

NEGIN MOHAMMAD HUSSEINI

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM A PROTEÍNA  
MITOCONDRIAL DESACOPLADORA EM *Arabidopsis thaliana* (*AtUCP1-6*),  
ESTUDOS *IN VIVO* EMPREGANDO PLANTAS TRANSGÊNICAS E MAPEAMENTO  
DO SINAL DE ENDEREÇAMENTO DA PROTEÍNA AtUCP1

BOTUCATU-SP

2008

NEGIN MOHAMMAD HUSSEINI

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM A PROTEÍNA  
MITOCONDRIAL DESACOPLADORA EM *Arabidopsis thaliana* (AtUCP1-6),  
ESTUDOS *IN VIVO* EMPREGANDO PLANTAS TRANSGÊNICAS E MAPEAMENTO  
DO SINAL DE ENDEREÇAMENTO DA PROTEÍNA AtUCP1

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biociências, Universidade Estadual  
Paulista Júlio de Mesquita Filho para  
obtenção do título de Mestre em Ciências  
Biológicas (Genética)

Orientador: Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

Botucatu-SP

2008

## **Agradecimentos**

Para a realização desse trabalho, devo meus sinceros agradecimentos, em primeiro lugar, ao meu orientador professor Ivan de Godoy Maia por toda atenção, orientação e dedicação, os quais foram fundamentais para o meu processo de aprendizagem.

Um agradecimento especial a Regiane Degan Fávaro pela colaboração no trabalho, apoio, ensinamentos e pela amizade.

Aos companheiros do departamento Akemi, Ana Teresa, Antônio, Bonsai, Bruno, Carla, Débora, Edmárcia, Fábio, Roberto e Rodrigo, obrigada pelos momentos de camaradagem, aprendizagem, troca de idéias e experiências.

Às amigas Tamara, Jacqueline e Bianca pela convivência em todos esses anos, pela amizade, pelos momentos de alegria e companheirismo.

À professora Marta Mischan pelas análises estatísticas, ao Valdir pelas informações e materiais concedidos, e a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Por fim, agradeço aos meus pais por todo esforço, amor e dedicação.

## RESUMO

Inicialmente descrita no tecido adiposo marrom de mamíferos, a proteína mitocondrial desacopladora (uncoupling protein; UCP) permite a dissipação do gradiente de prótons criado pelas bombas redox da cadeia respiratória. A presença de uma UCP em plantas (pUCP) foi recentemente demonstrada. O presente projeto visou determinar a influência de diferentes estresses abióticos na expressão dos genes que codificam pUCP (*AtUCP1-6*) em *Arabidopsis thaliana*, bem como procurou estudar os aspectos funcionais desta proteína *in vivo*. Para tal, sementes de plantas transgênicas capazes de super expressar o gene *AtUCP1* foram utilizadas e germinadas em meios adicionados ou não de NaCl e Manitol. Parâmetros analisados, como índice de velocidade de germinação (IVG), revelaram um maior IVG para as sementes transgênicas em relação às do tipo selvagem, e que o estresse salino é mais bem tolerado pelas plantas transgênicas. Quanto à expressão dos genes *AtUCP1-6*, nenhuma alteração na expressão dos mesmos em resposta ao estresse salino induzido pelo tratamento com NaCl foi observada, exceção feita ao gene *AtUCP2*. Já em tratamento com Manitol, um aumento significativo da expressão relativa de três genes, *AtUCP2*, *AtUCP5* e *AtUCP6*, foi constatado, sugerindo que estes genes estão envolvidos na resposta adaptativa ao estresse osmótico e sujeitos a regulação transcricional, já que foram rapidamente induzidos pelo tratamento. Esses genes foram induzidos também pela aplicação de ácido abscísico no meio. Paralelamente, um estudo empregando a proteína fluorescente verde (GFP) como repórter foi empreendido a fim de investigar o domínio responsável pelo endereçamento mitocondrial da *AtUCP1*. Análises preliminares revelaram a participação da segunda unidade de repetição no transporte da *AtUCP1* à mitocôndria.

Palavras-chave: *Arabidopsis thaliana*, expressão gênica, plantas, proteínas desacopladoras e sinal de endereçamento.

## ABSTRACT

Initially described in the mammalian brown adipose tissue, the uncoupling mitochondrial protein (UCP) permits the dissipation of proton gradient created by the electron transport via the respiratory chain. The presence of a UCP in plants (pUCP) was recently shown. The present project aimed to determine the influence of different abiotic stresses on the expression profiles of the genes coding for pUCP (*AtUCP1-6*) in *Arabidopsis thaliana*, and sought to study the functional aspects of this protein *in vivo*. For such, we used seeds of transgenic plants capable to overexpress the *AtUCP1* gene, germinated on medium containing NaCl and Mannitol. Parameters analyzed, as the germination speed, revealed a greater rate for transgenic seeds compared to wild type, and that salt stress is better tolerated by the transgenic plants. Considering the expression of the *AtUCP1-6* genes, no changes in the expression profiles of the investigated genes in response to salt stress were observed, except for *AtUCP2*. On the other hand, a significant increase in the relative expression of three genes, *AtUCP2*, *AtUCP5* and *AtUCP6*, in response to mannitol was observed, suggesting that these genes are involved in the adaptive response to osmotic stress and subjected to transcriptional regulation, as they were rapidly induced by treatment. These genes were also induced by treatment with abscisic acid. Additionally, a study employing the green fluorescent protein (GFP) as a reporter was carried out to investigate the domain of *AtUCP1* responsible for mitochondrial targeting. Our preliminary analysis indicates that the second repetition unit is involved in the transport of *AtUCP1* to the mitochondria.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, gene expression, plant, uncoupling proteins and target signal.

## Sumário

Resumo

Abstract

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	09
1.1. A mitocôndria e seu papel.....	09
1.2. As proteínas mitocondriais desacopladoras (UCPs) .....	13
1.3. As UCPs em plantas.....	15
1.4. Papel das pUCPs em resposta a situações de estresse.....	17
1.5. A família gênica da UCP em <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	21
1.6. Endereçamento mitocondrial das pUCPs.....	22
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	25
<b>Capítulo I. Análise de germinação de sementes de tabaco</b>	
que superexpressam o gene <i>AtUCP1</i> .....	26
I.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
I.1.1. Esterilização e cultivo das sementes empregadas.....	26
I.1.2. Obtenção dos dados e análise estatística.....	28
I.2. RESULTADOS.....	30
<b>Capítulo II. Estudos de expressão gênica em <i>A. thaliana</i></b> .....	34
II.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
II.1.1. Cultivo das sementes de <i>A. thaliana</i> .....	34
II.1.2. Extração de RNA total e análise da expressão gênica por	
qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction).....	35
II.2. RESULTADOS.....	40

II.2.1. Extração de RNA total e análise da expressão gênica por qPCR.....	40
<b>Capítulo III. Estudo do sinal de endereçamento mitocondrial da proteína AtUCP1 com o emprego de GFP.....</b>	<b>43</b>
III.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
III.1.1. Preparação do material vegetal.....	43
III.1.2. Preparação do vetor contendo o cassete para transformação.....	44
III.1.3. Transformação de discos foliares de tabaco via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	45
III.1.4. Análises moleculares.....	49
III.1.5. Análise em microscopia.....	52
III.2. RESULTADOS.....	53
III.2.1. Confirmação da transformação das plantas obtidas.....	53
III.2.2. Análise da localização.....	55
<b>3. DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>57</b>
3.1. Análise de germinação de sementes de tabaco que super expressam o gene <i>AtUCP1</i> .....	57
3.2. Estudos de expressão gênica em <i>A. thaliana</i> .....	61
3.3. Estudo do sinal de endereçamento mitocondrial da proteína AtUCP1 com o emprego de GFP.....	65
<b>4. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>68</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>69</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>70</b>



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1. *A mitocôndria e seu papel*

A mitocôndria é uma das mais importantes organelas celulares, sendo responsável por muitos processos catabólicos fundamentais para a obtenção de energia para a célula. Seu número varia entre as células, sendo proporcional à atividade metabólica de cada uma.

As mitocôndrias apresentam duas membranas fosfolipídicas, uma externa lisa e outra interna que se dobra formando vilosidades, chamadas cristas (Figura 1) (revisto em Logan, 2006). A região limitada pela membrana mitocondrial externa e interna é chamada de espaço intermembranas, cuja concentração em metabólitos e íons é semelhante a do citosol, devido à permeabilidade da membrana mitocondrial externa. Já na região delimitada pela membrana mitocondrial interna, conhecida como matriz mitocondrial, estão localizadas as enzimas responsáveis pelo metabolismo oxidativo, bem como substratos, co-fatores, nucleotídeos, íons inorgânicos, e a maquinaria genética mitocondrial (DNA, RNA e ribossomos). A permeabilidade da membrana mitocondrial interna está restrita a  $O_2$ , ao  $CO_2$ , e a  $H_2O$ , sendo que o transporte de metabólitos se dá pelas proteínas transportadoras presentes na membrana.

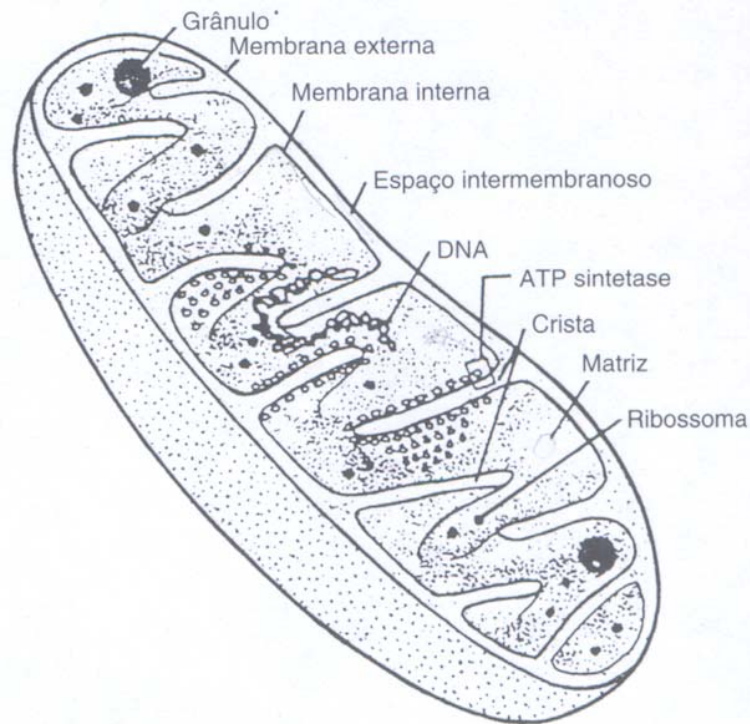


Figura 1 - Representação esquemática da mitocôndria. Fonte: Junqueira & Carneiro, 2000.

O processo de formação de energia inicia-se no compartimento citosólico, onde ocorre o catabolismo de carboidratos, lipídeos e às vezes de aminoácidos. O piruvato, proveniente da glicólise, e o ácido graxo, derivado dos lipídeos, são transportados pela membrana mitocondrial interna e são convertidos em acetil-CoA (acetil coenzima A) por um complexo enzimático localizado na matriz mitocondrial. Em condições anaeróbias, o piruvato é utilizado em outras vias metabólicas no processo de fermentação.

O acetil-CoA formado é oxidado pelo ciclo de Krebs, o qual corresponde a uma série de reações químicas. Dessa oxidação, há produção de  $\text{CO}_2$ , que é liberado pela célula como subproduto, e geração de elétrons de alta energia que são transportados pelas moléculas carreadoras reduzidas: NADH (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo) e  $\text{FADH}_2$  (flavina-adenina-dinucleotídeo).

Esses elétrons de alta energia são, então, transferidos para a membrana mitocondrial interna, onde entram na cadeia transportadora de elétrons. Nessa doação de elétrons NADH é oxidado a  $\text{NAD}^+$  e  $\text{FADH}_2$  a FADH.

A cadeia transportadora de elétrons está presente em muitas cópias na membrana mitocondrial interna. Também conhecida por cadeia respiratória, ela contém mais de 40 proteínas, das quais cerca de 15 estão diretamente envolvidas no transporte de elétrons. A maioria das proteínas envolvidas na cadeia transportadora de elétrons está agrupada em três grandes complexos enzimáticos respiratórios: complexo I ou NADH desidrogenase, complexo III ou citocromo  $\text{bc}_1$  e complexo IV ou citocromo c oxidase.

O movimento dos elétrons entre os componentes da cadeia transportadora de elétrons é dirigido pelo potencial de oxidação/redução. Em organismos aeróbicos, o destino final dos elétrons é o oxigênio molecular, o qual é reduzido para  $\text{H}_2\text{O}$  no último passo da cadeia transportadora de elétrons. Desta forma, o processo de oxidação dos substratos e redução do oxigênio é denominado de respiração celular.

O movimento dos elétrons ao longo da cadeia respiratória gera, pelos complexos, um bombeamento de um número fixo de prótons ( $\text{H}^+$ ) da matriz mitocondrial (região com baixa concentração de  $\text{H}^+$ ) para o espaço intermembrana da mitocôndria (região com alta concentração de  $\text{H}^+$ ). Esse bombeamento estabelece um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna.

Os prótons acumulados no espaço intermembranas tendem a retornar para a matriz através do complexo V, que funciona como um canal de prótons. Ao atravessar esse complexo, também chamado de ATP-sintetase,  $\text{F}_1\text{F}_0\text{-ATPase}$  ou ATPase, a energia conservada no gradiente de prótons através da membrana

mitocondrial interna é usada para a síntese de ATP, a partir da adição de um fosfato inorgânico ( $P_i$ ) ao ADP, num processo chamado fosforilação oxidativa. Dessa forma, a síntese de ATP está acoplada ao gradiente de prótons, que por sua vez, depende da impermeabilidade da membrana mitocondrial interna aos prótons, a qual estabelece um gradiente eletroquímico.

O acoplamento entre o transporte de elétrons na cadeia respiratória, o potencial de membrana e a fosforilação do ADP pode vir a ser rompido por intermédio de proteínas específicas da membrana mitocondrial interna, que podem funcionar como sistemas dissipadores de energia (Figura 2). Em plantas, duas importantes vias dissipadoras de energia são a oxidase alternativa (AOx) e as proteínas desacopladoras (uncoupling protein; UCP) (Mackenzie e McIntosh, 1999). As UCPs, objeto do presente estudo, serão descritas com maior detalhamento adiante.

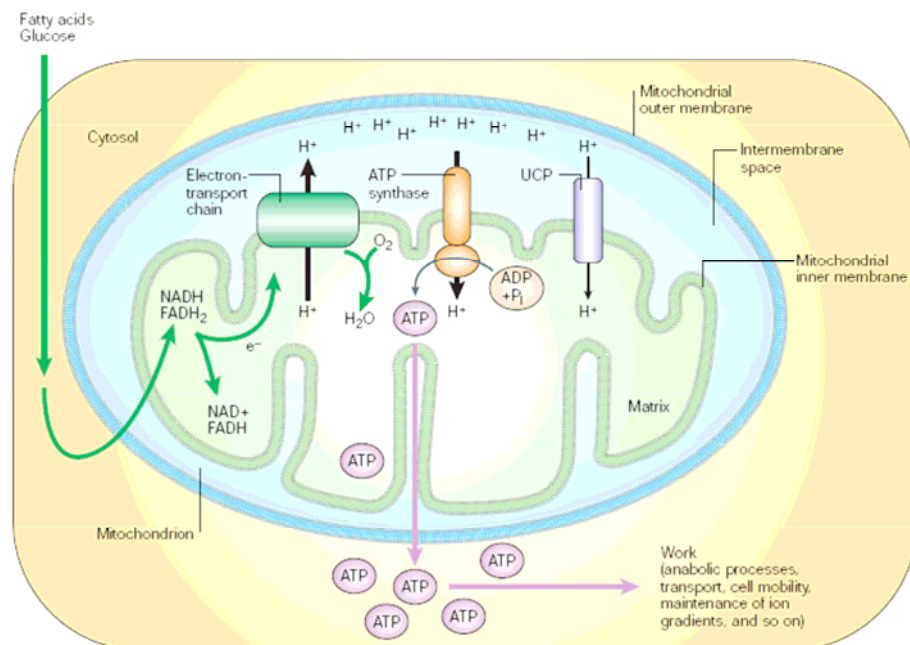


Figura 2 - Representação esquemática da cadeia transportadora de elétrons. A UCP está representada promovendo a entrada de prótons para a matriz. Fonte: Krauss *et al.* (2005).

## 1.2. As proteínas mitocondriais desacopladoras (UCPs)

A membrana mitocondrial interna, devido a sua permeabilidade restrita, é rica em proteínas carreadores que permitem o transporte de metabólitos como, ATP, ADP, piruvato,  $\text{Ca}^{+2}$  e fosfato. A família dos carreadores mitocondriais (MCF) (revista em Palmieri, 1994) é composta por proteínas com peso molecular entre 28 -34 kDa codificadas exclusivamente por genes nucleares (Borecký *et al.*, 2001).

Estes carreadores mitocondriais apresentam uma estrutura tripartida que consiste em três repetições, cada qual contendo duas regiões hidrofóbicas que formam  $\alpha$ -hélices transmembranas. As  $\alpha$ -hélices de cada repetição são conectadas por um *loop* hidrofílico localizado no lado matricial. Todas as proteínas carreadoras mitocondriais apresentam um motivo altamente conservado denominado *Energy Transfer Proteins Signature* – P-x-[DE]-x-[LIVAT]-[RK]-x-[LRH]-[LIVMFY] (Borecký *et al.*, 2001). As UCPs formam uma subfamília dentro da família dos carreadores aniônicos mitocondriais (MACF), apresentando a estrutura acima relatada.

