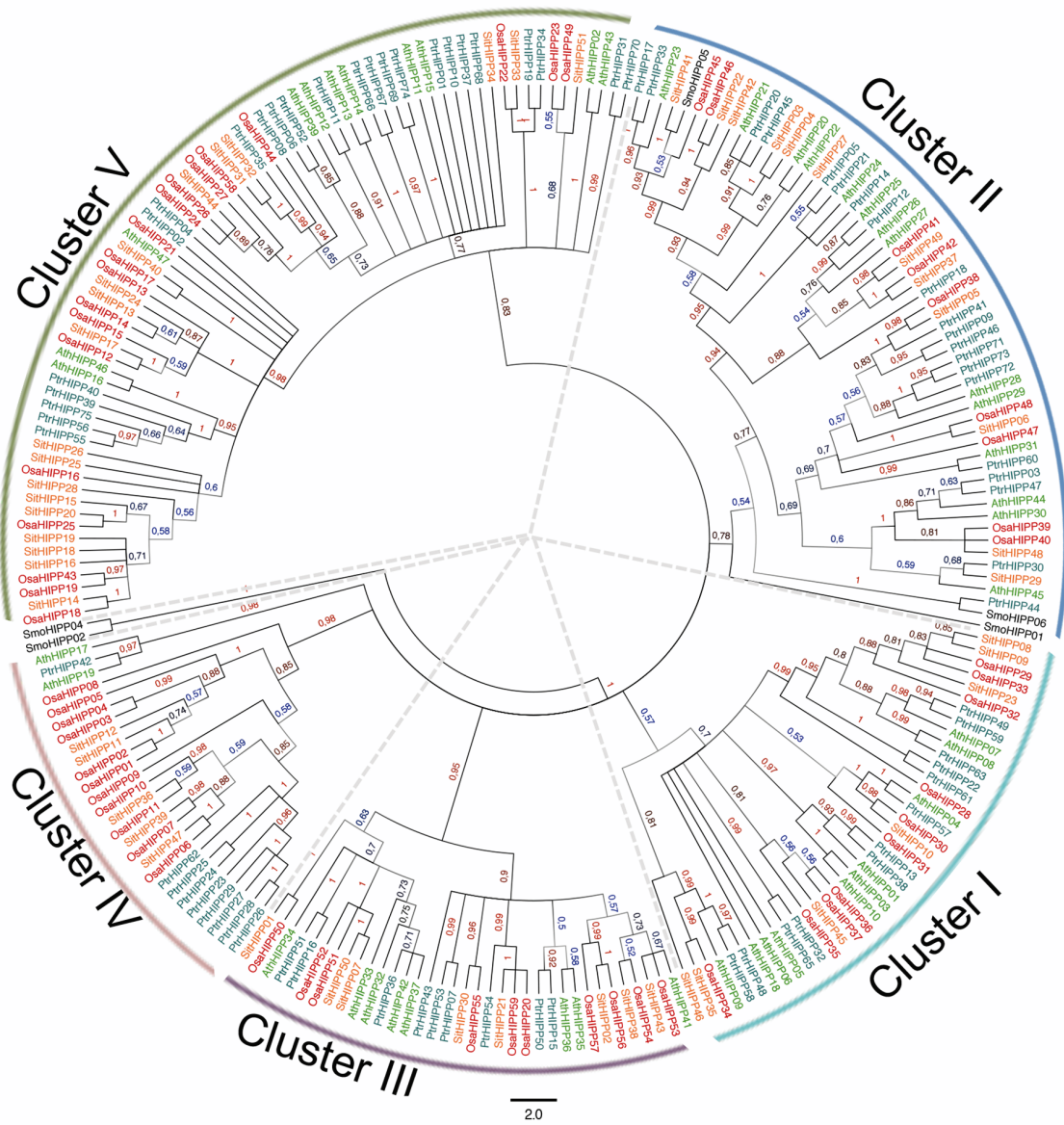


Fig. 6 - Análise filogenética de HIPPs inferida por análise Bayesiana usando a sequência peptídica do domínio HMA de todas as HIPPs identificadas em cinco espécies de plantas: *Selaginella moellendorffii* (em letras pretas), *A. thaliana* (em verde), *O. sativa* (em vermelho), *Populus tricarpa* (em azul) e *Setaria italica* (em laranja).



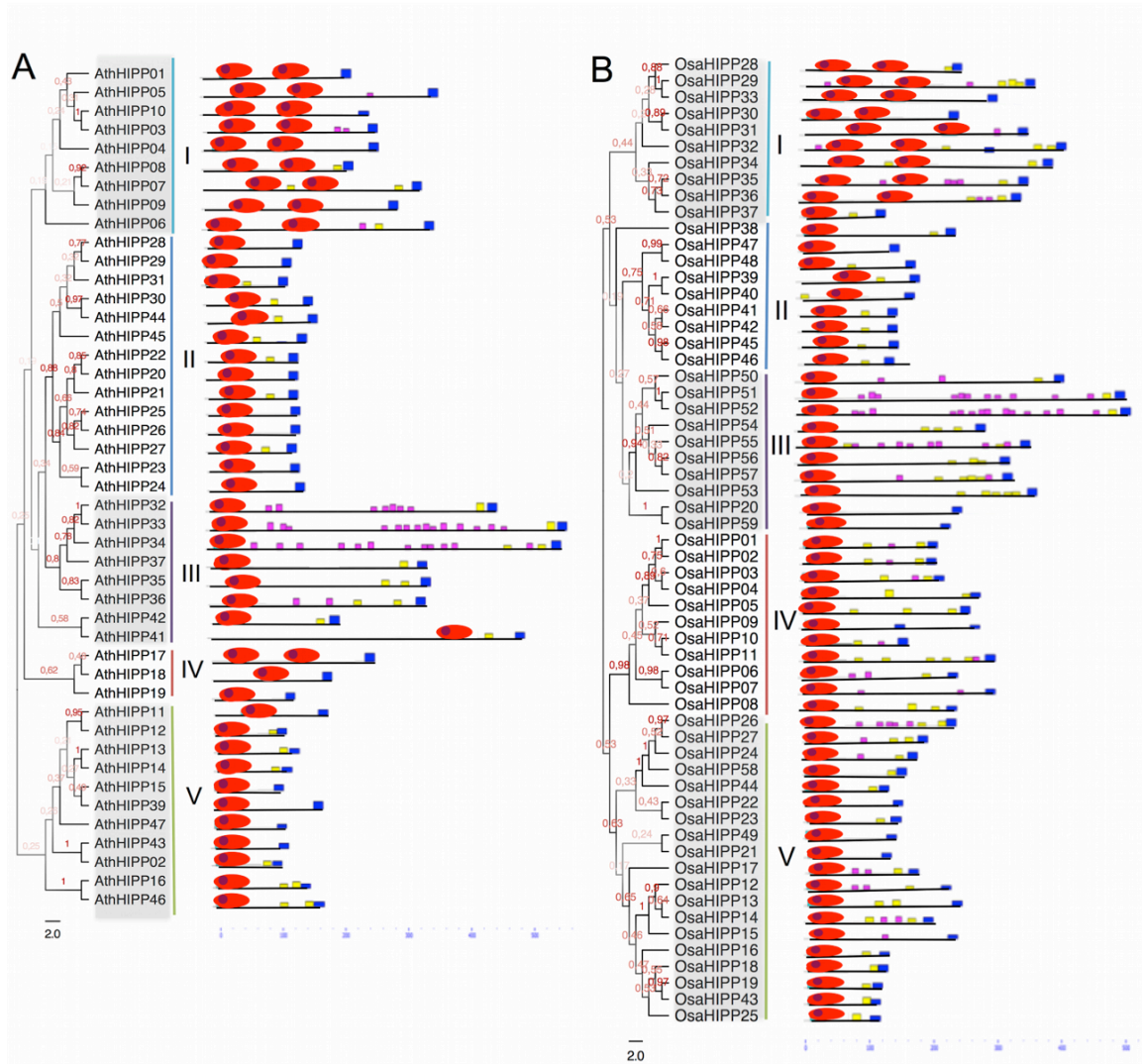


Fig 7 - Arquitetura e tamanho de proteínas HIPP de *A. thaliana* (A) e arroz (B). O dendograma contendo todas as HIPP identificadas nesses genomas foi montado pelo programa MEGA 5.1, usando a metodologia de neighbor-joining com 2000 repetições de bootstrap. A arquitetura de domínios conservados baseada nos resultados do programa MEME 5.05. Domínio HMA em vermelho; motivo de isoprenilação representado pelas caixas azuis; repetições ricas em glicina em rosa; e, em amarelo, motivos ricos em prolina.

## DISCUSSÃO

Trabalhos anteriores que buscaram analisar a relação filogenética entre ATX1, CCH, HPPs e HPPs usaram somente sequências de *A. thaliana* e não conseguiram observar uma distinção clara entre estes tipos de proteínas (Barth *et al.*, 2009; Tehseen *et al.*, 2010). Ao analisar sequências de um número maior de espécies, foi possível observar que existem dois tipos de HPPs: i) proteínas semelhantes a ATX1, que se agrupam com proteínas ATX1 de plantas e algas, porém que possuem a adição de novos domínios, como a CCH (Fig. 5), e ii) Proteínas derivadas de HPPs, porém que ao longo da sua evolução perderam o motivo de isoprenilação, como observamos com AtHPP01, que se assemelha mais a AtHIPP07 que a qualquer outra proteína (Tehseen *et al.*, 2010), e são incluídas nos clusters de HPPs pelas análises filogenéticas. Para facilitar a compreensão dos dados e das análises, HPPs do tipo ii não serão mais citadas ao longo deste trabalho.

Embora não seja possível identificar o ponto exato de seu surgimento é possível supor que a diversificação das HPP a partir de uma única ATX1 teve princípio em um organismo ancestral das plantas terrestres. Tal previsão vem do fato que nas algas verdes *Chlamydomonas reinhardtii* e *Volvox carteri*, pertencentes a um grupo irmão que deu origem às plantas (Chlorophyta), existe somente uma ATX1 e em plantas avasculares como a *P. patens* as HPPs estão presentes (Fig. 5 e Tabela 3).

A origem das HPPs claramente ocorreu com o surgimento das plantas vasculares, visto que elas não são encontradas em qualquer organismo fora deste grupo. Porém, sua diversificação em cinco clusters deve ter ocorrido no início da diversificação das angiospermas, visto que encontramos proteínas pertencentes aos cinco clusters em cada uma das angiospermas analisadas, tanto monocotiledôneas como dicotiledôneas (Fig. 5).

A partir destas análises filogenéticas (fig. 5 e 7) e do conhecimento prévio da filogenia e história dos organismos analisados (Fig. 4) é possível propor um modelo de evolução e diversificação das metalochaperonas tipo ATX1 em plantas (Fig. 8): a partir de eventos de duplicação e mutação, surgiu a ATX1 (que se manteve conservada) e outra proteína similar que, por mutação ou translocação, recebeu sequências adicionais, sendo classificada como HPP. Esta provavelmente deu origem a CCH que identificamos nas plantas atuais, visto que esta é descrita como a mais similar à ATX1 (passo 2 da Fig. 8). Fenômenos similares de duplicação e mutação deram origem a outras metalochaperonas



HPP e entre estas as primeiras com o sinal de isoprenilação, as HIPPs (passos 3 e 4 da Fig. 8). O processo de diversificação continuou especialmente entre as HIPPs, formando novos *clusters* dentro dessa família com estruturas distintas (Fig. 8, passo 5). Com base nos dados da literatura é possível propor inclusive a idade destes eventos, tendo os passos 2 e 3 ocorrido próximos a diversificação das embriophytas; o passo 4, na diversificação das thraechophytas, e o passo 5, antes da divergência das monocotiledôneas (Fig. 4 e 8).

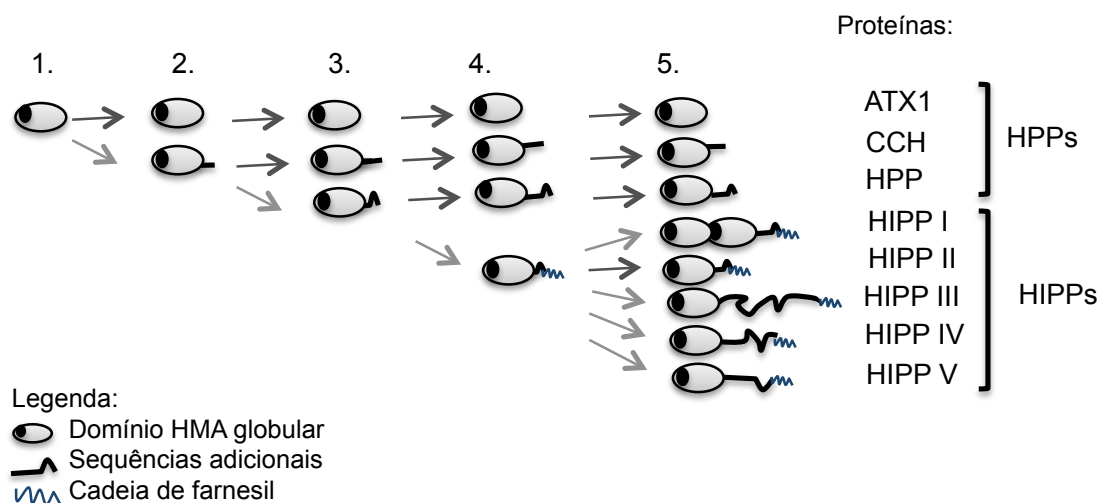


Fig.8 - Modelo da diversificação das metalochaperonas de plantas a partir de proteína ATX1 de organismo ancestral das plantas terrestres, composta essencialmente por um domínio HMA globular. Ao longo da evolução das plantas, retratada em etapas diferentes (1-5), algumas proteínas foram mais conservadas (setas cinza escuro) outras se alteraram (setas cinza claro) com a adição de novas sequências compostas de diferentes motivos proteicos (linha volteada) e pela adição de um grupamento de farnesil ou geranylgeranyl (em azul).

Eventos de duplicação de todo o genoma ou de partes desse são considerados um “combustível” para a evolução por darem origem a novos genes. Genes duplicados apresentam diferentes destinos. Tradicionalmente acreditava-se que enquanto um gene continuasse a desempenhar sua função original, a sua nova cópia, sofrendo uma menor pressão seletiva, seria alterada por mutações aleatórias e assim poderia desenvolver uma nova função (neo-funcionalização) (Chen e Tholl, 2011). Porém, ao longo dos últimos anos foi observado que o que ocorre mais frequentemente é a sub-funcionalização, ou seja, cada um dos genes originados da duplicação passa a desempenhar parte da função do gene original. Esse é um dos fenômenos que se observa por trás do crescimento de famílias gênicas como a das HIPPs/HPPs (Kliebenstein, 2008; Kondrashov, 2012; Pires e Dolan, 2012).

Enquanto que em fungos e animais existe somente uma proteína ATX1, em plantas existe uma família composta de muitas proteínas similares a ATX1. Mesmo na planta avascular *P. patens*, que não possui HPPs, existe um grupo de doze HPPs praticamente exclusivas desse musgo (Fig. 5). Tal fato indica uma forte tendência à duplicação e diversificação deste tipo de proteína em plantas.

Muitas famílias de proteínas se diversificaram e cresceram nos genomas vegetais, porém mesmo ao comparar com outras famílias gênicas relacionadas ao transporte de metais que cresceram em número de genes ao longo da evolução das plantas, o aumento do número de HPPs, e, especialmente HPPs, nestes mesmos organismos é notável (Tabela 4). O motivo pelo qual as plantas precisam de tantas metalochaperonas a mais do que outros organismos ainda é desconhecido, porém isso indica que essas proteínas devem desempenhar um papel essencial no metabolismo das plantas.

Tabela 4. Número de genes de algumas famílias de transportadores de metais e metalochaperonas nos genomas analisados.

Espécie	Transportadores*					Metalochaperonas					Genoma (Mb)*
	CTR	CDF	ZIP	NRAMP	HMA	ATX1	CCS	CCH	HPP**	HIPP	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	6	5	3	2	1	1	0	0	0	12
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	3	5	11	3	4	1	0	0	0	0	112
<i>Physcomitella patiens</i>	2	11	9	6	9	1	2	1	12	0	511
<i>Selaginella moellendorffii</i>	8	9	9	7	12	1	1	1	4	5	212
<i>Sorghum bicolor</i>	4	9	17	10	9	1	1	1	4	44	740
<i>Oryza sativa</i>	7	8	16	7	9	1	1	1	7	59	490
<i>Populus trichocarpa</i>	7	19	20	9	10	1	1	1	10	79	485
<i>Arabidopsis thaliana</i>	6	12	18	8	9	1	1	1	19	45	157

\* Dados obtidos da revisão de Migeon et al., 2010; \*\* o número real pode ser maior, porém nossos parâmetros de busca não conseguiram filtrar todos.

As proteínas possuem uma estrutura que normalmente pode ser descrita como modular, ou seja, composta por módulos, domínios estruturais e funcionais que agem de forma relativamente independente uns dos outros. Muitas proteínas ganham novas funções a partir de rearranjos gênicos que acabam por incorporar ou remover domínios na sequência da proteína original (Kersting *et al.*, 2012). Por esta ótica, podemos analisar as proteínas HPPs, originalmente possuindo somente um domínio HMA, como as proteínas tipo ATX1, e recebendo um motivo de isoprenilação que lhes permitia a interação com membranas e diferentes proteínas com regiões apolares. Ao analisar a arquitetura de domínios das HPPs de arroz e Arabidopsis, identificamos, além desses dois elementos

principais (Domínio HMA e motivo de isoprenilação) a presença de outros domínios descritos na literatura como elementos de interação proteína-proteína, sendo os mais frequentes as repetições ricas em glicina (*Glycine Rich Domain- GRD*) (Fig. 9D) e os motivos ricos em prolina (*Proline Rich Motif - PRM*) (Fig. 9E), representados, respectivamente, em rosa e amarelo nas figuras 7 e 9.

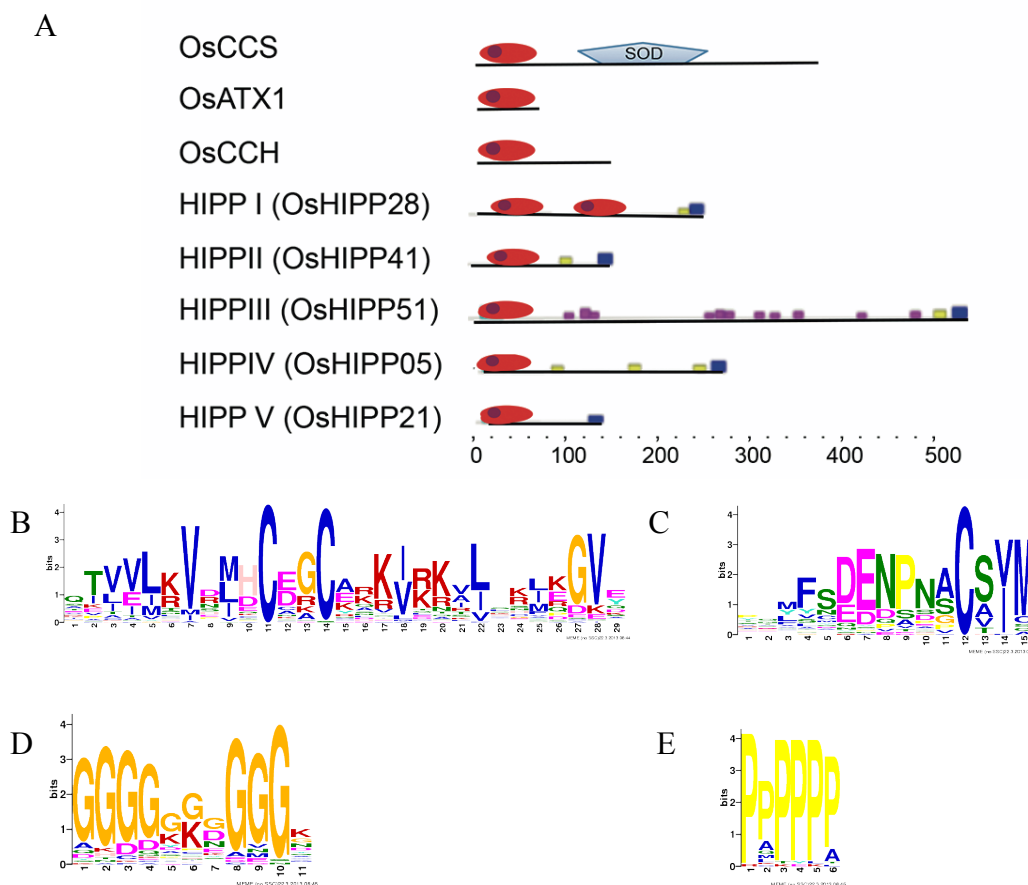


Fig 9 A) Estrutura de proteínas HIPP representativas em comparação com a de outras metalochaperonas conhecidas. Domínios conservados identificados pelo programa MEME 5.1 (B-E): Domínio HMA (B) representado em vermelho em A; motivo de isoprenilação (C) representado pelas caixas azuis; GRD (D) em rosa; e, em amarelo, PRM (E).

Estes dois tipos de motivos formados pela repetição de um resíduo na sequência proteica são descritos como capazes de conferir conformações únicas à estrutura secundária e terciária da proteína. Repetições de glicina são capazes de formar uma estrutura altamente flexível de alças de glicina (Fig 10A), que já foi descrita como capaz de prender-se a outras GRDs de proteínas vizinhas ou da própria proteína de forma similar a de um “velcro” (Sachetto-Martins, Franco e Oliveira, de, 2000). Já a prolina confere maior rigidez à

proteína, formando, em contato com meio aquoso, uma estrutura denominada de hélice de prolina (Fig 10 B) que apresenta em sua superfície regiões hidrofóbicas expostas assim como pontos que permitem ligações de hidrogênio, o que facilita a interação com outras proteínas a ponto de serem descritas com um “braço grudento”, visto que normalmente são encontradas em extremidades N ou C terminal de proteínas globulares (Kay, Williamson e Sudol, 2000).