A primeira proteína mitocondrial desacopladora, posteriormente denominada UCP1 (uncoupling protein 1), foi descoberta em tecido adiposo marrom de camundongo (Ricquier e Kader, 1976). A função fisiológica do tecido adiposo marrom, termogênese (sem tremor), está diretamente relacionada com a atividade da UCP1 presente nas numerosas mitocôndrias deste tecido. A função termogênica da UCP1 foi caracterizada em mamíferos hibernantes (Nicholls *et al.*, 1999), em mamíferos recém-nascidos adaptados ao frio (Argyropoulos *et al.*, 2002; Mozo, *et al.*, 2005), e durante a termogênese induzida por dieta em pequenos roedores (Erlanson-Albertsson *et al.*, 2003).

Em adição a UCP1, quatro outros membros da subfamília foram identificados em diferentes órgãos/tecidos de mamíferos: UCP2 com distribuição ubíqua; UCP3 em tecido adiposo marrom, tecidos cardíacos e músculo esquelético e UCP 4 e 5 em cérebro (Borecký *et al.*, 2001).

Devido à similaridade de suas seqüências com a UCP1 e semelhanças na atividade bioquímica, as UCPs 2 e 3 foram inicialmente relacionadas com a termogênese (Boss *et al.*, 1997a; Fleury *et al.*, 1997; Gimeno *et al.*, 1997). A função termogênica foi definitivamente abolida quando se demonstrou que camundongos nocautes para os genes *UCP2* e *UCP3*, quando expostos ao frio, apresentaram as mesmas respostas que camundongos selvagens (Arsenijevic *et al.*, 2000; Gong *et al.*, 2000; Vidal-Puig *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000).

Cabe ressaltar que além dos mamíferos, as UCPs estão presentes em vários organismos. A ampla distribuição dessas proteínas nos eucariontes foi evidenciada pela sua identificação em plantas (Vercesi *et al.*, 1995; Maia *et al.*, 1998), pássaros (Raimbault *et al.*, 2001; Talbot *et al.*, 2003; Vianna *et al.*, 2001), vertebrados exotérmicos, como sapos (Klein *et al.*, 2002) e peixes (Stuart *et al.*, 1999), *Drosophila* (Fridell *et al.*, 2004), e em eucariontes primitivos como *Caenorhabditis elegans* (Sokolova e Sokolov, 2005), *Acanthamoeba castellanii* (Jarmuszkiewicz *et al.*, 1999), *Dictyostelium discoideum* (Jarmuszkiewicz *et al.*, 2002), fungos (Cavalheiro *et al.*, 2004; Jarmuszkiewicz *et al.*, 2000), e no parasita *Plasmodium berghei* (Uemura *et al.*, 2000). Essa ampla distribuição sugere diferentes papéis fisiológicos para as UCPs que extrapolam a função termogênica descrita inicialmente para a UCP1.

### 1.3. As UCPs em plantas

A existência de um condutor de H<sup>+</sup> em mitocôndrias de plantas desempenhando funções similares a UCP só foi evidenciada em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) por Vercesi e colaboradores em 1995, sendo a mesma denominada PUMP (plant uncoupling mitochondrial protein), sendo a abreviação pUCP empregada atualmente. Estudos posteriores revelaram alto grau de homologia funcional e estrutural dessa para com a UCP1 (Jezek *et al.*, 1996, 1997). Foi atribuída a pUCP, a mesma função desempenhada pelas UCPs de mamíferos, ou seja, a de promover o transporte de prótons através da membrana mitocondrial interna dissipando o gradiente eletroquímico. Experimentos em lipossomos da proteína purificada vieram a confirmar tal função (Jezek *et al.*, 1997), sendo a sua atividade desacopladora ativada pela adição de ácido graxo e inibida na presença de ATP (Jaburek *et al.*, 1999; Borecký *et al.*, 2001).

Desde então, diversos cDNAs que codificam para proteínas desacopladoras em plantas foram identificados e isolados em diferentes espécies. O primeiro cDNA foi isolado por Laloi e colaboradores em 1997 a partir de uma biblioteca de cDNA de batata, e denominado *StUCP*. Verificou-se que a expressão deste gene é fortemente induzida em baixas temperaturas, sendo esta indução presente na maioria dos órgãos/tecidos da planta.

Posteriormente, dois homólogos da *StUCP* foram clonados e caracterizados em *Arabidopsis thaliana*, sendo denominados *AtUCP1* (Maia *et al.*, 1998) e *AtUCP2* (Watanabe *et al.*, 1999). A análise da expressão do gene *AtUCP1*

demonstrou que o mesmo é induzido pela exposição das plantas à baixa temperatura (4°C) e é ubíquo.

Genes que codificam proteínas desacopladoras foram subseqüentemente identificados tanto em plantas dicotiledôneas [*SfUCP* em repolho (Ito *et al.*, 1999) e *HmUCPa* em *Helicodiceros muscivorus* (Ito *et al.*, 2003)] como em monocotiledôneas [*WhUCP* em trigo (Murayama *et al.*, 2000), *OsUCP* em arroz (Watanabe *et al.*, 2002) e *ZmUCP* em milho (Brandalise *et al.*, 2003a)].

O desacoplamento promovido pelas UCPs é altamente regulado, embora seu mecanismo de ação ainda não seja totalmente claro. De maneira geral, se aceita que a inibição de sua atividade ocorra por nucleotídeos de purina di ou trifosfatos como ATP, ADP e GTP (Garlid *et al.*, 1996), e que sua ativação se dê pela presença de ácidos graxos livres. Dois diferentes modelos têm sido propostos para explicar o *modus operandi* dessa proteína: o modelo tamponante (Winkler e Klingenberg, 1994) e o modelo protonoforético (Garlid *et al.*, 1998; 2000).

No modelo tamponante, a UCP seria um canal de prótons, onde os ânions de ácidos graxos livres estariam inseridos na parede do canal e disponibilizariam seus grupos carboxila ao longo do trajeto dos prótons para a matriz (Figura 3A). Já no modelo protonoforético, os autores sugerem que as UCPs não transportam diretamente os prótons H<sup>+</sup>, mas sim ânions de ácidos graxos. Essa proposta teve como base estudos em que foi demonstrado que os ácidos graxos protonados penetram rapidamente através da membrana mitocondrial, sem a ajuda de um transportador (Skulachev, 1991). Após dissociação do H<sup>+</sup> na matriz alcalina, os ânions (que, por ter carga, não passam diretamente pela membrana) retornam ao meio externo pela ação das UCPs. Ao fazer o transporte indireto de H<sup>+</sup> para o interior da mitocôndria, através do movimento denominado “flip-flop” de ácidos



graxos, a UCP estaria promovendo o desacoplamento entre a respiração e a fosforilação oxidativa (Figura 3B).

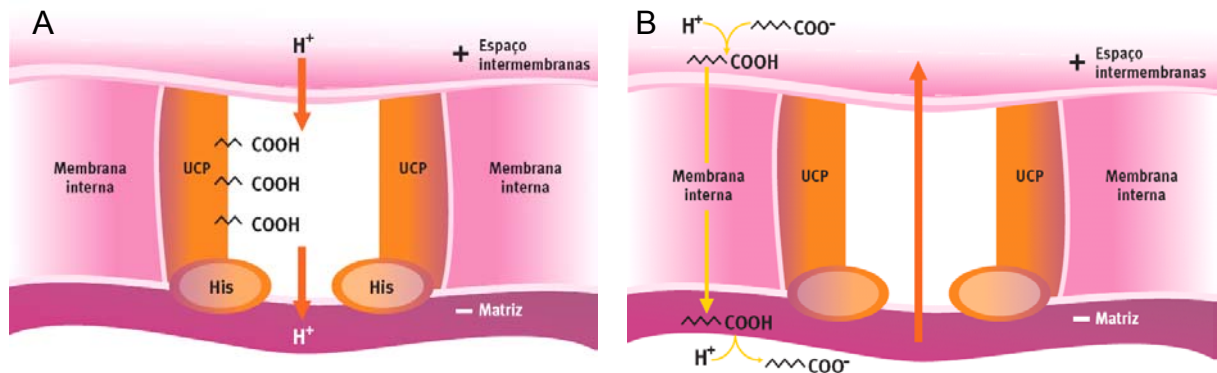


Figura 3 - A) Modelo do retorno de prótons ( $H^+$ ) para a matriz mitocondrial com a ajuda de ácidos graxos ( $wCOO^-$ ) que se ligariam à proteína desacopladora (UCP), representada como um retângulo na membrana interna da mitocôndria. B) Modelo do transporte de prótons em que o ácido graxo ligado ao próton ( $wCOOH$ ) atravessa livremente a membrana da mitocôndria para a matriz, onde perde o próton e retorna ao espaço intermembranas na forma aniônica ( $wCOO^-$ ) através da UCP. Fonte: Vercesi, 2003.

#### 1.4. *Papel das pUCPs em resposta a situações de estresse*

Dentre os vários papéis fisiológicos, ainda não muito claros, atribuídos às proteínas desacopladoras em plantas está o controle da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Há evidências de que a ativação da pUCP promove uma diminuição da geração de EROs pela cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de plantas (Kowaltowski *et al.*, 1998), o que pode resultar em implicações fisiológicas importantes como, por exemplo, a resposta a estresses.

Existem várias fontes de geração de espécies reativas de oxigênio celular em plantas, sendo algumas destas associadas a eventos fisiológicos do

metabolismo vegetal, como por exemplo, a fotossíntese e a respiração (Asada e Takahashi, 1987). As EROs podem promover lesões oxidativas em praticamente qualquer biomolécula. As mitocôndrias são particularmente propensas a tais lesões, já que as EROs são continuamente geradas pela cadeia respiratória (em dois sítios principais, os complexos I e III) ou produzidas pelo metabolismo de compostos endógenos na organela. São consideradas como as principais formas de EROs o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) e o óxido nítrico (NO) (Mittler, 2002).

Níveis toleráveis de EROs são produzidos continuamente pelas células podendo alcançar taxas máximas de produção de  $240 \mu M s^{-1} O_2^{\cdot-}$  e, um nível estável de  $H_2O_2$  ao redor de  $0,5 \mu M$  nos cloroplastos (Polle, 2001). Todavia, estas concentrações são compatíveis com a capacidade detoxificante do sistema antioxidante celular (Polle, 2001). Entretanto, situações adversas como patologias ou condições de estresses como, por exemplo, estresse hídrico, salino, baixa/alta temperatura, excesso de luminosidade, deficiência de nutrientes, metais pesados e radiação ultravioleta, estimulam a produção celular de EROs pelos aparatos fotossintéticos e pela respiração mitocondrial. Sob tais condições desfavoráveis, ocorre maior exigência quanto à capacidade do sistema antioxidante celular (Vercesi *et al.*, 1997). Na maioria das vezes, a célula é incapaz de suprir tal demanda tendo como resposta intolerância/impotência funcional do sistema, o que pode causar uma disfunção mitocondrial (Vercesi e Hoffmann, 1993).

Estudos recentes demonstraram que as pUCPs desempenham um papel indireto na regulação da formação desses radicais tóxicos, pois o desacoplamento entre a respiração e a fosforilação oxidativa, mediado pelas pUCPs, aumentaria a velocidade respiratória, levando a uma significativa redução na geração mitocondrial

de EROs (Kowaltowski *et al.*, 1998; Skulachev, 1996; Boveris e Chance, 1973; Nègre-Slavayre *et al.*, 1997; Popov *et al.*, 1997; Houron-Cabassa *et al.*, 2002). A atividade dissipativa, nesse caso, ajudaria a prevenir o estresse oxidativo (Maxwell *et al.*, 1999). O fato das UCPs serem ativadas pelas EROs sugere que um dos papéis fisiológicos dessas proteínas seja o de moderar a produção desses radicais durante o estresse abiótico (Vercesi *et al.*, 2006; Fernie *et al.*, 2004; revisto em Pastore *et al.*, 2007).

Nesse contexto, observou-se que a ativação da pUCP promoveu uma diminuição na geração de EROs pela cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de batata (Kowaltowski *et al.*, 1998). Resultados semelhantes foram observados quando proteínas desacopladoras de plantas foram expressas em levedura (Houron-Cabassa *et al.*, 2002). Pastore e colaboradores (2000; 2004) observaram que em trigo a atividade da pUCP é modulada por EROs através de um mecanismo de *feedback*. Deve-se ressaltar que a geração de EROs é aumentada em plantas submetidas a diferentes situações de estresse, e que a expressão de algumas pUCPs também é estimulada nestas condições (Laloi *et al.*, 1997; Maia *et al.*, 1998; Nantes *et al.*, 1999). Num estudo recente em trigo, foi sugerido que a pUCP deve atuar como um sistema antioxidante de defesa precoce em resposta ao estresse osmótico (Pastore *et al.*, 2004). Uma evidência adicional sobre o envolvimento das pUCPs na regulação do estresse oxidativo foi encontrada por Brandalise *et al.* (2003b). Nesse caso, os autores demonstraram que plantas transgênicas de tabaco que super expressam o gene *AtUCP1* apresentam alta tolerância ao estresse oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno.

Em outro trabalho relacionando a atuação da pUCP e o estresse osmótico, Trono e colaboradores não constataram um aumento na expressão de

dois genes relacionados a pUCP em plântulas de trigo submetidas a condições de estresse osmótico e salino, muito embora análises bioquímicas usando mitocôndrias isoladas tenham revelado um aumento da atividade desacopladora das proteínas relacionadas. Uma ressalva que se deve fazer a tais resultados é que como diferentes isoformas podem estar relacionadas com o aumento da atividade desacopladora nas mitocôndrias, uma análise de expressão de todos os genes que codificam pUCP em trigo deveria ter sido empreendida. Já no trabalho de Dlasková *et al.* (2006) observou-se um aumento na transcrição do gene *ZmUCP1* em cotilédones de milho submetidos a estresse salino, sendo que os altos níveis da proteína correlacionada estariam contendo o aumento da produção de EROs sob condições de estresse. Recentemente, Sweetlove *et al.* (2006) utilizando um mutante nocaute de *A. thaliana* para o gene *AtUCP1* verificaram que a ausência dessa proteína resultou em estresse oxidativo localizado e afetou a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>, sugerindo um forte papel da pUCP no metabolismo fotossintético dessa espécie.

Adicionalmente, verificou-se que a expressão dos genes que codificam pUCPs pode ser modulada em diferentes situações ambientais. Em estudos de expressão gênica em larga escala, esses genes aparecem como induzidos em condições de estresse biótico e abiótico tais como fermento (Cheong *et al.*, 2002), ataque de patógenos (Van Wees *et al.*, 2003; Whitham *et al.*, 2003), morte celular induzida por calor (Swidzinski *et al.*, 2002) bem como em resposta a determinados fitohormônios como, por exemplo, o ácido abscísico (ABA) (Seki *et al.*, 2002). O fato de tais genes serem induzidos em situações de estresse pode ser uma consequência direta da maior acumulação celular de EROs durante tais eventos, sendo esse o elemento indutor como discutido anteriormente. Corroborando tal

possibilidade, dentre os genes altamente induzidos por estresse oxidativo em *Arabidopsis* encontra-se um dos genes que codificam pUCP nessa espécie (Desikan et al., 2001).

### 1.5. A família gênica da UCP em *Arabidopsis thaliana*

O primeiro gene caracterizado codificando UCP em *A. thaliana*, *AtUCP1*, apresenta em seu cDNA uma fase aberta de leitura de 921 nucleotídeos que codifica uma proteína de 306 aminoácidos, com peso molecular estimado de 32 kDa (Maia et al., 1998). Após sua caracterização, outros estudos levaram à identificação de uma família gênica codificando UCPs nessa planta: *AtUCP1-6* (At3g54110; At5g58970; At1g14140; At4g24570; At2g22500; At5g09470). A disponibilidade da seqüência completa do genoma de *A. thaliana* permitiu também a localização desses genes nos diferentes cromossomos dessa espécie.

Os seis genes que codificam UCP em *A. thaliana* estão dispersos em cinco cromossomos: *AtUCP1* no cromossomo 3, *AtUCP2* e *AtUCP6* no cromossomo 5, *AtUCP3* no cromossomo 1, *AtUCP4* no cromossomo 4 e *AtUCP5* no cromossomo 2 (Nogueira et al., 2005; Borecký et al., 2006). A análise do genoma de *A. thaliana* revelou não existir uma estrutura genômica conservada entre os diferentes membros (Nogueira et al., 2005). As seqüências codificadoras dos genes *AtUCP1* e 2 estão distribuídas por nove éxons, já as dos genes *AtUCP3* e 6 estão concentradas em apenas dois éxons. A posição e tamanho dos íntrons também são variáveis (Borecký et al., 2001), sendo que os genes *AtUCP4* e 5 são desprovidos de íntrons. Em função de tais genes estarem localizados próximos às regiões duplicadas do

genoma de *A. thaliana*, foi sugerido que os mesmos tenham surgido por eventos de duplicação (Borecký, *et al.*, 2006).

No estudo conduzido por Borecký e colaboradores (2006), o perfil de expressão desses genes em diferentes órgãos/tecidos de *A. thaliana* foi investigado. Dos seis genes descritos, três (*AtUCP1*, *AtUCP4* e *AtUCP5*) apresentaram expressão ubíqua, um (*AtUCP2*) foi expresso exclusivamente em sílica verde e outro (*AtUCP3*) detectado exclusivamente em raiz. Por outro lado, não foi possível detectar os transcritos da *AtUCP6*. Em contrapartida, os transcritos correspondentes aos genes *AtUCP4* e *AtUCP5* foram os mais abundantes. Nesse mesmo trabalho foi constatado que os genes *AtUCP4* e *AtUCP5* são induzidos por baixa temperatura como anteriormente observado para o gene *AtUCP1* (Maia *et al.*, 1998).

#### 1.6. Endereçamento mitocondrial das pUCPs

O aspecto fundamental do endereçamento de proteínas para a mitocôndria trata da maneira pela qual as proteínas codificadas nuclearmente e sintetizadas no citoplasma atravessam as membranas mitocondriais. Muitos estudos neste sentido foram realizados em mitocôndrias de levedura e *Neurospora crassa* (Neupert, 1997), sendo que diferentes análises indicam que o transporte em mamíferos ocorre por mecanismos muito similares (Komiya *et al.*, 1996).

Nos compartimentos da mitocôndria (membranas interna e externa, matriz e espaço intermembrana) foram identificados quatro complexos protéicos de translocação, chamados “translocon”, com os quais as proteínas transportadas acabam interagindo de diferentes formas (Neupert, 1997; Agarraberes *et al.*, 2001).

Duby *et al.*, 2002)s. Dois estão presentes na membrana mitocondrial externa (Tom) e dois, na membrana mitocondrial interna (Tim). Porém, algumas proteínas podem ser importadas de maneira independente, provavelmente devido às suas habilidades para uma associação espontânea com a membrana mitocondrial ou com o “translocon”, sem ajuda dos receptores dos complexos (Rassow *et al.*, 2000).

Sinais de endereçamento são definidos como seqüências em pré-proteínas que são necessárias e suficientes para direcionar as proteínas para a mitocôndria. A maioria dos sinais de endereçamento está situada em segmentos N-terminais (pré-seqüências), e muitos desses sinais são processados após ocorrer a importação para a mitocôndria. Por outro lado, muitas proteínas contêm seqüências de endereçamento que não residem nas terminações N-terminais, mas internamente à seqüência primária de aminoácidos. A análise de sinais internos, especialmente por manipulação genética, é inerentemente difícil uma vez que alterações na seqüência de aminoácidos podem modificar a conformação geral da proteína e desse modo afetar a acessibilidade desses sinais (Neupert, 1997).

As UCPs são codificadas por genes nucleares e, após a tradução no citosol, são endereçadas para a mitocôndria. Embora endereçadas para a mitocôndria, as UCPs não apresentam sinais típicos de localização mitocondrial em sua seqüência de aminoácidos. Scheleiff e McBride (2000) procurando mapear os possíveis sinais internos de endereçamento presentes nas unidades repetitivas da UCP1, demonstraram que a primeira repetição, contendo dois segmentos de transmembrana e um loop hidrofóbico, era responsável pelo reconhecimento e inserção da UCP1, e de um marcador (Dihydrofolate redutase – DHFR) fusionado a esse sinal, na membrana externa mitocondrial. Tal sinal, porém, não era suficiente para promover a translocação da proteína através da mesma. Verificou-se, então,

que a região transmembrana central da referida proteína era responsável pela sua correta localização na mitocôndria. Em trabalho visando mapear a região responsável pelo endereçamento mitocondrial de uma UCP de trigo, Murayama & Handa (2005) realizaram a sua expressão em levedura e observaram que a região central age como a maior responsável pelo direcionamento da proteína, embora as outras regiões apresentem um fraco sinal de endereçamento. Em estudo recente, Sasaki (2003) demonstrou que a *AtUCP1* possui um sinal de endereçamento associado à sua região central, mas uma evidência experimental definitiva *in planta* da participação desse domínio no endereçamento ainda não foi obtida.



## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

- investigar, *in vivo*, o comportamento de plantas de tabaco transgênicas que super expressam o gene *AtUCP1* (Brandalise *et al.*, 2003b) frente ao estresse osmótico e salino.
- Investigar a expressão dos genes que codificam pUCP em *Arabidopsis thaliana* em resposta ao estresse osmótico e salino e a determinados fitohormônios.
- Investigar o papel do domínio central da proteína mitocondrial desacopladora de *Arabidopsis thaliana* (*AtUCP1*) envolvido no seu direcionamento para as mitocôndrias, usando-se de metodologias que permitam acompanhar a dinâmica e a localização de proteínas fusionadas a repórteres em tabaco transgênico.

## **Capítulo I: Análise de germinação de sementes de tabaco que super expressam o gene *AtUCP1***

Os resultados disponíveis na literatura evidenciam a participação da pUCP em importantes eventos fisiológicos, especialmente na resposta ao estresse oxidativo. Grande parte desses resultados, entretanto, foi obtida empregando mitocôndrias isoladas ou órgãos/tecidos destacados (folhas), não existindo, exceção feita ao trabalho de Sweetlove *et al.* (2006), dados funcionais de sua atividade *in planta*. A fim de fornecer subsídios para melhor compreender a funcionalidade desta proteína *in planta*, o comportamento de plantas de tabaco transgênicas capazes de super expressar o gene *AtUCP1* (Brandalise *et al.*, 2003b) frente a estresses geradores de EROs foi investigado. Nesse caso, a germinabilidade e a velocidade de germinação de sementes obtidas de tais plantas em situações de estresse salino e osmótico foi analisada.

### I.1. MATERIAL E MÉTODOS

#### I.1.1. Esterilização e cultivo das sementes empregadas

Foram utilizadas sementes de *Nicotiana tabacum* SR1 selvagem e de uma linhagem transgênica, P07, que expressa de maneira constitutiva o gene *AtUCP1* (Brandalise *et al.*, 2003b).

Todas as sementes passaram por um processo de esterilização antes de sua utilização. Primeiramente, as sementes foram embebidas em água Milli-Q por 1 hora. Em seguida, as sementes foram esterilizadas em etanol 70% por 1 minuto, lavadas com água Milli-Q autoclavada (2x), incubadas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 20 minutos, e lavadas novamente com água Milli-Q autoclavada (5x).

Após a esterilização, as sementes de tabaco selvagem (não transgênico), bem como as de tabaco transgênico, foram dispostas em placas de Petri contendo meio Murashige e Skoog (MS; Murashige & Skoog, 1962) e 0,23% de Phytigel (Sigma), com ou sem tratamento. As placas de Petri utilizadas continham uma divisão central permitindo a germinação simultânea das sementes transgênicas e selvagens, utilizadas como controle.

Para a indução de estresse salino e osmótico foram adicionados ao meio MS, cloreto de sódio (NaCl) na concentração de 125 mM e Manitol na concentração de 250 mM, respectivamente. Além disso, como controle positivo, foram usados os fitohormônios, ácido abscísico (ABA) na concentração de 0,1 mM e, aminociclopropano 1-ácido carboxílico (ACC) na concentração de 0,1 mM. As referidas concentrações foram definidas em testes preliminares de germinação empregando soluções com diferentes concentrações desses agentes, sendo as concentrações empregadas consideradas moderadas.

O teste de germinação foi realizado dispondo 25 sementes selvagens e 25 sementes transgênicas por placa de Petri, com três repetições (placas) por tratamento (controle sem estresse, NaCl 125 mM, Manitol 250 mM, ABA 0,1 mM e ACC 0,1 mM) (Figura 4). Após a semeadura, as placas permaneceram no escuro a 4°C por 24 h e posteriormente dispostas em câmara aclimatizada com fotoperíodo de 16 horas/dia de luz artificial e temperatura de 22 ± 2°C.

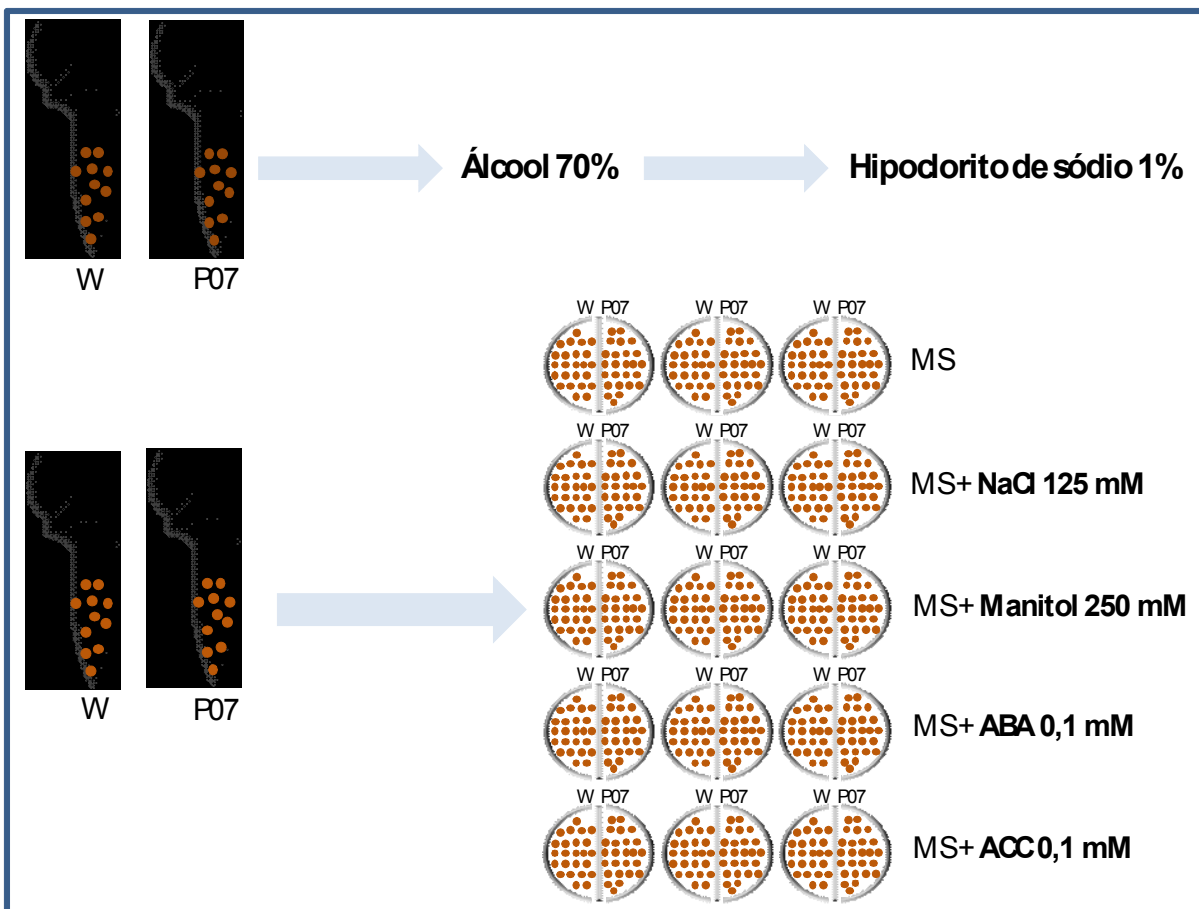


Figura 4 - Representação esquemática do processo de esterilização das sementes e a disposição das mesmas nas placas com os respectivos tratamentos.

### 1.1.2. Obtenção dos dados e análise estatística

As contagens do número de sementes transgênicas (P07) e não transgênicas (W) germinadas nos diferentes tratamentos foram efetuadas todos dias por um período de 20 dias, sendo a primeira delas realizada aos seis dias após a semeadura, a qual correspondeu à primeira germinação observada. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentavam a emissão de radículas possíveis de serem vistas a olho nu.

A porcentagem de germinação, ou germinalidade, foi calculada de acordo com Labouriau & Valadares (1976):

$$\%G=(S_{n_i}.N^{-1}).100$$

Em que:

**%G**= germinabilidade

$S_{n_i}$ = número total de sementes germinadas

$N^{-1}$ = número total de sementes semeadas (25)

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado pela somatória do número de plântulas normais germinadas a cada dia, dividido pelo número de dias decorridos entre a semeadura e a germinação, de acordo com a fórmula descrita por Maguirre (1962):

$$IVG=G_1/N_1+G_2/N_2+G_n/N_n$$

Em que:

IVG = Índice de velocidade de germinação.

$G_1$ ,  $G_2$  e  $G_n$  = número de sementes germinadas na primeira, segunda e última contagem.

$N_1$ ,  $N_2$  e  $N_n$  = número de dias após a semeadura.

Foi realizada análise de variância dos dados de germinabilidade e IVG, conforme um esquema fatorial com 2 fatores:

Fator A: tipo de sementes (W e P07);

Fator B: tratamento (controle, NaCl, Monitol, ABA e ACC).

O teste de análise foi o teste de Tukey e o nível de significância adotado foi  $\alpha = 0,05$ . Para verificar homogeneidade de variâncias foi aplicado o teste de Levene.

## I.2. RESULTADOS

Os números obtidos com as contagens foram plotados em gráficos tanto para comparação entre os tratamentos (Figura 5) quanto para comparação entre as sementes selvagens e transgênicas nos diferentes tratamentos (Figura 6).

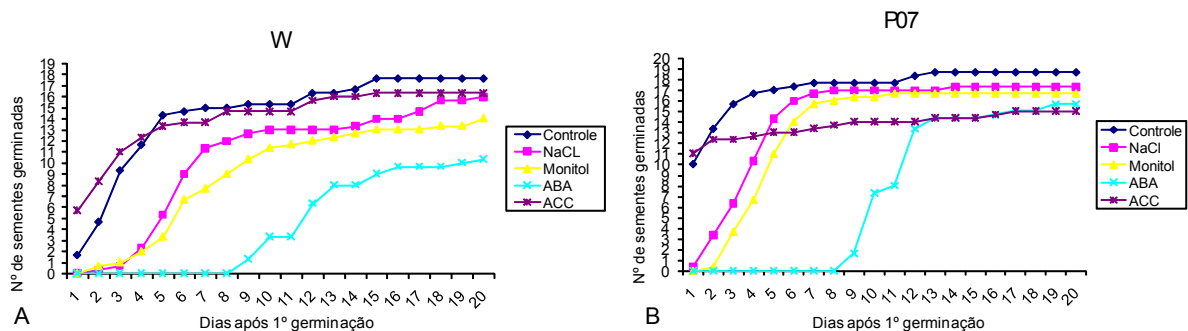


Figura 5 - Comparação do número de sementes selvagens (A) e transgênicas (B) germinadas em placas sem tratamento (controle) ou submetidas aos tratamentos com NaCl, Manitol, ABA e ACC.

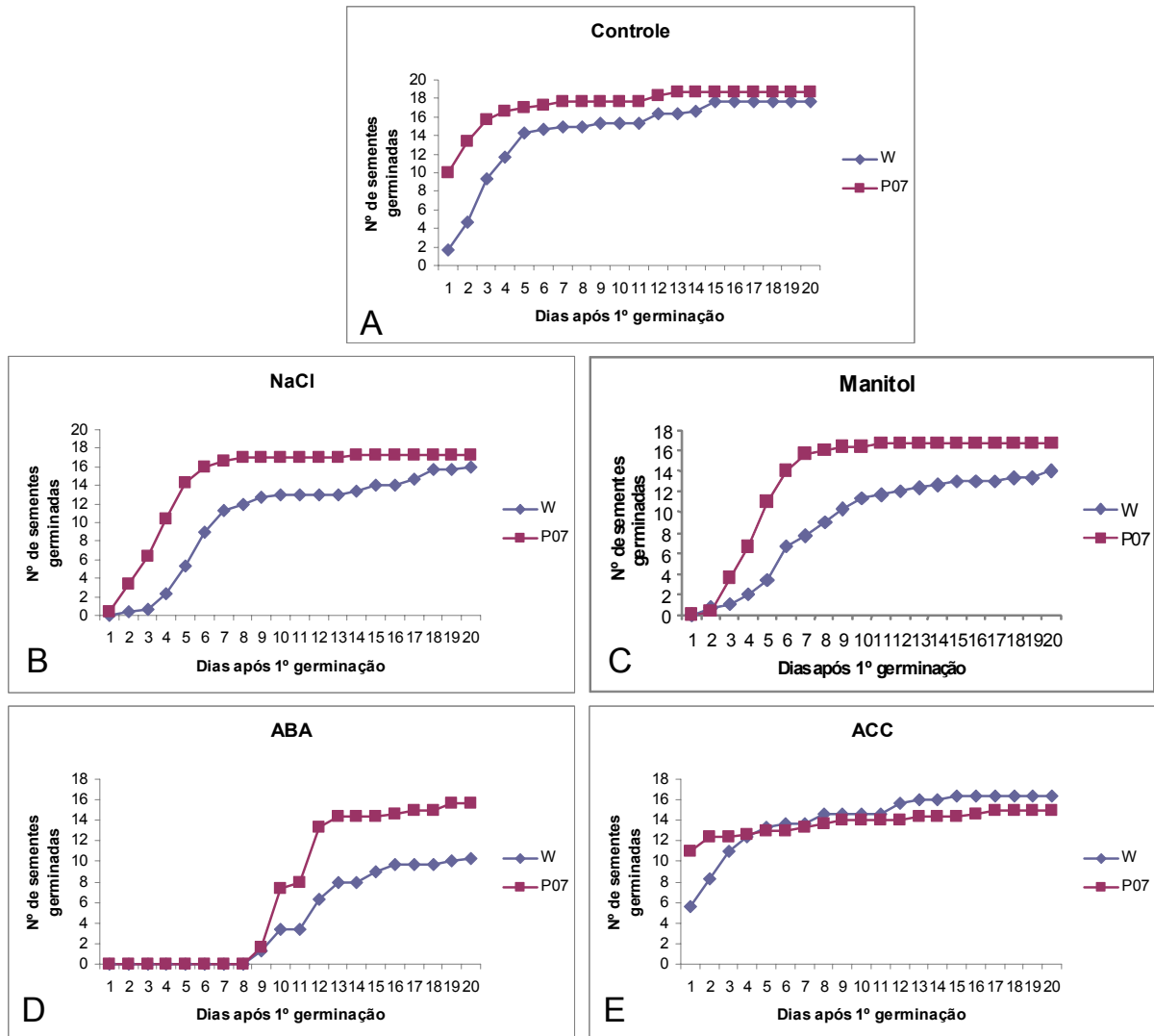


Figura 6 - Comparação do número de sementes selvagens germinadas em relação às transgênicas em placas sem tratamento (A) ou tratadas com NaCl (B), Manitol (C), ABA (D) e ACC (E).

A análise de variância dos dados de IVG mostrou efeitos principais significativos dos fatores estudados e não-significativos da interação entre eles. Para os dados de germinabilidade, a análise de variância não mostrou efeitos significativos dos fatores estudados e não houve interação entre eles (Tabela 1). Ou seja, para os dados de IVG, as diferenças observadas entre as médias das amostras foram estatisticamente significantes, existindo variação no IVG entre as sementes selvagens e transgênicas, bem como entre os tratamentos. Para a germinabilidade

não ocorreu variação significativa nem entre o tipo de sementes nem entre os tratamentos.