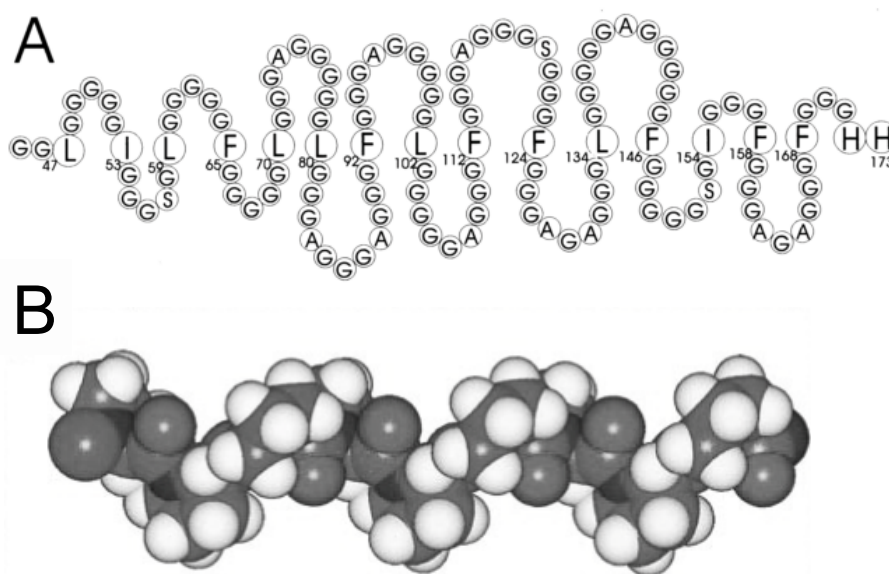


Fig. 10 Modelos de estruturas secundárias atribuídas aos motivos GRD (A) e PRM (B). Fonte: Sachetto-Martins et al, 2000; Kay et al., 2000

Portanto, a partir dos dados reunidos pode-se inferir que proteínas HIPPs devem depender de interações com diferentes proteínas para desempenhar seu papel dentro da célula vegetal. Devido ao grande número de HIPPs que se diferenciam muito entre si, pode-se supor que cada HIPP deve possuir subfunções e regulações próprias, que podem ter um papel de grande importância na regulação fina do transporte de íons metais nas plantas.

## **CAPÍTULO II:**

### **ANÁLISES DA EXPRESSÃO DOS GENES HIPPS E DA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DOS SEUS PRODUTOS GÊNICOS**

## INTRODUÇÃO

Até o momento, poucos membros da família HIPP foram avaliados funcionalmente. Entre as proteínas melhor caracterizadas estão:

- AtHIPP7/AtFP3 – Identificada a partir de uma biblioteca de proteínas farnesiladas, esta proteína se mostrou capaz de se ligar a Cu, Ni e Cd em colunas de afinidade. Essa proteína se mostrou hidrossolúvel, sendo principalmente recuperada na primeira eluição passada por estas colunas, porém uma fração destas foi recuperada somente em eluição com SDS, provavelmente por sua isoprenilação ligar a proteína a outros elementos apolares (Dykema *et al.*, 1999);
- AtHIPP06/CdI19 – Esta proteína que possui dois domínios HMA foi identificada por ser expressa em resposta a cádmio, por isso foi denominada de *Cd induced protein 19*. Sua expressão também foi induzida pelo excesso de Cu, Hg e Fe. Análises de dicroísmo circular mostraram que ela é capaz de ligar Cu, Cd e Hg, mas não Mn, Co e Ca. Análises por mutação pontual demonstraram que a ligação ao metal realmente se dá pelas duas cisteínas do domínio HMA. A superexpressão desta proteína conferiu maior tolerância a Cd para levedura e Arabidopsis. Em fusão com GFP, AtHIPP06 se mostrou ligada às membranas da célula (Suzuki *et al.*, 2002);
- AtHIPP26/AtFP6 – Alvo de dois artigos publicados independentes, esta proteína foi descrita como uma proteína associada à membrana e envolvida na resposta a metais pesados e ao estresse oxidativo (Gao *et al.*, 2009) e como uma proteína nuclear envolvida na regulação da resposta transcricional a frio e seca (Barth *et al.*, 2009);
- AtHIPP20, 21, 22, – Estas proteínas foram descritas como envolvidas na resposta a cádmio, resgatando o fenótipo tolerante a leveduras mutantes sensíveis ao metal. Plantas triplo-nocautes para estes genes se mostraram mais sensíveis ao cádmio. Porém ao realizar testes similares para outros metais (Zn e Cu) tais respostas não foram vistas, o que indica que estas proteínas estão envolvidas somente na homeostase de Cd (Tehseen *et al.*, 2010).
- HvHIPP01/HvFP1, descrita em cevada (*Hordeum vulgare* L. cv. Trixi). Esta proteína nuclear é mais expressa em resposta ao frio e à seca, tendo uma baixa indução por Cu e Cd. Também é altamente expressa em folhas durante a senescência (Barth *et al.*, 2004).

Ao analisar estas diferentes proteínas, podemos entender que proteínas dessa mesma família podem agir em mecanismos fisiológicos e celulares muito distintos. Embora os estudos citados sejam muito importantes por desvendar a função destas proteínas em particular, um trabalho que avalie as HPPs de modo mais abrangente se faz necessário para compreender a função desta família como um todo.

No capítulo que se segue, iremos descrever o perfil de expressão dos genes HPP de *A. thaliana* e arroz, de forma que seja possível inferir sobre a regulação gênica e possíveis funções das diferentes HPPs que estão presentes nestes organismos.

Empregamos uma segunda estratégia de análise com as HPPs que mais se destacaram por seu perfil de expressão. Através da expressão, em protoplastos de arroz, da proteína de estudo fusionada com uma proteína repórter (RFP) observamos a localização desta dentro da célula. Esta abordagem é semelhante à empregada durante a identificação de outras HPPs como HvFP1, AtHPP26 e AtHPP06 (Barth *et al.*, 2004, 2009; Suzuki *et al.*, 2002).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Análise *in silico* da expressão de genes HIPP**

Para o estudo detalhado da expressão de genes HIPP, duas espécies que apresentam grande número de dados de expressão disponíveis, arroz e *Arabidopsis*, foram utilizadas. Essas análises foram realizadas com o uso de ferramentas disponíveis para o uso *on line* com dados das plataformas públicas RiceXPro (Sato *et al.*, 2011) e Genevestigator V4 (Hruz *et al.*, 2008). Essas análises permitiram inferir o padrão de expressão de genes ao longo do desenvolvimento da planta e em resposta a diferentes fatores ambientais.

Para identificar possíveis genes HIPPs responsivos a estresses abióticos em arroz foi utilizada uma abordagem alternativa: dados brutos de microarranjo do dataset GSE6901 obtido de plataforma GEO ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)) foram utilizados. Em seguida usando LIMMA (Linear Models for Microarray data) os dados foram normalizados, pelo método RMA, de forma a identificar genes induzidos e reprimidos nas condições analisadas (seca x controle, sal x controle e frio x controle). A significância dos resultados pelo teste estatístico t moderado com  $P \leq 0,05$  (Smyth, 2005).

### **Tratamentos das plantas para análise de resposta a estresses abióticos**

Para a análise de expressão de genes HIPP de arroz em resposta a estresses abióticos, foram testadas plantas submetidas tanto a frio quanto a seca. As plantas de ambos os experimentos foram crescidas em câmara de crescimento com temperatura média de 28°C e iluminação de 16h luz/dia ( $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Para o experimento de frio, plântulas de duas semanas de idade foram mantidas a 4°C por 24 horas, enquanto o mesmo número de plantas deste mesmo lote de sementes e idade foram mantidas a 28°C como controle. Esse experimento foi realizado num conjunto de B.O.D. de mesmo modelo e condições, variando somente em temperatura. O experimento de seca foi realizado com plântulas do estágio de quatro folhas, também separadas em dois tratamentos: Plântulas controle, que continuaram a receber água, e plântulas “estressadas”, que não receberam mais água por um período de 15 dias. Depois desse período, folhas e caules das plantas de ambos os experimentos, incluindo os seus controles, foram imediatamente colhidas e estocadas em nitrogênio líquido para a extração de RNA.



Para o experimento com cádmio, plântulas de duas semanas de idade foram cultivadas em meio hidropônico de baixa força iônica (Baier, Somers e Gusiafson, 1995) e divididas em grupos de controle e de teste, que ficaram num meio suplementado com 60 µM CdCl<sub>2</sub> e colhidas 6, 12 e 24 horas a partir do início do estresse.

### **Análise por RT-qPCR (Quantitative Reverse Transcription PCR)**

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados com cDNAs sintetizados a partir de RNA total purificado com Trizol (Invitrogen®) e tratado com RQ1 DNase-free RNase® (Promega®). As diferentes amostras de cDNAs foram produzidas com o sistema de transcriptase reversa M-MLV e *primers* poliT (Promega®). Depois da síntese, cada cDNA foi diluído 10 e 100 vezes em água estéril para ser utilizado nas reações de PCR.

No total, oito genes foram analisados: quatro HIPPs: (*OsHIPP21*, *OsHIPP28*, *OsHIPP41* e *OsHIPP50*), que foram escolhidos a partir das análises *in silico* do seu padrão de expressão, e quatro genes controles (*OsFDH*, *OsNSL*, *OseF1α1* e *OsGAPDH*), que foram usados para normalizar a quantidade de mRNA presente em cada amostra. Os pares de *primers* foram desenhados para produzir fragmentos de DNA com tamanhos entre 100 e 250 pb (Tabela 5).

Tabela 5. Sequências dos pares de *primers* utilizados nas reações de RT-qPCR

<b>Nome</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<b>OsHIPP21_RT</b>	5' -CCGGTTGATGAGAAGAAGGA-3'	5' -ATCTGGCAGCATGATGGACT-3'
<b>OsHIPP28_RT</b>	5' -TCGGTCGAGACTGATCTCCT-3'	5' -GTCGGCCTTATCCTCATCTG-3'
<b>OsHIPP41_RT</b>	5' -AGCTTGCCTCCGCCTCAGC-3'	5' -ATGGCATGGCCGCATGGGTG-3'
<b>OsHIPP50_RT</b>	5' -TTAGCCCTTACACCGCTAC-3'	5' -CATGCTTCATCACCAACCTC-3'
<b>OsFDH_RT</b>	5' -TTCCAATGCATTCAAAGCTG-3'	5' -CAAATCAGCTGGTGCTTCTC3'
<b>OseF1α1_RT</b>	5' TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT-3'	5' GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA
<b>OsGAPDH_RT</b>	5-GGGCTGCTAGCTTCAACATC-3'	5' -TTGATTGCAGCCTTGATCTG-3'
<b>OsNSF_RT</b>	5' -CGCTAAACCAGGCTGTTGAT-3'	5' -GCCCTCACTGTCAAAAAGA-3'

Para cada condição testada foram realizadas quatro repetições experimentais (indivíduos diferentes) e estas foram avaliadas em quatro replicas técnicas seguindo o protocolo de RT-qPCR descrito por Rosa e colaboradores (Rosa *et al.*, 2010). As reações foram feitas no Applied Biosystems StepOne plus Real-time PCR system com detecção da fluorescência de *SYBR green*. As análises dos dados de expressão foram realizadas após

quantificação comparativa dos produtos amplificados usando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak e Schmittgen, 2001; Schmittgen e Livak, 2008). Análises estatísticas foram realizadas com o Teste T de Student para avaliar par a par as diferenças na expressão. Valores foram considerados significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

### **Localização subcelular**

Para verificar a localização subcelular das proteínas HIPPs foram utilizadas abordagens *in silico* e *in vivo*. Para as análises *in silico*, foram utilizados três programas que usam algoritmos diferentes de predição da localização subcelular: CELLO v.2.5 (Yu *et al.*, 2006), PredSL (Petsalaki *et al.*, 2006) e TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000). A visualização *in vivo* foi realizada em protoplastos de arroz usando proteínas OsHIPP21 e OsHIPP41 fusionadas com RFP (Proteína Fluorescente vermelha) na sua extremidade amino-terminal. Essas proteínas repórteres foram obtidas pela uso da tecnologia Gateway, introduzindo a sequência de cDNA amplificada (inicialmente clonada no vetor pENTR (invitrogen) no plasmídeo p2RGW7 para expressar sob ação do promotor da ubiquitina 1 de milho a RFP fusionada com a proteína clonada (Karimi, Depicker e Hilson, 2007). A clonagem do cDNA *OsHIPP21* foi realizada com os *primers* HIPP21F (5'-caccTTTGGAGAAAACATGG-3') e HIPP21R (5'-CTACATCTGGCAGCATGATG-3'), enquanto a clonagem de *OsHIPP41* foi realizada com os *primers* HIPP41F (5'-caccATGGGCGTGGACACAT -3') e HIPP41R (5'-CTACATGACGGCGCAGGA-3'). Os vetores obtidos foram utilizados para a transformação de protoplastos.

Os protoplastos foram isolados de plântulas de arroz, cultivar Nipponbare, crescidas por duas semanas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962). Após esse período as plantas foram picotadas e incubadas em solução contendo a enzima celulase 1.5%, macerozima 0.3% e sorbitol 12% por 5 h para a digestão da parede celular. Os protoplastos foram isolados em meio W5 (Sidorov *et al.*, 1981) e transformados com PEG seguindo o método descrito em trabalhos anteriores (Lazzarotto *et al.*, 2011; Tao, Cheung e Wu, 2002). Protoplastos transformados foram incubados no escuro por aproximadamente 16 h a 28°C antes da análise. A observação foi realizada no microscópio confocal por varredura laser Olympus FluoView 1000. Em análises complementares, se utilizou DAPI nucleic acid stain (0,1 mg/mL) para marcar os núcleos das células.

## RESULTADOS

### Expressão de genes HIPPs em diferentes órgãos e ao longo do desenvolvimento

Genes da família HIPP apresentaram um amplo espectro de perfis de expressão. Análises dos dados disponíveis de expressão de *A. thaliana* e *O. sativa* revelam que os membros dessa família não apresentam um padrão comum de expressão. Alguns genes apresentam uma expressão ubíqua, enquanto outros apresentam expressão restrita, específica a determinados órgãos e/ou estágios de desenvolvimento da planta. Isso novamente indica que ao longo de sua evolução e diversificação essas proteínas passaram por diversos eventos de sub-funcionalização e neo-funcionalização.

*AtHIP34*, *AtHIP42*, *OsHIP31* e *OsHIP59* são exemplos de genes expressos durante todo o desenvolvimento da planta e em diversos tecidos, enquanto outros genes apresentam um padrão mais pontual de expressão (Fig. 11, 12, 13 e 14). Em arroz, *OsHIP21* e *OsHIP28* são específicos e altamente expressos em folhas, enquanto *OsHIP13* e *OsHIP48* são expressos principalmente nas raízes. Já genes como *OsHIP10* são expressos somente nas inflorescências e tecidos reprodutivos (Fig. 14).

Também observamos genes HIPPs que são induzidos ou reprimidos em resposta a diferentes fatores ambientais, como o excesso de cádmio, frio, seca, excesso salino e ataque de patógenos, como discutido a seguir.

## Stages of development

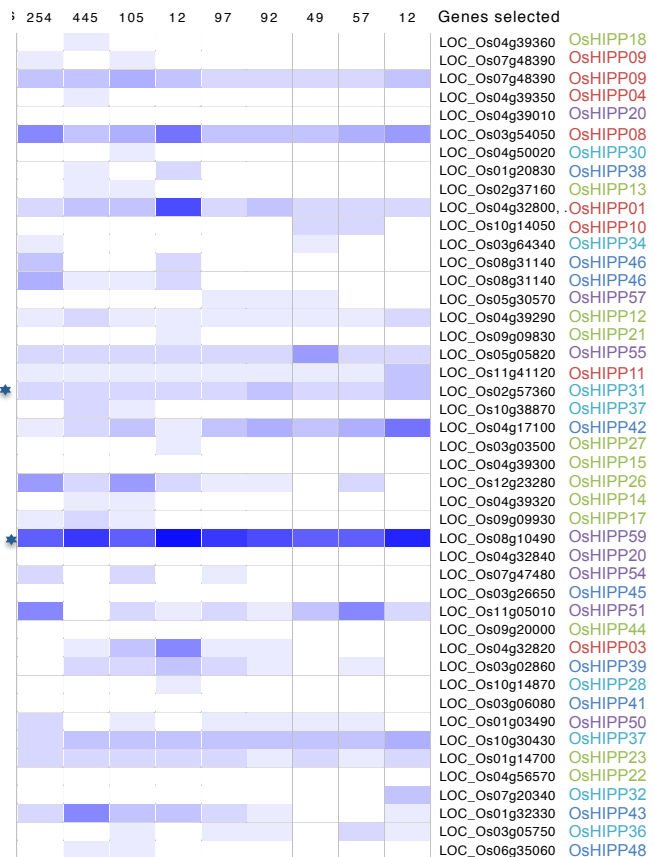
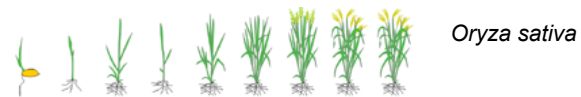
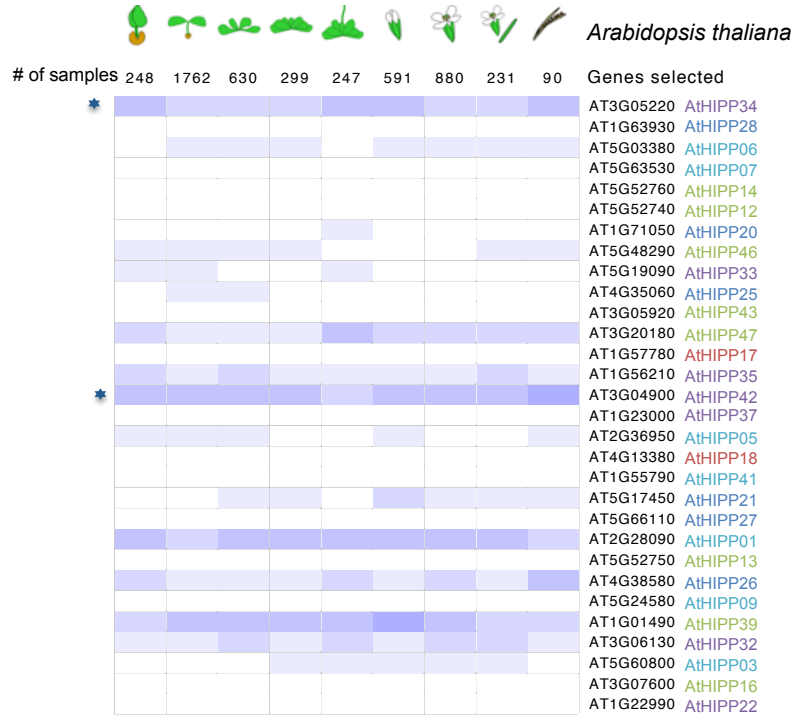


Fig. 11 – Perfil de expressão de genes HIPP de *A. thaliana* e *O. sativa* ao longo do desenvolvimento da planta (em log<sub>2</sub>). Adaptado de Genevestigator 4.0

# Anatomy profile Genevestigator 4.0



Fig. 12 – Perfil de expressão de genes HIPP de *A. thaliana* em diferentes órgãos da planta (em log<sub>2</sub>). Adaptado de Genevestigator 4.0



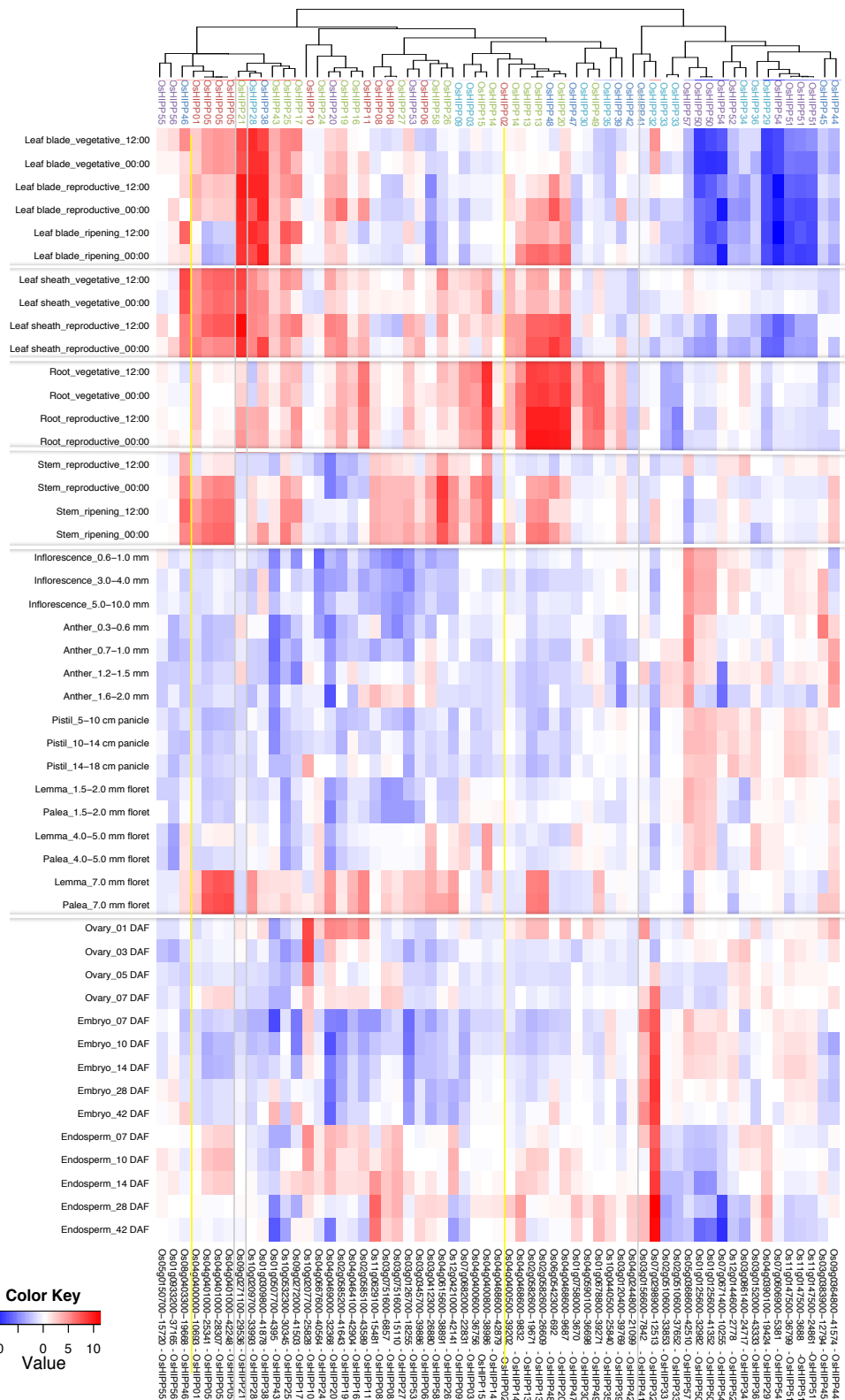


Fig. 14– Perfil de expressão de genes HIPP de *O. sativa* em diferentes tecidos da planta ao longo do seu desenvolvimento. Adaptado de RiceXPro. Cladograma apresenta o agrupamento de sondas por similaridade de perfil de expressão.

## Expressão de genes HIPP em resposta a cádmio

Trabalhos publicados anteriormente mostraram que o Cd é capaz de induzir a expressão de várias HIPPs distintas, por este motivo buscamos por HIPPs responsivas a esse metal em experimentos de microarranjo usando o aplicativo Genevestigator. Usando dessa abordagem foram identificados novos genes induzidos em raízes de plantas tratadas com Cd: *AtHIPP05*, *AtHIPP13*, *AtHIPP14*, *AtHIPP39*, *AtHIPP43*, *OsHIPP14* e *OsHIPP44*. Enquanto outros genes se mostraram reprimidos em tais condições: *AtHIPP32*, *OsHIPP18*, *OsHIPP23* e *OsHIPP38* (Fig. 15).

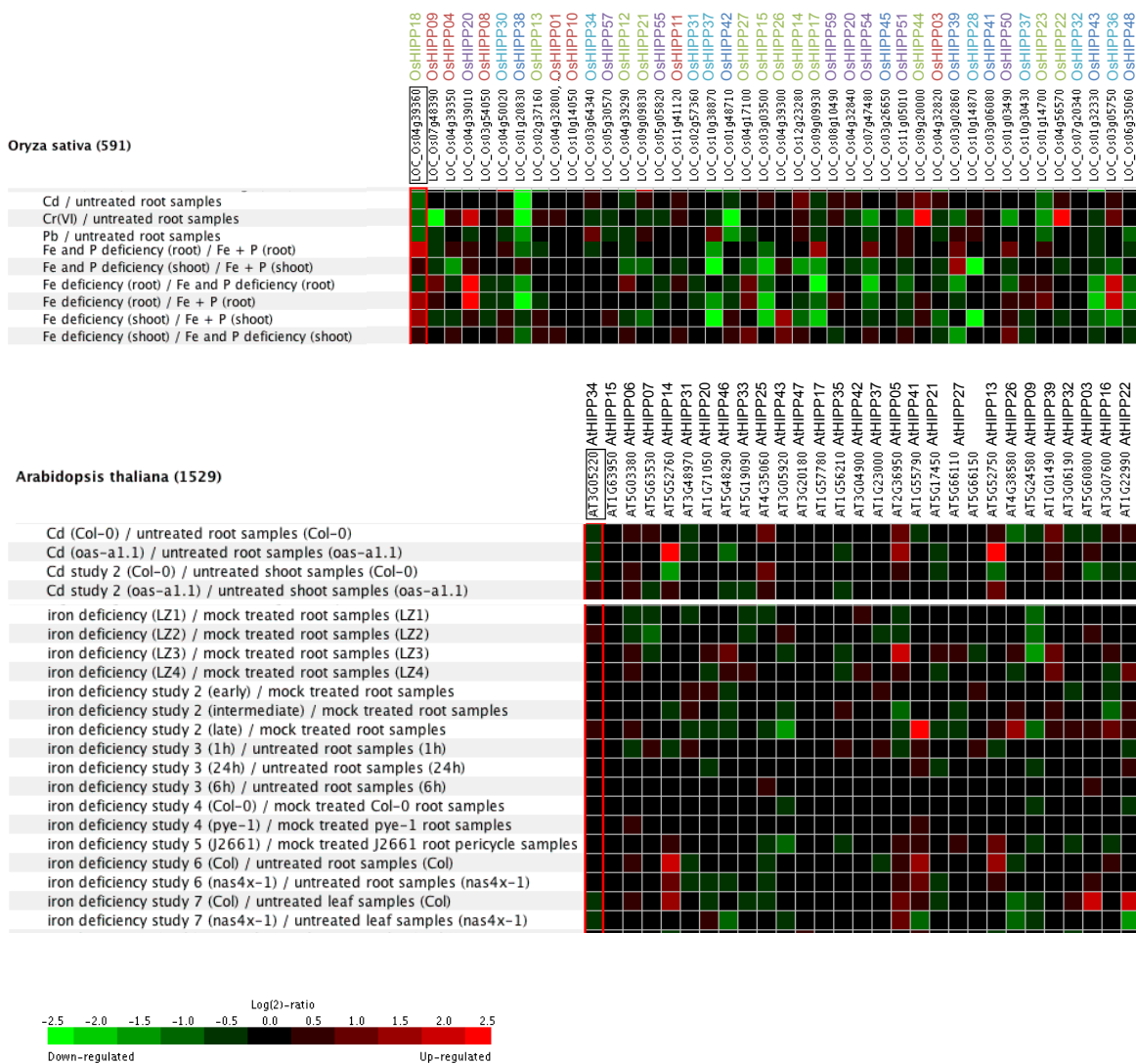


Fig. 15 - Perfil de expressão de genes HIPP de *A. thaliana* e *O. sativa* em plantas expostas a diferentes estresses por metal (em log<sub>2</sub>). Adaptado de Genevestigator 4.0



Em paralelo, a expressão de quatro genes de HIPPs em amostras de partes aéreas de plântulas tratadas com 60  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  foi avaliada por RT-qPCR. Desses, três genes mostraram uma pequena, porém significativa indução após 24 horas de exposição ao cádmio, *OsHIPP28*, *OsHIPP41* e *OsHIPP21*, aumentando cerca de duas, três e cinco vezes mais, respectivamente, em resposta ao excesso de cádmio do que em plantas mantidas nas condições controle. O mesmo não foi observado em amostras colhidas com 6 e 12 horas de tratamento. E um quarto gene, *OsHIPP50*, não mostrou nenhuma variação significativa nas amostras analisadas (Fig. 16).

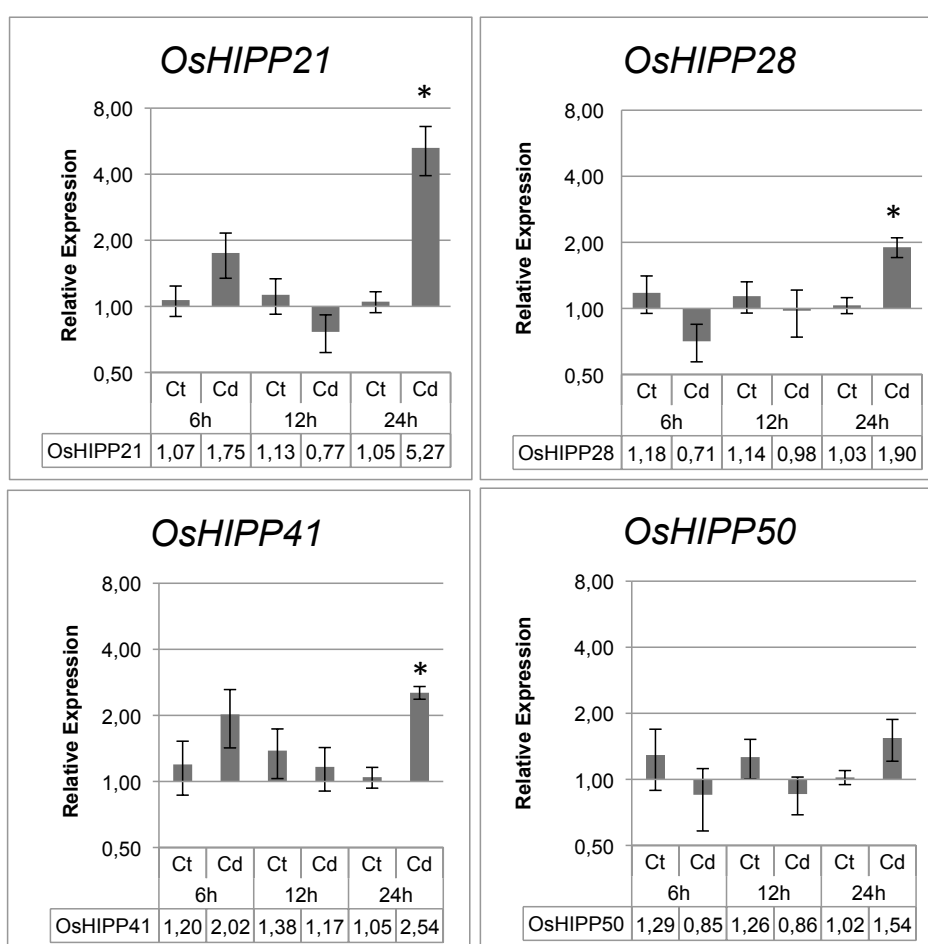


Fig 16 – Análise por RT-qPCR de genes HIPP em plântulas de duas semanas de idade expostas à  $\text{CdCl}_2$  60 $\mu\text{M}$  por 6, 12 e 24 horas. Expressão relativa de cada gene foi normalizada pela expressão de três genes controles *OsFDH*, *OsNSL* e *OsGAPDH*). Diferenças estatisticamente significantes entre plantas tratadas e seus controles são representadas por \* ( $P < 0.05$ ) e \*\* ( $P < 0.01$ ).

### **Expressão dos genes HPPs em resposta ao frio e à seca**

Análises dos dados de microarranjos de plântulas de arroz expostas a estresses de seca, sal e frio mostraram que os transcritos da maioria dos HPPs não variam significativamente nessas condições. Entretanto, alguns genes se mostraram responsivos a tais condições. A expressão de *OsHIPP09* e *OsHIPP15* foi reprimida em resposta a seca e sal respectivamente, enquanto *OsHIPP23* e *OsHIPP40* foram reprimidos em ambas condições. Já os genes *OsHIPP11* e *OsHIPP45* foram reprimidos somente em resposta ao frio (Fig. 17). *OsHIPP41*, que é fracamente expresso em condições normais (Fig. 13 e 14), é altamente expresso em resposta às condições de frio e seca (Fig. 17). Para confirmar esses resultados, a expressão de *OsHIPP41* em plântulas de arroz expostas a tratamentos de frio e seca foi analisada por RT-qPCR e o mesmo padrão de resposta foi obtido (Fig. 18).

Também foram avaliados por RT-qPCR, em plântulas submetidas ao frio e à seca, os genes *OsHIPP21* e *OsHIPP28*. Em condições normais esses genes são altamente expressos em folhas. No experimento anterior, esses genes se mostraram, juntamente com *OsHIPP41*, induzidos por excesso de Cd. A expressão relativa de *OsHIPP41* exibe um aumento de 10 vezes em resposta a seca e mais de 50 vezes em resposta ao tratamento em baixas temperaturas. E enquanto a expressão de *OsHIPP28* não mostrou mudanças significativas, *OsHIPP21* foi reprimido quase 10 vezes em resposta às mesmas condições (Fig. 18).

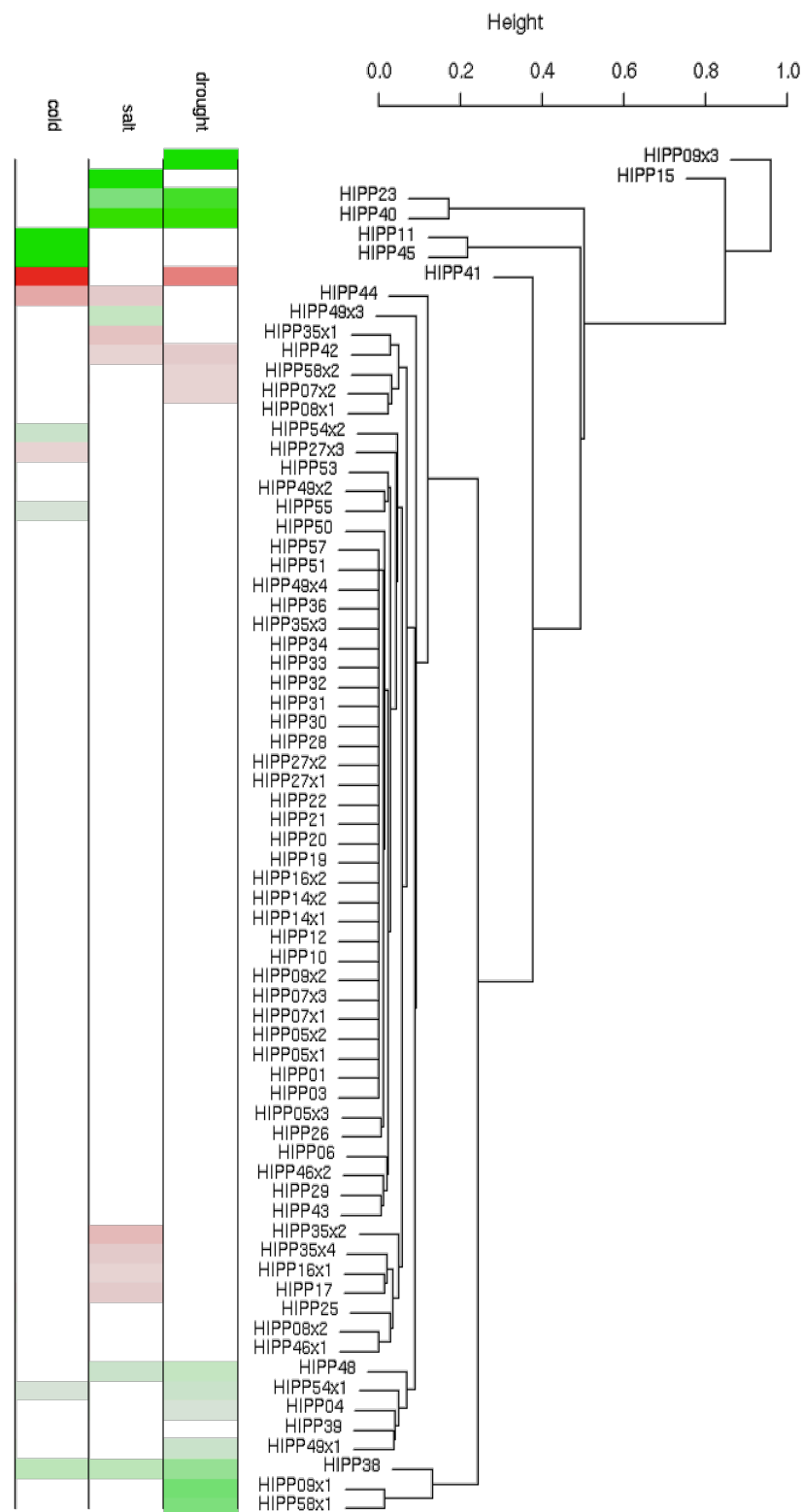


Fig. 17 – Expressão de HIPPs de arroz em resposta à tratamentos de frio (*cold*), sal (*salt*) e seca (*drought*). Heat map mostrando mudanças de expressão significantes ( $p > 0.05$ ) de genes HIPP em microarranjo. Sondas com diferença não significantes estão em branco, entre amostras controle e tratadas reprimidas em verde e induzidas em vermelho. Cladograma à direita representa o agrupamento das sondas analisadas por similaridade de perfil de expressão.

## Resposta a estresses abióticos

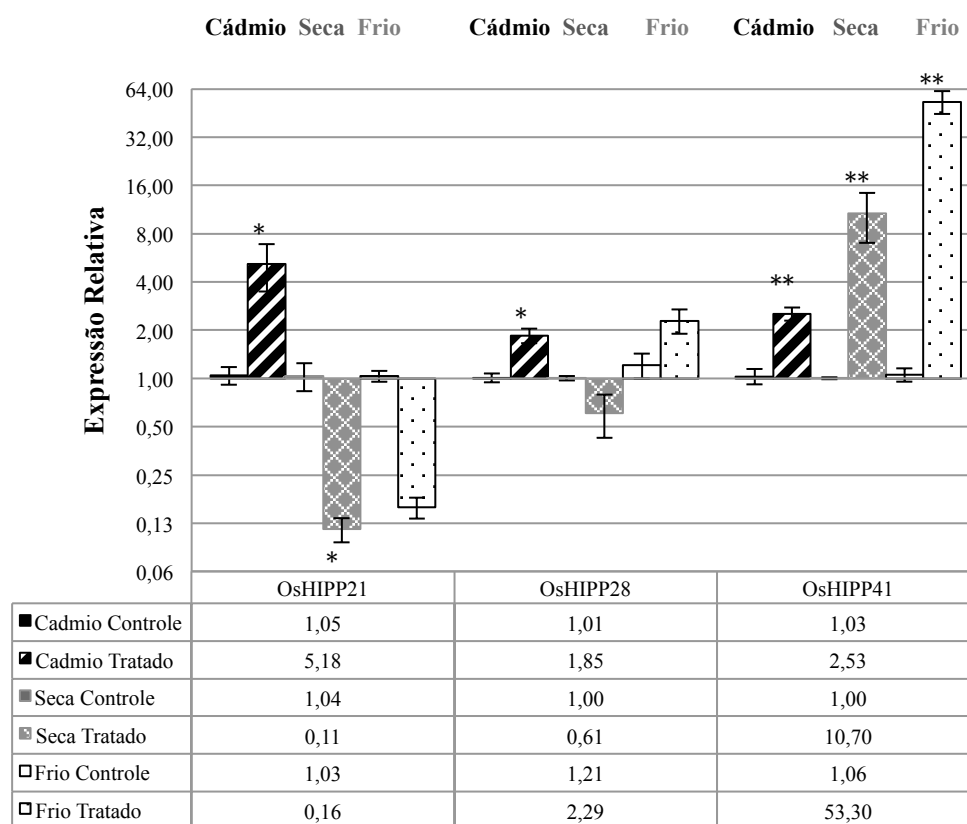


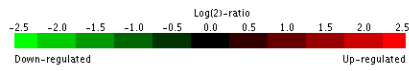
Fig. 18 – Resposta de *OsHIPP21*, *OsHIPP28* e *OsHIPP41* em plântulas de arroz submetidas a diversos tratamentos: Cádmiio (exposição de 24 h com  $\text{CdCl}_2$  60  $\mu\text{M}$ - barras pretas); seca (15 dias - rachurado) e frio ( $4^\circ\text{C}$ / 24 h – colunas brancas). Resultados de RTqPCR mostrando a expressão relativa de cada gene normalizada pela expressão de três genes controles. Valores apresentados na tabela. Diferenças significantes entre plantas tratadas e seus controles são representadas por \*( $P < 0.05$ ) e \*\* ( $P < 0.01$ ).

### Expressão de genes HIPP em resposta a patógenos

Análises de dados de microarranjo também mostraram que alguns genes de HIPPs têm sua transcrição alterada pela presença de diferentes agentes patogênicos. Os genes *AtHIPP13*, *AtHIPP14*, *OsHIPP04* e *OsHIPP09* foram altamente induzidos em tais condições (Fig. 19 e 20).



Fig. 19 – Perfil de expressão de HPPs em plantas de *A. thaliana* expostas a diferentes organismos patogênicos. Adaptado de Genevestigator 4.0



*Oryza sativa* (591)

▼ Biotic



Fig. 20 – Perfil de expressão dos genes HIPPs em plantas de arroz expostas a diferentes organismos patogênicos. Adaptado de Genevestigator 4.0

## Localização subcelular

Para a determinação da localização subcelular das proteínas codificadas pelos genes HIPPs foram utilizadas duas abordagens distintas, uma *in silico* outra *in vivo*. Para verificar a localização *in vivo*, proteínas fusionadas a RFP foram expressas e observadas em protoplastos de arroz. OsHIPP21 e OsHIPP41 foram escolhidas para essa análise. Ambas as proteínas estão presentes nos órgãos usados na preparação de protoplastos (porção aérea de plântulas de duas semanas de idade), porém mostram padrões de expressão contrastantes em resposta a estresses abióticos (Fig. 18). Construções de fusão aminoterminal foram selecionadas, pois trabalhos anteriores (Barth *et al.*, 2004, 2009; Suzuki *et al.*, 2002) demonstraram que a isoprenilação influencia a distribuição de proteínas HIPP dentro de compartimentos celulares.

Em protoplastos transformados, as proteínas fusionadas foram observadas no citosol e no núcleo da célula, mostrando que estas são proteínas solúveis não ligadas a membranas celulares por suas “âncoras hidrofóbicas” (Fig. 21).

Na abordagem *in silico*, três programas distintos de predição foram utilizados para inferir a localização subcelular de proteínas HIPP de arroz e Arabidopsis. Porém na maioria das proteínas avaliadas, as predições dada pelos programas não chegaram a um consenso (Tabela 3.b e .c). O resultado observado *in vivo* concordou melhor com as previsões do programa CELLO.

Para confirmar a localização das proteínas recombinantes no núcleo da célula, a marcação de ácidos nucléicos foi feita com DAPI (Fig. 21 G-J). Observamos uma variação na distribuição de proteínas repórteres. Em alguns protoplastos a proteína marcada é abundante no núcleo e quase ausente e outros compartimentos celulares (Fig. 21C, D e E); entretanto, em outras células essa distribuição assimétrica não foi observada (Fig. 21F e G).