Tabela 1 - Valores do teste F da análise de variância para germinabilidade e IVG.

CAUSA DE VARIAÇÃO	GERMINALIDADE	IVG
A	1,67 <sup>ns</sup>	8,04 *
B	1,49 <sup>ns</sup>	11,90 *
A * B	0,62 <sup>ns</sup>	0,39 *

ns= não-significativo \*= significativo

O teste Tukey para comparar tratamentos revelou as diferenças apresentadas na Tabela 2 para IVG e na Tabela 3 para germinabilidade. É possível perceber, quanto ao IVG, que os tratamentos com manitol e ABA apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Já nos tratamentos com NaCl e com o fitohormônio ACC não foram detectadas diferenças significativas em relação ao controle. Quanto a germinabilidade, as médias são seguidas de mesma letra, o que revela a não existência de variação significativa em nenhum fator empregado.

Tabela 2 - Médias de IVG conforme A e B e comparação entre elas.

	W	P07	MÉDIAS DE TRATAMENTO
Controle	2,023	0,486	2,360 a
NaCl	1,36	1,956	1,658 ab
Manitol	1,163	1,713	1,438 bc
ABA	0,606	0,966	0,786 c
ACC	2,11	2,223	2,166 ab
Médias de W e P07	1,452 B	1,911 A	
CV	26,33%		

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.



Tabela 3 - Médias de germinabilidade conforme A e B e comparação entre elas.

	<b>W</b>	<b>P07</b>	<b>MÉDIAS DE TRATAMENTO</b>
<b>Controle</b>	17,67	18,67	18,17 a
<b>NaCl</b>	16,00	17,33	16,67 a
<b>Manitol</b>	14,00	16,67	15,33 a
<b>ABA</b>	10,33	15,67	13,00 a
<b>ACC</b>	16,33	15,00	15,67 a
<b>Médias de W e P07</b>	14.867 A	16.667 A	
<b>CV</b>	24.179%		

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

## **Capítulo II. Estudos de expressão gênica em *A. thaliana***

Poucos são os trabalhos da literatura que têm procurado desvendar o perfil de expressão e a regulação dos genes que codificam UCPs em plantas. Estudos com tal enfoque são imprescindíveis, pois tendem a revelar padrões de expressão específicos que podem estar diretamente relacionados com as funções desempenhadas pelos diferentes genes que compõe as famílias multigênicas presentes em plantas, bem como evidenciar a existência ou não de redundância funcional entre eles.

Levando em consideração as observações acima, um estudo visando analisar de forma detalhada a expressão dos genes que codificam as seis isoformas de pUCP em *A. thaliana*, *AtUCP-1*, *2*, *3*, *4*, *5* e *6* (Borecký *et al.*, 2006), em resposta a estímulos externos [estresse salino (NaCl) e osmótico (Manitol)] e endógenos [fitohormônios (ácido abiscísico - ABA e aminociclopropano 1-ácido carboxílico - ACC)] foi iniciado. Para tal foram empregados os mesmos tratamentos/doses utilizados nos ensaios de germinação relatados no Capítulo I: NaCl 125 mM, Manitol 250 mM, ABA (0,1 mM) e ACC (0,1 MM).

### II.1. MATERIAL E MÉTODOS

#### II.1.1. *Cultivo das sementes de A. thaliana*

Sementes de *A. thaliana* (ecótipo Columbia) foram embebidas em água

Milli-Q por 1 hora, e em seguida esterilizadas segundo protocolo descrito no capítulo anterior. Após esterilização, as sementes foram dispostas em placas de Petri contendo meio MS (Murashige e Skoog, 1962) e 0,23% de Phytigel (Sigma). As placas permaneceram no escuro a 4°C por 24 h, sendo posteriormente mantidas em câmara climatizada com fotoperíodo de 16 horas/dia de luz artificial e temperatura entre 20-22°C. Três semanas após a germinação, as plântulas foram submetidas aos diferentes tratamentos: NaCl 125 mM; Manitol 250 mM; ABA 0,1 mM e ACC 0,1 mM e amostradas em diferentes tempos (0, 12, 24 e 48 h) para posterior extração de RNA total.

#### II.1.2. *Extração de RNA total e análise da expressão gênica por qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction).*

Para a extração de RNA total utilizou-se o reagente Trizol (Invitrogen) segundo protocolo descrito pelo fabricante, mas com pequenas modificações. Plântulas de *A. thaliana* submetidas aos diferentes tratamentos foram maceradas em nitrogênio líquido. Um ml de Trizol foi então adicionado à cerca de 100-200 mg do tecido macerado e procedeu-se a homogeneização em agitador. Após incubação por 5 minutos a temperatura ambiente as amostras foram centrifugadas a 12000xg por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi coletado seguido da adição de 200 µl de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada em agitador e, após incubação por mais 3 minutos a temperatura ambiente, centrifugada a 12000xg por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo ao qual foram adicionados 500 µl de isopropanol. Após incubação por 60 minutos a -20°C e centrifugação por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e o sedimento lavado com 1 ml de etanol 70 %.

Após uma nova centrifugação a 7500xg por 5 min a 4°C, o sedimento foi seco e ressuspenso em 30 µl de H<sub>2</sub>O tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

A integridade do RNA total extraído foi determinada por eletroforese em gel desnaturante (1,85% de formaldeído) de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Amostras de RNA total (~2 µg) tratadas com DNase I (Fermentas) foram submetidas a transcrição reversa utilizando-se oligo dT17VN (2 µM) e *SuperScript<sup>TM</sup> III Reverse Transcriptase* (Invitrogen), segundo as informações do fabricante. O produto da transcrição reversa foi quantificado utilizando-se o *ND-1000 Spectrophotometer* (NanoDrop Technologies).

Para a quantificação da expressão gênica por qPCR, amostras de cDNA na concentração de 60 ng/µl foram diluídas 10x. Os oligonucleotídeos gene-específicos listados na Tabela 4 foram desenhados no programa “Primer Express”. Considerando a alta identidade existente entre as isoformas analisadas, os oligonucleotídeos gene-específicos foram posicionados na região 5’UTR (região não traduzida). Os componentes da reação de amplificação estão listados na Tabela 4. A reação composta por um ciclo prévio a 50°C por 2 min e 95°C por 10 min, seguido de um ciclo de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento e extensão a 62°C por 1 min, repetido por quarenta vezes. Após a amplificação foi adicionado um passo de dissociação pela elevação da temperatura de 60°C para 95°C, subindo 1°C por minuto. Este procedimento serviu para verificar a especificidade dos oligonucleotídeos utilizados ou a formação de “primers-dimers”. A eficiência de reação (E) foi calculada para cada par de oligonucleotídeos utilizando-se o programa LingRegPCR (Ramakers *et al.*, 2003), considerando um intervalo ótimo de eficiência entre 1,8-2,2. O modelo matemático (1) utilizado para a análise da expressão

relativa foi baseado em Pfaffl (2001). Para a utilização deste modelo é necessária a determinação do “crossing point” (CP) para cada transcrito. O CP é definido como o ponto no qual a emissão da fluorescência é superior ao “background”.

$$R = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta CP_{\text{alvo}} (\text{controle} - \text{amostra})}}{(E_{\text{referência}})^{\Delta CP_{\text{preferência}} (\text{controle} - \text{amostra})}} \quad (1)$$

Em que:

R= razão de expressão relativa

$E_{\text{alvo}}$ = eficiência de reação de gene alvo

$E_{\text{referência}}$ = eficiência de reação de gene referência

$\Delta CP_{\text{alvo}}$ = CP controle (tempo zero) – CP tratamento (12, 24 ou 48 horas)

$\Delta CP_{\text{preferência}}$ = CP controle (tempo zero) – CP tratamento (12, 24 ou 48 horas)

Tabela 4 – Componentes da reação de qPCR.

REAGENTES	QUANTIDADE/CONCENTRAÇÃO
<b>cDNA</b>	0,48 ng/ $\mu$ l
<b>Sybr Green Master Mix*</b>	50% da reação
<b>Oligo “forward”</b>	0,4 $\mu$ M
<b>Oligo “reverse”</b>	0,4 $\mu$ M
<b>H<sub>2</sub>O tratada com DEPC</b>	cpv 12,5 $\mu$ l

\* Produto da Applied Biosystems.

Tabela 5 - Oligonucleotídeos empregados nas análises de expressão relativa.

GENE	NÚMERO DE ACESSO*	SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS (5'-3')	TAMANHO DO FRAGMENTO (pb)
<b>AtUCP1</b>	TC271062	GATGGTGGCGGCTGGTA CGCCGACGCAAGCAG	77
<b>AtUCP2</b>	TC264719	CATAACAATGGCGGATTTCAA CGCTGCAAATGAAGTTTCA	65
<b>AtUCP3</b>	TC273718	GGAGCCGAGTGACCAGAGAA CGCAGAGAGTGAAGCAAGCA	62
<b>AtUCP4</b>	TC251734	TCGTTGAAGGTGGGATTGC CTTGATTAGATCGAGAGGGTGAGT	65
<b>AtUCP5</b>	TC270882	CGACCCACCCGCTTGAT GCTGGTCGGAGATTGGTTTG	82
<b>AtUCP6</b>	TC269710	AATCTTCCCGTGAACCTTACC AAGGAAATGCTGCCGATGAG	65
<b>FDH</b>	AT5G43940	ATTGATCCTACTGCTCCTTTGG CCAAGGCCAGTGGGAACA	67
<b>40S</b>	AT2G09990	CGACTCTCTGCGTTAGGTTTCA GGGTTTCTCCTTGCTTTTGCT	62
<b>AtS1A</b>	X13611	CATCAGTTTCGTTGCCTACAAG GGTTTACACAAAAGCAAAGGGAA	67
<b>RD29A</b>	AT5G52310	TCACTTGGCTCCACTGTTGTTC TCCAAAGTGAACCTTGAATCTC	79
<b>PDF1.2</b>	At5g44420	TCTTCGCTGCTCTTGTTCTCTT TTCTGTGCTTCCACCATTGC	61
<b>AtbZip39</b>	AT2G36270	CAGCAACAGCTTTATGGTGTGTT GCTTGACCCGGAATGAA	59

\* O número de acesso é referente às seqüências depositadas nos bancos de dados GenBank, Tair ou Tigr.

A fim de verificar a efetividade dos diferentes tratamentos aos quais as plântulas foram submetidas, uma busca por genes induzidos pelos tratamentos em estudo foi realizada. Os genes *AtS1A*, que codifica a pequena subunidade da rubisco (small subunits of the rubisco; Charrier *et al.*, 2002), *RD29A* (desiccation-responsive gene; Nakashima *et al.*, 2006), *PDF1.2*, que codifica uma proteína antifúngica (Arroyo *et al.*, 2003), e *AtbZip39*, que codifica um fator de transcrição do tipo bZip (Lorenzo *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2004), são descritos na literatura como induzidos por manitol, NaCl, ACC e ABA, respectivamente. Oligos para amplificação dos transcritos correspondentes foram usados como controle positivo de indução (Tabela 5).

Para as análises de expressão relativa foram selecionados genes de referência que não fossem influenciados pelos tratamentos. O gene *FDH* que codifica uma formaldeído desidrogenase (Dolferus *et al.*, 1997) foi utilizado como normalizador nos tratamentos com ABA e ACC, enquanto que o gene *40S* que codifica a subunidade S16 da proteína ribossomal 40S (Kreps *et al.*, 2002) foi utilizado nos tratamentos com NaCl e Manitol.

A fim de verificar a correta amplificação de cada isoforma pelo qPCR, os respectivos produtos de amplificação foram clonados em vetor pGEM-Teasy e posteriormente seqüenciados. Por se tratar de fragmentos pequenos (entre 62 e 82 pb) foram obtidos clones apenas para os genes *AtUCP3* e *AtUCP5*. As seqüências de nucleotídeos dos referidos produtos apresentaram 100% de similaridade com as seqüências desses genes depositadas no banco de dados.

## II.2. RESULTADOS

### II.2.1. Extração de RNA total e análise da expressão gênica por qPCR

Para a análise da expressão dos genes *AtUCP1-6* em resposta a diferentes tratamentos (NaCl, Manitol, ABA e ACC) foram extraídas amostras de RNA total de plântulas de *A. thaliana* submetidas aos mesmos. A integridade do RNA total foi verificada em gel desnaturante de agarose corado com brometo de etídeo (Figura 7). Após a síntese de cDNA, as amostras foram quantificadas utilizando-se um aparelho Nanodrop, visando às análises de qPCR.

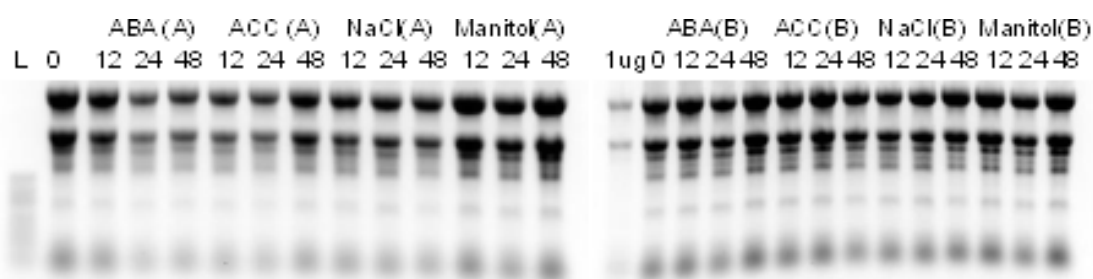


Figura 7- Gel desnaturante de agarose 1% corado com brometo de etídeo contendo o RNA total extraído das plântulas submetidas aos diferentes tratamentos (ABA, ACC, NaCl e Manitol) após 12, 24 e 48 horas. Os experimentos foram feitos em duplicatas biológicas denominadas A e B. Na figura, L e 1 µg representam o Ladder de RNA e uma amostra de concentração conhecida previamente, respectivamente. As bandas detectadas representam as subunidades ribossomais. Imagem invertida.

As análises de expressão relativa revelaram que todas as isoformas investigadas (*AtUCP1*, 2, 3, 4, 5 e 6) foram amplificadas nas amostras de cDNA provenientes dos tratamentos com NaCl, manitol e ABA. Foram consideradas



significativas as variações na expressão relativa maiores que dois e não relevantes àquelas situadas abaixo de dois.

Na Figura 8 estão apresentados os resultados de quantificação da expressão relativa dos seis genes investigados em resposta aos diferentes tratamentos. Nas análises relativas ao tratamento com ACC não foi possível observar uma variação significativa no perfil de expressão de cinco dos seis genes investigados (Figura 8.1), sendo que um deles (*AtUCP6*) não foi detectado. No tratamento com ABA foi possível observar um aumento na expressão relativa, 12 horas após o tratamento, dos genes *AtUCP2* (2,33x), *AtUCP5* (2,02x) e *AtUCP6* (3,14x) (Figura 8.2). Por outro lado, nenhuma alteração no perfil de expressão dos referidos genes em resposta ao tratamento com NaCl foi observada, exceção feita ao gene *AtUCP2* cuja expressão foi aumentada após 12 horas com subsequente queda (Figura 8.3). Já para o tratamento com manitol foram observadas mudanças significativas na expressão relativa de três genes (*AtUCP2*, *AtUCP5* e *AtUCP6*; Figura 8.4), o que demonstra que os mesmos são responsivos ao estresse osmótico. Para os genes *AtUCP2* e *AtUCP5*, o maior aumento foi observado 12 horas após o tratamento (2,3x e 2,36x, respectivamente), enquanto que para o gene *AtUCP6*, esse aumento só foi perceptível após 24 horas (2,06x) atingindo um pico após 48 horas (2,62x).

Os genes endógenos *FDH1* e *40S* apresentaram um perfil inalterado face aos tratamentos, podendo portanto ser utilizados como normalizadores nas análises de expressão relativa. A confirmação dos efeitos dos tratamentos realizados foi validada pela indução observada para os genes *AtS1A*, *RD29A* (9,4x após 12h), *PDF1.2* (14,47x após 24h) e *AtbZip39*.

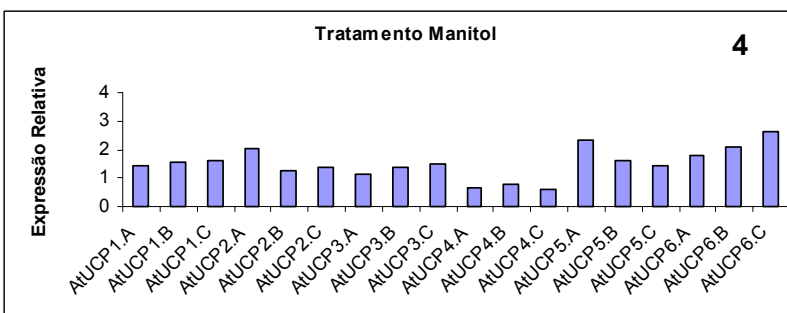
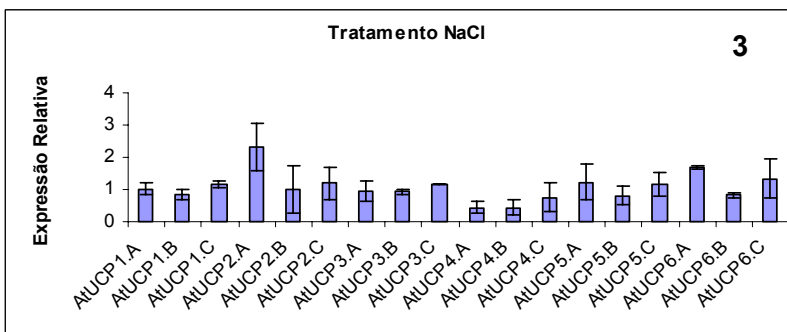
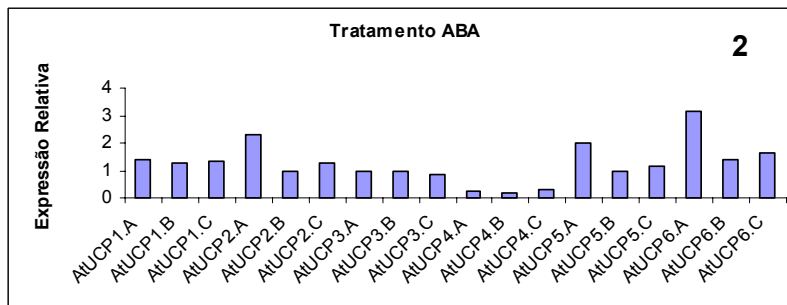
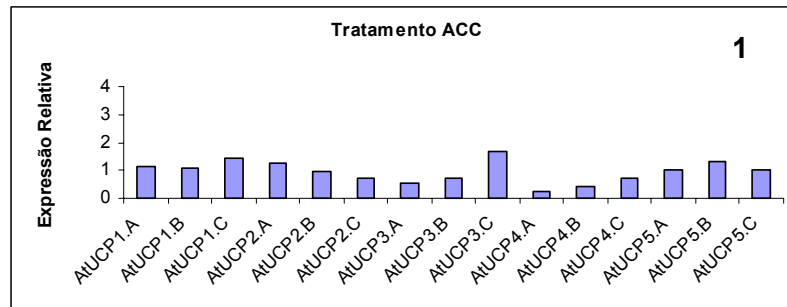


Figura 8 - Análise da expressão relativa dos genes *AtUCP1-6* após 12 (A), 24 (B) e 48 (C) horas de tratamento. As análises da expressão relativa foram feitas usando como normalizadores, o gene endógeno *FDH1* para os tratamentos com ACC e ABA, e o gene *40S* para os tratamentos com NaCl e Manitol.