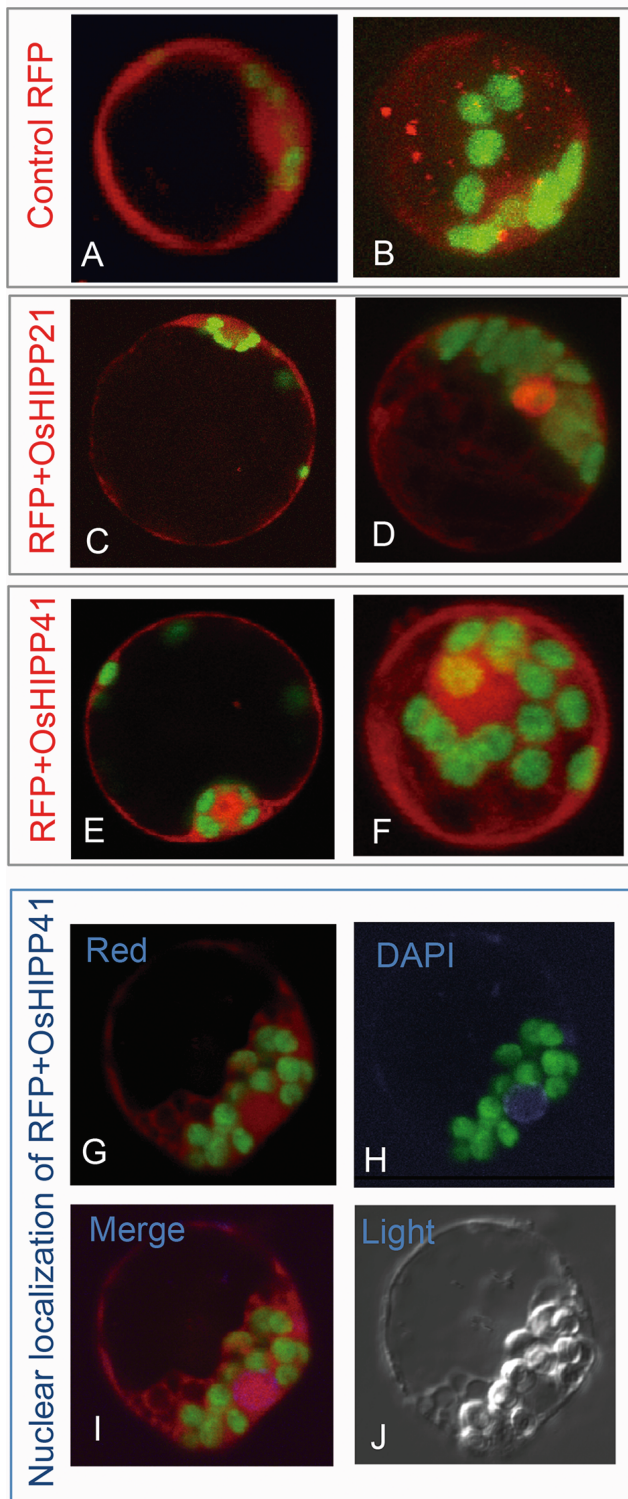


Fig. 21 – Localização subcelular em protoplastos de arroz. Em verde, marcação em cor-falsa, da clorofila enquanto a proteína repórter é mostrada em vermelho. A e B- Protoplastos expressando somente RFP (controle positivo da transformação); C e D) – expressando RFP+OsHIPP21; E – K) - RFP+OsHIPP41 . H e I) marcação do núcleo com DAPI em azul . A – F cada imagem mostra uma célula de uma transformação independente. H – J mostra o mesmo protoplasto sob diferentes filtros. K mostra uma célula necrótica com seu conteúdo celular extravasando



## DISCUSSÃO

### Expressão de HPPs em diferentes órgãos e fases do desenvolvimento da planta

As diferentes HPPs analisadas mostraram vários padrões de expressão distintos em diferentes órgãos ao longo do desenvolvimento da planta. Dados de microarranjo mostram que muitos genes HPPs são mais expressos em órgãos condutores da planta de arroz, como o caule (*OsHIPP01, 08, 17, 26, 36 e 54*) e a raiz (*OsHIPP13, 39, 48 e 51*) (Fig. 13 e 14).

Os diferentes padrões de expressão observados pelas análises de dados de microarranjo estão de acordo com o descrito em trabalhos anteriores que utilizaram técnicas diferentes de análise: RT-PCR, RT-qPCR, Northern e expressão do gene repórter GUS com regiões promotoras de genes HIPP. Nesses trabalhos foi possível observar a expressão pontual em células do sistema vascular das plantas, o que está de acordo com a função descrita destas proteínas no transporte de metais (Barth *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2002; Tehseen *et al.*, 2010).

No transporte de metais são encontrados muitos casos de famílias gênicas que apresentam membros com expressão em tecidos específicos da planta e são essenciais para a distribuição destes íons pela planta. Por exemplo, na família de transportadores HM-ATPase existem diversas proteínas chave desta regulação: OsHMA3 é uma proteína presente no vacúolo de células da raiz e é responsável pelo aprisionamento de  $Cd^{+2}$  nestas células impedindo que esse metal circule pela planta, enquanto AtHMA4 é uma proteína envolvida no transporte de Cd e Zn das células da raiz para o xilema planta. Desta forma, graus diferentes de expressão destes parálogos afetam diretamente a tolerância da planta a Cd e acúmulo deste metal em folhas e grãos (Uraguchi e Fujiwara, 2012).

### Participação de HPPs na resposta a metal pesado

O conhecimento dos mecanismos de regulação do transporte e armazenamento de metais pesados é de grande importância devido às consequências que esses metais geram nas plantas e em humanos. No presente estudo, identificamos em arroz três novas proteínas que podem estar envolvidas nestes processos por serem induzidas por Cd, um dos metais mais perigosos para esta cultura. Os genes *OsHIPP21, OsHIPP28 e OsHIPP41* foram induzidos em graus diferentes pelo excesso de Cd, cinco, duas e 2,5 vezes (Fig. 16).

A transcrição de muitas HIPPs se encontra alterada em plantas submetidas a estresses por excesso de metais pesados, o que indica a participação dessas proteínas na homeostase destes elementos, porém genes diferentes apresentam respostas únicas para cada um desses metais. Foi demonstrado que, por exemplo, que a transcrição de *AtHIPP06* é induzida por Cd, Hg, Fe e Cu, enquanto *AtHIPP26* responde a Cd e Zn, mas não a Fe ou Cu (Gao *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2002).

Estudos anteriores mostraram que proteínas da família HIPP estão diretamente envolvidas com a homeostase de metais pesados. O trabalho que descreveu essas proteínas pela primeira vez (Dykema *et al.* 1999), demonstrou que elas eram capazes de ligar-se a  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$ . Outros estudos mostraram *in vitro* que HIPPs também podem se ligar a  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$  e  $\text{Pb}^{+2}$  (pelo motivo CXXC do domínio HMA), porém sem se ligar a outros íons dicatiônicos como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  ou  $\text{Co}^{+2}$  (Gao *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2002).

O papel dessas proteínas em mecanismos de detoxificação e homeostase de metais pesados foi demonstrado por diversos trabalhos independentes. A superexpressão de *AtHIPP06* e *AtHIPP26* em plantas transgênicas conferiu maior tolerância a Cd. Por outro lado, mutantes triplo nocautes *AtHIPP20/21/22* são mais sensíveis a Cd que plantas selvagens (Gao *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2002; Tehseen *et al.*, 2010).

Tal capacidade também foi testada com métodos de expressão heteróloga em levedura: a expressão de *AtHIPP06* aumentou a tolerância de leveduras WT a Cd (Suzuki, KoizumieSano, 2001), enquanto *AtHIPP20*, *AtHIPP22*, *AtHIPP26* e *AtHIPP27* foram capazes de conferir tolerância em leveduras hipersensíveis a Cd (mutantes *ycf1*). Interessantemente, resultados similares não foram observados ao testar esses genes para a tolerância a  $\text{Cu}^{2+}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$ , o que sugere que essas proteínas atuam especificamente na homeostase de cádmio (Tehseen *et al.*, 2010).

A hipótese mais aceita para explicar a ação das HIPPs na homeostase de cádmio é que essas proteínas protejam a planta ao capturar  $\text{Cd}^{2+}$  que esteja livre no citosol, assim impedindo que esse íon se ligue a alguma proteína essencial à célula (Suzuki *et al.*, 2002; Tehseen *et al.*, 2010). Diferente de outros íons metálicos, cádmio não é um elemento necessário para o crescimento da maioria das plantas e animais, mesmo contendo propriedades físicas muito similares ao zinco. A toxicidade do Cd é uma consequência direta dessa similaridade química com outros íons divalentes como  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (Clemens, 2006). Acredita-se que tal similaridade permita que os íons de Cd substituam íons

essenciais e, dessa forma, interferiram em processos dependentes de cálcio ou zinco, incluindo os processos de proteção contra estresse oxidativo (Clemens, 2006; Villiers *et al.*, 2011). Em leveduras, foi demonstrado que a toxidez por  $Cd^{2+}$  ocorre quando  $Cd^{2+}$  substitui  $Cu^+$  no domínio HMA de ATX1 e é transportado para o complexo de Golgi, onde acabará por ligar-se a sítios de ligação a Cu de outras proteínas (Heo *et al.*, 2012).

### **HIPPs expressos na resposta ao Frio e Seca**

Entre as condições em que a expressão de genes HIPP foi avaliada, estão alguns estresses climáticos como a seca e o frio. Dados de microarranjo mostram que a maioria dos genes dessa família não responde a estas condições em arroz. Entretanto, alguns genes, especialmente *OsHIPP41*, mostraram-se induzidos por estes estresses (Fig. 17). Análises por RT-qPCR confirmaram que este gene, realmente é altamente expresso em resposta ao frio e à seca, cerca de 50 e 10 vezes, respectivamente (Fig 18). *OsHIPP41* possui 61.6% de identidade de sequência com a sequência codante de *AtHIPP26*, um gene induzido nestas mesmas condições e descrito por Barth *et al.* (2009) como parte de um elaborado mecanismo de regulação da transcrição de genes de resposta a estresses hídricos.

Foi demonstrado que ocorre a interação direta entre o domínio HMA de *AtHIPP26* e um domínio dedo-de-zinco (*zinc-finger homeodomain*) de *AtHB29*, um fator de transcrição relacionado com a resposta à seca. Ao analisar mutantes nocautes para *AtHIPP26* foi possível confirmar esta interação, pois genes já descritos como regulados por *AtHB29* tiveram sua transcrição alterada neste mutante (Barth *et al.*, 2009).

Além disto, ensaios de duplo híbrido de levedura mostraram que outras proteínas deste mesmo cluster (*AtHIPP20*, *21*, *22*, *23*, *24*, *27* e *30*) também foram capazes de interagir com este fator de transcrição, indicando que outras HIPPs também podem desempenhar uma função similar na regulação transcricional (Barth *et al.*, 2009).

Um mecanismo similar de interação entre uma metalochaperona e um fator de transcrição foi previamente descrito na bactéria *Enterococcus hirae*, onde  $Cu^+$  transportado pela metalochaperona CopZ desloca o íon  $Zn^{+2}$  do domínio dedo-de-zinco do repressor CopY.  $Zn^{+2}$  é essencial para a ligação da proteína CopY ao DNA e sem esse íon, CopY libera a região promotora do operon cop, permitindo que ocorra a transcrição desse operon (Barth *et al.*, 2009; Cobine *et al.*, 2002).

Em sua tese (Barth, Humbeck e Wirén, 2011), Olaf Barth ressalva que AtHB29 age como indutor e não repressor da expressão de genes, e portanto o papel de AtHIPP26 seria o de entregar o íon  $Zn^{+2}$  para AtHB29 de forma que esta proteína possa se ligar ao DNA e induzir a transcrição de genes de resposta à desidratação. O modelo elaborado por esse autor parte da AtHIPP26 ancorada à membrana plasmática, fato descrito por outro grupo de pesquisa (Gao *et al.*, 2009), associando-se ao  $Zn^{+2}$  e carregando este íon até o núcleo da célula. No núcleo, AtHIPP26 se associa com os fatores de transcrição AtHB29 e AtHB32 transferindo  $Zn^{+2}$  para estas proteínas, que se tornam ativas e desta forma se associando ao DNA, promovendo a transcrição de genes alvo (Fig. 22).

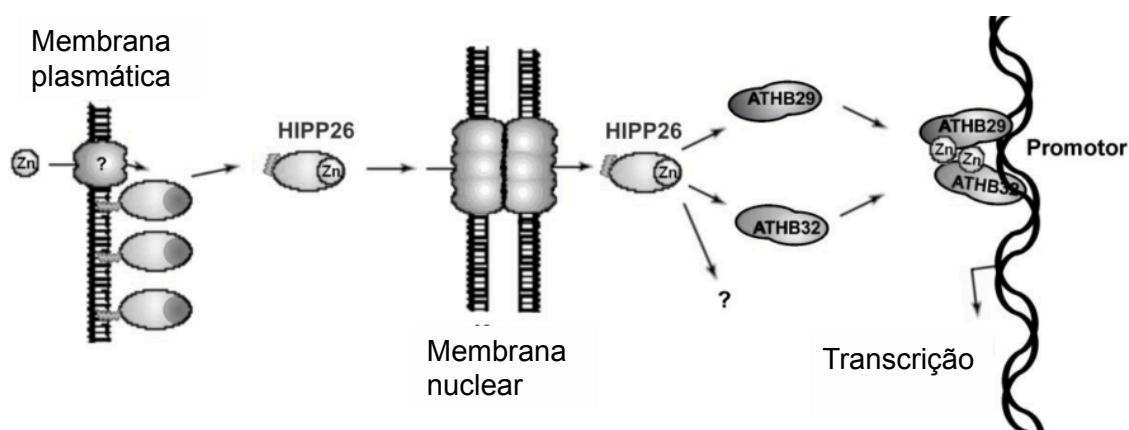


Fig. 22 – Modo de ação de AtHIPP26, captando  $Zn^{2+}$  ao entrar na célula e o levando até o núcleo, onde o íon é transferido para AtHB29, permitindo que esse fator de transcrição se ligue à região promotora de genes de resposta à desidratação (fonte: Barth *et al.*, 2011)

### Participação de HIPPs na interação planta-patógeno

Ao analisar a expressão de genes HIPP em plantas submetidas a diferentes agentes patogênicos foi observado que muitos genes foram induzidos ou reprimidos nestas condições (Fig. 19 e 20). Por se tratar de plantas sob estresse, pode-se esperar que muitos mecanismos de defesa estejam ativados enquanto mecanismos envolvidos no crescimento do organismo e no armazenamento de nutrientes estejam reprimidos, já que os recursos da planta estão voltados à defesa contra este patógeno. Entretanto, algumas proteínas HIPPs podem estar envolvidas diretamente na interação planta-patógeno devido ao seu papel no transporte de metais.

Desde muitos anos, o cobre vem sendo usado como um importante componente de muitos pesticidas químicos e antibióticos com atividade antimicrobiana comprovada. Esta atividade antibiótica faz com que o Cu seja um elemento essencial na batalha entre plantas e patógenos (Tian *et al.*, 2012).

Um exemplo do seu papel é encontrado na interação entre o arroz e *Xanthomonas oryzae pv oryzae* (Xoo), o agente responsável pela doença da queima bacteriana. Xoo é sensível a Cu, entretanto a bactéria secreta um efector capaz de ativar no arroz a transcrição do gene de suscetibilidade *Xa13*. Essa proteína (Xa13) junto com os transportadores de cobre COPT1 e COPT5 promove a remoção do Cu dos vasos do xilema da planta infectada, facilitando a difusão do patógeno pelos vasos condutores do indivíduo. Entretanto, plantas que contém alelos recessivos de *Xa13*, que codifica uma variante mutada dessa proteína, são mais resistentes a infecção por Xoo (Yuan *et al.*, 2010).

Ao catalogar as proteínas HPPs de arroz, identificamos uma proteína previamente descrita como elemento chave na interação entre a planta e um fungo patogênico. OsHIPP05/Pi21 (Fig. 9) foi descrita como um fator de suscetibilidade a infecções fungicas, envolvido no retardo da respostas de defesa da planta a um patógeno específico. Pi21 é uma forma alélica de OsHIPP05 que apresenta a deleção de seus PRMs (motivos ricos em prolina) e confere resistência durável à doença da ferrugem do arroz (Fukuoka *et al.*, 2009). Recentemente, foi descrito que a forma selvagem desse gene facilita a movimentação da hifa de infecção de *Magnaporthe oryzae* em células do mesófilo do hospedeiro. Além disso, foi demonstrado que hifas de *M. oryzae* são capazes de crescer em *Arabidopsis* (uma planta não-hospedeira, ou seja, naturalmente resistente a esse fungo) quando a planta superexpressa OsHIPP05, indicando claramente que essa proteína (com seus PRMs intactos) é essencial para a infecção fúngica (Nakao *et al.*, 2011).

Domínios proteicos PRMs estão frequentemente descritos como importantes para rotas de sinalização. Regiões ricas em prolina, como as observadas na maioria das HPPs (Fig. 7), tendem a adotar estrutura secundária denominada de hélice de poliprolina (Fig. 10B). Esta estrutura forma bolsões hidrofóbicos e hidrofílicos na superfície da proteína que permitem a interação desta com diferentes proteínas e outros elementos (Freund *et al.*, 2008; Kay, Williamson e Sudol, 2000).

### **HIPPs citosólicas solúveis**

No presente estudo, usamos um sistema homólogo (protoplastos de arroz) para expressar proteínas de arroz marcadas com RFP. Os protoplastos foram obtidos de tecidos onde essas proteínas eram naturalmente expressas e, portanto, onde proteínas que naturalmente se associassem com a HIPP estariam presentes. A proteína OsHIPP41, que tem uma composição e padrão de expressão similar à proteína AtHIPP26, que foi descrita como exclusivamente nuclear, foi visualizada tanto no núcleo quanto no citosol. A mesma distribuição foi observada com OsHIPP21.

Trabalhos anteriores utilizaram sistemas heterólogos para expressar proteínas de fusão com repórteres fluorescentes (GFP ou RFP) e detectaram proteínas HIPPs no citosol associadas a membranas (Gao *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2002) ou exclusivamente dentro do núcleo da célula (Barth *et al.*, 2004, 2009). Portanto, OsHIPP21 e OsHIPP41 são as primeiras proteínas dessa família a serem observadas livres no citosol, o que é evidenciado ao analisar a imagem de uma célula morrendo e extravasando seu conteúdo celular, onde pode ser observada a proteína RFP+HIPP41 espalhada junto com restos celulares (Fig. 21K).

Porém outro fator a ser considerado é que protoplastos são células vegetais que sofreram do estresse da digestão da sua parede celular. Trabalhos anteriores, apesar de usarem sistemas heterólogos para analisar as proteínas HIPPs (células BY2 de tabaco, epiderme de cebola e de tabaco), utilizaram células que possuíam a parede celular intacta, fato que pode influenciar a interação de HIPPs com diferentes componentes celulares.

Embora metalochaperonas geralmente sejam descritas como proteínas citosólicas, algumas desempenham funções que requerem que elas estejam em compartimentos celulares específicos. Por exemplo, Cox17, a metalochaperona responsável em entregar Cu para as proteínas da cadeia respiratória, é encontrada no citosol e na mitocôndria (Cobine, Pierrel e Winge, 2006). De forma similar, CCS que entrega Cu para três isoformas de Cu/Zn superóxido dismutase (CSD), cada uma pertencente a um compartimento celular diferente, precisam estar nestes locais: CSD1 no citosol; CSD2 nos cloroplastos, e CSD3 nos peroxisomos (Huang *et al.*, 2012).

Curiosamente observamos uma variação na distribuição destas proteínas, sendo menos abundantes no citosol de algumas células e mais em outras. Entretanto o motivo para tal variação poderia ser atribuído a existência de diferentes tipos celulares utilizados

na preparação dos protoplastos, que, portanto, teriam diferenças de conteúdo e estrutura interna, o que poderia influenciar a distribuição da proteína repórter na célula, inclusive pela quantidade e volume de vacúolos.

Barth e colaboradores (2004 e 2009) identificaram um sinal de localização nuclear novo em diferentes HIPPs do cluster II (AtHIPP26 e HvFP1), este sinal foi identificado primeiro pela observação da translocação da proteína e depois na análise da sequência de peptídios, presente na extremidade N terminal da proteína, antes do domínio HMA. Ao analisar a estrutura das proteínas deste cluster em arábido e arroz, pode-se observar que nestas há uma pequena sequência de aminoácidos antes do HMA, algo que é encontrado em poucas proteínas HIPPs (Fig. 7). Por este motivo, formulamos a hipótese inicial que nesta região estariam conservados sinais de localização nuclear ou outros sinais de direcionamento. Porém, a proteína OshIPP41, que possui essa sequência na extremidade N-terminal, teve o mesmo padrão de localização subcelular que OshIPP21, que pertence ao cluster V e não o possui (Fig 9).

Utilizando de metodologias relativamente simples de análises, foi possível correlacionar proteínas HIPPs com diferentes mecanismos fisiológicos ao longo do desenvolvimento da planta assim como na resposta à diferentes estresses bióticos e abióticos. Tal fato sugere um amplo papel para essa família de proteínas citosólicas.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**



Metalochaperonas são proteínas responsáveis pelo transporte intracelular correto de íons metálicos e possuem reconhecida importância para a homeostase destes elementos potencialmente tóxicos para a célula. Diferentes proteínas recebem a denominação de metalochaperonas: CopZ, Cox17, CSS e ATX1. A proteína ATX1 foi inicialmente descrita em leveduras e posteriormente identificada como presente em todos os organismos eucarióticos. Embora na maioria dos eucariotos se encontre somente um gene que codifique a proteína ATX1, em plantas se identificou um grande número de genes que codificam proteínas similares a ATX1 (Fig. 5 e tabela 2). Devido a falta de informações sobre este grupo de proteínas, sua descrição e análise se tornou um dos objetivos principais do estudo aqui apresentado.

A busca destas proteínas similares a ATX1 em diversos genomas sequenciados em conjunto com análises filogenéticas permitiu a elaboração de um modelo para a evolução desta família de proteínas em plantas. Por processos de duplicação, recombinação e mutação, deve ter surgido, a partir do gene da ATX1, uma nova categoria de proteínas que podem ser descritas como HPP (*Heavy metal associated Plant Proteins*) originadas em um organismo ancestral das plantas terrestres. Estas proteínas são exclusivas de plantas e apresentam como elemento chave um domínio de associação a metais pesados (HMA) semelhante ao de ATX1 (Fig. 8 passo 2). Processos semelhantes criaram nos ancestrais das plantas vasculares um novo ramo desta grande família de proteínas, as HIPPs (*Heavy metal associated Isoprenylated Plant Proteins*) (Fig. 8 passos 4 e 5). Embora existam várias proteínas HPP em algumas espécies, a família das HIPPs se sobressaiu em relação a seu grupo de origem tanto em número quanto em variabilidade de estruturas e funções.

Presentes somente em plantas vasculares, as HIPPs se tornaram, em angiospermas, uma família composta geralmente por mais de 40 membros (por exemplo, 45 genes em *A. thaliana* e 74 em *P. trichocarpa*) que podem ser divididos em cinco clusters, de acordo com similaridade de sequência e organização de domínios. Em geral, proteínas HIPPs se organizam em um domínio HMA globular próximo a sua extremidade aminoterminal e um motivo de isoprenilação em sua extremidade carboxi-terminal, intercalados por uma sequência relativamente flexível e composta por diferentes elementos descritos como envolvidos na interação entre diferentes proteínas (Fig. 9). Dos cinco tipos de HIPP dois se destacam por apresentar estruturas diferenciadas. Proteínas agrupadas no cluster I apresentam um segundo domínio HMA, enquanto proteínas do cluster III são maiores que

as demais devido a adição de um número maior de domínios ricos em glicina na região entre o HMA e o motivo de isoprenilação.

Análises filogenéticas indicam que a diversificação das HIPPs ocorreu em vários momentos da história evolutiva das plantas, contendo proteínas que se diversificaram no período de origem das angiospermas e outras em eventos mais recentes (Fig. 5).

Estudos anteriores descreveram casos de proteínas desta família agindo em mecanismos de homeostase e desintoxicação de metais pesados, especialmente o cádmio, e na regulação da resposta transcricional ao frio e à seca (Barth *et al.*, 2004, 2009; Gao *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2002; Tehseen *et al.*, 2010). Ao analisar o padrão de expressão dos diferentes genes HIPPs de *A. thaliana* e *O. sativa*, identificamos genes que são transcritos em diferentes momentos e tecidos ao longo do desenvolvimento da planta, o que vai de acordo com os princípios de neofuncionalização e subfuncionalização de novos genes dentro de famílias gênicas.

Muitos genes HIPPs se mostraram responsivos a diferentes fatores ambientais, em especial a estresses abióticos e bióticos. Análises de dados de microarranjo e de RTqPCR foram úteis para a identificação de três genes de arroz que são induzidos por cádmio, um metal de grande importância no cultivo desta planta. Estes genes *OsHIPP21*, *OsHIPP28* e *OsHIPP41* curiosamente pertencem a clusters diferentes de HIPPs (V, I e II, respectivamente) (Fig. 9). Algumas proteínas HIPPs já estudadas se mostraram em estudos independentes como capazes de conferir maior tolerância a Cd para a planta (Suzuki *et al.*, 2002; Tehseen *et al.*, 2010).

Em especial, *OsHIPP41* corresponde ao gene HIPP mais induzido por estresses de seca e frio. O aumento drástico de expressão em plantas submetidas a baixas temperaturas (50x) aponta para uma grande correlação entre esta proteína e a resposta da planta a tais condições (Fig. 18). A proteína AtHIPP26, assim como outras proteínas do cluster II de arabidopsis são capazes de interagir com AtHB29, um fator de transcrição dedo-de-zinco envolvido na regulação de genes de resposta a seca (Barth *et al.*, 2009).

Dois estudos independentes descreveram a proteína AtHIPP26. O primeiro a identificou como uma proteína exclusivamente nuclear (Barth *et al.*, 2009), enquanto outro a localizou associada a membranas biológicas (Tehseen *et al.*, 2009). Esta dúvida localização, mais que um erro metodológico, pode refletir dois estados diferentes desta

proteína, um estado em que a proteína está associada à membrana plasmática e outro em que está associada a um complexo de proteínas nucleares.

Ao realizar ensaio de localização subcelular das proteínas OsHIPP21 e OsHIPP41 fusionadas a proteína fluorescente vermelha (RFP) em protoplastos de arroz encontramos, além do núcleo, HIPPs em uma terceira localização, livre no citoplasma das células vegetais (Fig. 21).

Ao catalogar as proteínas HIPPs de arroz, identificamos uma proteína já descrita como essencial na interação entre a planta e o fungo *Magnaporthe oryzae*, OsHIPP05/Pi21. Embora a transcrição deste gene não tenha se destacado em análise de dados de microarranjo, esta análise indica que muitos outros genes são possíveis candidatos para estudo por se mostrarem modulados diferencialmente em diferentes linhagens (cultivares) de plantas e em resposta a diferentes patógenos (Fig. 19 e 20).

Ao identificar e caracterizar HIPPs de diferentes plantas, verificamos que a importância destas proteínas vai muito além do descrito inicialmente, como mecanismo de desintoxicação de metais pesados. HIPPs podem agir nas mais diferentes rotas metabólicas e de sinalização ao fornecer íons metálicos essenciais para o funcionamento de outras proteínas e devido a sua grande diversidade, é possível que haja nas células vegetais muitos casos de regulação pela interação entre uma HIPP e sua proteína alvo. Deste modo, assim como descrito para AtHIPP26, uma proteína HIPP pode regular a ativação desta proteína, que só passaria a desempenhar sua função ao receber o cofator metálico correto.

A partir do objetivo de sistematizar e organizar as informações disponíveis sobre estas proteínas, desde sua origem até suas funções específicas, identificamos várias HIPPs que podem ser de importância para futuras aplicações biotecnológicas. Mais estudos serão necessários para desvendar o funcionamento das HIPPs caso a caso, mas o presente trabalho pode representar um importante passo no conhecimento desta família de genes que podem estar envolvidos em vários mecanismos chave da célula vegetal.

## REFERÊNCIAS

AKHUNOV, E. D. *et al.* Comparative analysis of syntenic genes in grass genomes reveals accelerated rates of gene structure and coding sequence evolution in polyploid wheat. **Plant physiology**, v. 161, n. 1, p. 252-65, jan. 2013.

ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 5 out. 1990.

ANDRE, N. *et al.* Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. **Sciences-New York**, v. 354, p. 385-390, 2007.

BADARAU, A.; DENNISON, C. Copper trafficking mechanism of CXXC-containing domains: insight from the pH-dependence of their Cu(I) affinities. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 9, p. 2983-8, 9 mar. 2011.

BAIER, A. C.; SOMERS, D. J.; GUSIAFSON, J. P. Aluminium tolerance in wheat: correlating hydroponic evaluations with field and soil performances\*. **Plant Breeding**, v. 114, n. 4, p. 291-296, 1995.

BAILEY, T. L. *et al.* MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. **Nucleic acids research**, v. 37, n. Web Server issue, p. W202-8, 1 jul. 2009.

BARTH, O. *et al.* Isolation of a novel barley cDNA encoding a nuclear protein involved in stress response and leaf senescence. **Physiologia Plantarum**, p. 282-293, 2004.

BARTH, O. *et al.* Stress induced and nuclear localized HIP26 from *Arabidopsis thaliana* interacts via its heavy metal associated domain with the drought stress related zinc finger transcription factor ATHB29. **Plant molecular biology**, v. 69, n. 1-2, p. 213-26, jan. 2009.

BARTH, O.; HUMBECK, P. K.; WIRÉN, P. N. VON. **Studien zu putativen Kältestress-relevanten Schwermetallchaperonen in *Hordeum vulgare* L. und *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH.** [s.l.] Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2011.

BASHIR, K. *et al.* The road to micronutrient biofortification of rice: progress and prospects. **Frontiers in plant science**, v. 4, n. February, p. 15, jan. 2013.

BERTINI, I.; CAVALLARO, G.; MCGREEVY, K. S. Cellular copper management—a draft user's guide. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, n. 5-6, p. 506-524, mar. 2010.

CHANDRAN, D. *et al.* Transcriptome profiling identified novel genes associated with aluminum toxicity, resistance and tolerance in *Medicago truncatula*. **Planta**, v. 228, n. 1, p. 151-66, jun. 2008.

- CHEN, F.; THOLL, D. The family of terpene synthases in plants : a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. p. 212-229, 2011.
- CLEMENS, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1707-19, nov. 2006.
- CLEMENS, S. *et al.* Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. **Trends in plant science**, v. 18, n. 2, p. 92-9, fev. 2013.
- COBINE, P. A *et al.* Copper transfer from the Cu(I) chaperone, CopZ, to the repressor, Zn(II)CopY: metal coordination environments and protein interactions. **Biochemistry**, v. 41, n. 18, p. 5822-9, 7 maio. 2002.
- COBINE, P. A.; PIERREL, F.; WINGE, D. R. Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 7, p. 759-772, jul. 2006.
- CROWELL, D. N. Functional implications of protein isoprenylation in plants. **Progress in lipid research**, v. 39, n. 5, p. 393-408, set. 2000.
- CULOTTA, V. C.; LUK, E. Chaperones for Metalloproteins. *In: LENNARZ, W. J. et al.* (Eds.). **Encyclopedia of Biological Chemistry**,. [s.l.] Elsevier Science & Technology Books, 2004. v. 1p. 383-386.
- DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC evolutionary biology**, v. 7, p. 214, jan. 2007.
- DUPONT, C. L. *et al.* History of biological metal utilization inferred through phylogenomic analysis of protein structures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 23, p. 10567-72, 8 jun. 2010.
- DYKEMA, P. E. *et al.* A new class of proteins capable of binding transition metals. **Plant molecular biology**, v. 41, n. 1, p. 139-50, set. 1999.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792-7, jan. 2004.
- EMANUELSSON, O. *et al.* Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **Journal of molecular biology**, v. 300, n. 4, p. 1005-16, 21 jul. 2000.
- FESTA, R. A; THIELE, D. J. Copper: an essential metal in biology. **Current biology : CB**, v. 21, n. 21, p. R877-83, 8 nov. 2011.
- FREUND, C. *et al.* Proline-rich sequence recognition domains (PRD): ligands, function and inhibition. **Handbook of experimental pharmacology**, n. 186, p. 407-29, jan. 2008.

FUKUOKA, S. *et al.* Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. **Science (New York, N.Y.)**, v. 325, n. 5943, p. 998-1001, 21 ago. 2009.

GAO, W. *et al.* Arabidopsis thaliana acyl-CoA-binding protein ACBP2 interacts with heavy-metal-binding farnesylated protein AtFP6. **The New phytologist**, v. 181, n. 1, p. 89-102, jan. 2009.

GAUTAM, N.; VERMA, P. K. Genome-wide identification of rice class I metallothionein gene : tissue expression patterns and induction in response to heavy metal stress. 2012.

GUO, Y.-L. Gene family evolution in green plants with emphasis on the origination and evolution of Arabidopsis thaliana genes. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v.73, p.941-951, 2013.

HEO, D.-H. *et al.* Cd<sup>2+</sup> binds to Atx1 and affects the physical interaction between Atx1 and Ccc2 in Saccharomyces cerevisiae. **Biotechnology letters**, v. 34, n. 2, p. 303-7, fev. 2012.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, T.; MARTÍNEZ-CASTILLA, L. P.; ALVAREZ-BUYLLA, E. R. Functional diversification of B MADS-box homeotic regulators of flower development: Adaptive evolution in protein-protein interaction domains after major gene duplication events. **Molecular biology and evolution**, v. 24, n. 2, p. 465-81, fev. 2007.

HONDA, R. *et al.* Cadmium induced renal dysfunction among residents of rice farming area downstream from a zinc-mineralized belt in Thailand. **Toxicology letters**, v. 198, n. 1, p. 26-32, 15 set. 2010.

HOSSAIN, M. A. *et al.* Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants : Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. v. 2012, n. Cd, 2012.

HRUZ, T. *et al.* Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. **Advances in bioinformatics**, v. 2008, p. 420747, jan. 2008.

HUANG, C.-H. *et al.* Copper chaperone-dependent and -independent activation of three copper-zinc superoxide dismutase homologs localized in different cellular compartments in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 158, n. 2, p. 737-46, fev. 2012.

HUFFMAN, D. L.; HALLORAN, T. V. O. Function, Structure and Mechanism of Intracellular Trafficking Proteins. **Annual review of biochemistry**, v. 70, p. 677-701, 2001.

INABA, T. *et al.* Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease. **Toxicology letters**, v. 159, n. 2, p. 192-201, 15 nov. 2005.

INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v. 436, n. 7052, p. 793-800, 11 ago. 2005.

JIANG, Y. *et al.* Rice functional genomics research: progress and implications for crop genetic improvement. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 5, p. 1059-70, 2012.

KARIMI, M.; DEPICKER, A.; HILSON, P. Recombinational cloning with plant gateway vectors. **Plant physiology**, v. 145, n. 4, p. 1144-54, dez. 2007.

KAY, B.; WILLIAMSON, M.; SUDOL, M. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. **The FASEB Journal**, v. 14, p. 231-241, 2000.

KERSTING, A. R. *et al.* Dynamics and adaptive benefits of protein domain emergence and arrangements during plant genome evolution. **Genome biology and evolution**, v. 4, n. 3, p. 316-329, 14 mar. 2012.

KLIEBENSTEIN, D. J. A role for gene duplication and natural variation of gene expression in the evolution of metabolism. **PloS one**, v. 3, n. 3, p. e1838, jan. 2008.

KONDRASHOV, F. A. Gene duplication as a mechanism of genomic adaptation to a changing environment. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 279, n. 1749, p. 5048-57, 22 dez. 2012.

LAZZAROTTO, F. *et al.* Ascorbate peroxidase-related (APx-R) is a new heme-containing protein functionally associated with ascorbate peroxidase but evolutionarily divergent. **The New phytologist**, v. 191, n. 1, p. 234-50, jul. 2011.

LIN, S. J.; CULOTTA, V. C. The ATX1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 9, p. 3784-8, 25 abr. 1995.

LIN, Y.-F.; AARTS, M. G. M. The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 69, n. 19, p. 3187-206, out. 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402-8, dez. 2001.

MAURER-STROH, S.; EISENHABER, F. Refinement and prediction of protein prenylation motifs. **Genome biology**, v. 6, n. 6, p. R55, jan. 2005.

MIGEON, A. *et al.* Genome-wide analysis of plant metal transporters, with an emphasis on poplar. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 67, n. 22, p. 3763-84, nov. 2010.

MIRA, H. *et al.* Functional and conformational properties of the exclusive C-domain from the *Arabidopsis* copper chaperone (CCH). **The Biochemical journal**, v. 357, n. Pt 2, p. 545-9, 15 jul. 2001.

MIRA, H.; MARTÍNEZ-GARCÍA, F.; PEÑARRUBIA, L. Evidence for the plant-specific intercellular transport of the Arabidopsis copper chaperone CCH. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 25, n. 5, p. 521-8, mar. 2001.

MIRAS, R. *et al.* Interplay between glutathione, Atx1 and copper. 1. Copper(I) glutathionate induced dimerization of Atx1. **Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 195-205, fev. 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAKAO, M. *et al.* Non-host resistance to penetration and hyphal growth of *Magnaporthe oryzae* in Arabidopsis. **Scientific reports**, v. 1, p. 171, jan. 2011.

NEVITT, T.; OHRVIK, H.; THIELE, D. J. Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. **Biochimica et biophysica acta**, p. 1-14, 24 fev. 2012.

O'HALLORAN, T. V; CULOTTA, V. C. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 33, p. 25057-60, 18 ago. 2000.

OSORIO, M. B. *et al.* Identification and in silico characterization of soybean trihelix-GT and bHLH transcription factors involved in stress responses. **Genetics and molecular biology**, v. 35, n. 1 (suppl), p. 233-46, jun. 2012.

PALMER, C. M.; GUERINOT, M. LOU. Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. **Nature chemical biology**, v. 5, n. 5, p. 333-40, maio. 2009.

PATERSON, A. H. *et al.* Comparative genomics of grasses promises a bountiful harvest. **Plant physiology**, v. 149, n. 1, p. 125-31, jan. 2009.

PETSALAKI, E. I. *et al.* PredSL: a tool for the N-terminal sequence-based prediction of protein subcellular localization. **Genomics, proteomics & bioinformatics / Beijing Genomics Institute**, v. 4, n. 1, p. 48-55, fev. 2006.

PIRES, N. D.; DOLAN, L. Morphological evolution in land plants: new designs with old genes. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 367, n. 1588, p. 508-18, 19 fev. 2012.

PUIG, S.; PEÑARRUBIA, L. Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 3, p. 299-306, jun. 2009.

ROBINSON, N. J.; WINGE, D. R. Copper metallochaperones. **Annual review of biochemistry**, v. 79, p. 537-62, jan. 2010.

ROSA, S. B. *et al.* Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice. **Phytochemistry**, v. 71, n. 5-6, p. 548-58, abr. 2010.



RUBINO, J. T.; FRANZ, K. J. Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 107, n. 1, p. 129-43, fev. 2012.

SACHETTO-MARTINS, G.; FRANCO, L. O.; OLIVEIRA, D. E. DE. Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? **Biochimica et biophysica acta**, v. 1492, n. 1, p. 1-14, 21 jun. 2000.

SATO, Y. *et al.* RiceXPro: a platform for monitoring gene expression in japonica rice grown under natural field conditions. **Nucleic acids research**, v. 39, n. Database issue, p. D1141-8, jan. 2011.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, jun. 2008.

SCHRÖDINGER, E. **What is life? The physical aspect of the living cell.** [s.l.] Cambridge University Press, 1944. p. viii, 91 p.

SHAN, H. *et al.* Evolution of plant MADS box transcription factors: evidence for shifts in selection associated with early angiosperm diversification and concerted gene duplications. **Molecular biology and evolution**, v. 26, n. 10, p. 2229-44, out. 2009.

SHIN, L.-J.; LO, J.-C.; YEH, K.-C. Copper chaperone antioxidant protein 1 is essential for copper homeostasis. **Plant physiology**, 3 maio. 2012.

SIDOROV, V. A. *et al.* Chloroplast transfer in *Nicotiana* based on metabolic complementation between irradiated and iodoacetate treated protoplasts. **Planta**, v. 152, n. 4, p. 341-345, 1981.

SMYTH, G. limma: Linear Models for Microarray Data. *In*: GENTLEMAN, R. *et al.* (Eds.). [s.l.] Springer New York, 2005. p. 397-420.

SPEROTTO, R. A. *et al.* Iron biofortification in rice: it's a long way to the top. **Plant science : an international journal of experimental plant biology**, v. 190, p. 24-39, jul. 2012.

SUZUKI, N. *et al.* Functional characterization of a heavy metal binding protein CdI19 from *Arabidopsis*. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 32, n. 2, p. 165-73, out. 2002.

SUZUKI, N.; KOIZUMI, N.; SANO, H. Screening of cadmium-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, n. 11, p. 1177-1188, nov. 2001.

TAKAHASHI, R. *et al.* The OsHMA2 transporter is involved in root-to-shoot translocation of Zn and Cd in rice. **Plant, cell & environment**, p. 1-10, 1 maio. 2012.

TAKEDA, S.; MATSUOKA, M. Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. **Nature reviews. Genetics**, v. 9, n. 6, p. 444-57, jun. 2008.

TAMURA, K. *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 4 maio. 2011.

TAO, L.; CHEUNG, A. Y.; WU, H. Plant Rac-Like GTPases Are Activated by Auxin and Mediate Auxin-Responsive Gene Expression. **Society**, v. 14, n. November, p. 2745-2760, 2002.

TEHSEEN, M. *et al.* Metallochaperone-like genes in Arabidopsis thaliana. **Metalomics**, p. 556-564, 2010.

THAPA, G. *et al.* Molecular mechanistic model of plant heavy metal tolerance. **Biomaterials : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, 6 abr. 2012.

TIAN, W.-X. *et al.* Copper as an antimicrobial agent against opportunistic pathogenic and multidrug resistant Enterobacter bacteria. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 50, n. 4, p. 586-93, ago. 2012.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. *et al.* Evolutionary view of acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase (DGAT), a key enzyme in neutral lipid biosynthesis. **BMC evolutionary biology**, v. 11, n. 1, p. 263, jan. 2011.

URAGUCHI, S.; FUJIWARA, T. Cadmium transport and tolerance in rice: perspectives for reducing grain cadmium accumulation. **Rice**, v. 5, n. 1, p. 5, 2012.

VILLIERS, F. *et al.* Investigating the plant response to cadmium exposure by proteomic and metabolomic approaches. **Proteomics**, v. 11, n. 9, p. 1650-63, maio. 2011.

YANG, Z.; RANNALA, B. Molecular phylogenetics: principles and practice. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. May, 28 mar. 2012.

YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, v. 36, n. 5, p. 409, 2009.

YU, C. *et al.* Prediction of Protein Subcellular Localization. **Amino Acids**, v. 651, n. December 2005, p. 643-651, 2006.

YUAN, M. *et al.* The bacterial pathogen Xanthomonas oryzae overcomes rice defenses by regulating host copper redistribution. **The Plant cell**, v. 22, n. 9, p. 3164-76, set. 2010.

## ANEXO 1

Artigo publicado no periódico FEBS Journal: **Heavy Metal-Associated Isoprenylated Plant Protein (HIPP): Characterization of a family of proteins exclusive to plants**

## Heavy metal-associated isoprenylated plant protein (HIPP): characterization of a family of proteins exclusive to plants

João Braga de Abreu-Neto<sup>1</sup>, Andreia C. Turchetto-Zolet<sup>2</sup>, Luiz Felipe Valter de Oliveira<sup>2</sup>, Maria Helena Bodanese Zanettini<sup>2</sup> and Marcia Margis-Pinheiro<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

### Keywords

abiotic stress; heavy metal homeostasis; HIPP; isoprenylated proteins; metallochaperone

### Correspondence

M. Margis-Pinheiro, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil  
Fax: +55 51 3308 7311  
Tel: +55 51 3308 9814  
E-mail: marcia.margis@ufrgs.br

(Received 27 July 2012, revised 15 December 2012, accepted 29 January 2013)

doi:10.1111/febs.12159

Metallochaperones are key proteins for the safe transport of metallic ions inside the cell. HIPPs (heavy metal-associated isoprenylated plant proteins) are metallochaperones that contain a metal binding domain (HMA) and a C-terminal isoprenylation motif. In this study, we provide evidence that proteins of this family are found only in vascular plants and may be separated into five distinct clusters. HIPPs may be involved in (a) heavy metal homeostasis and detoxification mechanisms, especially those involved in cadmium tolerance, (b) transcriptional responses to cold and drought, and (c) plant–pathogen interactions. In particular, our results show that the rice (*Oryza sativa*) HIPP *OsHIPP41* gene is highly expressed in response to cold and drought stresses, and its product is localized in the cytosol and the nucleus. The results suggest that HIPPs play an important role in the development of vascular plants and in plant responses to environmental changes.