### **Capítulo III. Estudo do sinal de endereçamento mitocondrial da proteína AtUCP1 com o emprego de GFP**

Esse trabalho foi desenvolvido a fim de se obter uma evidência experimental definitiva sobre a participação do domínio central da proteína AtUCP1 no seu endereçamento à mitocôndria, uma vez que experimentos anteriores evidenciaram que a AtUCP1 possui um sinal de endereçamento associado a essa região (Sasaki, 2002).

#### III.1. MATERIAL E MÉTODOS

##### III.1.1. *Preparação do material vegetal*

Foram utilizadas plantas de tabaco - *Nicotiana tabacum* SR1 – cujas sementes passaram por um processo de esterilização antes de sua utilização. Primeiramente, as sementes foram embebidas em água Milli-Q por 1 hora, e em seguida esterilizadas segundo protocolo descrito no capítulo I.

Após a esterilização, as sementes foram dispostas em placas de Petri contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962) adicionado de Phytogel (0,23 %) e vitaminas. Três semanas após a germinação, as plântulas foram transferidas para placas com meio MS fresco e, assim que atingiram aproximadamente 1 cm, foram transferidas para um suporte de cultivo *in vitro* contendo meio MS sólido e vitaminas. Quando as plântulas atingiram aproximadamente 10 cm, a região contendo o meristema apical foi cortada e transferida para novo suporte contendo meio MS

sólido, e suas folhas foram usadas para a obtenção dos discos foliares para transformação. Durante todo esse processo, as sementes e as plântulas foram mantidas em câmara climatizada sob condições controladas (fotoperíodo de 16 horas/dia de luz artificial e temperatura entre  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

### III.1.2. *Preparação do vetor contendo o cassete para transformação*

Um cassete de expressão contendo a região codificadora do domínio central da proteína AtUCP1 (aminoácidos de 105 a 205; 303 nucleotídeos) fusionada a mGFP4 (*Green Fluorescent Protein*; 714 nucleotídeos; nº de acesso U87624) sob controle de um duplo promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV) e do terminador da nopalina sintetase (NOS) foi utilizado para a transformação estável de tabaco. Esse cassete, previamente construído (Sasaki, 2002) e inserido no plasmídeo pBIGFP, foi isolado por digestão com enzimas de restrição (*HindIII* e *EcoRI*) e após purificação em gel de agarose, subclonado no vetor de transformação de plantas pBI121 (Clontech) igualmente digerido (Sambrook *et al.*, 1989) (Figura 9).

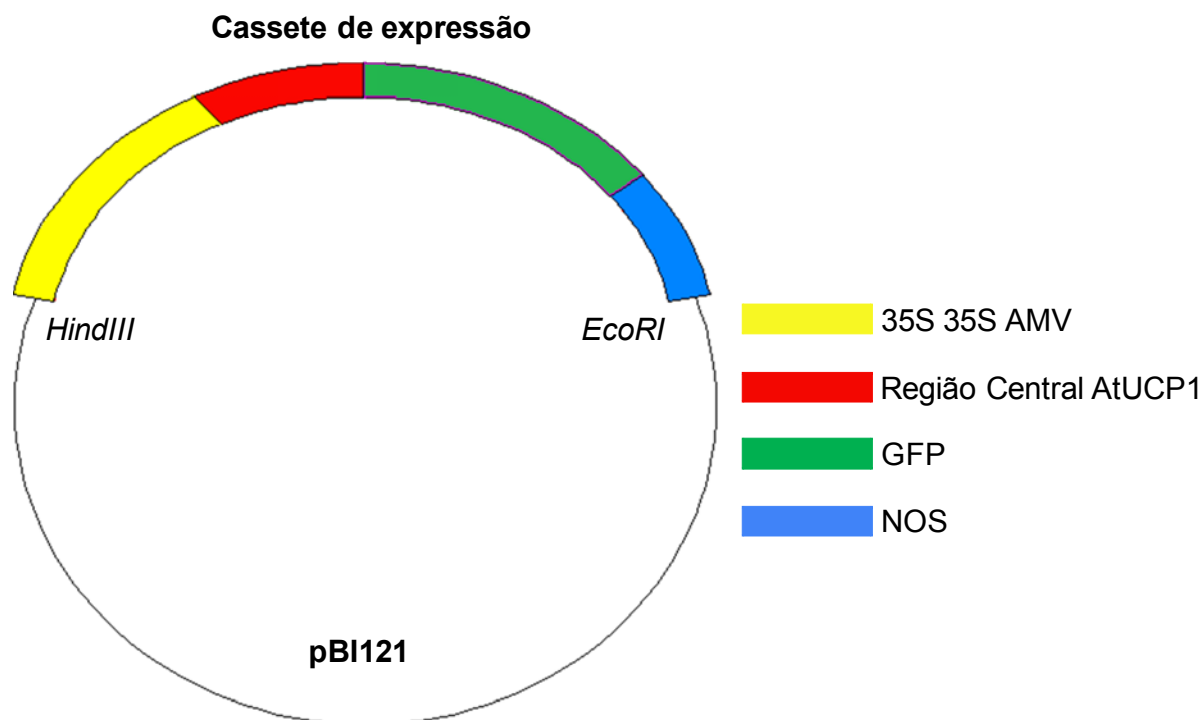


Figura 9 - Representação esquemática do cassete de expressão contendo a região central da AtUCP1 inserido no vetor de transformação de plantas pBI121 (Clontech). As regiões apresentadas não estão em escala.

O produto de ligação foi transformado em *Escherichia coli* tornadas competentes utilizando uma solução de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M (Sambrook *et.al.*, 1989). A fim de verificar a real inserção do fragmento desejado foi realizada a digestão do DNA plasmidial isolado dos clones transformados com as enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRI*. A correta inserção do fragmento clonado em relação ao gene repórter (mGFP4) foi confirmada por sequenciamento empregando um sequenciador automático ABI-PRISMA 3100 (Perkin-Elmer).

### III.1.3. *Transformação de discos foliares de tabaco via Agrobacterium tumefaciens*

Após a obtenção dos recombinantes em *Escherichia coli*, o vetor resultante foi inserido em *Agrobacterium tumefaciens* (LBA 4404). As bactérias transformadas foram selecionadas em placas de Petri contendo meio LB sólido e os antibióticos rifampicina (100mg/l), estreptomicina (25mg/l) e canamicina (100mg/l). Para verificação da real transformação da agrobactéria, as colônias resultantes tiveram os seus plasmídeos purificados por miniprep (Sambrook *et al.*, 1989) e a presença do cassete de interesse foi confirmada por reação de PCR, usando oligos específicos para a GFP e para a região central da AtUCP1.

Para a transformação dos discos de folha, uma colônia isolada de agrobactéria foi inoculada em meio LB líquido contendo os antibióticos descritos e então crescidas a 28°C sob agitação de 200 rpm até alcançar uma  $A_{600}$  de 0,1 a 1,5. Em seguida, 1 ml desse meio foi diluído com LB líquido até atingir uma  $A_{600}$  de 0,1. Esse volume foi então completado com LB para 10 ml num tubo Falcon, e o processo de transformação de discos foliares iniciado segundo protocolo descrito por Horsch (1985) (Figura 10).

Os discos foliares foram extraídos a partir de folhas jovens de tabaco cujas plantas foram mantidas *in vitro*, livres de qualquer contaminação. Os discos foram mergulhados no meio líquido contendo as agrobactérias transformadas com o vetor de interesse e aí permaneceram por 5 minutos. Logo após, os discos foram secos em papel de filtro e transferidos para placas com meio MS sólido contendo vitaminas e os hormônios BAP - 6-benzilaminopurina - (2mg/l) e ANA – ácido naftalenoacético – (0,1mg/l). Foram colocados de 8 a 9 discos em cada placa,

dispostos com a face adaxial da folha em contato com o meio. Essas placas permaneceram em câmara climatizada, envoltas por alumínio, durante 48 horas. Após esse tempo, os discos foram transferidos para placas com meio MS, vitaminas, hormônios BAP e ANA, o bacteriostático cefotaxima (300mg/l), para evitar crescimento das agrobactérias remanescentes, e o antibiótico canamicina (100mg/l), para selecionar as células transformadas. Os discos permaneceram nessas placas por 20 dias até o surgimento de calos. Os calos foram então cortados e transferidos para novas placas contendo o agente de seleção e a partir dos mesmos foram obtidos os brotos. Esses foram então transferidos para vidros com meio MS sólido contendo antibióticos e o hormônio ANA visando a indução de enraizamento.

As plântulas, uma vez enraizadas, foram transferidas para copos descartáveis de 300 ml contendo terra vegetal e vermiculita, na proporção de 2:1, sendo os mesmos dispostos em bandejas. Essas bandejas foram mantidas em câmara aclimatizada até que as plantas atingissem um certo crescimento (~30 cm), e então, as mesmas foram transferidas para vasos com terra e areia e mantidas em casa de vegetação.

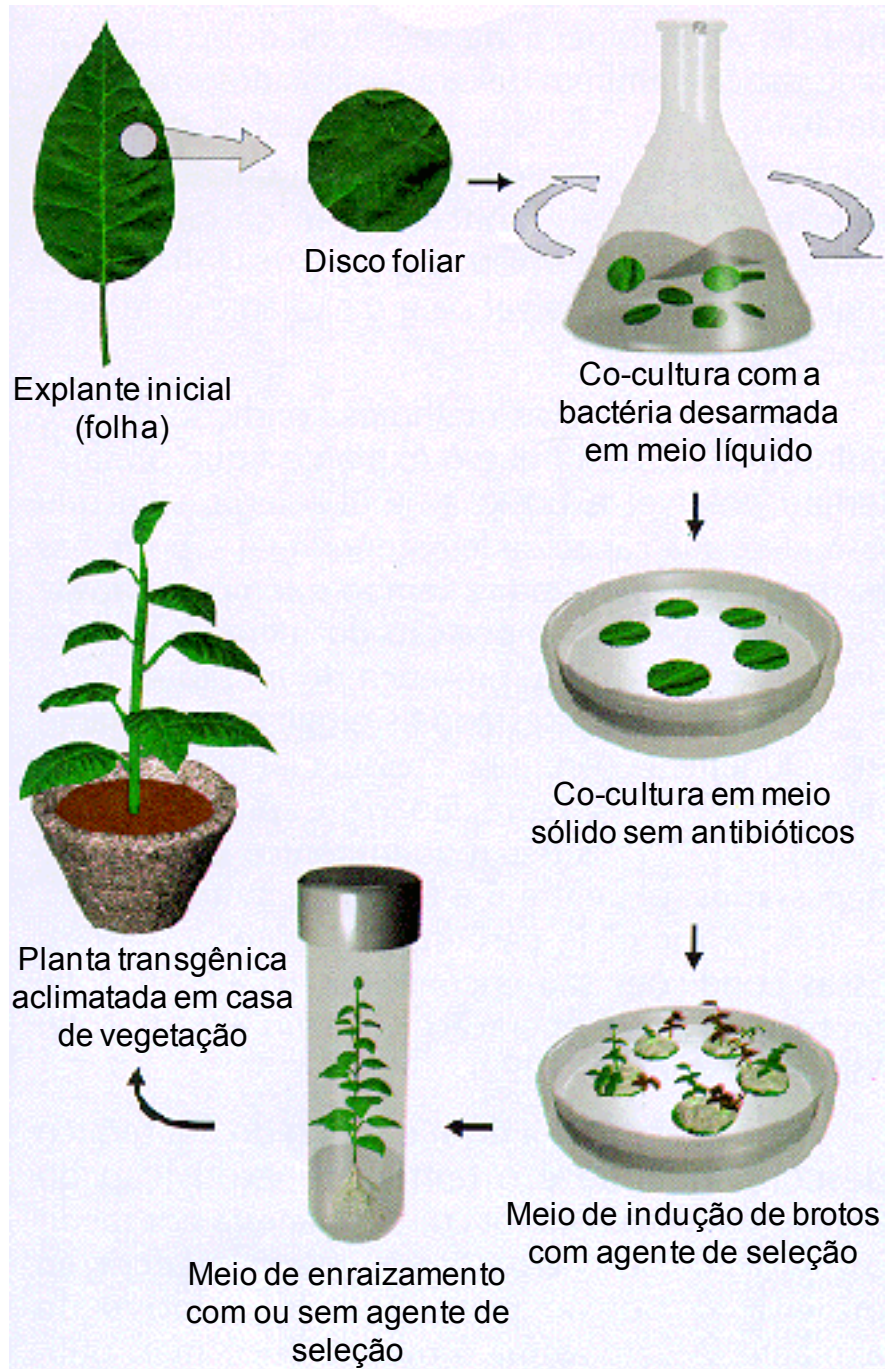


Figura 10 - Representação esquemática da metodologia utilizada para transformação de discos foliares de tabaco, mediado por *A. tumefaciens* e, a completa regeneração das plantas transgênicas. FONTE: Manual de transformação genética de plantas, 1998.



#### III.1.4. Análises moleculares

Análises moleculares (Sambrook *et al.*, 1989) foram realizadas para verificar a inserção do cassete de interesse no genoma das linhagens transformadas e a correspondente expressão do transgene.

Para verificar a inserção do transgene foi realizada a extração de DNA genômico usando o procedimento descrito por Ausubel *et al.* (1993). Discos foliares de aproximadamente 1 cm de diâmetro de cada planta foram congelados em nitrogênio líquido e macerados em tubos de 1,5 ml. Ao macerado foi adicionado 500 µl de tampão de extração (10mM Tris pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 500 mM NaCl e 10 mM mercaptoetanol) seguido por 35 µl de SDS 20%. As amostras foram incubadas a 65°C por 10 min e 130 µl de acetato de potássio 5 M foi adicionado ao tubo. Após 5 min de incubação a 4°C, o precipitado foi centrifugado por 10 min a 15000 g, e o sobrenadante transferido para tubos contendo 640 µl de isopropanol e 60 µl de acetato de sódio 3 M, sendo então misturado e incubado a -20°C por 10 min. O DNA foi precipitado por centrifugação a 15000 g por 15 min e ressuscitado em 200 µl de TE (50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA). Esta solução foi centrifugada a 15000 g por 5 min para remover o material insolúvel, e o sobrenadante foi transferido para tubos contendo 20 µl de acetato de sódio 3 M e 440 µl de etanol. Após incubação a -20°C por 10 min, o DNA foi novamente precipitado por centrifugação a 15000 g por 5 min e lavado com etanol 70%. O precipitado após seco foi ressuscitado em 15 µl de água Milli-Q autoclavada.

O DNA genômico obtido, após quantificação por eletroforese em gel de agarose a 1%, foi submetido à reação de PCR usando-se para tal os reagentes do *kit Taq DNA Polymerase recombinant* (Invitrogen) seguindo as recomendações do

fabricante. Para tal, foram utilizados 50 ng de DNA genômico; 1 µl de oligonucleotídeo senso para a região central da AtUCP1 a 10 µM (GCATGCCATGGGAAAAGACTTTGTAG) e 1 µl de oligonucleotídeo reverso GFP a 10 µM (GTGCCCATTAACATCACC); 5 µl de tampão 10x; 1,5 µl mM MgCl 50 mM; 1 µl de dNTPmix 10 mM; 0,2 µl de Taq Polimerase 5u/ µl, e água Milli-Q autoclavada para completar a reação num volume final de 50 µl. Foram realizados 35 ciclos de amplificação sendo que a temperatura de anelamento utilizada na reação foi de 50°C. O ciclo completo consistiu em:

Passo	Temperatura	Tempo
1	94°C	2 min
2	94°C	45 seg
3	55°C	30 seg
4	72°C	1 min 30 seg
5	72°C	7 min
6	4°C	indeterminado

Junto a essas reações foram realizados controles negativo e positivo. Como controle negativo foi usado DNA genômico extraído de tabaco selvagem para testar a especificidade dos oligos bem como uma reação com ausência de qualquer DNA para verificar a possível contaminação dos reagentes ou dos oligonucleotídeos. Como controle positivo usou-se o DNA do vetor purificado a partir da agrobactéria com a qual transformamos as plantas.

Amostras de RNA total foram extraídas das linhagens que apresentaram

inserção do fragmento no genoma visando a análise de expressão via RT-PCR.

Para extração de RNA total, discos foliares foram macerados em nitrogênio líquido. Um ml de Trizol foi então adicionado à cerca de 100-200 mg do tecido macerado e procedeu-se a homogeneização em agitador. Após incubação por 5 minutos a temperatura ambiente as amostras foram centrifugadas a 12000xg por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi coletado seguido da adição de 200 µl de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada em agitador e, após incubação por mais 3 minutos a temperatura ambiente, centrifugada a 12000xg por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo ao qual foram adicionados 500 µl de isopropanol. Após incubação por 60 minutos a -20°C e centrifugação por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e o sedimento lavado com 1 ml de etanol 70 %. Após uma nova centrifugação a 7500xg por 5 min a 4°C, o sedimento foi seco e ressuspenso em 30 µl de H<sub>2</sub>O tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). A integridade do RNA total extraído foi determinada por eletroforese em gel desnaturante (1,85% de formaldeído) de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Amostras de RNA total (~2 µg) tratadas com DNaseI (Fermentas) foram submetidas a transcrição reversa utilizando-se oligo dT17VN (2 µM) e *SuperScript<sup>TM</sup> III Reverse Transcriptase* (Invitrogen), segundo as informações do fabricante.

O cDNA obtido foi submetido à reação de PCR usando-se para tal os reagentes do *kit Taq DNA Polymerase recombinant* (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. Para tal, foram utilizados 50 ng de cDNA; 0,6 µl de oligonucleotídeo senso para a região central da AtUCP1 a 10 µM (GCATGCCATGGGAAAAGACTTTGTAG) e 0,6 µl de oligonucleotídeo reverso GFP a 10 µM (GTGCCCATTAACATCACC); 3 µl de tampão 10x; 0,9 µl mM MgCl 50 mM; 0,6 µl de dNTPmix 10 mM; 0,2 µl de Taq Polimerase 5u/ µl, e água Milli-Q

autoclavada para completar a reação num volume final de 30 µl. Foram realizados 35 ciclos de amplificação sendo que a temperatura de anelamento utilizada na reação foi de 50°C. O ciclo completo consistiu em:

Passo	Temperatura	Tempo
1	95°C	5 min
2	95°C	20 seg
3	50°C	20 seg
4	72°C	40 seg
5	72°C	7 min
6	4°C	indeterminado

A amplificação de parte da região codificadora da alfa-tubulina de tabaco nas amostras de cDNA provenientes das linhagens transgênicas foi usada como controle positivo da reação de PCR. Como controle negativo foi usada uma alíquota de cDNA obtido a partir de RNA total isolado de tabaco selvagem não transformado empregando, na PCR, os oligos descritos acima.

### III.1.5. *Análise em microscopia*

A expressão do transgene nas linhagens transformadas foi também confirmada pela emissão de fluorescência correspondente ao repórter GFP. Para tal foram realizados cortes de 0,1 mm na face abaxial do epitélio foliar com lâminas cortantes, sendo os mesmos dispostos em lâminas umedecidas com água destilada

e cobertas com lamínolas. Para detecção da fluorescência emitida pela GFP foi usado um fotomicroscópio de fluorescência Olympus BX 61 e os filtros FTC e filtro de Rodamina - comprimento de 510-550. As imagens foram capturadas através de uma câmera digital (Olympus DP70) e do programa Image-Pro MC 6.0 e processadas através do programa Adobe Photoshop 7.0.

## III.2. RESULTADOS

### III.2.1. *Confirmação da transformação das plantas obtidas*

Após a confirmação por sequenciamento da correta inserção do fragmento desejado no cassete de expressão contendo o gene repórter GFP e da introdução do vetor contendo tal cassete em *A. tumefaciens* (dados não apresentados), os experimentos de transformação de discos foliares de tabaco foram iniciados. Várias plantas foram obtidas a partir do referido processo de transformação e regeneração, as quais foram mantidas em casa de vegetação. O DNA genômico extraído de algumas dessas linhagens foi submetido à reação de PCR como descrito e, após eletroforese em gel de agarose 1%, foi constatada a inserção do fragmento de interesse no genoma de duas plantas (Linhagens 3 e 4; Figura 11).

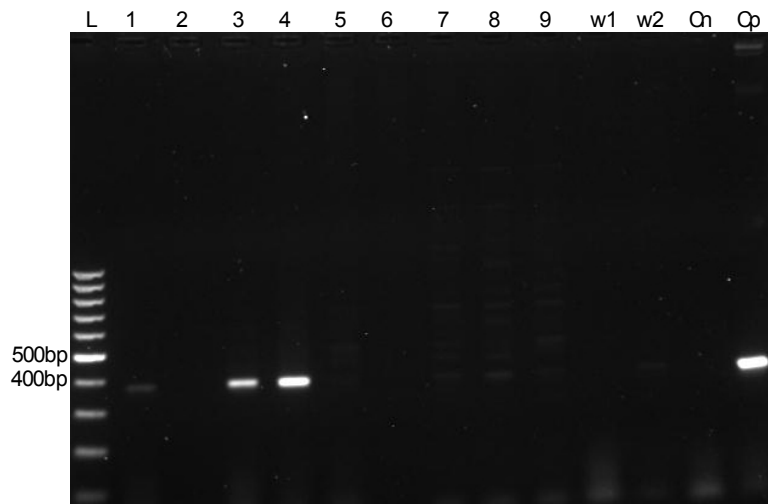


Figura 11 – Confirmação da inserção do fragmento de 400 bp contendo a região central da AtUCP1 nas linhagens de tabaco transformadas. Para tal, amostras de DNA genômico das diferentes linhagens foram submetidas à reação de PCR. L) Marcador de peso molecular (Ladder GeneRuller™ 100bp; Fermentas); 1 a 9) Diferentes linhagens de plantas transformadas; w1 e w2) Tabaco não transformado; Cn) Controle com ausência de DNA; Cp) Controle com DNA plasmidial (pCAMBIA 1381z contendo o inserto de interesse). Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

A expressão do transgene na linhagem 4 foi confirmada em um experimento de RT-PCR (Figura 12) que revelou a presença de um produto de amplificação de tamanho esperado nessa linhagem (~400 pb; canaleta 4), o qual estava ausente na reação correspondente a planta não transformada (canaleta W). Produtos correspondentes à parte da região codificadora da alfa-tubulina de tabaco foram amplificados nas amostras de cDNA provenientes de ambas as plantas (canaletas CpT4 e CpTW), demonstrando a qualidade do cDNA obtido. Infelizmente, por motivos alheios a nossa vontade, a linhagem 3 foi contaminada em vaso e a planta regenerada perdida.

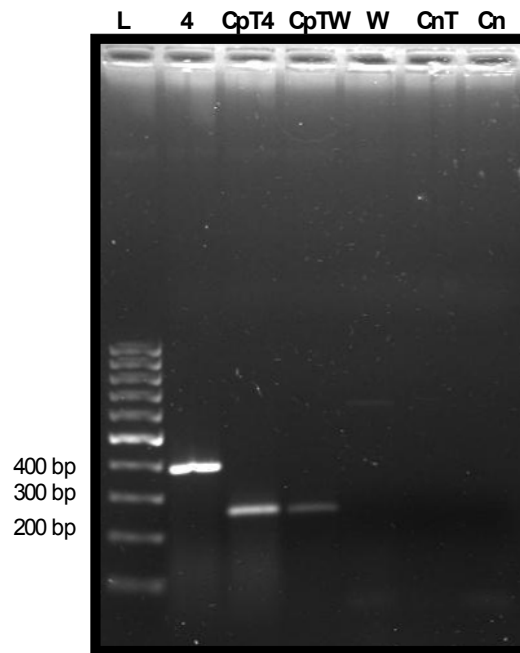


Figura 12 – Confirmação via RT-PCR da expressão do transgene na linhagem 4 obtida. L) Marcador de peso molecular (Ladder GeneRuller™ 100bp; Fermentas); 4) Amplificação do transgene usando cDNA da linhagem 4; CpT4 e CpTW) Amplificação da alfa-tubulina empregando cDNA da linhagem 4 e de tabaco selvagem, respectivamente; W) Amplificação do transgene em cDNA de tabaco selvagem; CnT e Cn) Controles negativos de amplificação com ausência de DNA. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

### III.2.2. Análise da localização

A linhagem transformada de nº 4 que revelou possuir em seu genoma o cassete de expressão contendo a região central da proteína AtUCP1 fusionada a GFP cuja expressão foi confirmada por RT-PCR, foi usada para verificar, ao fotomicroscópio de fluorescência, a localização celular da proteína de fusão resultante. Quando foi utilizado o filtro FTC foi possível observar pontos com fluorescência verde relacionados à expressão da GFP (Figuras 13a, c), sendo que

ao se usar o filtro de rodamina na mesma região nenhuma fluorescência pôde ser detectada (Figura 13b e d), dado que demonstra que a fluorescência emitida está relacionada à presença da GFP. Os pontos verdes observados evidenciam a provável localização mitocondrial da proteína de fusão, mas análises adicionais em microscopia confocal serão necessárias para confirmação de tal resultado.

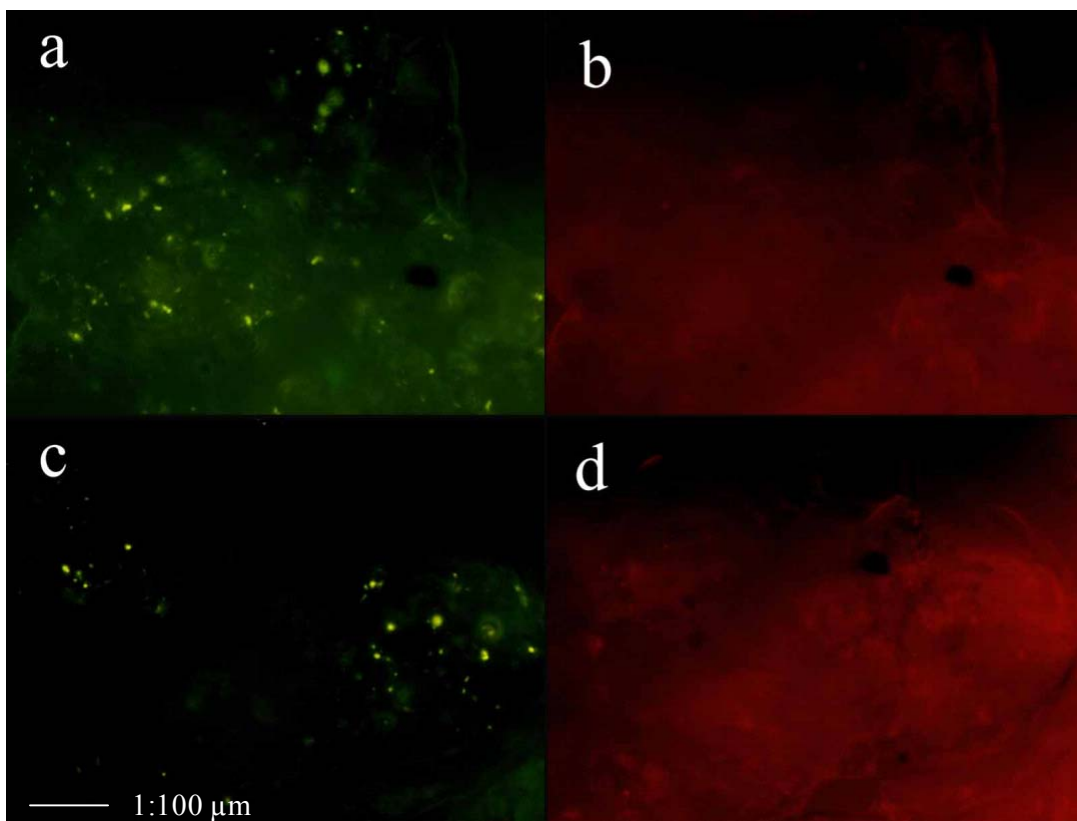


Figura 13 – Detecção da fluorescência associada a GFP em epitélio foliar da linhagem 4 contendo a região central da proteína AtUCP1 fusionada a GFP. As análises foram realizadas em fotomicroscópio de fluorescência. Painéis a e c) Filtro FTC. Painéis b e d) filtro rodamina. Imagens ampliadas 1000x.



### 3. DISCUSSÃO GERAL

#### 3.1. Análise de germinação de sementes de tabaco que super expressam o gene *AtUCP1*

As proteínas desacopladoras, responsáveis por processos altamente regulados de desacoplamento mitocondrial para fins específicos, tais como geração de calor e/ou regulação da concentração celular de EROs, têm sido objeto de muitos estudos bioquímicos, de bioenergética e mais recentemente de biologia molecular.

Nesse contexto, a investigação da função dessas proteínas em plantas de tabaco transgênicas capazes de expressar de forma constitutiva uma proteína desacopladora de *A. thaliana* (*AtUCP1*) (Brandalise *et al.*, 2003b), trouxe uma confirmação sobre sua participação na modulação do estresse oxidativo e no controle da geração de EROs mitocondrial.

Por mecanismos distintos, o desacoplamento mitocondrial e/ou a ativação das vias dissipadoras de energia respiratória, como UCPs e AOX, diminuem a produção de EROs devido ao aumento da taxa respiratória. Uma vez acelerada a respiração celular, ocorre diminuição tanto da tensão do oxigênio nos tecidos como da meia vida da semiubiquinona. Esse estado fisiológico reduz significativamente a doação do elétron da semiubiquinona ( $UQ^-$ ) ao  $O_2$  celular. Nas plantas transgênicas obtidas por Brandalise *et al.* (2003b), e empregadas no presente estudo, acredita-se que a produção endógena de EROs pela cadeia respiratória possa estar diminuída devido ao desacoplamento exacerbado provocado pela super expressão da *AtUCP1*. Nestas condições, o sistema antioxidante de tais plantas transgênicas estaria mais disponível para promover a inativação de EROs de origem exógena.

Para melhor investigar o comportamento dessas plantas, empregou-se um estudo de germinação em condições de estresse osmótico e salino, estresses ambientais que têm conseqüências severas na função mitocondrial. A germinação compreende uma sequência ordenada de atividades metabólicas iniciadas a partir da embebição. Durante esse processo, ocorre captação de água, reativação do metabolismo - marcada pela atividade respiratória, síntese e atividade de enzimas - digestão das reservas de nutrientes, formação de novos tecidos e ruptura do tegumento com a protusão da raiz primária.

Daley *et al.* (2003) desenvolveram um trabalho em que examinaram a expressão de vários componentes da cadeia respiratória mitocondrial, tanto em níveis de mRNA quanto de proteína, em cotilédones de soja durante a germinação. Para a maioria dos componentes estudados, incluindo a pUCP, a quantidade de proteína expressa segue um modelo parecido - um aumento é registrado a partir de baixos níveis logo após a embebição das sementes, atingindo um pico no 15º dia e declinando com a senescência. Uma relação entre o aumento de proteína e a abundância dos transcritos correspondentes pôde ser constatada, sugerindo um controle transcricional da expressão gênica. Os autores sugerem ainda que, nessa espécie, a expressão dos vários componentes da cadeia respiratória está harmonizada com a atividade respiratória dos mesmos.

Uma vez que a atividade respiratória é alta durante a germinação, o presente estudo procurou correlacionar a atividade da proteína desacopladora com o aumento da tolerância aos referidos estresses *in planta* exatamente nesse período. Para tal, realizou-se um ensaio que consistiu no emprego de sementes de tabaco selvagem e transgênico (linhagens que expressam de forma constitutiva do gene *AtUCP1*) germinadas em meios adicionados ou não de NaCl 125 mM e Manitol 250

mM. Como controles adicionais foram usados tratamentos com os fitohormônios ABA 0,1 mM e ACC 0,1 mM. Cabe ressaltar que tais hormônios têm efeitos antagônicos na germinação das sementes, sendo o ABA um inibidor desse processo (promove a indução e manutenção da dormência; Finkelstein *et al.*, 2008) e o ACC um estimulador (atua como um regulador negativo da ação do ABA durante a germinação) (Beaudoin *et al.*, 2000; Finkelstein *et al.*, 2002). Para realizar as análises de germinação usou-se a medida de germinabilidade e o índice de velocidade de germinação (IVG).

Os resultados de germinabilidade, que representa a porcentagem de sementes germinadas em relação ao número de sementes dispostas sob mesma condição experimental, não evidenciaram variação significativa entre as sementes selvagens e transgênicas, e nem entre os diferentes tratamentos empregados. Isso significa que a não germinação de 100% das sementes não foi ocasionada pelos fatores, tipo de semente e tratamento empregado. Possivelmente, havia sementes inviáveis em nosso lote. Embora não significativo, um efeito inibitório do ABA foi observado já que não foram constatadas sementes germinadas até o oitavo dia de amostragem (Figura 6D).

Os resultados de IVG evidenciaram uma variação significativa na velocidade de germinação. Em todos os tratamentos empregados, as sementes transgênicas apresentaram uma velocidade de germinação maior que as sementes do tipo selvagem. Já quanto ao efeito dos tratamentos na velocidade de germinação das sementes, foi possível notar que as sementes submetidas ao estresse causado por manitol, ou tratadas com ABA, tiveram valores de IVG significativamente menores do que os registrados para sementes germinadas na ausência de estresse ou do fitohormônio (controles). O efeito significativo do ABA sobre o IVG era

esperado já que concentrações de 3  $\mu$ M de ABA exógeno são consideradas inibitórias (suprimem a emergência da radícula), podendo a mesma ser melhor tolerada (até 100  $\mu$ M) caso haja a adição de algum açúcar no meio (Finkelstein *et al.*, 2002). Os dados de IVG parecem indicar também que o estresse salino é mais bem tolerado pelas plantas transgênicas que o estresse osmótico gerado pelo manitol, cujos valores de IVG diferem significativamente do controle.

Ainda como reflexo da velocidade de germinação, pelos gráficos apresentados na Figura 6, é possível perceber um maior afastamento das curvas relativas ao número de sementes transgênicas germinadas em relação às selvagens nos primeiros dias da contagem, período que se refere ao início da germinação. Em contrapartida, no tratamento com ACC (Figura 6E) existe uma aproximação das curvas revelando um efeito estimulatório.