## Introduction

It is estimated that one-third to half of all proteins require metallic ions, either as a structural component or as a catalytic factor [1–3]. These ions possess chemical and physical properties that are essential for diverse metabolic reactions such as hydrolysis, electron transfer and oxidation of molecules. However, these same reactive characteristics make the metals potentially toxic. Thus, all organisms have developed fine-tuned mechanisms that allow them to obtain and maintain the necessary concentration of each of these trace elements without accumulating excess amounts [2,4].

In eukaryotes, metallic ions that enter the cell are immediately chelated by proteins and small molecule ligands. For example, copper (Cu) binds to glutathione and various thiol-rich proteins, which prevents release of free Cu<sup>+</sup> into the cytosol and protects the cell

against Cu toxicity. However, to act as structural components or as enzymatic co-factors of many proteins, the metallic ions need to reach specific cellular sites. Transport of these essential ions is accomplished by proteins called metallochaperones [1,5,6].

Metallochaperones are generally soluble intracellular proteins that bind metallic ions tightly enough to prevent deleterious reactions with other cellular elements and transport the ions safely through the cell. Additionally, these proteins are labile enough to permit ion exchange, delivering the metal directly to a specific partner via protein–protein interactions [6]. The concept of metallochaperones is derived from study of the bacterial CopZ protein and the yeast antioxidant protein 1 (ATX1). These similar small proteins (69 and 73 residues, respectively) contain the Cys-XX-Cys metal-

### Abbreviations

ATX1, antioxidant protein 1; CCC2, yeast copper-transporting ATPase; CCH, copper chaperone; CCS, copper chaperone for Cu–Zn superoxide dismutase; COX17, copper chaperone for cytochrome *c* oxidase; HIPP, heavy metal-associated isoprenylated plant protein; HMA domain, heavy metal-associated domain; HPP, heavy metal-associated plant protein.

binding motif within the first loop of a ferredoxin-like structural fold ( $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ ), which is usually referred to as a heavy metal-associated domain (HMA; pfam00403.6) [6]. These Cu metallochaperones are able to lower the kinetic barrier for Cu transfer in the cytosol, and catalyze Cu delivery through interaction between analogous HMA domains of the chaperone and a partner protein, which may be a transporter or the metal 'target protein' [4,7].

In yeast, ATX1 was first shown to interact with CCC2, which is a Cu-transporting P-type ATPase localized in the membrane of the Golgi, where Cu is assembled into new metalloproteins [1,4]. This appears to be one of the most basic and ancestral type of pairing between Cu proteins. For example, in organisms that do not need Cu to survive, such as *Archaeoglobus fulgidus*, *Thermoplasma acidophilum* and *Thermotoga maritima*, this pair of proteins forms a basic efflux system comprising a carrier (ATX1-like) that captures Cu and delivers it to a pump (CCC2-like) that exports it across the membrane [8].

A similar process is observed with two other well-conserved eukaryotic chaperones: copper chaperone for Cu-Zn superoxide dismutase (CCS) and copper chaperone for cytochrome *c* oxidase (COX17). CCS delivers Cu to a Cu/Zn superoxide dismutase, while COX17 mediates the transfer of Cu to cytochrome *c* oxidase, which is essential in the respiratory chain. In addition to an HMA domain similar to that of ATX1, both proteins contain other functional domains that are involved in recognition of their specific targets [1,9,10].

In addition to the three previously mentioned Cu chaperones (ATX1, CCS and COX17), another ATX1-like protein has been described in plants. The *Arabidopsis thaliana* copper chaperone CCH differs from other plant ATX1 homologs due to the presence of 46 additional residues at its C-terminus. Both AtATX1 and AtCCH are able to restore a normal Cu tolerance phenotype to the yeast  $\Delta$ ATX1 null mutant [11,12]. However, the C-terminal extension of CCH is a plant-exclusive domain that acts independently of the N-terminal HMA domain and plays an important role in translocation of the protein to neighboring cells in plant vascular tissues, which is a characteristic specific of this metallochaperone [12,13].

In other organisms, e.g. algae, fungi and animals, there are a small number of metallochaperone-like proteins. However, in plants, this group has diversified into a large family comprising two types of proteins: heavy metal-associated plant proteins (HPPs) and heavy metal-associated isoprenylated plant proteins (HIPPs) [14,15].

HIPPs are characterized by the presence of one or two HMA domains and an isoprenylation motif. In addition, most HIPPs present a flexible glycine-rich region between these elements [14,16]. Isoprenylation, also known as farnesylation, is a post-translational protein modification that involves addition of a C-terminal hydrophobic anchor that is important for interaction of the protein with membranes or other proteins. This occurs via covalent thioether binding of a 15-carbon farnesyl or 20-carbon geranylgeranyl group to the cysteine residue of a C-terminal CaaX motif (where 'C' is cysteine, 'a' is an aliphatic amino acid, and 'X' is any amino acid) [15,17].

Although the HMA domain and the isoprenylation process are common in many organisms from bacteria to humans, the presence of both in the same protein was observed only in plants [18]. Only a few HIPPs have been studied so far, and the more detailed studies focused on the model plant *Arabidopsis*. In this species, 45 HIPPs and 22 HPPs have been identified, including AtATX1, AtCCH and AtCCS as HPPs [14,15]. HIPPs were described as acting in two different ways: (a) in heavy metal homeostasis and detoxification mechanisms (especially cadmium tolerance) [15,16,19,20], and (b) as regulatory elements in the transcriptional response to cold and drought [14,21].

However, virtually nothing is known about the evolution of the HIPP gene family or even whether they are involved in other biological processes. In the present study, we present phylogenetic analyses for HIPP genes based on newly available data from recent genome sequencing projects of numerous organisms in order to help understand their evolutionary history in plants. Additionally, to suggest processes in which these genes may be involved, we performed an expression analysis of HIPP genes in the model plants *Arabidopsis* and rice. The diversity of expression patterns for HIPP genes suggests that HIPP may be involved in various roles in plant development and defense responses.

## Results

### Phylogenetic analysis of the HIPP gene family

Through a search of the available genomic databanks, putative HIPP sequences were identified in all vascular plants but not in any other organisms, including the moss *Physcomitrella patens*. In the lycophyte *Selaginella moellendorffii*, which belongs to the oldest groups of live vascular plants, five putative HIPP genes were found, and 59 HIPP genes were identified in rice. This illustrates the vast diversification of this gene family in more derived plants (Table S1). While only ATX1

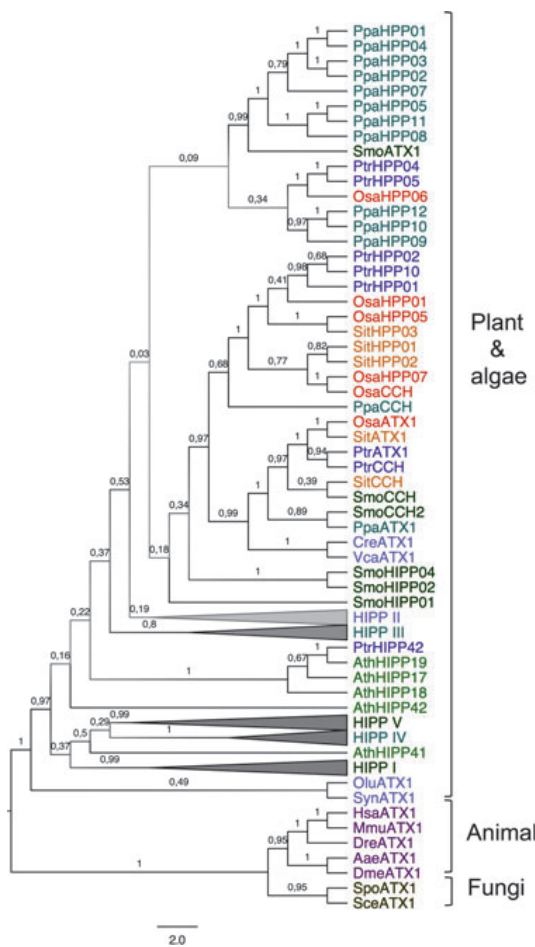
genes are found in animals, fungi and algae, a larger number of other ATX1-like metallochaperone genes (HIPPs and HPPs) were identified in plants (Fig. 1).

A great number of duplications and diversification of HIPP genes were observed in this gene family. Phylogenetic analyses show genes that diversified at various times through plant evolution, some recently as observed for clusters exclusive to one species (e.g.

*PtrHIPP23–29* and *PtrHIPP62*) or plant family (e.g. *OsaHIPP1–5* and *SitHIPP11–12*) (Fig. 2). In *P. patens*, 12 putative HPP genes were identified, suggesting a similar diversification in this group of plants (Fig. 1).

The phylogenetic analysis of all the HIPPs found in five distinct plant genomes (five genes in *S. moellendorffii*, 45 in *A. thaliana*, 74 in *Populus trichocarpa*, 59 in *O. sativa* and 51 in *Setaria italica*) showed five distinct clusters (Fig. 2). Except for *S. moellendorffii*, all the plants that were analyzed possess genes in each of these clusters, indicating an early diversification of angiosperm HIPP genes in these five groups. Two *S. moellendorffii* proteins were not included in any of the five clusters (SmoHIPP02 and SmoHIPP04), but SmoHIPP01, SmoHIPP05 and SmoHIPP06 were grouped into cluster II (Fig. 2).

A relevant characteristic of the HIPPs is their size, which ranges from 113 to 584 amino acids. This is several times larger than AtATX1, which has 66 amino acids. Despite their great variation in size, most HIPPs have a conserved structure, which includes a globular HMA domain similar to that of ATX1, a C-terminal isoprenylation CaaX motif, and a flexible segment located between these two domains with predicted protein–protein binding elements (e.g. glycine-rich repeats and proline-rich motifs). A closer analysis of the architecture of HIPPs in rice and Arabidopsis shows conserved features within the five predicted clusters. For example, proteins from cluster I are distinguished by the presence of a second HMA domain, while larger proteins are found in cluster III, with a great quantity of glycine repetition (GGGGG) (Fig. 3).

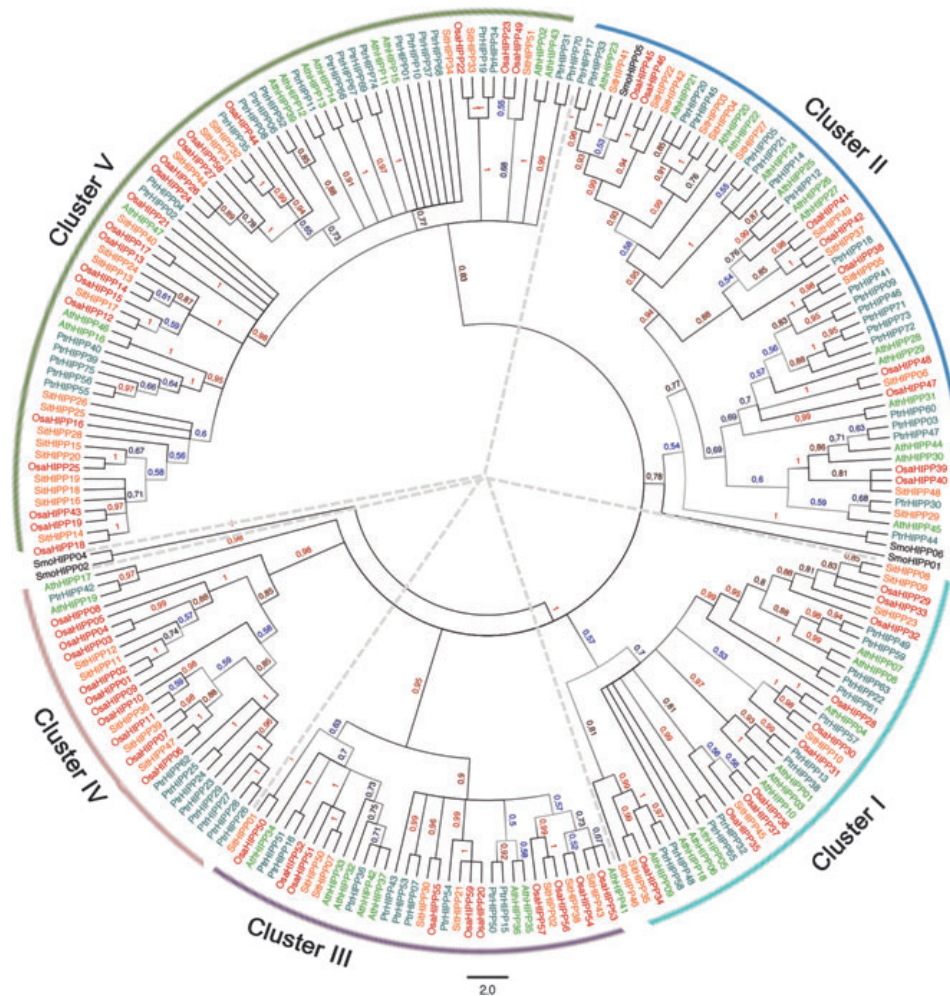


**Fig. 1.** Phylogenetic tree of ATX1-like proteins inferred by Bayesian analysis using the HMA domain from ATX1, CCH, HPP and HIPP sequences of *Saccharomyces cerevisiae* (Sce), *Schizosaccharomyces pombe* (Spo), *Homo sapiens* (Hsa), *Mus musculus* (Mmu), *Danio rerio* (Dre), *Aedes aegypti* (Aae), *Drosophila melanogaster* (Dme), *Selaginella moellendorffii* (Smo), *A. thaliana* (Ath), *O. sativa* (Osa), *Populus trichocarpa* (Ptr), *Setaria italica* (Sit), *Physcomitrella patens* (Ppa), *Chlamydomonas reinhardtii* (Cre), *Volvox carterii* (Vca) and *Ostreococcus lucimarinus* (Olu).

### Expression patterns of rice and Arabidopsis HIPP genes

The HIPP genes demonstrated a broad spectrum of expression profiles. Analysis of available microarray expression data from *A. thaliana* and *O. sativa* revealed the absence of a conserved pattern shared by all members of the HIPP family. Rather, some genes exhibited ubiquitous expression, but expression of others was more restricted to a specific organ and/or stage of plant development.

*AtHIP34*, *AtHIPP42*, *OsHIPP31* and *OsHIPP59* are examples of genes that are expressed throughout plant development and in diverse tissues, while other genes show a more specific expression pattern (Figs S1, S2 and S3). In rice, *OsHIPP21* and *OsHIPP28* were specifically and highly expressed in the leaf, while *OsHIPP13* and *OsHIPP48* were expressed mostly in the roots. Some genes, such as *OsHIPP10*, are expressed only in the inflorescence and reproductive tissues (Fig. S4).



**Fig. 2.** Phylogenetic analysis of HIPPs inferred by the Bayesian analysis using HIPP peptide sequences of five plant species: *Selaginella moellendorffii* (black), *A. thaliana* (green), *O. sativa* (red), *Populus trichocarpa* (blue) and *Setaria italica* (orange).

### Response to heavy metal exposure

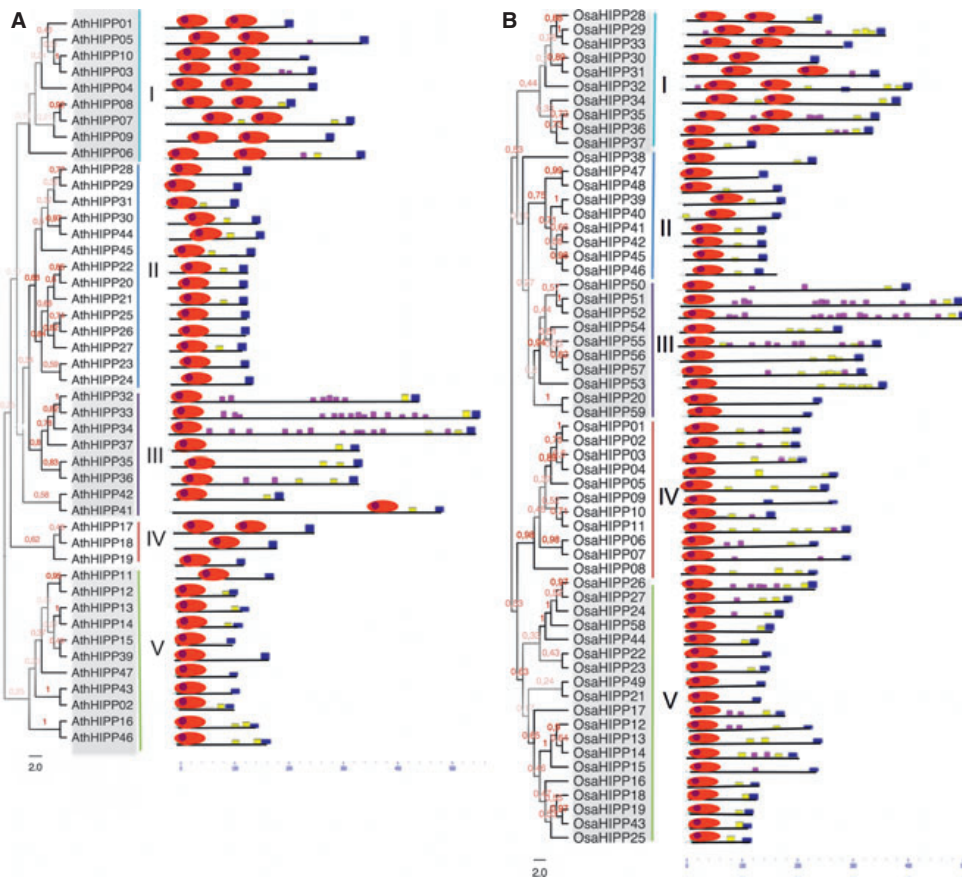
Previous studies showed the involvement of HIPPs in cadmium (Cd) homeostasis. The expression of four HIPP genes was analyzed by quantitative RT-PCR in shoots of rice seedlings treated with 60  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub>. Three genes showed a small but statistically significant induction after 24 h treatment, *OsHIPP28*, *OsHIPP41* and *OsHIPP21* transcripts increased approximately two-, three- and fivefold, respectively, in seedlings exposed to excess Cd compared with control conditions (Fig. 4). However, this was not observed after 6 or 12 h treatment. Expression of *OsHIPP50* did not show any significant variation in the analyzed samples (Fig. S5).

Using the Geneinvestigator tool [22], it was possible to identify other Cd-responsive HIPP genes based on the available microarray data. This analysis identified additional up-regulated genes (e.g. *AtHIPP05*, *AtHIPP13*, *AtHIPP14*, *AtHIPP39*, *AtHIPP43*, *OsHIPP14* and *OsHIPP44*) and down-regulated genes (e.g. *AtHIPP32*, *OsHIPP18*, *OsHIPP23* and *OsHIPP38*) in the roots of plants treated with Cd (Fig. S6).

### Expression of *OsHIPP41* is induced by cold and drought

*OsHIPP21* and *OsHIPP28*, which are highly expressed in leaves under normal conditions and induced by





**Fig. 3.** The architecture of HIPP proteins identified in *A. thaliana* (A) and the rice (*Oryza sativa*) genome (B). Dendrogram of predicted HIPPs using the neighbor-joining method with 2000 bootstrap replications and the amino acid sequences of the HMA domains of putative HIPPs (MEGA 5.1 [40]). Protein architecture was determined, and conserved domains are indicated based on MEME 5.05 results. Red dot, HMA domain; blue box, isoprenylation motif; pink box, glycine-rich repetitions; yellow box, proline-rich motif.

excess Cd, were also tested by quantitative RT-PCR in cold- and drought-treated seedlings. The relative expression of *OsHIPP41* exhibits a tenfold increase in response to drought and a more than 50-fold increase in response to low temperatures, while *OsHIPP28* shows no significant changes, and *OsHIPP21* is down-regulated in response to these conditions (Fig. 4).

Analysis of microarray data from rice seedlings exposed to drought, salt and cold stress has shown that most HIPP transcript levels did not change under these conditions. However, some HIPP genes were responsive under the tested conditions. The expression of *OsHIPP09* and *OsHIPP15* was down-regulated in response to drought and salt stress, respectively, while expression of *OsHIPP23* and *OsHIPP40* was down-regulated under both conditions. However, *OsHIPP11* and *OsHIPP45* were

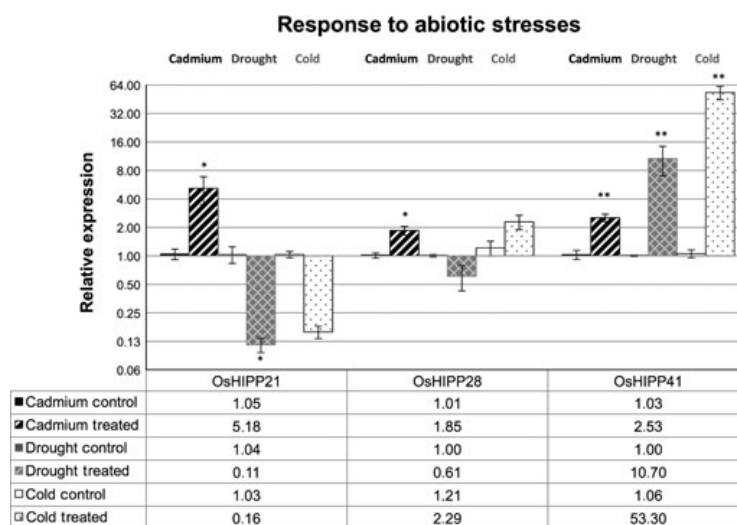
down-regulated only in response to cold stress (Fig. S5). *OsHIPP41* was weakly expressed under normal conditions (Figs S3 and S4) but was highly expressed in response to cold and drought conditions (Fig. S7). In order to confirm this result, we performed quantitative RT-PCR for the *OsHIPP41* gene in rice seedlings exposed to cold and drought treatment and found the same pattern.