Os resultados de IVG sugerem uma efetiva participação da pUCP durante a germinação das sementes e nas fases iniciais de desenvolvimento das plântulas, sendo sua atividade provavelmente necessária durante a transição do metabolismo de mobilização de reserva para o metabolismo fotossintético. Tal observação corrobora a hipótese de que a pUCP desempenha funções fisiológicas essenciais em processos onde a sua regulação conduz a alta atividade, como na fase de germinação, a qual é marcada pela alta atividade metabólica.

A expressão constitutiva da pUCP em plantas transgênicas parece conferir maior tolerância ao estresse salino, especialmente nas fases iniciais do desenvolvimento. A observada correlação entre maior acúmulo de pUCP nas plantas transgênicas e menor sensibilidade a determinados estresses torna evidente a participação dessa proteína na resposta de defesa das plantas contra estresses ambientais. Estudos recentes relatam que a pUCP é ativada em plântulas de trigo

submetidas a estresse salino e osmótico (Trono *et al.*, 2004), e demonstram que tal ativação é promovida pelas espécies reativas de oxigênio geradas durante os estresses.

### **3.2. Estudos de expressão gênica em *A. thaliana***

As mitocôndrias estão envolvidas em diversos processos metabólicos relacionados com a adaptação celular em resposta aos estresses ambientais e em função disso, representam a maior fonte de geração de EROs em células submetidas a condições adversas. Em plantas, a função mitocondrial é essencial para a modulação do balanço redox e ativação do sistema oxidante durante a ocorrência de estresses ambientais além de estar diretamente envolvida com a morte celular programada. Nesse contexto, diversos estudos têm correlacionado a função fisiológica das pUCPs com a proteção celular contra o dano oxidativo (Jarmuszkiewicz *et al.*, 1998; Almeida *et al.*, 1999; Brandalise *et al.*, 2003), sendo a sua atividade importante para diminuir a geração mitocondrial de EROs. O mecanismo de ação mais aceito é que o desacoplamento promovido pelas pUCPs determina uma aceleração da cadeia transportadora de elétrons fazendo com que a mesma seja mantida devidamente oxidada, o que resultaria em menor geração de EROs (Pastore *et al.*, 2007).

No presente trabalho, os efeitos do estresse oxidativo na transcrição dos genes que codificam UCPs em *A. thaliana* foram avaliados. Para tal, plântulas de *Arabidopsis* foram submetidas a tratamentos que promovem estresse salino e osmótico, os quais sabidamente afetam a função mitocondrial e acentuam o

estresse oxidativo nessa organela. Além disso, o efeito de determinados fitohormônios na expressão dos referidos genes também foi avaliado.

Os resultados obtidos não revelaram uma variação significativa do perfil de expressão de cinco dos seis genes analisados em resposta ao tratamento com ACC, um precursor do etileno (Figura 8.1). Nesse caso, não foram observados produtos de amplificação para o gene *AtUCP6*. A efetividade do tratamento com ACC foi confirmada pela indução do gene *PDF1.2* que é responsivo ao etileno (após 24h de tratamento observou-se um aumento da expressão de ~14x). O etileno é um hormônio vegetal que atua em concentrações muito baixas e participa da regulação de praticamente todos os processos de crescimento, desenvolvimento e senescência das plantas. Ele é sintetizado em muitos órgãos dos vegetais superiores, sendo que tecidos senescentes e frutos em amadurecimento produzem mais etileno que tecidos jovens (Taiz e Zeiger, 2006). Embora os nossos resultados não tenham demonstrado alterações no perfil de expressão de tais genes em resposta ao ACC, a indução da expressão de algumas pUCPs durante a maturação de frutos climatéricos é relatada na literatura. Segundo Considine e colaboradores (2001), a expressão dos genes que codificam pUCPs é fortemente aumentada nos estágios finais da maturação (senescência) de frutos de manga. Resultados semelhantes foram observados em estágios tardios da maturação de frutos de tomate mantidos na própria planta (Holtzapffel *et al.*, 2002). Estes dados corroboram o maior acoplamento observado em mitocôndrias isoladas de tomates verdes quando comparado com o obtido com mitocôndrias de tomates vermelhos (Costa *et al.*, 1999).

Além do etileno, existem evidências na literatura de que a expressão dos genes que codificam pUCPs é induzida por um outro fitohormônio, o ácido abscísico

(ABA). Análises empregando microarranjos demonstraram a indução dos genes *AtUCP4* e *AtUCP5* mediante tratamento com ABA (Seki *et al.*, 2002). O ABA desempenha um papel importante na dormência de sementes e gemas, bem como na resposta aos estresses ambientais (Taiz e Zeiger, 2006). Na Figura 8.2 encontram-se os perfis de expressão dos seis genes investigados em resposta ao tratamento com ABA. Um aumento significativo da expressão relativa, 12h após o tratamento, foi observado para três dos seis genes investigados: *AtUCP2* (2,33 x), *AtUCP5* (2,02 x) e *AtUCP6* (3,14 x). Dentre os genes cuja expressão foi majorada encontra-se o *AtUCP5* que já havia sido relacionado por Seki e colaboradores (2002) como induzido por ABA. A efetividade do tratamento com ABA foi confirmada pela indução observada para o gene *AtbZip39* que é responsivo a este hormônio.

Segundo Trono e colaboradores (2006), plântulas jovens de trigo quando submetidas a estresse salino ou osmótico não demonstraram um relevante aumento no nível de expressão gênica das duas isoformas de *pUCPs* presentes no trigo. Entretanto, um aumento na atividade desacopladora dos produtos gênicos correspondentes foi observado, indicando que o estresse em questão deve modular a atividade e não a expressão dos genes relacionados. Já no trabalho de Dlasková e colaboradores (2006) observou-se, em sementes de milho germinadas e submetidas a estresse salino, um aumento na transcrição do gene *ZmUCP1*, cujos níveis de proteína estariam contendo o aumento da produção de ROS sob condições de estresse.

Nenhuma alteração na expressão dos genes investigados em resposta ao estresse salino induzido pelo tratamento com NaCl foi observada, exceção feita ao gene *AtUCP2* (Figura 8.3). Diferentemente dos demais, para esse tratamento foram analisadas duplicatas biológicas. Esses resultados corroboram os obtidos por Trono

e colaboradores (2006) e sugerem a existência de um mecanismo de regulação pós-transcricional para a maioria dos genes analisados. Em contrapartida, quando as plântulas foram tratadas com Manitol, um aumento significativo da expressão relativa de três genes, *AtUCP2*, *AtUCP5* e *AtUCP6* (Figura 8.4), foi constatado. O maior aumento na expressão relativa foi observado 12 horas após o tratamento para os genes *AtUCP2* (2,03 x) e *AtUCP5* (2,36 x), e 24 h após o tratamento para o gene *AtUCP6* (2,06 x) e esse teve continuidade na próxima coleta de 48h (2,62 x). A efetividade dos tratamentos com NaCl e Manitol foi validada pelas induções observadas para os genes *RD29A* (após 12h de tratamento observou-se um aumento da expressão de ~9x). e *AtS1A*, respectivamente.

Os dados de expressão relativa obtidos sugerem que os genes *AtUCP2*, *AtUCP5* e *AtUCP6* estão envolvidos na resposta adaptativa ao estresse osmótico sendo os mesmos responsivos ao ABA, que é um importante mediador da resposta fisiológica da planta a determinados estresses, especialmente aqueles envolvidos com balanço hídrico. O gene *AtUCP2* também é induzido pelo estresse salino o que sugere uma participação mais ampla do mesmo na resposta adaptativa. Esses dados indicam também que tais genes sofrem regulação transcricional já que foram rapidamente induzidos pelos tratamentos empregados, muito provavelmente pelas EROs geradas durante a injúria provocada pelo estresse. As proteínas resultantes atuam, nesse caso, como auxiliares do sistema detoxificante, reduzindo a geração de EROs através do desacoplamento.

Como não foram observadas mudanças na expressão relativa dos demais genes investigados é bastante provável que os mesmos não sejam ativados transcricionalmente pelos fatores investigados, fato que sugere a existência de



outros mecanismos de regulação, especialmente em nível protéico como sugerido por Pastore *et al.* (2007).

### **3.3. Estudo do sinal de endereçamento mitocondrial da proteína AtUCP1 com o emprego de GFP**

A maioria das proteínas mitocondriais é codificada pelo genoma nuclear e traduzidas no citoplasma como pré-proteínas, cujas regiões N-terminais contêm um peptídeo sinal que possui um importante papel no transporte das mesmas para a mitocôndria (Schatz e Dobberstein, 1996; Voos *et al.*, 1999).

A proteína desacopladora (UCP) é uma proteína mitocondrial codificada nuclearmente que não conta com um peptídeo sinal em sua seqüência primária de aminoácidos. Num estudo desenvolvido em nosso laboratório, Sasaki (2003) criou três versões da proteína AtUCP1 fusionadas a GFP e utilizou um sistema de eletroporação em protoplastos de tabaco para averiguar a localização dos mutantes resultantes. Todas as versões estudadas (AtUCP1 $\Delta$ 3-6 com ausência da unidade de repetição central e final, AtUCP1 $\Delta$ 5-6 com ausência da unidade de repetição final e AtUCP1 $\Delta$ 1-2 com ausência da unidade de repetição inicial) foram detectadas nas mitocôndrias, indicando que a primeira unidade de repetição e a repetição central devem conter os sinais de endereçamento para a mitocôndria. A primeira unidade de repetição, entretanto, parece não ser essencial, já que a versão onde tal região foi deletada continuou sendo direcionada para a organela.

Já no presente trabalho, uma linhagem transgênica de tabaco transformada com um cassete de expressão contendo a região central da proteína AtUCP1 fusionada a GFP foi obtida. Análises preliminares realizadas empregando

cortes foliares de tal linhagem, e microscopia de fluorescência, indicam que a fluorescência observada está correlacionada a GFP e encontra-se associada à mitocôndria. Os pontos de pequenas dimensões observados refletem adequadamente o tamanho da organela.

Como salientado na introdução, Scheleiff e Mcbride (2000) demonstraram que na UCP1 de mamíferos a unidade de repetição central é a responsável pelo endereçamento para a membrana mitocondrial interna, enquanto que a primeira unidade de repetição possui um sinal suficiente para o endereçamento para a membrana mitocondrial externa. Em contrapartida, estudos anteriores realizados por dois grupos distintos concluíram que a primeira unidade de repetição é importante para o transporte de alguns carreadores mitocondriais como o carreador de ADP/ATP (Liu *et al.*, 1988; Smagula e Douglas, 1988), mas outros relatam que a segunda ou terceira unidade são requeridas para o transporte de tal proteína (Endres *et al.*, 1999).

Em plantas, Murayama e Handa (2005) realizaram um estudo empregando três diferentes versões da proteína WhUCP1b fusionadas a GFP e inseridas em levedura. Observou-se que as três fusões (D1::GFP, D2::GFP, D3::GFP contendo a primeira, segunda e terceira unidade de repetição, respectivamente) foram transportadas para a mitocôndria. A fusão contendo a região central mostrou a maior eficiência no transporte à mitocôndria, mas as outras unidades repetidas da WhUCP1b puderam também direcionar o transporte à organela, dado que não determina qual a região efetivamente responsável pela localização na mitocôndria.

Experimentos adicionais empregando as plantas obtidas no presente trabalho são necessários para confirmar em definitivo a participação da segunda

unidade de repetição no transporte da pUCP à mitocôndria. Uma possibilidade interessante refere-se ao uso de um microscópio confocal e de plantas controle expressando somente a GFP.

#### 4. PERSPECTIVAS

O trabalho desenvolvido deu-nos a oportunidade de melhor compreender as proteínas desacopladoras mitocondriais de planta, bem como permitiu vislumbrar novas perspectivas de investigação de seu papel biológico.

Em relação ao estudo de expressão relativa das seis isoformas da AtUCP, faz-se necessária uma investigação que leve em consideração a possível repressão da expressão de alguns dos genes analisados sob determinados tratamentos, uma vez que pudemos observar em nossos resultados, não somente o aumento de expressão, mas também uma diminuição na expressão relativa de alguns dos membros da família.

Com a disponibilidade de uma planta transgênica de tabaco expressando a região central da AtUCP fusionada a uma proteína repórter será possível determinar em definitivo se o domínio central dessa proteína é responsável pela localização mitocondrial, o que, segundo nossos resultados, parece ser correto.

## 5. CONCLUSÕES

- 1) Sementes de plantas transgênicas de tabaco que super expressam a proteína desacopladora de *A. thaliana* (AtUCP1) apresentaram uma velocidade de germinação maior que as sementes não transgênicas.
- 2) Plântulas de *A. thaliana* submetidas a tratamento com ACC não revelaram variação significativa no perfil de expressão dos genes *AtUCP1-6*. Três dos seis genes investigados, *AtUCP2* , *AtUCP5* e *AtUCP6*, apresentaram aumento significativo na expressão relativa nos tratamentos com ABA e Manitol, respectivamente. Apenas o gene *AtUCP2* apresentou variação de expressão no tratamento com NaCl.
- 3) Indícios foram obtidos de que a segunda unidade de repetição da proteína mitocondrial desacopladora de *A. thaliana*, AtUCP1, tem participação no transporte da pUCP à mitocôndria.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARRABERES, F. A.; DICE, J. F.; Protein translocation across membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1513, p. 1-24, 2001.

ALMEIDA, A. M.; JARMUSZKIEWICZ, W.; KHOMSI, H.; ARRUDA, P.; VERCESI, A. E.; SLUSE, F. E. Cyanide-resistant, ATP-synthesis-sustained, and uncoupling-protein-sustained respiration during postharvest ripening of tomato fruit. *Plant Physiol.*, v.119, p.1323-1329, 1999.

ANDERSON, J.P.; BADRUZSAUFARI, E.; SCHENK, P.M.; MANNERS, J.M.; DESMOND, O.J.; EHLERT, C.; MACLEAN, D.J.; EBERT, P.R.; KAZAN, K. Antagonistic interaction between Abscisic Acid and Jasmonate-Ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *Plant cell*, v.16, p.3460-3479, 2004.

ARGYROPOULOS, G.; HARPER, M-E. Invited review: uncoupling proteins and thermoregulation, *J. Appl. Physiol.*, v.92, p.2187-2198, 2002.

ARROYO, A.; BOSSI, F.; FINKELSTEIN, R.R.; LEÓN, P. Three genes that affect sugar sensing (abscisic acid insensitive 4, abscisic acid insensitive 5, and constitutive triple response 1) are differentially regulated by glucose in Arabidopsis, *Plant Physiol.*, v.133, p.231-242, 2003.

ARSENIJEVIC, D.; ONUMA, H.; PECQUEUR, C.; RAIMBAULT, S.; MANNING, B.S.; MIROUX, B.; COUPLAN, E.; ALVES-GUERRA, M.C.; GOUBERN, M.; SURWIT, R.; BOUILLAUD, F.; RICHARD, D.; COLLINS, S.; RICQUIER, D. Disruption of the

- uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production, *Nat. Genet.*, v.6, p.435-439, 2000.
- ASADA, K.; TAKAHASHI, M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: KYLE, D. J. *et al.* (Eds). *Protein inhibition*. Elsevier, 1987. p.227-287.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. Current protocols in Molecular Biology. New York: Greene Publishing Associates/Wiley Interscience, 1993.
- BEAUDOIN, N.; SERIZET, C.; GOSTI, F.; GIRAUDAT, J. Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell.*, v.12, p.1103-1115, 2000.
- BORECKÝ, J.; MAIA, I. G.; ARRUDA, P. Mitochondrial uncoupling proteins in mammals and plants. *Biosci. Rev.* v.21, p.201-212, 2001.
- BORECKÝ, J.; NOGUEIRA, F. T. S.; DE OLIVEIRA, K. A. P.; MAIA, I. G.; VERCESI, A. E.; ARRUDA, P. The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and expression profiles of the gene families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots. *J. Exp. Botany*, v.57, p.849-864, 2006.
- BOSS, O.; SAMEC, S.; PAOLONI-GIACOBINO, A.; ROSSIER, C.; DULLOO, A.; SEYDOUX, J.; MUZZIN, P.; GIACOBINO, J.P. Uncoupling protein3: a new member of mitochondrial carrier family with tissue-specific expression, *FEBS Lett.*, v.408, p.39-42, 1997.

- BRANDALISE, M.; MAIA, G.I.; BORECKY, J.; VERCESI, A. E.; ARRUDA, P. *ZmPUMP* encodes a maize mitochondrial uncoupling protein that is induced by oxidative stress, *Plant Sci.*, v.165, p.329-335, 2003a.
- BRANDALISE, M.; MAIA, G.I.; BORECKY, J.; VERCESI, A. E.; ARRUDA, P. Overexpression of plant uncoupling mitochondrial protein in transgenic tobacco increases tolerance to oxidative stress. *J. Bioenerg. Biomemb.*, v.35, p.203-209, 2003b.
- BRASILEIRO, A. C. M. *et al. Manual de transformação genética de plantas*. 2.ed. Brasília: Embrapa, 1998. 309p.
- BRUCE, A.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Fundamentos da Biologia Celular*. 1.ed. Artmed, 1999. 775p.
- CAVALHEIRO, R.A.; FORTES, F.; BORECKÝ, J.; FAUSTINONI, V.C.; SCHREIBER, A.Z.; VERCESI, A.E. Respiration, oxidative phosphorylation, and uncoupling protein in *Candida albicans*. *Br. J. Med. Biol. Res.*, v.37, p.1455–1461, 2004.
- CHARRIER, B.; CHAMPION, A.; HENRY, Y.; KREIS, M. Expression profiling of the whole *Arabidopsis* shaggy-like multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Physiol.*, v.130, p.577-590, 2002.
- COSTA, A. D. T.; NANTES, I. L.; JEZEK, P.; LEITE, A.; ARRUDA, P.; VERCESI, A. E. Plant uncoupling mitochondrial protein activity in mitochondria isolated from tomatoes at different stages of ripening. *J. Bioenerg. Biomemb.*, v.31, p.527-533, 1999.



- DLASKOVÁ, A.; SPACEK, T.; SKOBISOVÁ, E.; SANTOROVÁ, J.; JEZEK, P. Certain aspects of uncoupling due to mitochondrial uncoupling proteins *in vitro* and *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1757, p.467-473, 2006.
- DOLFERUS, R., OSTERMAN, J.C., PEACO, W.J., DENNIS, E.S. Cloning of the Arabidopsis and rice formaldehyde dehydrogenase genes: Implications for the origin of plant ADH enzymes. *Genetics*, v.146, p.1131–1141, 1997.
- DUBY, G.; BOUTRY, M. Mitochondrial protein import machinery and targeting information. *Plant Science*, v.162, p.447-90, 2002.
- ENDRES, M.; NEUPERT, W.; BRUNNER, M. Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *EMBO J.*, v.18, p.3214-3221, 1999.
- ERLANSON-ALBERTSSON, C. The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism. *Acta Physiol Scand.*, v.178, p.405-412, 2003.
- FERNIE, A. R., CARRARI, F.; SWEETLOVE, L. J. Respiratory metabolism: Glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr. Opin. Plant Biol.*, v.7, p.254–261, 2004.
- FINKELSTEIN, R. R.; GAMPALA, S. S.; ROCK, C. D. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, v.14, p.S15-45, 2002.
- FINKELSTEIN, R.; REEVES, W.; ARIIZUMI, T.; STEBER, C. Molecular Aspects of Seed Dormancy. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008 Jan 7 [Epub ahead of print]
- FLEURY, C.; NEVEROVA, M.; COLLINS, S.; RAIMBAULT, S.; CHAMPIGNY, O.; LEVI-MEYRUEIS, C.; BOUILLAUD, F.; SELDIN, M. F.; SURWIT, R. S.;

- RICQUIER, D.; WARDEN, C. H. Uncoupling protein2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia, *Nat. Genet.*, v.15, p.269-272, 1997.
- FRIDELL, Y-W.C.; SÁNCHEZ-BLANCO, A.; SILVIA, B.A.; HELFAND, S.L. Functional characterization of a *Drosophila* mitochondrial uncoupling protein, *J. Bioenerg. Biomembr.*, v.36, p.219–228, 2004.
- GARLID, K.D.; OROSZ, D.E.; MODRIANSKÝ, M.; VASSANELLI, S.; JEZEK, P. On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. *J. Biol. Chem.*, v.271, p.2615-2620, 1996.
- GARLID, K.D.; JABUREK, M.; JEŽEK, P. The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett.*, v.438, p.10-14, 1998.
- GARLID, K.D.; JABUREK, M.; JEŽEK, P.; VARECHA, M. How do uncoupling proteins uncouple? *Biochim. Biophys. Acta*, v.1459, p.383-389, 2000.
- GIMENO, R.E.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; SHYJAN, A.W.; GIMENO, C.J.; IRIS, F.; ELLIS, S.J.; WOOLF, E.A.; TARTAGLIA, L.A. Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes*, v.46, p.900-906, 1997.
- GONG, D.W.; MONEMDJOU, S.; GAVRILOVA, O.; LEON, L.R.; MARCUS-SAMUELS, B.; CHOU, C.J.; EVERETT, C.; KOZAK, L.P.; LI, C.; DENG, C.; HARPER, M.E.; REITMAN, M.L. Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J. Biol. Chem.*, v.275, p.1651-1657, 2000.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.*, 1 ed., 1987, p. 358-364.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press, 1989, 543 p.

HOURON-CABASSA, C.; MESNEAU, A. ; MIROUX, B.; ROUSSAUX, J. ; RICQUIER, D.; ZACHOWSKI, A. ; MOREAU, F. Alteration of plant mitochondrial proton conductance by free fatty acids. Uncoupling protein involvement. *J. Biol. Chem.* v.277, p.41533-41538, 2002.

HORSCH, R.B.; FRALEY, R.T.; ROGERS, S.G.; SANDERS, P.R.; LLOYD, A.; HOFFMANN, N.L. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, v.277, p.1229-1231, 1985.

JABŮREK, M.; VAŘECHA, M.; GIMENO, R.E.; DEMBSKI, M.; JEŽEK, P.; ZHANG, M.; BURN, P.; TARTAGLIA, L.A.; GARLID, K.D. Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J. Biol. Chem.*, v.274, p.26003-26007, 1999.

JARMUSZKIEWICZ, W.; ALMEIDA, A. M.; SLUSE-GOFFART, C. M.; SLUSE, F. E.; VERCESI, A. E. Linoleic acid-induced activity of plant uncoupling mitochondrial protein in purified tomato fruit mitochondria during resting, phosphorylating, and progressively uncoupled respiration. *J. Biol. Chem.*, v.273, p.34882-34886, 1998.

JARMUSZKIEWICZ, W.; SLUSE-GOFFART, C.M.; HRYNIEWIECKA, L.; SLUSE, F.E. Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Biol. Chem.*, v.274, p.23198–23220, 1999.

JARMUSZKIEWICZ, W.; MILANI, G.; FORTES, F.; SCHREIBER, A.Z.; SLUSE, F.E.; VERCESI, A.E. First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*. *FEBS Lett.*, v.467, p.145–149, 2000.

JARMUSZKIEWICZ, W.; BEHRENDT, M.; NAVET, R.; SLUSE, F.E. Uncoupling protein and alternative oxidase of *Dictyostelium discoideum*: occurrence, properties and protein expression during vegetative life and starvation-induced early development. *FEBS Lett.*, v.532, p.459–464, 2002.

JEŽEK, P.; COSTA, A. D. T.; VERCESI, A. E. Evidence for anion-translocating plant uncoupling mitochondrial protein in potato mitochondria. *J. Biol. Chem.* v.271, p.32743-32748, 1996.

JEŽEK, P.; COSTA, A. D. T.; VERCESI, A. E. Reconstituted plant uncoupling mitochondrial protein allows for proton translocation via fatty acid cycling mechanism. *J. Biol. Chem.*, v.272, p.24272-24278, 1997.

JEŽEK, P.; ENGSTOVÁ, H.; ZÁCKOVÁ, M.; VERCESI, A. E.; COSTA, A. D. T.; ARRUDA, P.; GARLID, K. D. Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1365, p.319-327, 1998.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. *Biologia celular e Molecular*. 7. ed. , Editora Guanabara Koogan S.A, 2000.

KLEIN, S.L.; STRAUSBERG, R.L.; WAGNER, L.; PONTIUS, J.; CLIFTON, S.W.; RICHARDSON, P. Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: the NIH Xenopus initiative. *Dev. Dyn.*, v.225, p.384–91, 2002.

- KRAUSS, S., ZHANG, C. Y.; LOWELL, B. B. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v.6, p.248-261, 2005.
- KREPS *et al.* Transcriptome Changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold Stress. *Plant Physiol.*, v.130, p.2129-41, 2002.
- KOMIYA, T.; MIHARA, K. Protein import into mammalian mitochondria. Characterization of the intermediates along the import pathway of the precursor into the matrix. *J. Biol. Chem.* v.271, p.22105-10, 1996.
- KOWALTOWSKI, A. J.; COSTA, A. D. T.; VERCESI, A. E. Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. *FEBS Lett.*, v.425, p.213-216, 1998.
- LABORIAL, L. G.; VALADARES, M. B. On the germination of seeds of *Calotropis procera*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, São Paulo, v.48, p.174-186, 1976.
- LALOI, M.; KLEIN, M.; REISMEIER, J. W.; MÜLLER-RÖBER, B.; FLEURY, C.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D. A plant cold-induced uncoupling protein. *Nature*, v.389, p.135-136, 1997.
- LIU, X. Q.; BELL, A. W.; FREEMAN, K. B.; SHORE, G. C. Topogenesis of mitochondrial inner membrane uncoupling protein. Rerouting transmembrane segments to the soluble matrix compartment. *J. Cell Bio.*, v.107, p.503-309, 1988.
- LOGAN, D.C. The mitochondrial compartment. *J. Exp. Botany*, v.57, p.1225-1243, 2006.

LORENZO, O.; PIQUERAS, R.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.J.; SOLANO, R.  
ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and  
jasmonate pathways in plant defense. *Plant cell*, v.15, p.165-178, 2003.

MACKENZIE, S., MCINTOSH, L. Higher plant mitochondria. *Plant Cell*, v.11, p.571-  
585, 1999.

MAIA, I. G.; BENEDETTI, C. E.; LEITE, A.; TURCINELLI, S. R.; VERCESI, A. E.,  
ARRUDA, P. *AtPUMP*: an Arabidopsis gene encoding a plant uncoupling  
mitochondrial protein. *FEBS Lett.*, v.429, p.403-406, 1998.

MAGUIRRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling  
emergence and vigor. *Crop Science*, Madison, v.2, n.1, p.176-177, 1962.

MAXWELL, D.P.; WANG, Y.; MCINTOSH, L. The alternative oxidase lowers  
mitochondrial reactive oxygen species production in plant cells. *Proc. Natl. Acad  
Sci. USA*, v.96, p.8271-8276, 1999.

MITOCÔNDRIA. Disponível em:

<[http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:Diagram\\_of\\_a\\_human\\_mitochondrion\\_pt.svg](http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:Diagram_of_a_human_mitochondrion_pt.svg)>.

Acesso em: 25 fev. 2008.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, v.9,  
p.405-10, 2002.

MOZO, J.; EMRE, Y.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D.; CRISCUOLO, F.  
Thermoregulation: what role for UCPs in mammals and birds? *Biosci. Rep.*, v.25,  
p.227-249, 2005.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, v.15, p.473-497, 1962.
- MURAYAMA, S.; HANDA, H. Central region of wheat UCP acts as a major signal for protein transport to mitochondria, but both distal regions can also drive a protein import to mitochondria. *Breeding Science*, v.55, p.447-452, 2005.
- NAKASHIMA K, FUJITA Y, KATSURA K, MARUYAMA K, NARUSAKA Y, SEKI M, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including RD29B and RD29A in seeds, germinating embryos, and seedlings of *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol.*, v.60, p.51-68, 2006.
- NANTES, I. L.; FAGIAN, M. M.; CATISTI, R.; ARRUDA, P.; MAIA, I. G.; VERCESI, A. E. Low temperature- and aging-promoted expression of PUMP in potato tuber mitochondria. *FEBS Lett.*, v.457, p.103-106, 1999.
- NEUPERT, W. Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.*, v.66, p.863-917, 1997.
- NICHOLLS, D.G.; RIAL, E. A history of the first uncoupling protein, UCP1. *J. Bioenerg. Biomembr.*, v.31, p.399-418, 1999.
- NOGUEIRA, F. T. S.; BORECKÝ, J.; VERCESI, A. E.; ARRUDA, P. Genomic structure and regulation of mitochondrial uncoupling protein genes in mammals and plants. *Bioscience Reports*, v.25, p.209-26, 2005.
- PALMIERI, F. Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett.*, v.346, p.48-54, 1994.

- PASTORE, D.; FRATIANNI, A.; DI PEDE, S.; PASSARELLA, S. Effects of fatty acids, nucleotides and reactive oxygen species on durum wheat mitochondria. *FEBS Lett.*, v.470, p.88-92, 2000.
- PASTORE, D.; TRONO, D.; LAUS, M. N.; DI FONZO, N.; FLAGELLA, Z. Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. A case study: durum wheat mitochondria. *J. Exp. Bot.*, v.58, p.195-210, 2007.
- POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol.*, v.126, p.445-62, 2001.
- RAIMBAULD, S.; DRIDI, S.; DENJEAN, F.; LACHUER, J.; COUPLAN, E.; BOUILLAUD, F.; BORDAS, A.; DUCHAMP, C.; TAOUIS, M.; RICQUIER, D. An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds. *Biochem. J.*, v.353, p.441-44, 2001.
- RASSOW, J.; PFANNER, N. The protein import machinery of the mitochondrial membranes. *Traffic*, v.1, p.413-23, 2000.
- RICQUIER, D.; KADER, J.C. Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.73, p.577-583, 1976.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. E. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> e., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.



- SASSAKI, F.T. Identificação do sinal de endereçamento da proteína mitocondrial desacopladora de *Arabidopsis thaliana* (AtPUMP1). 2002. 31p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- SCHATZ, G.; DOBBERSTEIN, B. Common principles of protein translocation across membranes. *SCIENCE*, V.271, P.1519-1526, 1996.
- SCHLEIFF, E.; MCBRIDE, H. The central matrix loop drives import of uncoupling protein 1 into mitochondria. *J. Cell Sci.*, v.113, p.2267-72, 2000.
- SKULACHEV, V. P. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.*, v.294, p.158-162, 1991.
- SLATER, T.F. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.*, v.222, p.1-15, 1984.
- SLUSE, F. E.; ALMEIDA, A. M.; JARMUSZKIEWICZ, W.; VERCESI, A. E. Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria. *FEBS Lett.*, v.433, p.237-240, 1998.
- SMAGULA, C.; DOUGLAS, M. G. Mitochondrial import of the ADP/ATP carrier protein in *Saccharomyces cerevisiae*. Sequences required for receptor binding and membrane translocation. *J. Biol. Chem.*, v.263, p.6783-6790, 1988.
- SOKOLOVA I.M.; SOKOLOV, E.P. Evolution of mitochondrial uncoupling proteins: novel invertebrate UCP homologues suggest early evolutionary divergence of the UCP family. *FEBS Lett.*, v.579, p.313-317, 2005.

- STUART, J.A.; HARPER, J.A.; BRINDLE, K.M.; BRAND, M.D. Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish, ectothermic vertebrates. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1413, p.50–54, 1999.
- SWEETLOVE, L. J.; LYTOVCHENKO, A.; MORGAN, M.; NUNES-NESE, A.; TAYLOR, N. L.; BAXTER, C. J.; EICKMEIER, I.; FERNIE, A. R. Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.103, p.19587 – 19592, 2006.
- TALBOT, D.A.; HANUISE, N.; REY, B.; ROUANET, J-L.; DUCHAMP, C.; BRAND, M.D. Superoxide activates a GDP-sensitive proton conductance in skeletal muscle mitochondria from king penguin (*Aptenodytes patagonicus*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.312, p.983–88, 2003.
- TRONO, D.; FLAGELA, Z.; LAUS, M.N.; DI FRONZO, N.; PASTORE, D. The uncoupling protein and the potassium channel are activated by hyperosmotic stress in mitochondria from durum wheat seedlings. *Plant, Cell and Environment*, v.27, p.437-448, 2004.
- TRONO, D.; SOCCIO, M.; MASTRANGELO, A. M.; DE SIMONE, V.; DI FONZO, N.; PASTORE, D. The transcript levels of two plant mitochondrial uncoupling protein (pUCP) – related genes are not affected by hyperosmotic stress in durum wheat seedlings showing an increased level of pUCP activity. *Biosci. Rep.*, v.26, p.251-261, 2006.
- UEMURA, S.A.; LUO, S.; MORENO, S.N.J.; DOCAMPO, R. Oxidative phosphorylation, Ca<sup>2+</sup> transport, and fatty acid-induced uncoupling in malaria parasites mitochondria. *J. Biol. Chem.*, v.275, p.9709–9715, 2000.

VERCESI, A. E. Mitocôndria: ATP, calor e morte celular. *Ciência hoje*, v.34, p.16-23, 2003.

VERCESI, A. E.; HOFFMANN, M. E. Generation of reactive oxygen metabolites and oxidative damage in mitochondria: the role of calcium. In JONES, D. P.; LASH, L. H. (Eds). *Methods in toxicology* "Mitochondrial Dysfunction". New York: Academic Press, 1993. Chapter 21.

VERCESI, A. E.; BORECKÝ, J.; MAIA, I. G.; ARRUDA, P.; CUCCOVIA, I. M.; CHAIMOVICH, H. Plant Uncoupling Mitochondrial Proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.*, v.57, p.383-404, 2006.

VERCESI, A.E.; KOWALTOWSKI, A. J.; GRIJALBA, M. T.; MEININKE, A. R.; CASTILHO, R. F. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosc. Reports*, v.17, p.43-52, 1997.

VERCESI, A. E.; MARTINS, I. S.; SILVA, M. A. P.; LEITE, H. M. F.; CUCCOVIA, I. M.; CHAIMOVICH, H. PUMPing plants. *Nature*, v.375, p.24, 1995.

VIANNA, C.R.; HAGEN, T.; ZHANG, C-Y.; BACHMAN, E.; BOSS, O.; GEREBEN, B.; MORISCOT, A.S.; LOWELL, B.B.; BICUDO, J.E.; BIANCO, A.C. Cloning and functional characterization of an uncoupling protein homolog in hummingbirds. *Physiol. Genomics*, v.5, p.137-45, 2001.

VIDAL-PUIG, A.J.; GRUJIC, D.; ZHANG, C.Y.; HAGEN, T.; BOSS, O.; IDO, Y.; SZCZEPANIK, A.; WADE, J.; MOOTHA, V.; CORTRIGHT, R.; MUOIO, D.M.; LOWELL, B.B. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J. Biol. Chem.*, v.275, p.16258-16266, 2000.

- VOOS, W.; MARTIN, H.; KRIMMER, T.; PFANNER, N. Mechanisms of protein translocation into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1422, p.235-254, 1999.
- ZHANG, C.Y.; BAFFY, G.; PERRET, P.; KRAUSS, S.; PERONI, O.; GRUJIC, D.; HAGEN, T.; VIDAL-PUIG, A.J.; BOSS, O.; KIM, Y.B.; ZHENG, X.X.; WHEELER, M.B.; SHULMAN, G.I.; CHAN, C.B.; LOWELL, B.B. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell*, v.105, p.745-755, 2001.
- WATANABE, A.; NAKAZONO, M.; TSUTSUMI, N.; HIRAI, A. *AtUCP2*: a novel isoform of the mitochondrial uncoupling protein of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, v.40, p.1160-1166, 1999.
- WINKLER, E.; KLINGENBERG, M. Effect of fatty acids on H<sup>+</sup> transport activity of the reconstituted uncoupling protein. *J. Biol. Chem.*, v.269, p.2508-251, 1994.