### Subcellular localization

Knowledge regarding the localization of a protein inside the cell is very important for elucidation of its function. To verify where the HIPP proteins are localized *in vivo*, RFP-tagged fusion proteins were expressed and observed in rice protoplasts. *OsHIPP21* and *OsHIPP41* were chosen for this analysis. Both



**Fig. 4.** Response of *OsHIPP21*, *OsHIPP28* and *OsHIPP41* on rice seedlings subjected to diverse treatments: cadmium (exposed to 60  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  for 24 h; black bars), drought (15 days; gray bars) and cold (4  $^\circ\text{C}$  for 24 h; whitebars). Quantitative RT-PCR results showing the relative gene expression of each gene normalized against the expression of three control genes. Asterisks indicate statistically significant differences between control and treated plants (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ).



proteins are present in the protoplast organ source (2-week-old seedling shoots) but showed contrasting expression patterns (Fig. 4). An N-terminal fusion protein construct was selected because isoprenylation has been shown to influence distribution of the HIPP protein inside cellular compartments [14,16,21].

In transformed protoplasts, fusion proteins were observed in the cytosol and in the cell nucleus, showing them to be soluble proteins that are not bound to cellular membranes by hydrophobic anchors. In a bioinformatics approach, three distinct prediction programs were used to infer the subcellular localization of all rice and *Arabidopsis* HIPP proteins. However, for most proteins, a consensus among programs was not obtained (Table S1). The result observed *in vivo* was in agreement with the prediction given by the CELLO program [23].

The nuclear dye 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was used to confirm the presence of recombinant proteins in the nucleus in a complementary experiment (Fig. 5G–J). A variation in the distribution of the tagged protein was found. In some protoplasts, the reporter protein is abundant in the nucleus and almost absent in other parts of the cell (Fig. 5C–E); however, in other protoplasts, such a distribution was not observed (Fig. 5F,G). This variation may be attributed to the existence of different cell types in the protoplast preparation.

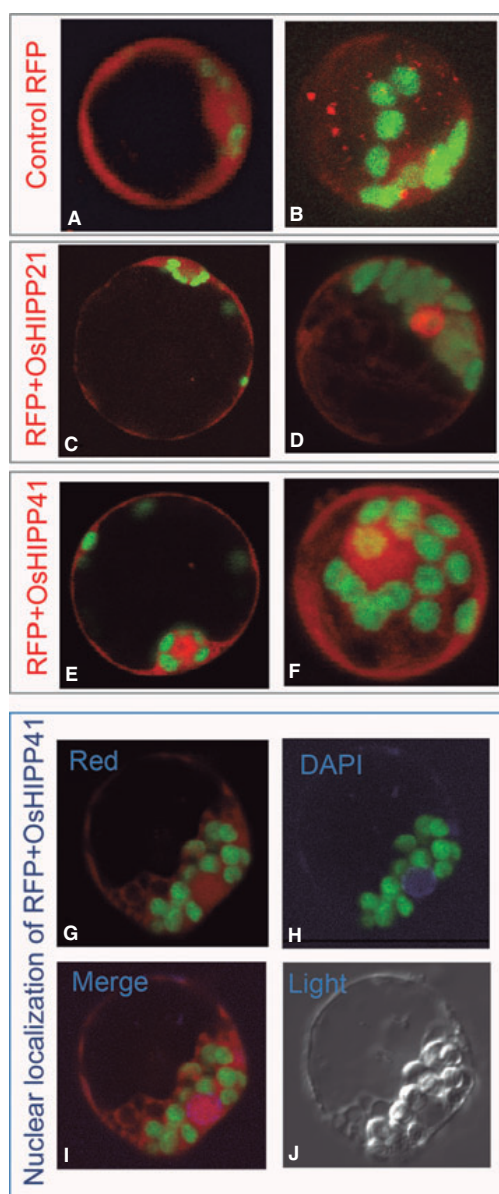
## Discussion

The HMA domain and the isoprenylation motif are found in almost all species, but the presence of both in the same protein occurs only in vascular plants. While

other types of metallochaperones are encoded by no more than a few genes in each organism, the HIPPs have diverged to form large families of more than 40 members (Fig. 1 and Table S1). All plant metallochaperone genes, including ATX, HPP and HIPP, started diversification early during plant evolution, and the phylogenetic analysis shows that they share a common ancestor in plants and algae species. This high diversification is in agreement with the important role of this gene family in all plant species. The phylogenetic relationships between metallochaperones of plant and metallochaperones of other eukaryotic organisms confirmed that the diversification occurred in the ancestral lineage of plant species, mainly within vascular plants (Fig. 1). This analysis also shows that HIPP and HPP genes have duplicated and diversified in several independent episodes during evolution of the land plants.

Phylogenetic analysis using only HIPP sequences from five distinct plant species shows that these proteins are grouped into five clusters. All species except *S. moellendorffii* have HIPP proteins in all clusters (Fig. 2), suggesting that these duplication events occurred early during angiosperm evolution.

Most HIPP proteins studied so far have been shown to be directly involved in heavy metal homeostasis. In 1999, while describing these proteins for the first time, Dykema *et al.* indicated their capacity for binding  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  [18]. Further studies *in vitro* have demonstrated that HIPPs can also bind to  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  (via the CXXC core motif of the HMA domain) but not to  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  or  $\text{Co}^{2+}$  [16,19].



**Fig. 5.** Subcellular localization in rice protoplasts. Green, false-color chlorophyll image; red, reporter protein. (A, B) Individual protoplasts expressing only RFP (positive control for transformation). (C, D) Localization of the RFP-OsHIPP21 fusion protein. (E–J) Localization of the RFP-OsHIPP41 fusion protein. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) nucleic acid stain (blue) was utilized to highlight the nucleus. Images (A–F) show individual cells from independent transformations; images (H–J) show the same protoplast under different light conditions. Imaging was performed using a confocal laser scanning microscope.

The role of these proteins in heavy metal homeostasis and/or detoxification has been demonstrated by several independent studies. Over-expression of *AtHIPP06* and *AtHIPP26* conferred Cd tolerance to transgenic plants, and the triple knockout mutant *AtHIPP20/21/22* was more sensitive to Cd than wild-type *Arabidopsis* plants were [15,16,19]. This capacity was also tested using heterologous expression methods; *AtHIPP06* conferred improved Cd tolerance to wild-type yeast [24], while *AtHIPP20*, *AtHIPP22*, *AtHIPP26* and *AtHIPP27* conferred Cd tolerance to the Cd-hypersensitive yeast mutant *ycf1*. Remarkably, similar results were not observed for  $\text{Cu}^{2+}$  or  $\text{Zn}^{2+}$  tolerance, suggesting that these proteins may act specifically in Cd homeostasis [15].

The main hypothesis for the mechanism of cadmium homeostasis is that HIPPs protect the plant by trapping free  $\text{Cd}^{2+}$  in the cytosol, thus preventing the ion from binding to a more essential protein [15,16]. Unlike other metallic ions, cadmium is not an element that is needed for the growth of most plants and animals, although it has similar properties to zinc. Indeed, the toxicity of Cd is a direct consequence of its chemical similarity to other divalent ions such as  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  [25]. It is likely that such a similarity allows Cd ions to replace essential ions and therefore interfere with Ca- or Zn-dependent processes, including protection against oxidative stress [25,26]. In yeast,  $\text{Cd}^{2+}$  toxicity occurs when  $\text{Cd}^{2+}$  replaces  $\text{Cu}^+$  in the HMA domain of ATX1 and is transported to the Golgi, where it binds to Cu-binding sites in other proteins [27].

The transcription of many HIPPs is altered in response to heavy metal stresses, which indicates that HIPPs may be involved in homeostasis of these elements. For example, *AtHIPP06* transcription was induced by Cd, Hg, Fe and Cu, while *AtHIPP26* transcription was induced by Cd and Zn but not Fe or Cu [16,19]. Because Cd induces very different HIPPs, we searched for other Cd-responsive genes using the Genevestigator tool. We found new genes that were up-regulated in the roots of Cd-treated plants (*AtHIPP05*, *AtHIPP13*, *AtHIPP14*, *AtHIPP39*, *AtHIPP43*, *OsHIPP14* and *OsHIPP44*) that may also be involved in Cd homeostasis (Fig. S6).

However, genes that are not induced by metal excess may also be directly involved in heavy metal homeostasis, especially if their function is to help cells to cope with a metal deficit rather than a metal excess, as in the case of AtCCH and its paired Cu transporting ATPase responsive-to-antagonist1 (AtRAN1) [28]. *AtHIPP32*, *OsHIPP18*, *OsHIPP23* and *OsHIPP38* were down-regulated by Cd treatment (Fig. S6). The genes that respond to Cd belong to all five clusters of

HIPPs, indicating that this may be a recurrent function within this group.

In addition to the simple function of chelating metals in the cytosol, HIPPs may act in a more elaborate mechanism. In 2009, Barth *et al.* identified nuclear HIPPs that function in the transcriptional response to cold [14]. They demonstrated a direct interaction between the HMA domain of AtHIPP26 and the zinc finger homeodomain of the drought stress-related transcription factor AtHB29 using a yeast two-hybrid approach and GST pull-down assays. Proteins from the same cluster (*AtHIPP20*, *21*, *22*, *23*, *24*, *27* and *30*) were also able to interact with this same transcription factor (AtHB29), illustrating that additional HIPPs may play a role in transcriptional regulation [14].

A similar mechanism has already been described in the bacteria *Enterococcus hirae*, in which Cu<sup>+</sup> of the metallochaperone CopZ displaces Zn<sup>2+</sup> from the zinc finger of the repressor CopY. Zn<sup>2+</sup> is essential for binding of CopY to the DNA, and, in the absence of this ion, CopY releases the promoter region of the *cop* operon, allowing transcription of this operon to proceed [14,29].

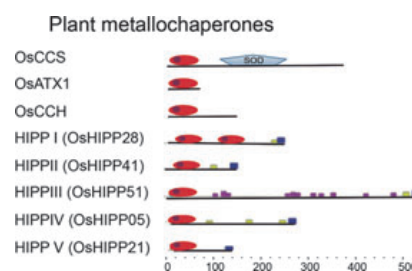
To identify genes that may play related roles in rice, we searched for genes that were induced by cold, salt or drought, which were the same treatments that induced *AtHIPP26* expression [14]. By analysis of microarray expression data, we identified *OsHIPP41*, a gene that possesses 61.6% sequence identity with the coding sequence of *AtHIPP26*. Quantitative RT-PCR analysis confirmed that *OsHIPP41* is highly expressed in response to drought and cold (Fig. 4).

Although most metallochaperones are predicted to be cytosolic proteins that are involved in the storage and delivery of heavy metals, some have roles that require their presence in specific cell compartments. For example, Cox17, the metallochaperone responsible for delivering Cu to the respiratory chain, is found in the cytosol and the mitochondria [10]. Similarly, CCS delivers Cu for three plant Cu/Zn superoxide dismutase isoforms, each present in a different cell compartment: CSD1 in the cytosol, CSD2 in chloroplasts, and CSD3 in peroxisomes [30]. Using heterologous systems to express fusion proteins with fluorescent reporters (GFP or RFP), HIPPs were previously detected in the cytosol, associated with membranes, and in the cell nucleus [14,16,19,21]. In the present study, we used a homologous system (rice protoplasts) to express a rice protein tagged with RFP. Protoplasts were obtained from tissues in which the natural proteins are expressed and where possible associated proteins are present. The protein OsHIPP41, which has a composi-

tion and expression pattern similar to the exclusively nuclear protein AtHIPP26, was visualized in the cell nucleus and in the cytosol. The same distribution was observed for OsHIPP21.

For many years, copper has been used as an important component in many chemical pesticides and antibiotics, with known antimicrobial activity [31]. It is also an essential element in the battle between plants and pathogens. An elegant example of this battle and co-evolution is found in the interaction between rice and *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (Xoo), the agent of bacterial blight disease. Xoo is sensitive to Cu; however, it secretes an effector that is able to activate transcription of the rice susceptibility gene *Xa13*. This protein (Xa13), together with the copper transporters COPT1 and COPT5, promotes removal of Cu from xylem vessels of the infected plant, facilitating the spread of Xoo through the plant vessels. Plants with recessive alleles of *Xa13*, that encode a mutated variation of this protein, are more resistant to Xoo infection [32]. HIPPs may also be involved in a similar mechanism in plant–pathogen interactions. In previous studies, OsHIPP05 was described as a susceptibility factor for fungal infections that slows plant defense responses to a specific pathogen [33,34]. It is known that deletion of the proline-rich motifs of OsHIPP05 (also designated Pi21; shown in Fig. 6), confers durable resistance to rice blast disease [34]. A recent study indicated that the wild-type form of this gene enhanced the movement of *M. oryzae* infection hyphae in host mesophyll cells. Nakao *et al.* demonstrated that *M. oryzae* hyphae were able to grow in lines of the non-host plant *Arabidopsis* when this plant over-expresses OsHIPP05, clearly indicating that this protein (with its proline-rich motifs intact) is essential for the fungal infection [33].

Protein domains that bind proline-rich motifs are frequently involved in signaling events. The proline-rich



**Fig. 6.** Plant metallochaperones. Structural representation of the proteins showing their conserved domains based on MEME 5.05 results. Red dot, HMA domain; blue box, isoprenylation motif; pink box, glycine-rich repetitions; yellow box, proline-rich motif.

regions, which are present in most HIPPs (Figs 3 and 6), tend to adopt a secondary structure nominated polyproline helix. When located in the solvent-exposed N- or C-terminus of a globular protein, the helix forms a structure described as 'sticky arms' that is responsible for interaction with other proteins [35,36].

Analysis of microarray data (Figs S8 and S9) indicated that many HIPP genes are up- or down-regulated in response to various micro-organisms, and thus may also be involved in the interaction between pathogens and plants.

Metallic ions are necessary for many biological functions, from basal metabolism to defenses against environmental stresses. The known metallochaperones play roles in intracellular transport of these elements; however, this family of proteins may also have developed a more fine-tuned function in plants. The HIPPs possess a conserved HMA domain for metal transport but vary in their 'carboxylic arm', which is a flexible structure with different protein-binding components that may allow precise interactions (Fig. 6). Thus, each HIPP may participate in protein complexes in specific tissues and situations.

The diversity of expression patterns presented by HIPP genes suggests that HIPPs may be involved in various roles in plant development and defense responses. However, the way in which these proteins act and their protein partners have yet to be identified.

In the present work, we have used phylogenetic analysis to ascertain the evolutionary history of HIPPs, which are involved in many different processes in plants, including the response to environmental stressors such as heavy metal excess, cold and drought, and also in plant-pathogen interactions. This broad functionality suggests that HIPPs play important roles in the responses of plants to the ever-changing environment.

## Experimental procedures

### Search for and identification of HIPP genes

We searched for putative HIPP genes in the National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), PHYTOZOME (<http://www.phytozome.net/>) and GRAMENE (<http://www.gramene.org/>) databases using BLAST methodology [36a] and previously identified HIPP sequences as queries. From the obtained sequences, only those that contained a heavy metal-associated domain (HMA, pfam00403.6) and a C-terminal isoprenylation motif (CaaX) were identified as putative HIPPs. The presence of the isoprenylation motif, which was not characterized in the databases, was confirmed using PrePS [37].

Using the MEME suite (Multiple EM for Motif Elicitation, version 5.05) [38], the architecture and the most highly conserved motifs were identified in the full-length amino acid sequences of all HIPP proteins of rice and *Arabidopsis*.

### Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis was performed after protein sequence alignment using both the neighbor-joining and Bayesian methods. The alignments were performed using MUSCLE [39] and implemented in MEGA 5.1 [40]. We used only the HMA domain to perform the phylogenetic analyses, as all metallochaperones possess this domain. The neighbor-joining analyses were performed in MEGA 5.1 [40] using a *p*-distance parameter with 2000 bootstrap replications. The Bayesian analyses were performed using BEAST1.7 software [41]. The model of protein evolution used in this analysis was the JTT model for protein matrix substitution [41a]. The Yule process was selected as a tree prior to Bayesian analysis, and 10 000 000 generations were performed using Markov chain Monte Carlo (MCMC) algorithms. The trees were visualized and edited using FIGTREE version 1.3.1 software (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

### *In silico* expression analysis

The expression analysis of rice and *Arabidopsis* HIPP genes was performed *in silico* using RiceXPro [42] and Genevestigator [22], which allowed us to infer the expression patterns of genes during plant development and in response to diverse conditions.

An alternative approach was used to identify possible abiotic stress-responsive HIPPs. The raw microarray data from the GSE6901 dataset was obtained from GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). LIMMA was used to normalize raw data, through the robust multichip average (RMA) method [43], and identify genes that were significantly up- or down-regulated [44]. The significance was determined using the LIMMA moderated *t* test with  $P \leq 0.05$ .

### Biological assays

For the expression analysis of rice HIPP genes in response to abiotic stress, both cold and drought conditions were tested. Plants were cultivated in a growth chamber with supplemental lighting (8 h dark/16 h light;  $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) at 28 °C.

For the cold stress experiment, 2-week-old seedlings were maintained at 4 °C for 24 h, and the same number of plants was kept at 28 °C as control. After that period, plants from both conditions were immediately harvested and stored in liquid nitrogen for RNA extraction. The

- and multidrug resistant *Enterobacter* bacteria. *J Microbiol* **50**, 586–593.
- 32 Yuan M, Chu Z, Li X, Xu C & Wang S (2010) The bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* overcomes rice defenses by regulating host copper redistribution. *Plant Cell* **22**, 3164–3176.
- 33 Nakao M, Nakamura R, Kita K, Inukai R & Ishikawa A (2011) Non-host resistance to penetration and hyphal growth of *Magnaporthe oryzae* in Arabidopsis. *Sci Rep* **1**, 171.
- 34 Fukuoka S, Saka N, Koga H, Ono K, Shimizu T, Ebana K, Hayashi N, Takahashi A, Hirochika H, Okuno K *et al.* (2009) Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. *Science* **325**, 998–1001.
- 35 Kay B, Williamson M & Sudol M (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* **14**, 231–241.
- 36 Freund C, Schmalz H-G, Sticht J & Kühne R (2008) Proline-rich sequence recognition domains (PRD): ligands, function and inhibition. *Handb Exp Pharmacol* **186**, 407–429.
- 36a Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403–410.
- 37 Maurer-Stroh S & Eisenhaber F (2005) Refinement and prediction of protein prenylation motifs. *Genome Biol* **6**, R55.
- 38 Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW & Noble WS (2009) MEME suite: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* **37**, W202–W208.
- 39 Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**, 1792–1797.
- 40 Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M & Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731–2739.
- 41 Drummond AJ & Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* **7**, 214.
- 41a Jones DT, Taylor WR & Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* **8**, 275–282.
- 42 Sato Y, Antonio BA, Namiki N, Takehisa H, Minami H, Kamatsuki K, Sugimoto K, Shimizu Y, Hirochika H & Nagamura Y (2011) RiceXPro: a platform for monitoring gene expression in *japonica* rice grown under natural field conditions. *Nucleic Acids Res* **39**, D1141–D1148.
- 43 Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M & Speed TP (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* **19**, 185–193.
- 44 Smyth GK (2005) limma: linear models for microarray data. In *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor* (Gentleman R, Carey VJ, Huber W, Irizarry RA & Dudoit S, eds), pp. 397–420. Springer, New York.
- 45 Baier AC, Somers DJ & Gusiufson JP (1995) Aluminium tolerance in wheat: correlating hydroponic evaluations with field and soil performances. *Plant Breed* **114**, 291–296.
- 46 Rosa SB, Caverzan A, Teixeira FK, Lazzarotto F, Silveira JAG, Ferreira-Silva SL, Abreu-Neto J, Margis R & Margis-Pinheiro M (2010) Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice. *Phytochemistry* **71**, 548–558.
- 47 Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. *Methods* **25**, 402–408.
- 48 Schmittgen TD & Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* **3**, 1101–1108.
- 49 Petsalaki EI, Bagos PG, Litou ZI & Hamodrakas SJ (2006) PredSL: a tool for the N-terminal sequence-based prediction of protein subcellular localization. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **4**, 48–55.
- 50 Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S & Von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**, 1005–1016.
- 51 Karimi M, Depicker A & Hilson P (2007) Recombinational cloning with plant Gateway vectors. *Plant Physiol* **145**, 1144–1154.
- 52 Tao L, Cheung AY & Wu H (2002) Plant Rac-like GTPases are activated by auxin and mediate auxin-responsive gene expression. *Plant Cell* **14**, 2745–2760.

## Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site:

**Fig. S1.** Expression profile of HIPP genes from *A. thaliana* and *O. sativa* during plant development.

**Fig. S2.** Anatomy profile of HIPP genes in various *A. thaliana* tissue samples.

**Fig. S3.** Anatomy profile of HIPP genes in various *O. sativa* tissue samples.

**Fig. S4.** Expression profile of HIPP genes in various tissues throughout rice development.

drought experiment was performed using seedlings at the four-leaf stage that were split into two treatments: drought stress and control. Control seedlings continued to receive a normal supply of water, whereas water was withheld from stressed seedlings for 15 days. After this period, plant material was collected from both treatments and stored in liquid nitrogen.

For the Cd experiment, 2-week-old seedlings cultivated in a low ionic-strength hydroponic medium [45] were divided into control and experimental groups. For the aluminum treatment, plants were cultivated with 450  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  for 8 h. For the cadmium treatment, plants were cultivated in medium supplemented with 60  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  for 6, 12 and 24 h.

### Quantitative RT-PCR analysis

Real-time PCR experiments were performed using cDNA synthesized from total RNA purified using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and treated with RQ1 DNase-free RNase (Promega, Madison, WI, USA). The cDNAs were obtained using the M-MLV reverse transcriptase system and a poly T primer (Promega). After synthesis, the cDNAs were diluted 10–100-fold in sterile water for use in PCR reactions.

In total, eight genes were analyzed: four HIPPs (*OsHIPP21*, *OsHIPP28*, *OsHIPP41* and *OsHIPP50*), which were chosen based their inferred expression pattern on the basis of *in silico* analyses, and four control genes (*OsFDH*, *OsNSL*, *OseFlx1* and *OsGAPDH*), which were used to normalize the amount of mRNA present in each sample as described previously [46]. The following primer pairs were designed to produce DNA fragments ranging from 100 to 250 bp: *OsHIPP21\_RT* (forward 5'-CCGGT TGATGAGAAGAAGGA-3', reverse 5'-ATCTGGCAGCATGATGGACT-3'); *OsHIPP28\_RT* (forward 5'-TCGGTCG AGACTGATCTCCT-3', reverse 5'-GTCGGCCTTATCCT CATCTG-3'); *OsHIPP41\_RT* (forward 5'-AGCTTGCCCT CCGCCTTCAGC-3, reverse 5'-ATGGCATGGCCGCATG GGTG-3'); *OsFDH\_RT* (forward 5'-TTCCAATGCATTC AAAGCTG-3', reverse 5'-CAAAATCAGCTGGTGCTTC TC-3'); *OsHIPP50\_RT* (forward 5'-TTAGCCCTTACACC GCCTAC-3', reverse 5'-CATGCTTCATACCAACCTC-3'); *OseFlx1\_RT* (forward 5'-5'TTTCACCTTGGTGTGAA GCAGAT-3', reverse 5'-GACTTCCTTACGATTTTCAT CGTAA-3'); *OsNSF\_RT* (forward 5'-CGTAAACCAGG CTGTTGAT-3', reverse 5'-GCCCTCACTGTCAAAAAG A-3') and *OsGAPDH\_RT* (forward 5'-GGGCTGCTAGC TTCAACATC-3', reverse 5'-TTGATTGCAGCCTTGATC TG-3).

We performed four experimental repetitions plus four technical replicates using an Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) StepOnePlus real-time PCR system with SYBR Green fluorescence detection (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). The expression data analyses were

performed after comparative quantification of the amplified products using the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method [47,48]. Statistical analysis was performed by Student's *t* test to compare pairwise differences in expression. Values were considered to be significantly different for  $P < 0.05$ .

### Subcellular localization

Both *in silico* and *in vivo* approaches were utilized to predict the subcellular localization of HIPP proteins. For *in silico* analysis, three programs with different algorithms for localization prediction were used: CELLO version 2.5 [23], PredSL [49] and TargetP [50]. The *in vivo* visualization was performed in rice protoplasts using *OsHIPP21* and *OsHIPP41* proteins tagged with RFP at their N-termini. The reporter proteins were obtained by introducing the amplified cDNA sequences (cloned into the pENTR vector) into the p2RGW7 plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using Gateway technology [51]. *OsHIPP21* cDNA cloning was performed using the HIPP21F (5'-CACCTT TGGAGAAAACATGG-3') and HIPP21R (5'-CTACA TCTGGCAGCATGATG-3') primers, and the cloning of *OsHIPP41* was performed using the HIPP41F (5'-CACC ATGGGCGTGGACACAT-3') and HIPP41R (5'-CTAC ATGACGGCGCAGGA-3') primers. The resulting vectors were used for protoplast transformation.

Protoplast isolation and transfection was performed as described by Tao *et al.* [52] with modifications. Briefly, transformed protoplasts were incubated in the dark for approximately 16 h at 28 °C before imaging. Fluorescence microscopy was performed using an Olympus (Tokyo, Japan) FluoView 1000 confocal laser scanning microscope. In complementary analyses, the cell nucleus was visualized using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) nucleic acid stain (0.1 mg·mL<sup>-1</sup>).

### Acknowledgements

This study was supported by the Brazilian National Council of Technological and Scientific Development (CNPq).

### References

- Huffman DL & Halloran TVO (2001) Function, structure and mechanism of intracellular trafficking proteins. *Annu Rev Biochem* **70**, 677–701.
- Dupont CL, Butcher A, Valas RE, Bourne PE & Caetano-Anollés G (2010) History of biological metal utilization inferred through phylogenomic analysis of protein structures. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 10567–10572.
- Tainer JA, Roberts VA & Getzoff ED (1991) Protein metal-binding sites. *Curr Opin Biotechnol* **2**, 582–591.

- 4 Rubino JT & Franz KJ (2012) Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function. *J Inorg Biochem* **107**, 129–143.
- 5 Haas CE, Rodionov DA, Kropat J, Malasarn D, Merchant SS & De Crécy-Lagard V (2009) A subset of the diverse COG0523 family of putative metal chaperones is linked to zinc homeostasis in all kingdoms of life. *BMC Genomics* **10**, 470.
- 6 Robinson NJ & Winge DR (2010) Copper metallochaperones. *Annu Rev Biochem* **79**, 537–562.
- 7 Wernimont AK, Huffman DL, Lamb AL, Halloran TVO & Rosenzweig AC (2000) Structural basis for copper transfer by the metallochaperone for the Menkes/Wilson disease proteins. *Nat Struct Biol* **7**, 766–771.
- 8 Bertini I, Cavallaro G & McGreevy KS (2010) Cellular copper management – a draft user's guide. *Coord Chem Rev* **254**, 506–524.
- 9 Nevitt T, Ohrvik H & Thiele DJ (2012) Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. *Biochim Biophys Acta* **1823**, 1580–1593.
- 10 Cobine PA, Pierrel F & Winge DR (2006) Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 759–772.
- 11 Andre N, Puig S, Mira H, Dorcey E, Sancenón V, Andrés-Colás N, Garcia-Molina A, Burkhead JL, Gogolin KA, Abdel-Ghany SE *et al.* (2007) Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. *Biochem Biophys Res Commun* **354**, 385–390.
- 12 Mira H, Vilar M, Pérez-Payá E & Peñarrubia L (2001) Functional and conformational properties of the exclusive C-domain from the Arabidopsis copper chaperone (CCH). *Biochem J* **357**, 545–549.
- 13 Mira H, Martínez-García F & Peñarrubia L (2001) Evidence for the plant-specific intercellular transport of the Arabidopsis copper chaperone CCH. *Plant J* **25**, 521–528.
- 14 Barth O, Vogt S, Uhlemann R, Zschiesche W & Humbeck K (2009) Stress induced and nuclear localized HIPP26 from *Arabidopsis thaliana* interacts via its heavy metal associated domain with the drought stress related zinc finger transcription factor ATHB29. *Plant Mol Biol* **69**, 213–226.
- 15 Tehseen M, Cairns N, Sherson S & Cobbett CS (2010) Metallochaperone-like genes in *Arabidopsis thaliana*. *Metallomics* **2**, 556–564.
- 16 Suzuki N, Yamaguchi Y, Koizumi N & Sano H (2002) Functional characterization of a heavy metal binding protein CdI19 from Arabidopsis. *Plant J* **32**, 165–173.
- 17 Crowell DN (2000) Functional implications of protein isoprenylation in plants. *Prog Lipid Res* **39**, 393–408.
- 18 Dykema PE, Sipes PR, Marie A, Biermann BJ, Crowell DN & Randall SK (1999) A new class of proteins capable of binding transition metals. *Plant Mol Biol* **41**, 139–150.
- 19 Gao W, Xiao S, Li H-Y, Tsao S-W & Chye M-L (2009) *Arabidopsis thaliana* acyl-CoA-binding protein ACBP2 interacts with heavy-metal-binding farnesylated protein AtFP6. *New Phytol* **181**, 89–102.
- 20 Chandran D, Sharopova N, Ivashuta S, Gantt JS, Vandenbosch KA & Samac DA (2008) Transcriptome profiling identified novel genes associated with aluminum toxicity, resistance and tolerance in *Medicago truncatula*. *Planta* **228**, 151–166.
- 21 Barth O, Zschiesche W, Siersleben S & Humbeck K (2004) Isolation of a novel barley cDNA encoding a nuclear protein involved in stress response and leaf senescence. *Physiol Plant* **121**, 282–293.
- 22 Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W & Zimmermann P (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics* **2008**, 420747.
- 23 Yu C, Chen Y, Lu C & Hwang J (2006) Prediction of protein subcellular localization. *Proteins* **64**, 643–651.
- 24 Suzuki N, Koizumi N & Sano H (2001) Screening of cadmium-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell Environ* **24**, 1177–1188.
- 25 Clemens S (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **88**, 1707–1719.
- 26 Villiers F, Ducruix C, Hugouvieux V, Jarno N, Ezan E, Garin J, Junot C & Bourguignon J (2011) Investigating the plant response to cadmium exposure by proteomic and metabolomic approaches. *Proteomics* **11**, 1650–1663.
- 27 Heo D-H, Baek I-J, Kang H-J, Kim J-H, Chang M, Kang C-M & Yun C-W (2012) Cd<sup>2+</sup> binds to Atx1 and affects the physical interaction between Atx1 and Ccc2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* **34**, 303–307.
- 28 Yruela I (2005) Copper in plants. *Braz J Plant Physiol* **17**, 145–156.
- 29 Cobine PA, George GN, Jones CE, Wickramasinghe WA, Solioz M & Dameron CT (2002) Copper transfer from the Cu(I) chaperone, CopZ, to the repressor, Zn (II)CopY: metal coordination environments and protein interactions. *Biochemistry* **41**, 5822–5829.
- 30 Huang C-H, Kuo W-Y, Weiss C & Jinn T-L (2012) Copper chaperone-dependent and -independent activation of three copper–zinc superoxide dismutase homologs localized in different cellular compartments in Arabidopsis. *Plant Physiol* **158**, 737–746.
- 31 Tian W-X, Yu S, Ibrahim M, Almonaofy AW, He L, Hui Q, Bo Z, Li B & Xie G-L (2012) Copper as an antimicrobial agent against opportunistic pathogenic

**Fig. S5.** Quantitative RT-PCR analysis of HIPP genes in 2-week-old seedlings exposed to 60  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  for 6, 12 and 24 h.

**Fig. S6.** Expression profile of *O. sativa* and *A. thaliana* HIPP genes in seedlings stressed with cadmium and other metals.

**Fig. S7.** Heatmap showing significant expression changes of *OsHIPP* genes identified in the GEO data-

set 'Expression data for stress treatment in rice seedlings (GSE6901)'.

**Fig. S8.** Expression profile of HIPP genes in *O. sativa* plants exposed to diverse pathogens.

**Fig. S9.** Expression profile of HIPP genes in *A. thaliana* plants exposed to diverse pathogens.

**Table S1.** Identification and analyses of all sequences utilized in the present work.



## **ANEXO 2**

### **CURRICULUM VITÆ**

# CURRICULUM VITÆ

## **ABREU NETO, J. B.**

### 1. DADOS PESSOAIS

Nome: **João Braga de Abreu Neto**

Nascimento 03/09/ 1984 - Porto Alegre/RS- Brasil

Endereço profissional: Av. Bento Gonçalves, 9500. Prédio 43312 Salas 205 e 204. CEP 91501-970. Porto Alegre, RS, Brasil

Telefone: +55 51 3308-9830

E-mail: [jb.abreu@gmail.com](mailto:jb.abreu@gmail.com)

<http://lattes.cnpq.br/5545443422779513>

### 2. FORMAÇÃO:

2002 – 2006

Graduação em Ciências Biológicas.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Título: **CRIAÇÃO DE MUTANTES POR INSERÇÃO DE TRANSPOSON EM ARROZ COMO FERRAMENTA DE GENÔMICA FUNCIONAL EM CEREAIS**

Orientadora: Marcia Maria Auxiliadora Naschenveng Pinheiro Margis

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2007 – 2009

Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação de Genética e Biologia Molecular. UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Título: **IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE OsPMBP1 (Prenylated Metal Binding Protein 1) DE ARROZ (Oryza sativa)**

Orientadora: Marcia Maria Auxiliadora Naschenveng Pinheiro Margis

Bolsista do: CNPq

2009 – 2013

Doutorado em Biologia Celular e Molecular.

UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Título: **História Evolutiva e Caracterização de Genes HIPP (Heavy Metal Isoprenylated Plant Protein)**

Orientadora: Marcia Pinheiro Margis

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

## **FORMAÇÃO COMPLEMENTAR**

2003

Curso de Extensão universitária em **Técnicas Histológicas.**

UFRGS, Porto Alegre, Brasil

2006

Minicurso de **Mecanismos moleculares da interação entre plantas e patógeno**

Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirao Preto, Brasil

2007

Minicurso **Transcriptomas e análises múltiplas da expressão gênica.**

Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, SBFV, Campos Dos Goytacazes, Brasil

2009

Curso de curta duração em **Gênomica Funcional da Reprodução Vegetal.**

Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil

2012

Curso de curta duração em **Formação de Auditores e Fiscais em Biosegurança e Biosseguridade.**

pela Associação Nacional de Biossegurança, ANBIO, Rio De Janeiro, Brasil

### 3. ESTÁGIOS:

05/2004 - 07/2005

Iniciação científica - Laboratório de Drosophila - Departamento de Genética - Instituto de Biociências, UFRGS - Sob orientação da Profa. Dra. Carmen C. R. Saavedra

Tema: estudo do envelhecimento e longevidade nos modelos experimentais: *Drosophila melanogaster* e *D. willistoni*.

Estágio Voluntário

08/2005 - 03/2007

Iniciação científica - Laboratório de Genética Molecular Vegetal e Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais. -- Departamento de Genética - Instituto de Biociências, UFRGS Sob orientação da Prof. Dra. Márcia Margis-Pinheiro

Tema: Produção e análise de mutantes insercionais em calos de arroz

Bolsista CNPq

2006

Estágio no Setor de Melhoramento Genético - Estação Experimental do Arroz - Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA)

Sob orientação da Dra. Renata Pereira Cruz

Estágio voluntário de 360 horas realizado como um dos requisitos à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas na UFRGS (Atividade de Estágio Supervisionado)

### 4. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

ROSA, SÍLVIA B., CAVERZAN, ANDRÉIA, TEIXEIRA, FELIPE K., LAZZAROTTO, FERNANDA, SILVEIRA, JOAQUIM A.G., FERREIRA-SILVA, SÉRGIO LUIZ, ABREU-NETO, JOÃO, MARGIS, ROGÉRIO, MARGIS-PINHEIRO, MÁRCIA.

**Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice.**

Phytochemistry. v.71, p.548 - 558, 2010.

de ABREU-NETO, JOÃO BRAGA, TURCHETTO-ZOLET, ANDREIA CARINA, DE OLIVEIRA, LUIZ FELIPE VALTER, ZANETTINI, MARIA HELENA BODANESE, MARGIS-PINHEIRO, MARCIA **Heavy Metal Associated Isoprenylated Plant Protein (HIPP): characterization of a family of proteins exclusive of plants**. The FEBS Journal (Print). v.280, p.1604 - 1616, 2013.

## 5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

ABREU NETO, JB, OLIVEIRA, A. K., SAAVEDRA, C. R. - Seleção disruptiva para longevidade diferencia geneticamente padrões protéicos de *Drosophila melanogaster*? In: XVI Salão de Iniciação Científica e XIII Feira de Iniciação Científica, 2004, Porto Alegre. **Livro de Resumos do XVI Salão de Iniciação Científica e XIII Feira de Iniciação Científica da UFRGS**. Porto Alegre: UFRGS, 2004. p.338 – 339

LIMA, J.C., ABREU NETO, JB, MARGIS-PINHEIRO, M., FETT, J.P. Caracterização funcional dos genes OsFer1 e OsFer2 de arroz (*Oryza sativa* L) utilizando o mecanismo de silenciamento gênico e a análise de mutantes. In: VII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2005, Porto Alegre. **Livro de Resumos da VII Reunião do PPGBCM - CBIOT - UFRGS.** , 2005.

ABREU NETO, JB, BEVITÓRI, R., RICHTER, S., ZANETTINI, M.H., MARGIS-PINHEIRO, M. - Mutação por Inserção de transposon em arroz como ferramenta de genômica funcional de cereais In: XVIII Salão de Iniciação Científica, 2006, Porto Alegre - RS. **Livro de Resumos do XVIII Salão de Iniciação Científica / XV Feira de Iniciação Científica.** , 2006. p.326 – 326

ABREU NETO, JB, BEVITÓRI, R., RICHTER, S., ZANETTINI, M.H., MARGIS-PINHEIRO, M.

Transposon insertional mutagenesis in rice as a tool for cereal functional genomics In: 52º Congresso Brasileiro de Genética e 12º Congreso de la Asociación Latinoamericana de Genética, 2006, Foz do Iguaçu. **Resumos do 52º Congresso Brasileiro de Genética.** , 2006.

MATTEI, F., ABREU NETO, JB, RICHTER, S., SACHETTO-MARTINS, G., ZANETTINI, M.H., MARGIS-PINHEIRO, M.

Regeneração e transformação de arroz da cultivar EMBRAPA 7-TAIM In: 52º Congresso Brasileiro de Genética e 12º Congreso de la Asociación Latinoamericana de Genética, 2006, Foz do Iguaçu- PR. **Resumo do 52º Congresso Brasileiro de Genética.** , 2006.

CAVERZAN, A., TEIXEIRA, F. A. K., ABREU NETO, JB, MARGIS, R., MARGIS-PINHEIRO, M.

Análise funcional das isoformas cloroplásticas e mitocondrial de ascorbato peroxidase de arroz In: 57º Congresso Nacional de Botânica, 2006, Gramado-RS. **CD de Resumos do 57º Congresso Nacional de Botânica.** , 2006.

LIMA, J.C., ABREU NETO, JB, TEIXEIRA, F. A. K., MARGIS-PINHEIRO, M., FETT, J.P. Caracterização funcional dos genes OsFer1 e 2 na cultivar Nipponbare de arroz (*Oryza sativa* L. ssp japonica) por silenciamento gênico. In: 57º Congresso Nacional de Botânica, 2006, Gramado-RS. **CD de Resumos do 57º Congresso Nacional de Botânica.** , 2006.

ROSA, S.B., TEIXEIRA, F. A. K., ABREU NETO, JB, MATTEI, F., MARGIS, R., MARGIS-PINHEIRO, M.- O papel das isoformas citosólicas de ascorbato peroxidases de arroz (*Oryza sativa* L.) nas respostas de defesa In: 57º Congresso Nacional de Botânica, 2006, Gramado-RS. **CD de Resumos do 57º Congresso Nacional de Botânica.** , 2006.

BEVITÓRI, R., MARGIS-PINHEIRO, M., SILVEIRA, R. D. D., ABREU NETO, JB, SILVA, A. B., ORTEGA, J.M.

Genômica funcional: mutagênese insercional como fonte de descoberta de novos genes para o melhoramento do arroz. In: II Congresso Brasileiro da Cadeia Produtiva do Arroz/ VIII Reunião Nacional de Pesquisa do Arroz - RENAPA, 2006, Brasília -DF. **Anais da VIII Reunião Nacional de Pesquisa de Arroz -RENAPA.** , 2006. v.1.

ABREU NETO, JB, RAUBER, R., PEDRON, M., ARENHART, R. A., BEVITÓRI, R., ZANETTINI, M.H., MARGIS-PINHEIRO, M.

Gênômica Funcional Empregando Mutagênese Insercional em arroz (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) In: XI Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Gramado, Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Plant Physiology. Suplem.** , 2007. v.19.

ROSA, S.B., CAVERZAN, A., TEIXEIRA, F. A. K., SILVEIRA, J. A., FERREIRA-SILVA, S., ABREU NETO, JB, MARGIS, R., MARGIS-PINHEIRO, M. Functional characterization of cytosolic and peroxisomal isoforms of ascorbate peroxidase in rice (*Oryza sativa* L.) In: XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB), 2008, Tampere, Finland. **Physiologia Plantarum.** , 2008. p.147 – 147

ABREU NETO, JB, RICHTER, S., BEVITÓRI, R., ZANETTINI, M.H., MARGIS-PINHEIRO, M.

Caracterização funcional do gene Os01g0125600 pela obtenção de mutantes insercionais In: 54º congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador - BA. **Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética.** , 2008. p.267 – 267

Abreu-Neto, João, RICHTER, S., BEVITÓRI, R., ZANETTINI, M.H., Upadhyaya, NM, Margis-Pinheiro, Márcia

Functional characterization of the gene OsGMBP1 of rice (*Oryza sativa* L.) In: II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2009, Búzios, Rio de Janeiro. **II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas.** Ribeirão Preto- SP: SBG- Sociedade Brasileira de Genética, 2009. p.137 –

ABREU NETO, JB, MARGIS-PINHEIRO, M.

Identification and Characterization of HIPP genes in Rice In: 8th international Symposium on Rice Functional Genomics, 2010, Bento Gonçalves. **8th International Symposium on Rice Functional Genomics.** , 2010.

ABREU NETO, JB, MARGIS-PINHEIRO, M.

Analysis of the HIPP gene family in the rice genome In: III Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2011, Ilhéus - BA. **Resumos do III Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas.** Ribeirão Preto- SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2011. v.v1.

## PATENTE

MARGIS, M. M. A. N. P., MARGIS, R., ROSA, S. B., TEIXEIRA, F. A. K., LAZZAROTTO, F., CAVERZAN, A., ABREU NETO, J. B.

CONSTRUÇÃO GÊNICA, PROCESSO PARA MODULAR A RESPOSTA OXIDATIVA EM ARROZ, PROCESSO PARA MODULAR A TOLERÂNCIA DE PLANTAS DE ALUMÍNIO, 2009. Categoria: Produto e Processo. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: PI0900450. Data de depósito: 17/02/2009. Data de concessão: 14/12/2010. Depositante/Titular: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS..

Resumo: CONSTRUÇÃO GÊNICA, PROCESSO PARA MODULAR A RESPOSTA OXIDATIVA EM ARROZ, PROCESSO PARA MODULAR A TOLERÂNCIA DE PLANTAS AO ALUMÍNIO. A presente invenção proporciona: construções gênicas; processos para modular resposta oxidativa em arroz; e processos para modular a tolerância de plantas ao alumínio. Os objetos da invenção têm como conceito inventivo comum o uso de funcional de APX citosólicas (OsAPx1 e OsAPx2) e peroxissomais (OsAPx3 e OsAPx4) de arroz. Em uma concretização preferencial, os processos da invenção compreendem, entre outros, o silenciamento pós-transcricional por RNA de interferência (RNAi) dos genes individualmente e de ambos os genes codificantes de isoformas do mesmo compartimento subcelular. A redução da expressão de cada gene, assim como de ambos os genes de um compartimento, de acordo com a presente invenção, resulta no desenvolvimento de diferentes sinais. As plantas RNAi apresentam diferentes fenótipos e padrões de expressão transcricional dos genes da família OsAPx.

Instituição(ões) Financiadora(s): Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Home-page: [revista.inpi.gov.br/INPI\\_UPLOAD/Revistas/PATENTES2084.pdf](http://revista.inpi.gov.br/INPI_UPLOAD/Revistas/PATENTES2084.pdf). Finalidade: Patente BR200900450-A2 em 17 fev. 2009 (Depósito), International Patent Classification: C12N-015/53; C12N-015/67; C12N-015/82.